



Araştırma Makalesi

Bursa ve Bilecik İlleri Şeftali Yetiştiriciliği Yapılan Alanlarda Prune dwarf virus (PDV) Yaygınlığı ve Genetik Çeşitliliği**

Ali Çelik^{1*}, Filiz Ertunç²

¹Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bolu

²Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara

Geliş tarihi (Received): 23.12.2019

Kabul tarihi (Accepted): 14.02.2020

Anahtar kelimeler:

Bursa, Bilecik, şeftali, PDV, enfeksiyon

Özet. Prune dwarf virus (PDV), sert çekirdekli meyve ağaçlarının önemli viral patojenleri arasında yer almaktadır. Bu çalışmada Türkiye'nin önemli şeftali üretiminin yapıldığı Bursa ve Bilecik illerinde ilk kapsamlı PDV enfeksiyonu araştırılmıştır. 460 viral semptom şüphesi ile toplanan şeftali yaprağı DAS-ELISA testine tabi tutulmuş ve 19 örneğin (%4.13) PDV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda virüsün kılıf protein bölgesine ait 862 bp uzunluğunda nükleotid dizileri elde edilmiş, elde edilen diziler GenBank'ta kayıtlı Türkiye ve dünya PDV referans izolatları ile karşılaştırılmıştır. Yapılan BLASTn analizi sonucunda PDV şeftali Türkiye izolatları, referans PDV sekans verileri ile nükleotid düzeyinde %87.77-97.56 arasında benzerlik göstermiştir. Nükleotid dizi bilgisi elde edilen izolatların filogenetik analiz çalışmaları ile, dünya ve Türkiye izolatları ile ilişkisi belirlenmiştir. Araştırma bulguları coğrafik orijin ve farklı *Prunus* türlerinden izole edilen PDV izolatları arasında herhangi bir filogenetik ilişkinin olmadığını göstermiştir. Çalışma sonucunda ilk kez ülkemizde şeftali PDV izolatlarının kılıf protein bölgesine ait nükleotid dizileri elde edilmiştir.

*Sorumlu yazar

alicelik032@gmail.com

Distribution and Genetic diversity of Prune dwarf virus (PDV) in Peach Growing Areas in Bursa and Bilecik Provinces

Keywords:

Bursa, Bilecik, peach, PDV, infection

Abstract. Prune dwarf virus (PDV) is one of the important viral pathogens of stone fruits. In this study, PDV infection was investigated extensively for the first time in Bursa and Bilecik provinces, which have large peach production areas of Turkey. Four hundred-sixty peach leaves showing viral symptoms were subjected to DAS-ELISA test and 19 samples (%4.13) were found to be infected with PDV. As a result of RT-PCR studies, 862 bp length nucleotide sequences of the coat protein region of the virus genome were obtained and compared with reference isolates in the GenBank. Sequence comparisons showed 87.77-97.56% nucleotide identity. The genetic relationship was determined by phylogenetic analysis of Turkey and world isolates of PDV. The results of the study showed that there was no phylogenetic relationship between geographic origin and PDV isolates from different *Prunus* species. As a result of this study, nucleotide sequences of the coat protein regions of PDV isolates from peach were obtained for the first time in our country.

**Bu çalışma Ali ÇELİK' in doktora tezinden üretilmiştir.

ORCID ID (Yazar sırasına göre/By author order)

0000-0002-5836-8030 0000-0002-0557-6119

GİRİŞ

Şeftali (*Prunus persica* L.) Rosales takımının Rosaceae familyasında bulunan, *Prunus* cinsi içerisinde ve Anavatani Çin olarak kabul edilen sert çekirdekli bir meyve türüdür (Seçmen ve ark., 2018). Şeftali meyvesi A ve C vitaminleri bakımından zengin bir meyve olup lif bakımından besin değeri oldukça yüksektir (Manzoor ve ark., 2012). Dünyanın 80'den fazla ülkesinde yetiştiriciliği yapılan şeftalinin en önemli üreticisi olan Çin'i, İspanya, İtalya, Yunanistan, ABD ve Türkiye sırasıyla takip etmektedir (İkinci ve Bolat, 2018). Ülkemiz sahip olduğu jeopolitik konumu ve iklim çeşitliliği sayesinde pek çok meyve sebze türünün tarımının yapılabildiği nadir ülkeler arasında yer almaktadır. TÜİK (2018) verilerine göre Türkiye'de yaklaşık 384.476 da alanda 667.982 ton şeftali üretimi yapılmakta, Bursa, Çanakkale, İzmir, Denizli ve Mersin üretimde ilk 5 il olarak ön plana çıkmaktadır.

Çeşitli taksonomik gruplara ait 30'dan fazla virüsün *Prunus* türlerini enfekte ettiği rapor edilmiş, bu virüsler arasında yaygın olarak görülen Prune dwarf virus (PDV)'nin, ciddi verim ve kalite kayıplarına yol açabilen yüksek ekonomik öneme sahip bir hastalık etmeni olduğu bildirilmiştir (Nemeth ve ark., 1986). PDV'nin genellikle *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) ve *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) ile karışık enfeksiyon halinde olduğu görülmüştür (Myrta ve Savino, 2008; Çevik ve ark., 2011). PDV, *Ilarvirus* genusu içerisinde yer alan Bromoviridae familyasının bir üyesi olup 3 parçalı, tek sarmal yapıda ve pozitif duyarlılığa sahip bir RNA virüsüdür (Hadidi ve ark., 2011). RNA1 ve RNA2 segmentleri replikazdan sorumlu proteinleri kodlarken, kılıf ve hareket proteinleri RNA3 segmenti tarafından sentezlenmektedir (Pallas ve ark., 2012).

PDV'nin konukçu bitkide oluşturduğu belirtiler iklim koşullarına, izolat çeşidine ve konukçu türüne bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (Nemeth ve ark., 1986). PDV ile enfekteli bitkiler sergilediği belirtiler genellikle küçük ve içe kıvrılmış yapraklar, kısalmış internodlar ve yapraklarının üzerinde klorotik lekeler şeklindedir (Sutic ve ark., 1999). Virüsün yeni alanlara yayılması enfekteli bitki materyalleri ve tohum-polen kaynaklı taşınma şeklinde gerçekleşmektedir (Mink, 1993).

PDV'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda virüsün kılıf proteini (Vašková ve ark., 2000; Youssef ve ark., 2002; Ulubaş Serçe ve ark., 2009; Öztürk ve Çevik, 2015) ve hareket proteini (Predajna ve ark., 2017) bölgeleri esas alınmaktadır. PDV varlığının tespitinde yönelik yürütülen çalışmalarda Akdeniz ülkelerindeki enfeksiyon oranının %67.2-80 arasında değiştiği bildirilmiştir (Myrta ve Savino, 2008). Sırbistan'da yapılan bir çalışmada ise bu oranın %37.6 olduğu tespit edilmiştir (Mandic ve ark., 2007). Vašková ve ark., (2000) farklı sert çekirdekli konukçulardan izole edilen 11 PDV izolatının kılıf protein gen bölgesinin oldukça korunan bir bölge olduğunu bildirmiş ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda coğrafik orijin, konukçu ve izolatlar arasında herhangi bir özelleşme belirlenmemiştir. 32 PDV izolatı ile yapılan analizlerde kılıf protein bölgesinin referans izolatlar ile yüksek oranda (%86-96) benzerlik gösterdiği belirlenmiş olup, oluşturulan filogenetik ağaçta 4 farklı grup gözlenmiştir (Boulila, 2010). Türkiye'de yapılan çalışmalarda enfeksiyon oranının bölgelere göre %5-55 arasında değiştiği görülmüştür (Çağlayan-Yıldızgördü ve Hurişil, 1996; Gümüş ve ark., 2007; Çevik ve ark., 2011; Öztürk ve Çevik, 2015). Dokuz kayısı ve bir kiraz izolatı dizilenerek elde edilen filogenetik ağaçta izolatlar 4 farklı grupta toplanmıştır (Ulubaş Serçe ve ark., 2009). Öztürk ve Çevik (2015) tarafından Türkiye'nin göller yöresinde PDV izolatlarının yaygınlığı ve genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla toplanan 521 kiraz numunesinin 316'sı PDV tespit edilirken (%60.27) yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda 3 ana grup altında alt grupların varlığına değinilmiştir.

Bu çalışmada Türkiye'de şeftali üretimi ile ön plana çıkan bir bölgede PDV varlığının tespiti açısından surveyler yapılmış, virüs varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmiştir. Survey bölgesini temsil edecek özellikte ve sayıda izolata ait nükleotid dizisi belirlenerek farklı konukçu ve coğrafyadan referans izolatlar ile kıyaslanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Arazi Surveyleri ve Bitki Materyali

Arazi surveyleri 2016-2018 yılları arasında Bursa ve Bilecik illerinin 12 farklı bölgesinde gerçekleştirilmiştir. Survey kapsamında virüs şüpheli belirtiler sergileyen 460 şeftali yaprağı toplanmış ve -20 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

DAS-ELISA

Toplanan bitki materyali Clark ve Adams (1977)'e göre DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Test PDV'e karşı antiserum içeren ticari ELISA kiti (Loewe, Germany) kullanılarak ilgili firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Test sonucunda plakalarda meydana gelen renk değişimleri gözlenmiş, ayrıca sonuçlar 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda ölçülmüştür.

Toplam RNA Eldesi ve cDNA Sentezi

DAS-ELISA sonuçlarına göre pozitif olduğu belirlenen örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. NucleoZOL (Macherey Nagel, Germany) ve minör modifikasyonlar uygulanarak optimize edilmiş CTAB temelli bir RNA izolasyon yöntemi (Li ve ark., 2008) olmak üzere iki farklı metot toplam RNA eldesi için kullanılmıştır. 100 ng μL^{-1} son konsantrasyona ayarlanan toplam RNA, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™, USA) kullanılarak ilgili firmanın talimatları çerçevesinde cDNA sentezine alınmıştır. Elde edilen total cDNA kullanılıncaya kadar -20 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

RT-PCR

PDV'nin kılıf protein bölgesi üzerinde yaklaşık 862 bp uzunluğundaki bir bölge, iki aşamalı RT-PCR metodu ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonun daha önce Vašková ve ark. (2000) tarafından tanımlanan koşullara göre gerçekleştirilmiştir. RT-PCR, 2 μL Total cDNA (100 ng μL^{-1}), 1.5 μL her bir primer (F: GTGTAGAAAGAAGAGAAGCCGACAAG. R: ATCTAGAAGCAGCATTTCCTCAACTACGA), 15 μL 2X PCR Master mix (Ampliqon, Denmark) ve 5 μL nükleaz içermeyen su kullanılarak 94 °C'de 2 dk, 94 °C'de 30 sn, 50 °C'de 30 sn, 70 °C'de 90 sn (40 döngü) ve 72 °C'de 10 dk koşulları altında toplam 25 μL hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde 100 bp DNA ladder ile birlikte yürütülmüştür. Elektroforez sonrası ethidium bromide ile boyanan amplikonlar bir G: BOX F3 jel görüntüleme sistemi (SynGene®, UK) altında görüntülenmiştir.

Dizileme ve Dizi Analizi

PCR sonucu pozitif olduğu belirlenen amplikonlar PDV kılıf proteinine spesifik primer çifti ile dizi analizine gönderilmiştir. Her bir izolat için elde edilen ham sekans verileri MEGA 6 programı ile düzenlenip işlenerek, Çizelge 2'de yer alan dünyanın farklı bölgelerinden ve farklı konukçu özelliği gösteren PDV izolatlarına ait nükleotid ve aminoasit dizileri ile consensus blokları oluşturulmuştur. Çalışma kapsamında elde edilen izolatlar dünya üzerinde ve Türkiye'de yer alan farklı PDV izolatları ile nükleotid düzeyinde karşılaştırılmıştır. Filogenetik ağaçlar MEGA 6 programı ile Kimura 2-parameter algoritmasına göre 1000 tekrarlı bootstrap analizi yöntemiyle oluşturulmuştur (Tamura ve ark., 2013).

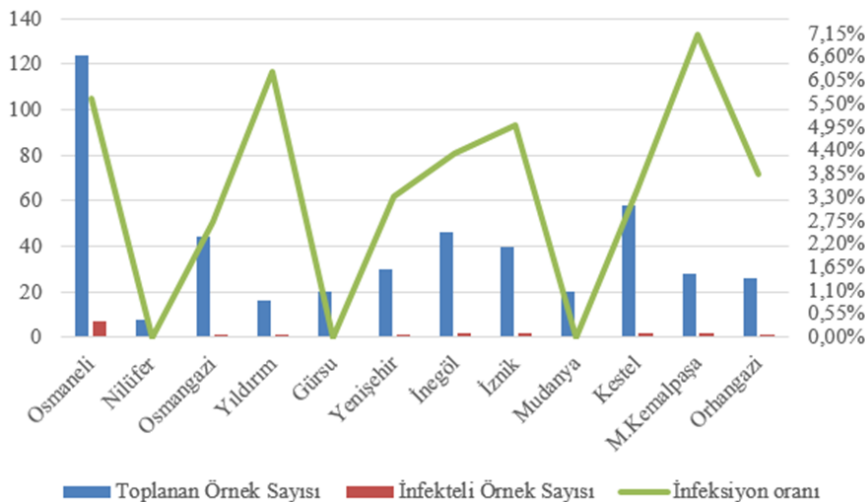
BULGULAR VE TARTIŞMA

Arazi Surveyleri

Bursa ve Bilecik il sınırları içerisinde yer alan şeftali üretim bölgelerinden viral belirtiler sergileyen 460 adet şeftali yaprağı toplanmıştır. Survey alanında görülen semptom tablosu yapraklarda kıvrılma, ağaç görünümünde genel bodurluk, yapraklarda klorotik halkalar ve mozaik lekeler şeklinde gözlenmiştir. Bazı ağaçlar bahsi geçen semptomların sadece birini sergilerken, bazı ağaçlarda ise birden fazla semptom görülmüştür.

Serolojik Testler

Laboratuvara getirilen örneklerin bir kısmı 1 hafta içerisinde DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Bir hafta içerisinde ELISA testine alınan örnekler, teste kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerin bir kısmı ise daha sonra DAS-ELISA testine alınmak üzere -20 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



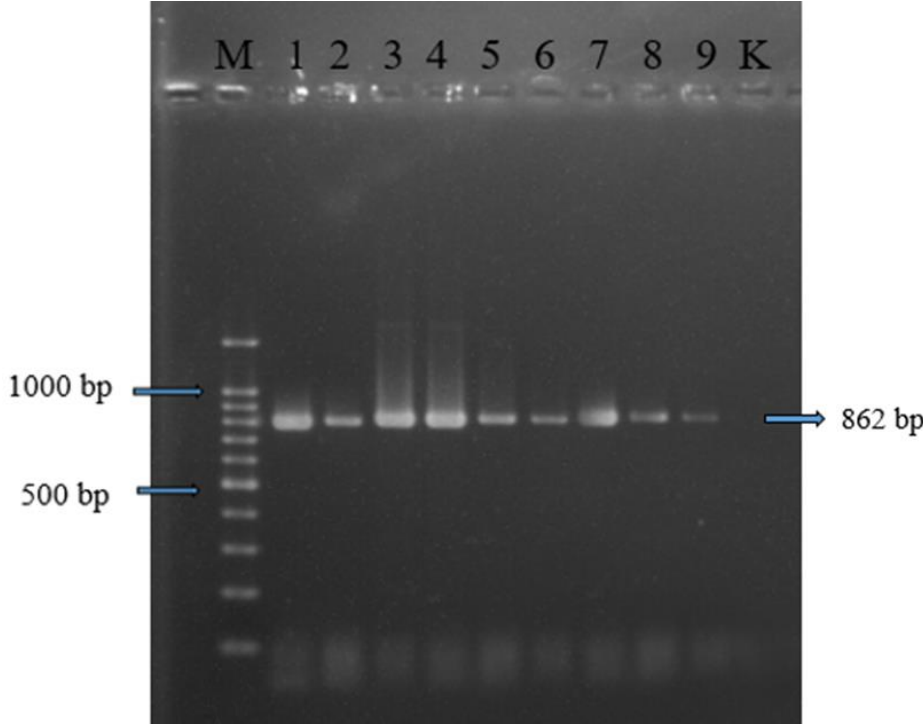
Şekil 1. DAS-ELISA sonuçlarına göre PDV dağılımı.

Figure 1. PDV distribution according to DAS-ELISA results.

Yapılan serolojik testler sonucunda 460 örneğin 19'unda (%4.13) PDV tespit edilmiştir. En yüksek PDV bulaşıklık oranı Mustafakemalpaşa ilçesinde %7.14 oranında tespit edilmiştir. Bu ilçeyi sırasıyla Yıldırım ve Osmaneli ilçeleri takip etmektedir. Nilüfer, Gürsu ve Mudanya toplanan örneklerin hiçbirinde PDV enfeksiyonuna rastlanmamıştır (Şekil 1).

RT-PCR ve Sekans Analizi

Survey bölgesi ilçelerinden birer adet seçilmek suretiyle toplamda 9 izolat kılıf protein bölgesini çoğaltan primer çiftli ile PCR reaksiyonuna alınmıştır. PCR sonucunda 862 bp büyüklüğünde bant görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 2). PCR sonucunda pozitif bant veren ürünler dizilenmek üzere gönderilmiştir. Dizileme işlemi sonucu gelen datalar işlenmiş ve GenBank referans verileri ile karşılaştırılmıştır. Yapılan BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda elde edilen sekans verileri referans datalar ile nükleotid düzeyinde %87.77-97.56 arasında benzerlik göstermiştir.



Şekil 2. PDV izolatları ile elde edilen 862 bp büyüklüğündeki amplikonlar (M: Marker 1: Osmaneli, 2: Kestel, 3: Orhangazi, 4: Mustafakemalpaşa, 5: İznik, 6: İnegöl, 7: Yenişehir, 8: Yıldırım, 9: Osmangazi, K: Kontrol).

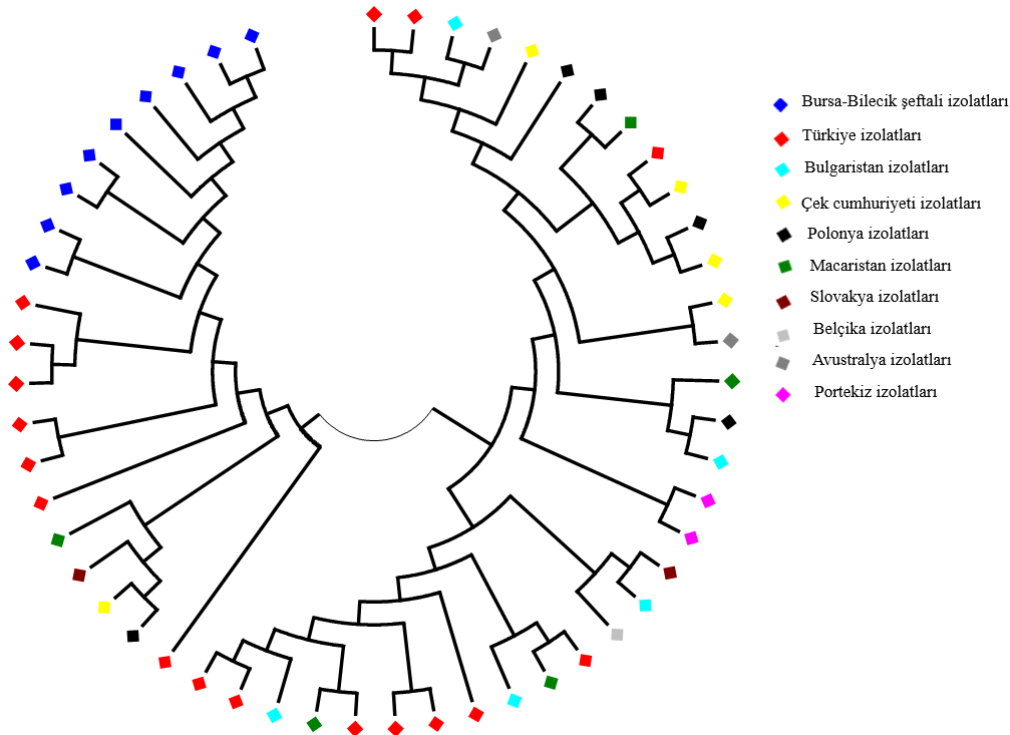
Figure 2. 862 bp amplicons obtained with PDV isolates (M: Marker 1: Osmaneli, 2: Kestel, 3: Orhangazi, 4: Mustafakemalpaşa, 5: İznik, 6: İnegöl, 7: Yenişehir, 8: Yıldırım, 9: Osmangazi, K: Control).

Filogenetik Analiz

GenBank'ta yer alan Türkiye'den ve dünyadan farklı konukçu ve coğrafi orijinden 44 PDV izolatı seçilmiştir (Çizelge 2). Çalışma kapsamında elde edilen 9 PDV izolatına ait sekans bilgisine ilave olarak, 5 farklı *Prunus* türünden ve 13 farklı ülkeden elde edilen 44 PDV izolatı ile Kimura 2-parameter modeli ile 1000 bootstrap algoritması ile filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Dünya izolatları ile yapılan filogenetik analizler sonucunda PDV izolatlarının 2 ana gruba ayrıldığı ve ana gruplar içerisinde alt grupların varlığı görülmüştür (Şekil 3). Birinci ana grupta yer alan 20 izolatın 16 tanesi Türkiye izolatlarından oluşmuştur. Çalışma kapsamında dizilenen şeftali PDV izolatları 1. ana grup içerisinde yer alırken Macaristan, Polonya, Çek Cumhuriyeti ve Slovakya'dan da izolatlar bu ana grup içerisinde yer almıştır. Toplamda 33 izolattan oluşan 2. ana grup içerisinde Türkiye'den 10 izolat, Bulgaristan'dan 4, Macaristan'dan 3, Slovakya'dan 1, Polonya'dan 4, Çek Cumhuriyeti'nden 4, Portekiz'den 2, Avustralya'dan 2 ve Belçika'dan 1 izolat yer almıştır. Farklı *Prunus* konukçularından ve farklı coğrafik orijinlerden seçilen PDV izolatlarının filogenetik ayrımında, filogenetik ağaç üzerinde meydana gelen ayrımlarda lokasyon ve konukçu düzeyinde bir fark tespit edilmemiştir.

Çizelge 2. Filogenetik analizde kullanılan referans PDV izolatları.
Table 2. Reference PDV isolates used in phylogenetic analysis.

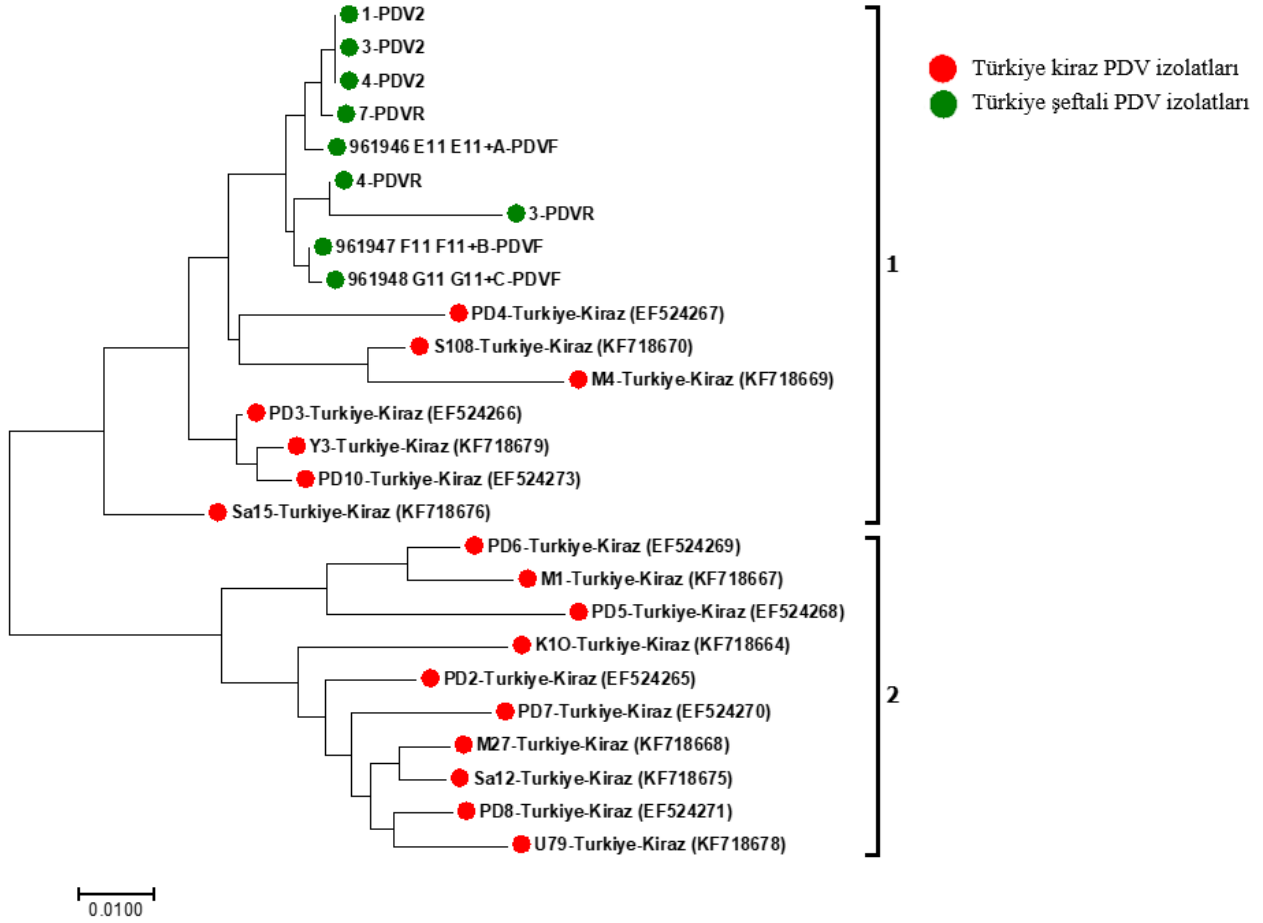
GenBank erişim no	Orijin	Konukçu	GenBank erişim no	Orijin	Konukçu
EF524266	Türkiye	Kiraz	MF078480	Slovakya	Kiraz
KF718679	Türkiye	Kiraz	KU949330	Slovakya	Kiraz
EF524273	Türkiye	Vişne	AY554275	Macaristan	Kiraz
KF718670	Türkiye	Kiraz	AY551441	Macaristan	Vişne
EF524267	Türkiye	Kiraz	AY554278	Macaristan	Kiraz
KF718676	Türkiye	Kiraz	AY554274	Macaristan	Vişne
KF718669	Türkiye	Kiraz	AY554277	Macaristan	Kiraz
KF718668	Türkiye	Kiraz	AF208742	Çek Cumhuriyeti	Şeftali
EF524271	Türkiye	Vişne	KU215404	Çek Cumhuriyeti	Vişne
EF524269	Türkiye	Vişne	AF208746	Çek Cumhuriyeti	Erik
EF524265	Türkiye	Vişne	AF208743	Çek Cumhuriyeti	Şeftali
KF718667	Türkiye	Kiraz	MK369931	Çek Cumhuriyeti	Kiraz
EF524270	Türkiye	Vişne	MK392156	Bulgaristan	Kiraz
KF718678	Türkiye	Kiraz	MK139693	Bulgaristan	Kiraz
KF718675	Türkiye	Kiraz	MK139685	Bulgaristan	Kiraz
KF718664	Türkiye	Kiraz	MK139692	Bulgaristan	Kiraz
EF524268	Türkiye	Vişne	MK139689	Bulgaristan	Kiraz
GU181400	Polonya	Kiraz	AY646838	Portekiz	Badem
GU066794	Polonya	Erik	AY646841	Portekiz	Badem
EU169999	Polonya	Vişne	KY883331	Avustralya	Kiraz
GU066790	Polonya	Kiraz	KY883330	Avustralya	Kiraz
GU066798	Polonya	Şeftali	MK834276	Belçika	Kiraz



Şekil 3. Bursa şeftali PDV izolatlarının, dünyanın farklı coğrafik orijinlerinden ve farklı konukçularından elde edilen izolatlar ile filogenetik ilişkisi (Filogenetik ağaç, Kimura 2-parameter modeli ile 1000 bootstrap parametresi seçilerek, Türkiye ve dünya PDV izolatlarının kılıf proteini bölgelerinden elde edilen sekans verileri ile MEGA 6 programında NJ algoritması kullanılarak elde edilmiştir).

Figure 3. Phylogenetic relationship of Bursa PDV isolates with other PDV variants from different hosts and geographic origins from the World (The tree was produced using the coat protein region sequences of Turkish and World PDV isolates with NJ algorithm option of MEGA 6 and Kimura 2-parameter bootstrap analysis of 1000 replicates was performed).

Ayrıca Türkiye’de daha önce bildirilen ve kirazdan izole edilen tüm PDV izolatları ile ikinci bir filogenetik analiz oluşturulmuştur. Türkiye PDV izolatlarının değerlendirildiği bu analizde, izolatların iki ana grup altında toplandığı görülmüştür. Ayrıca bu çalışma kapsamında şeftaliden izole edilen PDV izolatlarının ana grup 1 içerisinde yer aldığı ve kendi aralarında kümelenildiği gözlenmiştir (Şekil 4). Türkiye PDV izolatları ile oluşturulan filogenetik ağaçta, kirazdan elde edilen izolatların ana grup 2’i oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 4. Türkiye PDV izolatları ile oluşturulan filogenetik ağaç (Filogenetik ağaç, Kimura 2-parameter modeli ile 1000 bootstrap parametresi seçilerek, Türkiye PDV izolatlarının kılıf proteini bölgelerinden elde edilen sekans verileri ile MEGA 6 programında Kimura 2- parametre modeli ile NJ algoritması kullanılarak 1000 bootstrap tekrarı ile elde edilmiştir).

Figure 4. The phylogenetic tree generated using Turkish PDV isolates (The tree was produced using the coat protein region sequences of Turkish PDV isolates with NJ algorithm option of MEGA 6 and Kimura 2-parameter bootstrap analysis of 1000 replicates was performed).

Bu çalışmada Türkiye’nin önemli bir şeftali üretim bölgesi olan Bursa ve Bilecik illerinde şeftali tarımı yapılan alanlarda PDV enfeksiyonu araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda viral semptomlar sergileyen 460 şeftali DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiş, serolojik çalışmalar sonucunda 19 adet örneğin PDV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Kirazda PDV enfeksiyonunun belirlenmesi amacıyla ülkemizin İzmir yöresinde yapılan önceki çalışmalarda (Gümüş ve ark., 2007) Batı Anadolu Bölgesi tarım alanlarında virüsün varlığı bildirilmiştir. Ancak Türkiye’deki PDV tespit çalışmaları genellikle kiraz konukçusu üzerinde yürütülmüş (Gümüş ve ark., 2007; Ulubaş ve ark., 2009; Çevik ve ark., 2011; Çevik ve Öztürk, 2015) özellikle PDV’nin önemli konukçuları arasında yer alan şeftali ve şeftali üretiminin ön plana çıktığı bölgeler şimdiye kadar PDV enfeksiyonu açısından kapsamlı bir şekilde incelenmemiştir. Bu çalışma ile bölge PDV enfeksiyonu açısından detaylı bir şekilde araştırılmış ve virüsün bölgedeki varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Sert çekirdekli virüslerinin tespitinde önceki çalışmalarda ELISA testi ülkemizde yaygın olarak kullanılmış (Ulubaş ve ark., 2004; Gümüş ve ark., 2007; Ulubaş ve ark., 2009; Çevik ve ark., 2011; Çevik ve Öztürk, 2015) ve bu çalışma ile de hala virüslerin tespitinde başarı ile kullanılan bir tespit yöntemi olduğu görülmüştür.

NucleoZOL (Macherey Nagel, Germany) ve CTAB temelli (Li ve ark., 2008) bir yöntemle minör modifikasyonların adapte edilmesiyle uygulandığı RNA izolasyon çalışmalarında beklenen saflıkta ve konsantrasyonda toplam RNA başarılı bir şekilde izole edilmiştir. Li ve ark (2008)’de, fenolik bileşikler açısından zengin olan bitkilerden toplam

RNA eldesinde CTAB temelli yöntemin başarılı olduğu bildirilmiştir. Araştırma sonucunda elde edilen sonuçlar Li ve ark. (2008) ile yüksek derecede örtüşmektedir. Ayrıca bu çalışmada her iki yöntem ile izole edilen toplam RNA, cDNA sentezinde kullanılmış ve PCR sonucunda PDV başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda toplam RNA izolasyonu için kullanılan farklı yöntemler arasında önemli farklar görülmemiştir. Ancak işlemin süresi ve izolasyon esnasında kompleks sarf malzemelerin azlığı bakımından NucleoZOL (Macherey Nagel, Germany) daha pratik bulunmuştur.

Bursa ve Bilecik illerinden izole edilen PDV izolatları ile GenBank'ta kayıtlı referans izolatlar arasında nükleotid düzeyinde karşılaştırmalı çalışmalar yapılmıştır. Isparta'da kirazdan elde edilen izolatlar kullanılarak GenBank referans izolatları ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda %84-99 düzeyinde nükleotid benzerliği tespit edilmiş, virüsün kılıf protein bölgesinin nükleotid düzeyinde çok fazla polimorfizm göstermediği bildirilmiştir (Çevik ve Öztürk, 2015). Ayrıca Vašková ve ark. (2000) virüsün kılıf proteini bölgesinin oldukça korunaklı bir bölge olduğu yapılan çalışmalarda benzerlik oranının %88 düzeyinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Mısır PDV izolatları ile yapılan başka bir çalışmada ise bu oranın %97-98 seviyelerinde olduğu tespit edilmiştir (Youssef ve ark., 2002). Bulgaristan'da yürütülen bir çalışmada PDV izolatlarının kılıf protein bölgelerinin dizilenmesi sonucu elde edilen nükleotid dizileri arasında benzerlik oranı %87-100 arasında değişkenlik göstermiştir (Kamenova ve ark., 2019). Yapılan BLASTn analizlerinde Bursa ve Bilecik izolatlarının nükleotid düzeyinde %87.77-97.56 düzeyinde benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu çalışma sonucunda PDV izolatlarının kılıf protein bölgesinin dizilenmesi sonucu elde edilen nükleotid dizilerinin benzerlik oranları literatürde yer alan çalışmalarla yüksek derecede benzerlik göstermektedir.

Bursa ve Bilecik illerinden elde edilen PDV izolatlarının kılıf protein bölgesine ait diziler ve dünyanın farklı coğrafik orijin ve konukçularının GenBank'a kayıtlı PDV nükleotid dizileri (Çizelge 2) ile oluşturulan filogenetik ağaç (Şekil 3) incelendiğinde; 3 ana gruba ayrıldığı ve Türkiye PDV izolatlarının büyük çoğunluğunun birinci grup içerisinde ayrı bir alt grupta kümelendiği görülmüştür. Ayrıca bu çalışma kapsamında elde edilen Bursa ve Bilecik PDV izolatlarının tamamı 1. ana grup içerisinde ayrı bir alt grupta yer almıştır. Kamenova ve ark. (2019) farklı konukçu ve orijinlerden elde edilen PDV izolatları kullanarak oluşturduğu filogenetik ağaçta 3 ana grubun varlığından söz etmiştir. Öztürk ve Çevik (2015) tarafından Türkiye kiraz PDV izolatları ile oluşturulan filogenetik ağaçta 3 ana grubun yer aldığı ve bu ana gruplar içerisinde alt grupların varlığı tespit edilmiştir. PDV Türkiye kiraz izolatlarının büyük çoğunluğunun aynı ana gruplar içerisinde kümelendiği sadece 1 izolatın diğerlerinden farklı bir grupta yer aldığı bildirilmiştir. Türkiye izolatlarının aynı ana grup içerisinde yer alması, bu çalışmanın Öztürk ve Çevik (2015) ve Kamenova ve ark. (2019) ile yüksek derecede örtüştüğünü göstermiştir. Ayrıca Ulubaş-Serçe ve ark. (2009) ve Vašková ve ark. (2000) 'de coğrafik orijin ile farklı konukçular arasında herhangi bir filogenetik ilişkinin olmadığı bildirilmiştir. Filogenetik analizler, farklı konukçu ve coğrafik orijinlerin filogenetik ağaçta anlamlı bir şekilde kümelendiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, araştırma bulgularının Vašková ve ark. (2000), Ulubaş-Serçe ve ark. (2009), Öztürk ve Çevik (2015) ve Kamenova ve ark. (2019) ile örtüştüğünü göstermektedir. GenBank'ta yer alan Türkiye kiraz PDV izolatları ve bu çalışma kapsamında elde edilen şeftali izolatları ile oluşturulan 2. bir filogenetik ağaç, Türkiye PDV izolatlarının 2 ana gruba ayrıldığını göstermiştir (Şekil 4).

SONUÇ

Sonuç olarak Türkiye'nin önemli şeftali üretim illeri arasında yer alan Bursa ve Bilecik illerinde şeftali yetiştiriciliği yapılan alanlarda PDV enfeksiyonu araştırılmış, virüs serolojik ve moleküler yöntemler ile tespit edilmiştir. DAS-ELISA sonuçlarına göre Bursa ve Bilecik illerinden toplanan örneklerin %4.13'ünde PDV tespit edilmiştir. Elde edildiği lokasyonları farklı olan dokuz izolatın kılıf protein bölgesine ait nükleotid dizileri elde edilmiş ve referans PDV izolatları ile benzerlik dereceleri belirlenmiştir. Çalışma kapsamında nükleotid dizisi belirlenen şeftali PDV izolatları ile dünyanın farklı coğrafik orijinleri ve farklı *Prunus* konukçuları dikkate alınarak belirlenen referans izolatlar filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaçta şeftali PDV Türkiye izolatlarının aynı ana grup içerisinde kümelendiği tespit edilmiştir. Dünyadan coğrafik orijin ve konukçu farklılığı açısından izolatlar arasında herhangi bir filogenetik ilişki görülmemiştir. Çalışma kapsamında Türkiye'de şeftali PDV izolatlarının kılıf protein bölgelerine ait ilk nükleotid dizileri elde edilmiştir. Çalışma ile elde edilen şeftali PDV izolatlarının tüm genom dizilimlerinin belirlenmesi önerilmektedir. Tüm genom dizisinin belirlenmesi farklı konukçularda farklı PDV varyantlarının belirlenmesine katkı sunacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKISI

Çalışma kapsamındaki tüm arazi ve laboratuvar çalışmaları yazarlar tarafından birlikte yürütülmüş olup, yazım aşamasından yayın sürecine kadar olan her aşama ortak alınan kararlar çerçevesinde şekillenmiştir.

KAYNAKLAR

- Çağlayan Yıldızgördü, K., & Hurigil, H. (1996). Virus Diseases of Peach Trees in Hatay Province. *Journal of Turkish Phytopathology*, 25, 65-69.
- Çevik, B., Yardimci, N., & Çulal Kılıç, H. (2011). Detection of Viruses Infecting Stone Fruits in Western Mediterranean Region of Turkey. *Plant Pathology Journal*, 27, 44-52.
- Gümüş, M., Paylan, I. C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioglu, H. M., & 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, 265-268.
- Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., & Jelkmann, W. (2011). *Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits*. APS Press, USA.
- İkinci, A., & Polat, İ. (2018). Yield and Quality Performance of Some Peach Varieties Grown Under Sanliurfa Ecological Conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 13(2), 47-53.
- Kamenova, I., Borisova, A., & Popov, A. (2019). Incidence and genetic diversity of Prune dwarf virus in sweet and sour cherry in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 980-987.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J., & Kinard, G. (2008). A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods*, 154, 48-55.
- Mandic, B., Matic, S., Rwahni, M. A. L., Jelkman, W., & Myrta, A. (2007). Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. *Journal of Plant Pathology*, 89, 103-108.
- Manzoor, M., F. Anwar, N. Saari., & M. Ashraf, (2012). Variations of antioxidant characteristics and mineral contents in pulp and peel of different apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars from Pakistan. *Molecules*, 17(1), 390-407.
- Mink, G. I. (1993). Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), 375-402.
- Boulila, M. (2009). Molecular characterization of an almond isolate of Prune dwarf virus in Tunisia: putative recombination breakpoints in the partial sequences of the coat protein-encoding gene in isolates from different geographic origin. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(3), 411-421.
- Myrta, A., & Savino, V. (2008). Virus and virus-like diseases of cherry in the Mediterranean Region. *Acta Horticulturae*, 795, 891-896.
- Németh, M. V. (1984). *Virus, Mycoplasma, and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. M. Nijhoff/Dr. W. Junk Press, Netherlands.
- 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.
- Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, M. C., Amari, K., Sanchez-Pina, M. A., Myrta, A., & Sanchez-Navarro, J. A. (2012). Ilarviruses of *Prunus* spp.: a continued concern for fruit trees. *Phytopathology*, 102(12), 1108-1120.
- Predajňa, L., Sihelská, N., Benediková, D., Šoltys, K., Candresse, T., & Glasa, M. (2017). Molecular characterization of Prune dwarf virus cherry isolates from Slovakia shows their substantial variability and reveals recombination events in PDV RNA3. *European Journal of Plant Pathology*, 147(4), 877-885.
- Seçmen, S., Aydın, E., Macit, İ., Soysal, D., & Demirsoy, H. (2018). Şeftalilerde merkezi lider terbiye sisteminin büyüme, verim ve kalite üzerine etkileri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 33(1), 1-5.
- Sutic, D. D., Ford, R. E., & Tomic, M. T. (1999). *Handbook of Plant Virus Diseases*. CRC Press. USA.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- TÜİK. (2018). Bitkisel üretim istatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. Erişim tarihi: 20 Aralık 2019.
- Ulubas Serce, C., Ertunc, 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.
- Ulubas, C., & Ertunc, F. (2004). RT-PCR Detection and molecular characterization of *Prunus* necrotic ringspot virus isolates occurring in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 152, 498-502.

- Vašková, D., Petrzik, K., & Špak, J. (2000). Molecular variability of the capsid protein of the prune dwarf virus. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6), 573-580.
- Youssef, S. A., Shalaby, A. A., Mazyad, H. M. & Hadidi, A. (2002). Detection and identification of prune dwarf virus and plum pox virus by standard and multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA). *Journal of Plant Pathology*, 84, 113-119.