



Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology
Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

ISSN 1012-2354

Cilt (Volume): 30, Sayı (Issue): 2, Mart/March-2014

<http://fbe.erciyes.edu.tr/>



Kayseri’de yüksek şarka enfeksiyonu

Ahmet CEYLAN¹, Kahraman GÜRCAN², Mikail AKBULUT¹, Maryam GHADERI³

² Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitkisel Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Kayseri

³Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri

ÖZET

Şarka (*Plum Pox* Virüsü-PPV) sert çekirdekli meyvelerin en önemli hastalığıdır. PPV’nin Kayseri’de bulunduğu rapor edilmiş ise de yaygınlığı üzerine çalışma yapılmamıştır. Şarka semptomları Kayseri’de yetişen sert çekirdekli meyvelerde gözlenmiştir. Kayseri il merkezinde 53, Yahyalı’da ise 10 ağaçtan örnek toplanmıştır. DASI-ELİSA (Double Antibody Sandwich Indirect-ELISA) yöntemi ve RT (Revers Transkriptaz) PCR ile örneklerde virüsün varlığı testlenmiştir. PPV-M (Markus) spesifik antiserum-AL ve P1/PM primeri kullanılarak, PPV-D (Dideron) spesifik antiserum 4D ve P1/ PD primer çifti kullanılarak PPV-M ve PPV-D ırk gruplaması yapılmıştır. RT PCR çalışmaları sonucunda Kayseri il merkezinde 47 (%89) örneğin *Plum Pox* Virüsü ile bulaşık olduğu bulunmuştur. RT PCR çalışmaları izolatların PPV-M ırkı olduğuna işaret etmektedir. Serolojik testlemede 33 örnek M spesifik antiserumun yanı sıra D spesifik antiserum ile de reaksiyon göstermiştir. Benzer durumlarda yapılan detaylı çalışmalar böyle izolatların PPV-T (Turkey) olabileceği göstermiştir. Hastalık Yahyalı’da ki bir erik bahçesinde ilk defa tespit edilmiştir. Kayseri ilmerkezinin Şarka ile yoğun olarak bulaşık olduğu belirlenmiş ve dolayısıyla hastalığın Kayseri il merkezinde uzun süredir var olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar

Kelimeler:

Şarka hastalığı,
Plum pox virus,
 DASI-ELISA,
 RT-PCR, Sert
 çekirdekli
 meyveler

Prevalence of Sharka (*Plum Pox Virus*) in Kayseri

ABSTRACT

Sharka caused by *Plum Pox* virus is the most detrimental disease of stone fruits. Existence of PPV in Kayseri was reported previously. However prevalence of PPV was unknown to the date. Surveys were conducted and symptoms on stone fruits were observed to determine and assess the prevalence of Sharka disease in Kayseri. Fifty three samples showing the symptoms in Kayseri city center were collected randomly. In Yahyalı, 10 samples including symptomless samples in an infected plum orchard were collected. Double Antibody Sandwich Indirect-ELISA (DASI-ELISA) and Reverse Transcriptase (RT) PCR were performed to test the virus existence. PPV-D specific antibody 4D and primer pairs P1/ PD were used for PPV D subgrubing, while PPV-M (Marcus) subgrouping was conducted with M specific AL antibody and primer pairs P1/ PM. In Kayseri city center, 47 samples (89%) were found to be PPV infected. RT PCR results suggested that all positive samples are PPV-M. However, Of the 47 positive samples 33 reacted both against to PPM-D and PPV-M specific antibodies. Previous researches showed that some of this kind of ambiguous isolates could be PPV-T (Turkey). The disease were determined first time in a seven years old plum orchard in Yahyalı. The prevalence of PPV in Kayseri were found to be high suggesting that the disease in exist in Kayseri for a long time.

Key

Words:

Sharka disease,
Plum pox virus,
 DASI-ELISA,
 RT-PCR, Stone
 fruits

1.Giriş

Plum pox virüs(PPV), *Potyvirus* cinsinin bir üyesidir. Virüs özellikle kayısı, şeftali, erik, kiraz ve vişne gibi sert çekirdekli meyvelerde en önemli hastalıklardan birisi olan şarka hastalığına sebep olmaktadır [1]. Şarka hastalığının önemli ürün kayıplarına neden olduğu ve ekonomik zararın son 30 yılda 10 milyar Euro'nun üzerinde olduğu rapor edilmektedir [2]. Avrupa'nın birçok ülkesinde hastalığın görüldüğü bölgelerdeki hastalıklı ağaçlar sökülerek binlerce hektar bahçe bertaraf edilmektedir [2].PPV ilk defa 1932 yılında Bulgaristan'da erik ağaçlarında tespit edilmiş 1980'li yıllara doğru Avrupa'nın büyük bir bölümüne yayılmış, Şili, ABD ve son olarak Japonya ya ulaştığı tespit edilmiştir [3]. Türkiye'de hastalığın birçok şehir merkezinde bulunduğu bilinmektedir [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Hastalığın uzun mesafede yayılması, enfekte fidan ve gözlerin bir bölgeden başka bir bölgeye transferi ile olmaktadır. Kısa mesafelerde yayılması ise, yaprak bitleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Yaprak bitlerinin çok hızlı çoğalmalarından ötürü kimyasal uygulamalarla kontrolü etkin olamamakta ve hastalığın yayılması kesin olarak engellenmemektedir [13, 14]. Hastalık semptomları, yaprak üzerindeki benek ve çizgiler, çiçek taç yapraklarında solgunluklar, çekirdek üzerinde halkasal lekeler, meyve üzerindeki şekil bozuklukları, şeker miktarında düşüş, tatta bozulma, erken dökülmeler şeklinde gözlenir. Ağaçlar genelde ölmekte fakat meyve kalitesi ve verimde önemli kayıplar olmaktadır.

Şimdiye kadar 7 PPV ırkı biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır. Bunlar: PPV-Dideron(D), PPV-Marcus(M), PPV-Cherry(C), PPV-el Amar (EA), PPV-Winona(W), PPV- Recombinant(Rec) ve PPV-Turkey(T) dir. Marcus ve Dideron dünyada en yaygın olarak bulunan iki suşur[15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. PPV-T Türkiye'de Ankara ilinde toplanan örneklerde tespit ve karakterize edilmiştir [19]. Kayseri coğrafi olarak hem Türkiye'nin en büyük kayısı üreticisi ili Malatya'ya yakın hem de Malatya'dan sonra en çok kayısı üreten illerden biridir. Kayseri'nin Yahyalı ilçesi önemli bir kiraz üreticisi olduğu gibi, önemli bir kayısı üreticisi olan Yeşilhisar'a komşudur. Bu çalışmada, Kayseri il merkezi ve Yahyalı'da sert çekirdekli meyve türlerindeki şarka hastalığının tespiti ve hastalığın ELISA ve RT-PCR yöntemiyle Kayseri ilinde olan yaygınlığını araştırmak üzere yapılmıştır.

2. Mateyal ve Yöntem

Sörvey Çalışması ve Virüs Kaynağı

Kayseri'de Talas, Yahyalı, Hacılar, Hisarcık Esenyurt, Altınoluk, ve Fevzi Çakmak yerleşkelerinde 2012 Mayıs-Eylül aylarında sörvey yapılmış, hastalığın semptomları kayısı, erik, şeftali, nektarin ve kiraz ağaçlarında taranmıştır. İl merkezindeki ana caddelere yakın bahçeler gezilmiştir. Kayseri il merkezinde semptomlu bitkilerin 53 örnek alınmıştır. Yahyalı'da ise bir erik üreticisi yoğun meyve kaybı şikayetiyle ERÜ Ziraat Fakültesine gelmiştir. Ardından üreticinin bahçesi incelenmiş, yoğun Şarka semptomu gösteren erik bahçesinden 4 örnek ve bu bahçe etrafında semptom göstermeyen kayısı, kiraz ve şeftali ağaçlarından ikişer örnek alınmıştır. Toplanan örnekler çalışılncaya kadar ERÜ Ziraat Fakültesi Moleküler Genetik laboratuvarından -20'de muhafaza edilmiştir. Toplanan örnek kaynakları Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo1: Kayseri bölgesinden toplanan örneklerin sayısı, toplandığı yerler ve türleri.

Örnek sayısı(63)	Toplandığı yer	Prunus türleri
11	Talas-Sosyete Pazarı	<i>P.americana</i>
10	Talas-Bahçeli Evler	<i>P.americana</i>
10	Yahyalı	<i>P.americana, P.domestica, P. avium, P.persica</i>
8	Fevzi Çakmak	<i>P.americana</i>
7	Yukarı Talas	<i>P.americana</i>
6	Talas-Yenidoğan	<i>P.americana</i>
5	Esenyurt	<i>P.americana</i>
3	Altınoluk	<i>P.americana, P. avium</i>
2	Hisarcık	<i>P.americana</i>
1	Hacılar	<i>P.americana</i>

PPV pozitif örneklerin ve PPV altgruplarının tespiti

PPV ırklarının tespitinde serolojik (DASI-ELISA) ve moleküler yöntemler(RT-PCR) kullanılmıştır.

Eliza Testi:

PPV testlemede ve ırklarını ayırmada ilkin yaygınca kullanılan Cambra ve ark., (1994)'nın belirlediği DASI-ELISA testi ufak modifikasyonlarla kullanılmıştır. PPV-M spesifik antiserum-AL ve PPV-D spesifik antiserum 4D ve bütün ırkları tanımlayan 5B-IVIA antiserumu ile testlemeler yapılmıştır [22]. Antibodiler kit olarak ısmarlanmıştır (Real, Spain). **Özetle modifikeye yöntem:** A) Öncelikle poliklonal antibadiler 1/1000 oranında karbonat buffer içerisinde seyreltilerek tabaktaki kuyucuklara aktarılmış, 16 saat 4°C de inkübasyona bırakılmış ve sonrasında 3'er dakika 3 kez PBS-Tween (%0.05 oranında) ile yıkama yapılmıştır. B) Örnek ekstraksiyonundan 200µl tabaktaki her kuyucuğa eklenmiş 16 saat 4°C de inkübasyona bırakılmış ve 3'er dakika 3 kez PBS-Tween ile yıkama yapılmıştır. C) Kuyucuklara 200µl PBS+BSA (%0.5 oranında) ile sulandırılmış monoklonal antibadi eklenmiş (5B-IVIA, antiserum-AL, antiserum-4D) 37°C de 2 saat inkübasyon yapılmış ve 3'er dakika 3 kez PBS-Tween ile yıkama yapılmıştır. D) Kuyucuklara 200µl alkalın fosfataz ile işaretli anti-mouse immunoglobulinler konularak 37°C de 2 saat inkübasyon yapılmış ve 3'er dakika 3 kez PBS-Tween ile yıkama yapılmıştır. E) Alkalın fosfataz solüsyonu substrat tampon (97 ml Diethanolamine + 903 ml su/ ph 9.8) içerisinde çözülerek 200µl kuyucuklara aktarılmış, tabaklar 30 dk, 60 dk ve 90 dk'da microplate spectrophotometer (Bioteck) okuyucuda 405 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Negatif sonuç veren bitkilerin 2 katı ve üzeri absorbans değerine sahip örnekler pozitif olarak tespit edilmiştir. Enfekteli ve enfektesiz örnekler pozitif ve negative kontrol olarak kullanılmıştır.

RNA ekstraksiyonu

RT-PCR RNA ekstraksiyonu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ABD) modifikasyon yapılarak kullanılmıştır. Yaprakların homojenizasyonu TissueLyser (Retsch, Haan, Germany) kullanılarak yapılmıştır. 300 µl PBS hücre süspansiyonu alınıp üzerine 400 µl RLT buffer eklenip 30 saniye vorteks yapılmıştır. 14,000 rpm de 3dk santrifüj edilip, supernatant yeni ependorf tüpüne alınarak üzerine (400 µl) aynı hacimde %70 etanol eklenerek mikropipetle karıştırılmıştır. Elde edilen karışımdan 800 µl spin tüplere aktararak 8,000 x g de 15sn santrifüj edilmiştir. Sonra, altta kalan sıvı dökülüp, 700 µl RWI eklenerek 8,000 x g de 15 sn santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı tekrar dökülüp 500 µl RPE eklenerek 8000 x g de 15 sn santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı yine dökülüp 500 µl RPE eklenerek 10,000 x g de 2 dk santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı dökülüp,

Altta kalan sıvı yine dökülüp 500 µl RPE eklenerek 10,000 x g de 2 dk santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı dökülüp, spin tüpü 1,5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirilmiş, 50 µl RNase free water eklenip 8,000 x g de 1dk santrifüj yapılarak RNA izolasyonu tamamlanmıştır. İzole edilen RNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Revers transkripsiyon (RT) PCR:

Genel PPV tanımlanması Wetzel ve ark. (1991) yöntemine göre kılıf proteini 3' uçundan geliştirilmiş P1/P2 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir [15]. PPV-D ve PPV-M tanımlanması Olmos ve ark. (1977) yöntemine göre P1/PD ve P1/PM primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo2) [23].

Tablo 2. PPV-poli, M ve D ırklarının tanımlanması için kullanılan primerler

Primer	Primer Dizisi
P1:	<u>F-5'- ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC -3'</u>
P2:	<u>R-5'- CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA -3'</u>
PD:	<u>R-5'- CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3'</u>
PM:	<u>R-5'- CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT-3'</u>

RT-PCR toplamda 25 µl hacim olacak şekilde; 2.5 µl 10X Taq Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP, % 0.3 Triton X-100, % 2 formadid, 1 U AMV revers transkriptaz, 0.5 U Taq polimeraz, 1 µM Forward primer, 1 µM Reverse primer ve 2.5 µl RNA (2.5 -25 ng/µl) karıştırılarak hazırlanmıştır ve Thermal Cycler cihazında çoğaltım gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizi için kullanılan amplifikasyon programı 42 °C de 45 dk, 94 °C de 3 dk, 35 döngü (94 °C de 1 dk, 60 °C de 1 dk, 72 °C de 1dk) çoğalma, 72 °C de 7 dk son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin yürütülmesinde % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Örneklerin 20 µl'si yüklem tamponu ile karıştırılarak jellere yüklenip, 1X TBE tamponu içinde 100 V'ta 3 saat süre ile yürütülmüştür. Bantlar UV ışık altında görüntülenmiştir.

3. Bulgular

Kayseri il merkezinde 2012 vejetasyon döneminde sörveyler yapılmış, özellikle kayısı ağaçları takip edilmiştir. Şehrin tüm ağaçları incelenmemiş, tesadüfi olarak ana caddelere yakın ev bahçelerine bakılmıştır. Özellikle merkez ilçe Talas'da hastalığın çok yaygın olduğu ayrıca şiddetinin de yoğun olduğu görülmüştür. PPV semptomları yapraklar üzerinde lekeler ve renkli halkalar, çekirdek üzerinde halkasal lekeler, meyve üzerinde şekil bozuklukları şeklinde gözlenmiştir (Şekil 1-3). Kayısıda hastalık çok belirgin iken, kayısı ile aynı bahçede yetişen bir çok erik, badem, şeftali ve kiraz ağacında semptom görülmemiştir. Bazı kayısılarda hastalık çok şiddetli seyrettiği gözlenirken aynı bölgedeki bazı kayısılarda hafif, bazılarında ise çok düşük seviyede semptom gözlenmiş yada hiç semptom görülmemiştir. Yahyalı'da bir üreticinin ibraz etmesiyle şarkalı bahçe incelenmiş, Autumn Giant ve Angelina erik çeşitlerinin meyveleri hem sofralık hemde meyve suyuna verilemeyecek kadar kalite kaybına uğradığı

görülmüştür. Meyve yüzeyinde (Şekil 2.) lezyonlar, halkasal şekil bozukluğu, şişkinlikler, meyvede su kaybı, samanlaşma ve koflaşma olarak tabir edilebilecek tad kaybı semptomları görülmüştür. Üretici 7 yıllık bahçede semptomların 4. ve 5. yılda görülmeye başladığını, 6. yılda kalite kaybından dolayı verimin düştüğünü, 7. yılda ise bulaşık ağacın tüm meyvelerinin pazarlanamaz duruma geldiğini belirtmiştir.



Şekil 1. Talas'dan toplanan kayısı ağacı yaprağında PPV enfeksiyonu semptomları



Şekil 2. Yahyalı'dan toplanan erik ağacı meyvelerinde PPV enfeksiyonu semptomları.



Şekil 3. Hisarcık'ta alınan bir Kayısı ağacı çekirdeklerinde PPV enfeksiyonu semptomları.

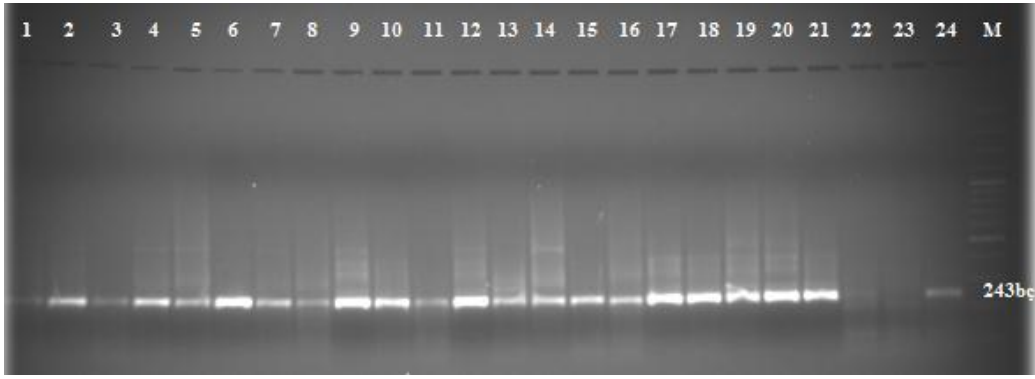
Kayseri il merkezinde 53 örnek analiz edilmiştir. DASI-ELISA yönteminde 5B antiserumuna 41 örnek pozitif reaksiyon verirken 12 örnek negatif sonuç vermiştir. M ırklarını tanımlayan AL antiserumu ile 36 örnek pozitif, D ırklarını tanımlayan 4D antiserumu ile 33 örnek pozitif sonuç vermiştir (Tablo3). RT-PCR yöntemi ile test edilen Kayseri il merkezi örneklerinin 47 (%89) tanesi tüm ırklara spesifik P1/P2 primerleriyle pozitif sonuç vermiştir. Pozitif örnekler beklediği gibi 243 bp uzunluğunda ampikonlar üretmiştir (Şekil 4). P1/PM primerleriyle pozitif sonuç veren örnek sayısı yine 47 olarak tespit edilmiştir. M spesifik primerlerin amplifikasyonu sonucunda, RT-PCR ürünleri beklediği gibi 198 bp uzunluğunda olmuştur (Şekil5). P1/PD primerlerinin RT-PCR'ı sonucunda ürüne rastlanmamıştır.

Yahyalı'da 4 bulaşık erik ağacı ve bu ağaçlarının yakınlarındaki kayısı, kiraz, ve şeftali ağaçları taranmıştır. Erik ağaçlarının üçünde DASI-ELISA ve RT-PCR ile şarka tespit edilmiş, virüs ırkının ise serolojik ve moleküler testler sonucunda PPV-M bulunmuştur. Semptomlu bir erik ağacında ise testler negatif sonuç vermiştir. Semptom göstermeyen 6 ağaç testlerde negatif sonuç vermiştir.

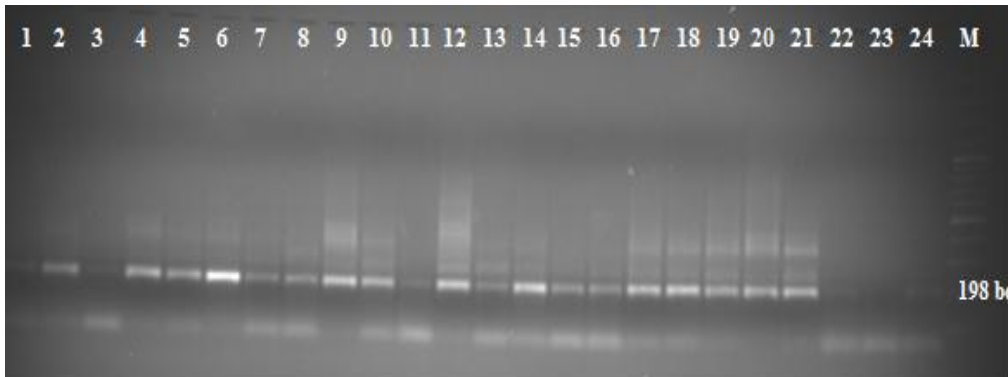
Tablo3: DASI-ELISA ve RT-PCR yöntemi ile taranan isolatların sonuçları

Yöntem	DASI-ELISA			RT-PCR			örnek Sayısı
	PPV-poli	M	D	PPV-poli	M	D	
Kayseri	+	+	+	+	+	-	33
	+	+	-	+	+	-	3
	+	-	-	+	+	-	5
	-	-	-	+	+	-	6
	-	-	-	-	-	-	6
*	41	36	33	47	47	0	53
Yahyalı	+	+	-	+	+	-	3
	-	-	-	-	-	-	7

*Toplam



Şekil4: PPV-Poli primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi (1-24 arası, M:Markır)



Şekil5: Spesifik PPV-M primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi(1-24 arası, M:Markır)

4.Tartışma ve sonuç Kayseri'de hastalığın seviyesi

Kayseri il merkezinde birçok enfeksiyonlu ağaç tespit edilmiş ve bunlardan 47 tanesi testler ile de netleştirilmiştir. Gerçekleştirilen gözlemlerle Kayseri il merkezinde bulaşıklığın yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Türkiye'de genel kanı hastalığın Ankara il merkezinde yoğun olarak mevcut olduğu, diğer bazı il merkezlerinde ise çok düşük seviyede seyrettiği yönündedir.

Çeşitli bölgelerde yapılan tarama çalışmalarında örnekleme metodları farklı olduğu için şehirlere göre enfeksiyon oranının karşılaştırılıp yorumlanması sağlıklı bir yaklaşım değildir. Fakat bununla beraber kaba bir fikir vermesi açısından rapor edilen bulaşık bitki sayısına bakıldığında en yüksek enfeksiyonun Kayseri ve Ankara'da olduğu görülmektedir. Elibüyük (2004) Ankara il merkezinde yürütülen çalışmada 935 örneği taramış bunlardan 523 tanesi (286 kayısı, 172 erik, 65 şeftali) PPV ile bulaşık bulunmuştur.

Örneklerin %55'inde (%71 kaysı, %60 erik ve %48 şeftali) hastalık gözlemlenmiştir [6]. Elibüyük (2005) diğer bir çalışmada Ankara'daki değişik semtlerden 129 şeftali ağacından topladığı örneklerden 59'unun bulaşık olduğunu rapor etmiştir. Şeftalilerde % 45 oranında PPV enfeksiyonu belirlenmiştir [24]. İlbağ ve ark., (2008), Tekirdağ'da *Prunus spinosa* türlerinde 54 örneği test etmiş ve 13 tanesinin (%24) PPV bulaşık olduğu belirlenmiştir [25]. Çıtır ve İlbağ (2008) Trakya'da yapmış oldukları bir çalışmada 9 Kayısı ağacından 4 (%44) tanesinin PPV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir [26]. Adana ve Mersin'de yapılan bir çalışmada toplamda 285 bahçeden 13 tanesi %5.31 oranında bulaşık olduğu bulunmuş, Adana ilinde %12.5 ve Mersin ilinde %5.55 enfeksiyon oranı saptanmıştır [11]. Kayseri il merkezinde pozitif olduğu tespit edilen 47 ağaç (%89) Kayseri'de enfeksiyon seviyesinin yüksekliğini göstermektedir. Hastalığın yaygın olması ve de bazı ağaçlardaki ileri seviyedeki hastalık durumu hastalığın Kayseri'de uzun yıllardan beri var olduğunu işaret etmektedir.

Yahyalı ilçesinde Şarka

Bir üreticinin ibrazı üzerine Yahyalı ilçesinde üreticinin erik bahçesi gezilmiş, Şarka semptomları gözlenmiştir. Testlemeler sonucunda meyve üretiminin yoğun olduğu Yahyalı ilçesinde erik bahçesinde şarka tespit edilmiştir. Bununla beraber kayısı, kiraz ve şeftali ağaçlarında hastalık tespit edilmemiştir. Hastalığın 4-6 yılda görünür olduğu, erken dönemlerde yapılan testlemeler sonucunun negatif verebileceği bilinmektedir [23].

PPV ırkları

Serolojik testler sonucunda Kayseri il merkezinde 36 izolat PPV-M spesifik antiserum ile reaksiyon gösterirken bunlardan 33'ü aynı zamanda D spesifik antiserum ile de reaksiyon göstermiştir. Fakat bu izolatlar RT-PCR'da D primerlerinde bant üretmemişlerdir. 6 örnek ise serolojik testlerde negatif sonuç verirken moleküler testlerde M olarak tespit edilmiştir. Yahyalı izolatları ise serolojik ve moleküler teste M olarak tespit edilmiştir.

Tek bir izolatın hem M hemde D antiserumu ile reaksiyona girmesi PPV karakterizasyon çalışmalarında bilinen bir olgudur [27, 28]. Türkiye'de yapılan ilk çalışmalar da serolojik testler M irkının yaygın olduğunu göstermiştir [7]. Bununla beraber serolojik testlerde ayrıca Ankara'da D ve M+D ırklarının birlikte olduğuda rapor edilmiştir [7]. Candresse ve ark (1998) Türkiye'de alınan Ab-Tk izolatının hem M hemde D antiserumları ile reaksiyon gösterdiğini belirtmiştir [29]. Glasa ve Candresse (2005) bu izolatın virüs genomunun 1566. bazı civarında HC-Pro geninde bir rekombinasyon olduğunu rapor etmişlerdir [30]. Ulubaş Serçe ve ark. (2009) daha sonra Ab-Tk izolatının tüm sekans analizini yaparak bu izolatın rekombinasyonunu kesinleştirmiş ve bu izolatı yeni bir ırk (PPV-Turkey) olarak önermişlerdir. [10]. Aynı zamanda Ankara'dan toplanan hem D hem de M ile reaksiyon gösteren izolatları analiz ettiklerinde bu izolatlardan bazılarının Ab-Tk ile çok yakın nükleotid dizi benzerliğigösterdiklerini rapor etmişlerdir [10]. Bu çalışmada belirlenen M ve D ile reaksiyon gösteren 33 izolatın bir kısmının PPV-T olma ihtimali kuvvetle muhtemeldir. Ulubaş Serçe ve ark., (2011) de hastalığın uzun süredir yer edindiği bölgelerde Türkiye'ye has T irkının yaygın olduğunu rapor etmişlerdir [12].

RT PCR ve DASI-ELİZA yöntemleri

PPV birkaç yaklaşım ile tespit edilebilir: a) biyolojik test [31,32] b) ELISA serolojik test [32, 33] c) farklı moleküler yöntemler [33]. Olmos ve ark., (2008) bu yöntemler içinde en fazla DASI-ELISA (5B-IVIA) [22] ve RT-PCR (P1-P2 primers) [6] kullanıldığını belirtmiştir [34]. Bu çalışmada da bu iki yöntem tercih edilmiştir. Çalışmamızda Kayseri il merkezinde Şarka semptomu taşıyan 53 örnek incelenmiş ve DASI-ELISA testi ile 41 (%77) örnek pozitif bulunurken, RT-PCR amplifikasyonu sonunda 47 (%89) örneğin pozitif olduğu tespit edilmiştir. RT-PCR yönteminin daha hassas olduğu bilinmektedir. Ağaçlar semptom göstermesine rağmen bazısının test sonucunda negatif çıkması a) farklı semptomların şarka zannedilerek örnek toplanması b) hastalığın düşük seviyede seyretmesi nedeniyle testlerde negatif sonuç vermesi c) örnek toplama zamanı d) -20°C'de yaprak muhafazası esnasında virüs protein ve RNA'sının deformasyonu e) teknik hatalar ile açıklanabilir. Bu nedenlerin yanı sıra test yöntemlerinin gücünde önemlidir. Test yöntemlerinin tüm hastalıklı bitkileri belirlemediği özellikle erken virüs konsantrasyonu düşük iken testlerin başarısız sonuç verdiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada PPV-Pozitif olduğu kesin olarak bilinen ağaçların dormant dönemde alınan tomurcuk örneklerinin DASI-ELİZA testi ile yalnız % 86'sının pozitif olduğunu belirlenirken, RT-PCR yöntemi ile ise %91'i tespit edebilmiştir [34].

Sonuç

Kısmi survey ve testleme çalışmaları Kayseri il merkezinin Ankara gibi hastalıklı yoğun bulaşık olduğunu göstermektedir. Kayseri'nin meyve üretim merkezi olan Yahyalı ilçesinde ilk kez üretici bahçesinde şarka tespit edilmiş olup, bahçede birçok ağaç hastalık yüzünden elden çıkmış durumdadır. Bu çalışma Kayserideki şarka hastalığının yayılma seviyesi ve virüsün ırkları hakkında önemli bilgi sağlamıştır. Bu bilgiler hastalığın yayılmasının önüne geçilmesi için gerekli önlemlerin alınması gerektiğini göstermektedir. Yahyalı ilinde ticari bir kapama bahçede de hastalığın görülmesi hastalığın fidanlarla taşındığını, yeni oluşturulacak olan bahçeler için şarka virüsü riskinin olduğunu göz ardı edilmemesini ve yeni oluşturulacak bahçelerde kesinlikle sertifikalı virüssüz fidan kullanılması gerektiğini göstermiştir. Ayrıca bu çalışma hastalığın yayılması, taşıyıcı vektörler ve hastaliksız sertifikalı fidan üretimi konusunda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK)'nın desteklediği COST-112O022 kodlu proje kapsamında yürütülmüştür.

Kaynaklar

1. Glasa, M., Malinowski, T., Predajna, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczuk, L., and Candresse, T., Sequence Variability, Recombination Analysis, and Specific Detection of the W Strain of *Plum Pox* virus, the American Phytopathological Society, Vol 101, No. 8, p 980-985, 2011.
2. Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., Llácer, G., *Plum Pox* Virus And The Estimated Costs Associated With Sharka Disease. EPP0 Bull 36: 202–204, 2006.

3. Maejima, K., Himeno, M., Komatsu, K., Takinami, Y., Hashimoto, Takahashi, S., Yamaji, Y., Oshima, K., Namba, S., Molecular Epidemiology of *Plum Pox* virus in Japan, The American Phytopathological society, Vol. 101, No.5, 2011.
4. Sahityancı, S., Virus De La Sharka Chez Le Prunier. Bulletin Phytosanitaire FAO 17:69, 1969.
5. Elibüyük, I. Ö., Natural Spread of Plum pox virus in Ankara, Turkey. J. Phytopathol, 151: 617–619, 2003.
6. Sertkaya, G, Ulubas, C, Çağlayan, K., Detection and Characterisation of *Plum pox* virus (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR/RFLP Analysis in Turkey. Turk. J. Agric. For, 27: 213–220, 2003.
7. Elibüyük, I. Ö., Current Situation of Sharka Disease in Ankara, Turkey. Phytoparasitica, 32: 417–420, 2004.
8. Elibüyük, I. Ö., Detection of *Plum Pox* Virus in Ornamental *Prunus Cerasifera*. Phytoparasitica, 34: 347–352, 2006.
9. Koç, G., and Baloğlu, S., First Report of Sharka in the Çukurova Region of Turkey. Journal of Plant Pathology, 88, s68, 2006.
10. Akbaş, B., Değirmenci, K., Çiftçi, O., Kaya, A., Yurtmen, M., Uzunoğulları, N., Çelik, N., and Türkölmez, Ş., Update on *Plum pox* virus Distribution in Turkey, Phytoparhol. Mediterr. 50, 75-83, 2011.
11. Koç, G., ve Baloğlu, S., Doğu Akdeniz Bölgesinde Sert Çekirdekli Meyvelerde Plum Pox Potyvirus (PPV)'ünün Durumunun Belirlenmesi ve Karakterizasyonu (Determination and Characterization of Plum pox potyvirus (PPV) on Stone Fruits in Eastern Mediterranean Region). Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş s71, 2011.
12. Ulubaş Serçe, U., Gazel, M., Çağlayan, K., Plum pox virus streynlerinin Türkiye'deki Dağılımı (Distribution of *Plum pox* virus strains in Turkey). Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş s72, 2011.
13. Kegler, H., Fuchs, E., Grüntzing, M., Schwarz, S., Some Results of 50 Years of Research on the Resistance to *Plum pox* virus, Acta Virol. 42, 200-215, 1998.
14. Kerlan, C., Dunez, J., Some Properties of *Plum pox* virus and Its Nucleic Acid And Protein Components. Acta Hort. 67, 185-192, 1976.
15. Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., and Dunez, J., A Polymerase Chain Reaction Assay Adapted to *Plum pox* Potyvirus detection. J. Virol. Methods, 33:335-365, 1991.
16. Nemeth, M., History and Importance of *Plum pox* in Stone Fruit production, EPPO Bull, 24:525-536, 1994.
17. Nemchinov, L., Hadidi, A., Characterization of the Sour Cherry Strain of *Plum pox* virus, Phytopathology 86, 575-580, 1996.
18. Candresse, T., Cambra, M., Causal Agent Of Sharka Disease: Historical Perspective And Current Status Of *Plum pox* Virus Strains. EPPO/OEPP Bull. 36, 239-246, 2006.
19. Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., and Çağlayan, K., Further Characterization Of A New Recombinant Group Of *Plum pox* V,Rus Isolates, PPV-T, Found In Orchards In The Ankara Province Of Turkey. Virus Research 142, 121-126, 2009.
20. Predajna, L., Subr, Z., Candresse, T., Glasa, M., Evolution Of The Genetic Diversty Of *Plum Pox* Virus In A Single Plum Tree, Virus Research, 167, 112-117, 2012.
21. FAO, Food Agriculture Organization of the United Nations, 2010.
22. Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., Garcia, J.A., Moyaj, J.J., Lopez-abella, D., Vela, C., and Sanz, A., Detection of *Plum pox Potyvirus* Using Monoclonal Antibodies To Structural And Non-Structural Proteins. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 24: 569-577, 1994.
23. Olmos, A., Cambra, M., Dası, MA., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T., Asensio, M., (1997) Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. Journal of Virological Methods, 68: 127–137
24. Elibüyük, İ.Ö., Ankara'da Şeftali Ağaçlarında Görülen Şarka Hastalığı Üzerinde Araştırmalar, Tarım Bilimleri dergisi, 11(3), 236-243, 2005.
25. İlbağı, H., Cıtır, A., Bostan, H., *Prunus spinosa* L. A natural wild host of Some Important Fruit Viruses in Tekirdağ, Turkey, Proceedings of the Twentieth International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Fruit Tree Diseases, Antalya, Turkey. Acta Horticulturæ 781:33-36, 2008.
26. Cıtır, A., and İlbağı, H., Serological Identification of Some Important Viruses on Fruit Trees and Bushes in Tekirdağ Province of Turkey, Proceedings of the Twentieth International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Fruit Tree Diseases, Antalya, Turkey. Acta Horticulturæ 781: 103-106, 2008.