

Trakya Bölgesi'nde Şarka hastalığının DASI-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile belirlenmesi

Kahraman GÜRCAN¹

ABSTRACT

Investigation of Sharka disease in Thrace region by DASI-ELISA and RT-PCR

Sharka is an important disease of stone fruit causing loss of economic values of fruits. The recent studies have unexpectedly showed that *Plum pox virus* (PPV) causing the Sharka disease has a high genetic diversity in Turkey. Determination of PPV prevalence in Thrace which is the first identified area will help to elucidate to understand roots of high genetic variation and epidemiology of PPV in Turkey. In this study, a survey has been conducted to detect PPV prevalence in 45 locations of Thrace region. Total of 1105 trees of stone fruits have been investigated and 339 trees (30%) in 17 locations have been found to exhibit PPV symptoms. DASI-ELISA and RT-PCR approaches were used to test 436 samples including 213 plums, 193 apricots and 30 peaches collected from 17 locations. At first, three primer type [random hexamer, sequence specific and Oligo (dT)₂₃] were examined and Oligo (dT)₂₃ was found to be proper for cDNA construction to obtain expected PCR amplicons successfully. Of the total, 351 samples (81%) were found to PPV infected as results of serological and molecular testing. One hundred seventy-six plums (83%), 156 apricots (81%) and 21 (70%) were identified as positive. Exhibiting symptoms on trees of almond and cherries were not observed. The study shows the prevalence of the virus in Thrace region and significant controlling plant material transfer from this region. Further studies on strain determination of the virus and genome sequencing will elucidate to whether PPV dispersed to the country from Thrace region.

Keywords: *Plum pox virus*, apricot, plum, peach, stone fruits

¹ Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Genom ve Kök Hücre Merkezi, 38310 Talas, Kayseri
Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: kgurcan@erciyes.edu.tr
Alınış (Received): 20.06.2016 Kabul ediliş (Accepted): 31.8.2016

ÖZ

Şarka, sert çekirdekli meyve grubundaki meyvelerin ekonomik değerinin yok olmasına neden olan önemli bir virüs hastalığıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile Şarka hastalığına neden olan *Plum pox virus* (PPV)'nin Türkiye'de beklenmedik şekilde zengin bir genetik varyasyon gösterdiği ortaya konmuştur. PPV'nin Türkiye'de ilk defa tespit edildiği Trakya'da yaygınlığının belirlenmesi Türkiye'deki yüksek genetik varyasyonun kökeninin ortaya konması ve Türkiye'de PPV epidemiyolojisinin anlaşılması bakımından önemli olacaktır. Bu çalışma kapsamında Trakya bölgesinde 45 yerleşim yeri ev bahçeleri incelenmiş, toplamda 1105 sert çekirdekli meyve ağacında PPV belirtileri incelenmiş, 17 yerleşim yerinde 339 (%30) ağaçta belirti tespit edilmiştir. On yedi yerleşim bölgesinden 213 erik, 193 kayısı ve 30 şeftali olmak üzere toplamda 436 örnek öncelikle DASI-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile test edilmiştir. Öncelikle başarılı bir cDNA oluşturmak için üç rutin primer çalışılmış [random heksamer, dizi özgün ve Oligo (dT)₂₃], üç primer içinde Oligo (dT)₂₃ primeri ile kurulan cDNA kütüphanelerinin beklenen bantları başarı ile ürettiği belirlenmiştir. Serolojik ve moleküler testler sonucunda toplamda 353 örnekte (%81) virüsün varlığı belirlenmiştir. Yüz yetmiş altı erik (%83), 156 kayısı (%81) ve 21 adet şeftali (%70) örneği pozitif bulunmuştur. Belirti gösteren badem, kiraz ve vişne ağacına rastlanmamıştır. Yapılan çalışma Trakya bölgesi PPV yaygınlığını göstermekte olup bu bölgeden sert çekirdekli meyvelerden bitki materyali transferine dikkat edilmesi gerektiğini işaret etmektedir. Bu örnekler üzerine yapılacak ırk tayini ve genom dizileme çalışmaları, PPV'nin Türkiye'ye Trakya bölgesinden yayılıp yayılmadığı konusunda bilgi verecektir.

Anahtar kelimeler: Plum pox virüs, kayısı, erik, şeftali, sert çekirdekli meyveler

GİRİŞ

Plum pox virus (PPV), Bulgarca ismi ile Şarka hastalığı, sert çekirdekli meyvelerin en önemli sorunu olarak kabul edilmektedir (Cambra et al. 2006). Hastalık meyve verimini ve kalitesini yoğun olarak düşürmekte, meyvede pazarlanamaz seviyede deformasyonlar oluşturmaktadır. Kayısı, şeftali, nektarin, ve erik başta olmak üzere sert çekirdekli meyvelerin birçoğu PPV'ye konukçuluk etmektedir. Hastalık belirtileri, yaprak üzerindeki benek ve çizgiler, yaprakta kıvrılma, çekirdek üzerinde halkalı lekeler, meyve üzerindeki şekil bozuklukları, meyve şeker miktarında düşüş, tatta bozulma, erken dökülmeler şeklinde gözlenir.

PPV ilk defa 1917 yılında Bulgaristan'da gözlenmiş ve viral bir hastalık olduğu tanısı 1932 yılında ortaya konmuştur (Atanassov 1932). 1980'lere doğru Avrupa'nın büyük bir bölümüne yayılmış, Gürcistan, Türkiye, Suriye, Ürdün, İran'da rapor edilmiştir. 1970'lerden sonra Batı Avrupa'da (EPPO 2006) ve sonraki yıllarda deniz aşırı ülkelerde; Şili, 1992 (Herrera 1994); ABD, 1999 (Damsteegt et al. 2001); Kanada, 2000 (Thompson et al. 2001); Çin, 2004 (EPPO 2006); Arjantin, 2005 (Dal zotto et al. 2006); Japonya, 2009 (Maejima et al. 2011) rapor edilmiştir. Hastalığın uzun mesafede yayılması, bulaşık fidan ve gözlerin bir bölgeden başka bir bölgeye transferi ile gerçekleşmektedir. Kısa mesafelerde yayılması ise yaprakbitleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Yaprakbitlerinin çok hızlı çoğalmalarından dolayı kimyasal uygulamalarla kontrolü etkin olamamakta ve böylece hastalığın

yayılmasını kesin olarak engellemektedir. Günümüze kadar, 9 PPV straini biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır. Bunlar; An (Ancestor Marcus), C (Cherry), CR (Cherry Russian), D (Dideron), M (Marcus), EA (El Amar), Rec (Recombinant), T (Turkey) ve W (Winona)'dir. Dünyada en yaygın olarak bulunan iki ırkı Dideron ve Marcus olarak belirlenmiştir. PPV-D küresel olarak yayılmıştır. PPV-M ise moleküler çalışmalar sonucunda sadece Avrupa (Garcia et al. 2014) ve Türkiye'de bulunmuştur (Ceylan et al. 2013, Gürcan and Ceylan 2016b). Ayrıca Türkiye'de sadece İstanbul'a özgün bir M filogenetik grubu mevcuttur (Gürcan et al. 2016, Teber and Gürcan 2016). PPV-An Arnavutluk (García et al. 2014)'ta, PPV-C ilk kez İtalya (Crescenzi et al. 1997)'da, Macaristan ve Beyaz Rusya'da ve Hırvatistan'da rapor edilmiştir. PPV El Amar (PPV-EA) Mısır (Wetzel et al. 1991)'da, PPV-W ilk olarak Kanada'da tanımlanmış (James et al. 2003) daha sonra Letonya, Ukrayna ve Rusya'da rapor edilmiştir (Glasa et al. 2011, Mavrodieva et al. 2013, Sheveleva et al. 2012). PPV CR Rusya'da Volga nehri vadisinde kirazlarda (Glasa et al. 2013) ve Moskova'da vişne ağaçlarında rapor edilmiştir. Rekombinant ırklardan PPV-T, Türkiye'de tespit edilmiş (Ulubaş Serçe et al. 2009) olup, Türkiye dışında Arnavutluk'ta da rapor edilmiştir (Palmisano et al. 2015). PPV-Rec ise birçok Avrupa ülkesinde yaygındır (García et al. 2014).

Türkiye'de Şarka hastalığı ilk kez 1960'larda Edirne'de rapor edilmiştir (Şahtiyancı 1969). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda PPV Adana, Ankara, Antalya, Aksaray, Edirne, Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çanakkale, Kayseri, Konya, İzmir, İzmit, Manisa, Mersin, Sakarya, Samsun, Tekirdağ, Yalova (Akbaş et al. 2011, Azeri 1994, Candresse et al. 2007, Ceylan ve ark. 2014, Çelik ve Topkaya Kütük 2013, Çıtır and İlbağı 2008, Deligöz et al. 2015, Dunez 1986, Elibüyük ve Erdiller 1991, Elibüyük 2003, 2004, 2006, Erdiller 1988, Gümüş et al. 2007, İlbağı and Çıtır 2014, İlbağı et al. 2008, Koç and Baloğlu 2006, Kurçman 1973, Ulubaş Serçe et al. 2011, Yürektürk 1984) illerinde tespit edilmiştir. Son olarak PPV Aydın, Denizli, Eskişehir, İstanbul'da rapor edilmiştir (Ceylan et al. 2013, Gürcan et al. 2013a,b).

PPV'yi tespit etmede biyolojik test, ELISA, PCR ve dizi analizi yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Poliklonal 5B-IVI antikorunun geliştirilmesi PPV tespitinde ELISA testini rutin kılmıştır (Cambra et al. 1994, Crescenzi et al. 1997, Myrta et al. 1998). Diğer virüslerde olduğu gibi kılıf geninin PCR ile çoğaltılması PPV tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wetzel et al. 1991, Olmos et al. 1996, Candresse et al. 1998). Kılıf geni başta olmak üzere viral genlerin dizi analizi PPV tespitinde en güvenilir yaklaşım olmuştur (Bousalem et al. 1994, Candresse et al. 1998). P3-6K1 bölgesinin PPV tespitinde kullanılması ilk defa Glasa et al. (2002) tarafından yapılmıştır. P1 ve P3 gen bölgesi Potyvirus gurubunda en yoğun varyasyon gösteren bölgeler olup ilginç olarak P3 geni Potyvirus içinde yer alan virüsün strainleri için ise oldukça korunmuştur. Glasa, bu bölgenin kılıf geni yanı sıra PPV çalışmalarında kullanılabileceğini belirtmiş ve ileriki yıllarda bu bölge birçok çalışmada kullanılmıştır (Glasa et al. 2004, 2005, Matic et al. 2006, Dallot et al. 2011, Gürcan et al. 2013a,b).

Türkiye'de PPV'nin epidemiyolojisini anlamak ve kontrolünde başarılı olmak için yapılması gereken çalışmalardan biri virüsün yayılış rotasını belirlemektir. PPV ilk defa Edirne'de daha sonra Ankara'da tespit edilmiştir. Ankara şehir merkezinde birçok çalışma yapılmış ve oldukça bulaşık olduğu rapor edilmiştir. Virüs Türkiye'de ayrıca zengin genetik çeşitlilik göstermektedir (Gürcan and Ceylan 2016b). Trakya bölgesinde birkaç çalışma ile sınırlı sayıda pozitif örnek rapor edilmiş (Akbaş et al. 2011, İlbağı et al. 2008, İlbağı and Çıtır 2014, Gürcan and Ceylan 2016b), detaylı bir sürvey yapılmamıştır. Yayınlarından Trakya'da virüsün var olduğu anlaşılmakta olup yaygınlığı ve genetik çeşitliliği üzerine bilgi sınırlıdır. Hâlbuki Trakya, 100 yıl önce PPV'nin ilk kez bulunduğu Bulgaristan'a sınır kapısı olup bu bölgenin virüsün Türkiye'ye girişi ve yayılışında önemli rolü olabilir. Bu çalışmada Trakya'da PPV'nin yaygınlığı araştırılmıştır. Bu bölgedeki PPV örneklerinin tüm genom analizleri, Anadolu kentlerindeki virüs ırk ve popülasyonları ile ilişkilerinin ortaya konması Türkiye'de PPV epidemiyolojisinin belirlenmesinde önemli olacaktır.

MATERYAL VE METOT

Sürvey

Trakya'da bulunan 45 yerleşim biriminde 2015 ve 2016 yılları Mayıs ayında sert çekirdekli meyve ağaçlarında PPV belirtileri taranmıştır. PPV'nin yapraklarda tipik belirtileri (sarıdan açık yeşile değişen halka ve lekeler, çizgi ve bantlar; meyvede deformasyon, halka ve şişkinlik) araştırılmıştır. Sürvey yapılan yerleşim birimleri Çizelge 1'de listelenmiştir. Trakya bölgesinde sürvey yapılan alanlarda ticari anlamda yetiştiricilik yapılan sert çekirdekli meyve bahçesine rastlanılmamış, ev bahçelerinde ise sert çekirdekli meyvelerin yaygın olduğu görülmüştür. Ev bahçelerinde 523 adet kayısı, 454 adet erik, 164 adet şeftali ve 39 adet kiraz/vişne ağacı incelenmiştir. Hastalık belirtisi gösteren ağaçlardan yaprak örnekleri toplanmış, araba tipi buzdolabı içinde Kayseri'ye getirilmiştir. EPPO (2004) protokolüne uygun olarak 1 g örnek yaprağı, 20 ml ekstraksiyon çözeltisi içinde homojenize edilmiş, kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon çözeltisi Phosphate buffer saline (PBS) tabletlerden, %2 Polyvinylpyrrolidone (PVP-10) ve %0,2 sodium diethyl dithiocarbamate (DIECA) ilave edilerek hazırlanmıştır.

DASI-ELISA testi

Pozitif örnekleri belirlemek için EPPO protokolüne (EPPO 2004) göre DASI-ELISA testi kullanılmış, PPV'nin bütün ırkları tanımlayan 5B-IVIA antikoru ile testler yapılmıştır. DASI-ELISA sarfları kit olarak ısmarlanmış (Real, Spain) test firmanın protokolüne göre yapılmıştır. Okuma PowerWave 200 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) spektrofotometrede yapılmış olup, 405 nm dalga boyunda negatif bitkilerin 2 katı ve üzeri absorbans değerine sahip örnekler pozitif olarak tespit edilmiştir. Her 96'lık tabak için 3 enfekteli bitki pozitif ve 3 sağlıklı bitki negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için uygun primerin seçilmesi ve kütüphanelerin kurulması

RNA ekstraksiyon Geneaid marka ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. EPPO protokolünde RT-PCR yöntemi olarak tek tüp RT-PCR yöntemi tarif edilmiştir (EPPO 2004). Bu yöntem hızlı ve az iş gücü gerektirmektedir. Fakat aynı örnekten birçok bölge çoğaltılacağı durumda tek tüp yöntemi pahalı ve zaman alıcı olmaktadır. İki aşamalı RT-PCR yönteminde bir defa cDNA sentezlendikten sonra, aynı cDNA örneğinden birçok PCR yapılabilmektedir. Bu çalışmada sentezlenen cDNA kütüphaneler ileriki dönemde tüm genom dizilemede de kullanılacağından iki aşamalı RT-PCR yöntemi avantajlı olacaktır. Bu nedenle öncelikle cDNA sentezi için uygun primer araştırılmıştır. Yaygın olarak kullanılan primerler ile 8 pozitif örnek (3 kayısı, 3 erik ve 2 şeftali) cDNA kütüphanesi sentezlenmiştir. İki evrensel primer, [random hexamer (Katalog No: N8080127, Invitrogen, Kanada), ve Oligo (dT)₂₃ Anchored (Katalog No: O4387; Sigma, MO, ABD)] ve bir çift PPV'ye özgün oligonükleotid kullanılmıştır. PPV özgün oligonükleotidler PPV genomunun 5' ve 3' uçlarından tasarlanmıştır (5' primer = 5'-AAAATATAAAAACTCAACACAACA-3' ve 3' primer = 5'-GYCTCTTGACACAAGAAGACTATAACCYG-3'). Sentezlenen cDNA kütüphaneler iki primer çifti kullanılarak test edilmiştir. PCR koşulları ve bileşenleri PCR ile PPV amplifikasyonu başlığının altında verildiği gibidir.

Yapılan deneme sonucunda Oligo (dT)₂₃ ile kurulan cDNA kütüphanelerinin PCR'da diğer yöntemlere göre iyi sonuç verdiği görülmüştür. Geriye kalan Trakya örneklerinde cDNA kütüphaneleri Oligo (dT)₂₃ kullanılarak oluşturulmuştur. cDNA kütüphanede Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase (Invitrogen, ON, Canada) enzimi kullanılmış ve üretici firmanın prosedürü modifiye edilerek takip edilmiştir: 12 µl RNA (ortalama 30 ng/µl RNA), 1 µl of 70 µM Oligo (dT)₂₃ ve 1 µl 10 mM dNTPs ile karıştırılmış, 65°C'de 5 dk tutulmuş ve derhal buz üzerine taşınmıştır. Üzerine 4 µl 5X First-Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT ve 1 µl (200 U) M-MLV eklenmiş, 37°C'de 50 dk ve son olarak 70°C 15 dk tutularak RT enzim inaktive edilmiştir.

PCR ile PPV amplifikasyonu

cDNA kütüphaneler PPV'ye özgün iki primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Birinci primer çifti PPV genomunda 2915 ve 3750 nt arasındaki 835 nükleotidlik bölgeyi çoğaltmakta olup P3 genin 3' bölgesini, 6K1 geninin tamamını ve CI geninin 5' bölgesini içermektedir. Bu bölge için 5' primer PP3 ve 3' primer PCI primer dizisi Glasa et al. (2002) tarafından geliştirilmiştir. İkinci bölge olarak ise PPV genomunda 8727-9784 (GenBank emb|HF585104.1 numaralı kaydına göre) nt arası çoğaltılmıştır. Bu bölge PPV genomunun kılıf proteini 3' (842nt) ve 3' UTR (215 nt) içermektedir. Bu bölge için 5' primer (5'-CCAGCAACAACCTCAGCCTGC-3') ve 3' primer (5'-CTCTTGACACAAGAAGACTAT-3') Primer3 programı kullanılarak geliştirilmiştir.

PCR 25 µl toplam hacimde hazırlanmıştır. 2,5 µl 10X Taq Buffer, 1 µl MgCl₂ (50 mM), 2,5 µl dNTPs (2 mM), 0,2 µl Taq polimeraz (5 U), 25 µM 5' primer, 25 µM 3' primer ve 2,5 µl cDNA eklenmiş, toplam hacim distile su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. PCR programı 94°C'de 3dk ve 35 döngü 94°C'de 30 dk, 60°C de 1 dk, 72°C'de 1 dk, son olarak da 72°C'de 7 dk son uzama olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenmiş, 1X TBE tamponu içinde 100 V' ta 3 saat süre ile yürütülmüş, etidyum bromid uygulanmış ve DNA görüntüleme cihazında UV ışık altında gerçekleştirilmiştir.

SONUÇLAR

Sürvey

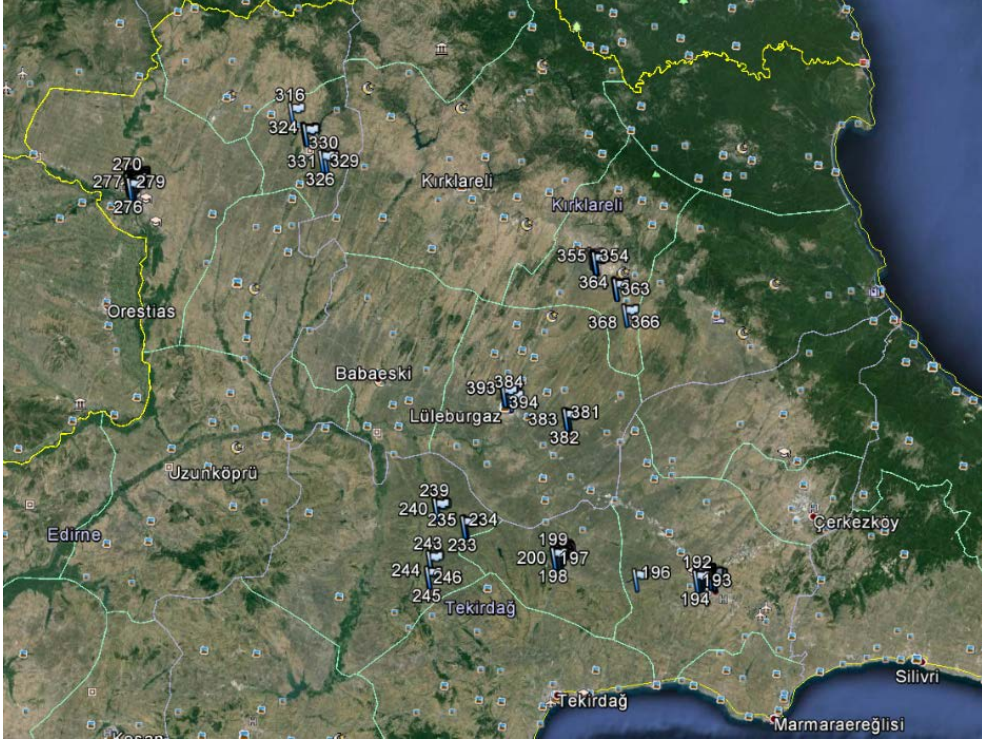
Toplamda 17 yerleşim yerinde 339 (%30) ağaçta belirti tespit edilmiştir (Çizelge 1). Büyük Gerdeli, Cevizköy, Çorlu, Dambaslar, Edirne, Evrensekiz, Kandamış, Kırklareli, Lüleburgaz, Muratlı, Pınarhisar, Sinanköy, Süloğlu, Taşlıkeban, Tozaklı, Yörükler ve Yertbekler yerleşim yerlerinde PPV belirtileri tespit edilmiştir. Bu yerleşim yerlerinden toplanan örneklerin GPS kayıtlarının Google Earth görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir. Tekirdağ şehir merkezinde belirtili ağaç görülmemiştir. Kırklareli'nde ise sadece 1 cami bahçesinde tek bir kayısı ağacının belirti gösterdiği görülmüştür. Bölgedeki büyük yerleşim yerlerinden Edirne, Çorlu, Muratlı, Lüleburgaz ve Pınarhisar'da belirtili kayısı ve erik ağaçlarının yoğun olduğu görülmüştür.

PPV belirtisi taşıyan yapraklar üzerinde lekeler ve renkli halkalar, kayısı meyveleri üzerinde şekil bozuklukları şeklinde gözlenmiştir (Şekil 1). Sürvey her iki yıl Mayıs ayında yapılmış olduğundan olgun meyvelerde belirti gözleme imkânı olmamıştır. Şekil 1c'de görüldüğü gibi genelde ham meyveler gözlenmiştir. Trakya'da kayısı, erik ve şeftali yapraklarında yoğun belirtiler gözlenirken meyvelerde deformasyon ve şekil bozukluğu belirtileri sadece kayısılarda gözlemiş erik ve şeftali ham meyvelerinde görülmemiştir. Bazı kayısılarda hastalığın çok şiddetli seyrettiği gözlenirken aynı bölgedeki bazı kayısılarda hafif, bazılarında daha düşük ya da hiç belirti taşımayan ağaçların mevcut olduğu görülmüştür. Kayısı yapraklarında PPV belirtilerinin erik ve şeftaliye nazaran daha belirgin olduğu görülmüştür. Sürvey güzergâhında badem, kiraz ve vişne ağacında belirti görülmemiştir.

Çizelge 1. Trakya bölgesinde incelenen ve PPV belirtisi görülen ağaç sayısı.

Yerleşim Yeri	Kayısı			Erik			Şeftali			Kiraz ve Vişne		
	A	B	%	A	B	%	A	B	%	A	B	%
Ahievren	7			6								
Ahmetbey	8			2								
Alıç	3			2								
Bıyıklı	7			6								
Büyük Gerdeli				10	4	40						
Çanta Köyü	3											
Çavuşköy	11			8								
Cevizköy	2	1	50	4	1	25	4					
Çorlu	69	18	26	57	45	79	9	3	33	10	0	
Dambaslar	4	4	100	10	10	100						
Edirne	42	33	79	66	45	68	28	12	43	12	0	
Evrensekiz	10	3	30	6	2	33	2					
Güvençli	4			6								
Haliç	4			5								
Hamzabeyli	2											
Havsa	8			5								
İnce	6			4								
İncik	12			7								
Izgar	4			5								
Kadıköy	3			5								
Kandamış	6	3	50	7	3	43						
Kavacık	6			8			3					
Kavaklı	5			1								
Kaynarca	3											
Keşan	19			21			10					
Kırklareli	10	3	30	10	0							
Lalapaşa	8			4								
Lüleburgaz	12	6	50	10	6	60						
Malkara	25			13			4					
Maltepe	5			8								
Muratlı	48	48	100	27	27	100	4	4	100	8	0	
Ortaca	5			8								
Paşayığıt	3			5								
Pınarhisar	22	14	64	10	4	40						
Sinanköy	4	2	50	4	2	50						
Sülecik	5											
Süloğlu	4			6	6	100						
Taşlıksekban	5	1	20	4								
Tekirdağ	85			63			22			9		
Tozaklı	6	4	67	4	2	50						
Uzunköprü	3			3								
Yenice	8			5								
Yeniköy	4			6								
Yörükler				9	3	33						
Yurtbekler	16	16	100	4	4	100	-					
Toplam	526	156	30	454	164	36	86	19	22	39	0	

A: İncelenen örnek sayısı, B: PPV belirtisi gösteren örnek sayısı.



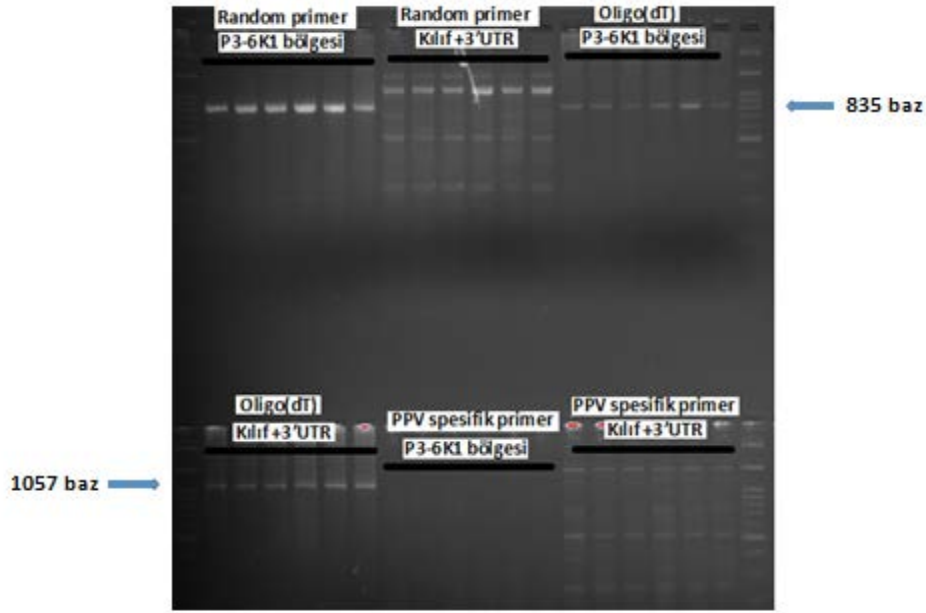
Şekil 1. Pozitif bulunan örneklerin alındığı bölgeleri gösteren Google Earth görüntüsü. GPS işaretleri ile pozitif örnek yoğunluğu orantılı değildir. Örneğin Edirne ilinden 94 pozitif örnek belirlenmiş olmasına rağmen Google Earth programı Edirne ilinden sadece 4 GPS noktası (270, 276, 277 ve 279) göstermektedir. Google Earth genişletilip Edirne'ye odaklandığında tüm örneklerin alındığı noktalar görülmektedir.



Şekil 2. PPV belirtileri. a) kayısı, b) erik, c) kayısı meyvesi d) şeftali

cdNA için primer seçimi

PPV genom parçalarını çoğaltmaya uygun cDNA kurmak için üç farklı cDNA primeri test edilmiştir. Bunun için PPV belirtisi taşıyan 8 örnek RNA'sı kullanarak 3 farklı primer ile cDNA kurulmuş, cDNA örnekleri daha sonra 2 farklı PPV primer çifti ile çoğaltılmışlardır. Amplifikasyon jel görüntüleri Şekil 3'de verilmiştir. Random primer ile kurulan cDNA örneklerinde P3-6K1 bölgesi başarıyla çoğalmış fakat PPV genomun kılıf proteini ve 3'UTR bölgesini içeren ikinci bölge PCR'ında beklenmeyen bantlar çoğalmıştır. Oligo (dT)₂₃ ile kurulan cDNA örneklerinde her iki bölgede başarı ile çoğalmış ve beklenmeyen bant oluşmamıştır. PPV 5' ve 3' sonlarından geliştirilen primerler ile kurulan cDNA kütüphanede ise P3-6K1 bölgesi çoğalmamış, ikinci bölge ise PPV-özgün olmayan bantlar ile birlikte çoğalmıştır. Özetle Oligo (dT)₂₃ primerleri ile kurulan cDNA kütüphanelerinin beklenen bantları başarı ile ürettiği belirlenmiştir.



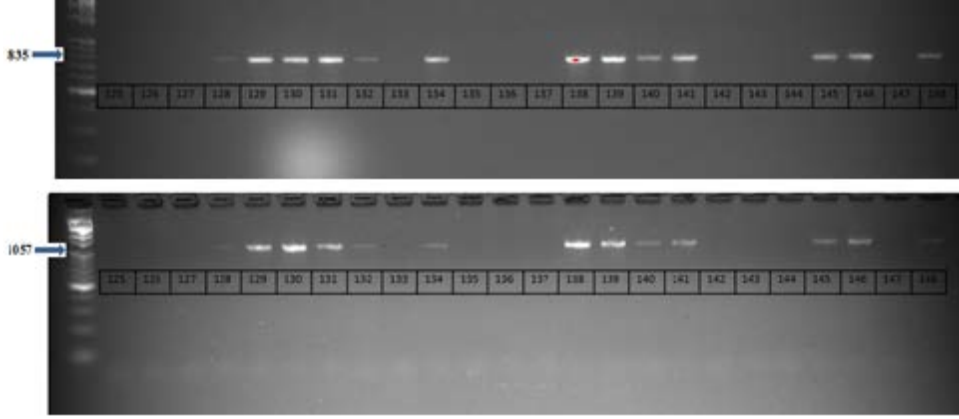
Şekil 3. cDNA kurma denemesi jel görüntüleri. Üç farklı primer ile kurulan 8 cDNA kütüphanesinin iki PPV gen bölgesi jel görüntüsü. Oligo (dT)₂₃ ile kurulan cDNA örneklerinden P3-6K1 ve Kılıf+3'UTR bölgelerinin sorunsuz çoğaldığı görülmektedir.

DASI-ELISA ve RT-PCR

DASI-ELISA testi spektrofotometrik değerler -0.10 ile 3.772 arasında değişmiştir. Sürvey sırasında belirtili olduğu gözlenen 339 örneğin tamamı serolojik yöntem sonucunda da pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca sürvey sırasında belirti gözlenmeyen 14 örnekte serolojik test sonucunda pozitif çıkmıştır. 436 örnek için cDNA oluşturulmuş daha sonra bu cDNA örnekleri iki primer çifti ile çoğaltılmıştır. Serolojik yöntem ile pozitif bulunan örnekler moleküler yöntem ile de pozitif bulunmuştur. Şekil 4' de P3-6K1 bölgesi ve Kılıf-3'UTR bölgelerinin bant görüntüleri verilmektedir.

Serolojik ve moleküler testler göz önünde bulundurulduğunda toplanan örneklerde PPV'nin %81 oranında olduğu görülmüştür. İki yüz on üç erik örneğinin 176 adeti (%83), 193 kayısı örneğinin 156 adeti (%81) pozitif çıkarken, 30 adet şeftali örneğinin 21 adeti (%70) pozitif çıkmıştır. Şehir bazında bakıldığında Çorlu, Dambaslar, Edirne, Lüleburgaz, Muratlı, Pınarhisar, Yurtbekler yerleşim yerinde hastalıklı örnek sayısının fazla olduğu görülmektedir. Çorlu'da toplanan 80 örneğin 70 adeti (%88) pozitif bulunmuştur. Yine Edirne il merkezinde toplanan 107 örneğin 94 adeti (%88) pozitif bulunmuştur. Bazı yerleşim birimlerinden ise daha az sayıda örnek pozitif çıkmıştır. Örneğin Kırklareli il merkezinde sadece üç örnek pozitif bulunmuştur. Yine Cevizköy'de bir adet kayısı ve bir adet erik örneği pozitif

bulunmuştur. Yerleşim birimlerinden erik, kayısı ve şeftali için tespit edilen pozitif örnek sayısı, oranları Çizelge 2’de verilmiştir.



Şekil 4. PPV-Genomu primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi jel görüntüsü. Jelin üst kısmında 125-172 arası örneklerin 836 nükleotid büyüklüğünde P3-6K1 bandı görülmektedir. Alt kısımda ise aynı örneklerin 1057 nükleotid büyüklüğünde kılıf geni ve 3’UTR bandı görülmektedir. İki bölge arasında bantların parlaklıklarında fark olsa da pozitif örnekler için iki bölgenin de başarı ile çoğaldığı görülmektedir.

Çizelge 2. DASI-ELISA ve RT-PCR sonuçlarına göre pozitif bulunan örnekler.

Yerleşim Yeri	Kayısı			Erik			Şeftali			Toplam		
	A	B	%	A	B	%	A	B	%	A	B	%
Büyük G.				5	5	100				5	5	100
Cevizköy	2	1	50	4	1	25	4			10	2	20
Çorlu	25	18	72	50	48	96	5	4	80	80	70	88
Dambaslar	4	4	100	10	10	100				14	14	100
Edirne	42	33	79	50	48	96	15	13	87	107	94	88
Evrensekiz	5	3	60	5	2	40	2			12	5	42
Kandımaş	5	3	60	5	3	60				10	6	60
Kırklareli	5	3	60	10	0					15	3	20
Lüleburgaz	8	6	75	10	6	60				18	12	67
Muratlı	48	48	100	27	27	100	4	4	100	79	79	100
Pınarhisar	15	14	93	10	6	60				25	20	80
Sinanköy	4	2	50	4	4	100				8	6	75
Süloğlu	4			6	6	100				10	6	60
Taşlıksekban	5	1	20	4						9	1	11
Tozaklı	5	4	80	4	2	50				9	6	67
Yörükler				5	4	80				5	4	80
Yurtbekler	16	16	100	4	4	100				20	20	100
Toplam	193	156	81	213	176	83	30	21	70	436	353	81

A: Test edilen örnek sayısı, B: Pozitif örnek sayısı.

TARTIŞMA VE KANI

Bu çalışmada Edirne ile Tekirdağ/Çorlu arasında yer alan 17 yerleşim yerinde PPV tespit edilmiştir. Bu yerleşim yerleri Edirne ile Tekirdağ/Çorlu arasında dağılmaktadır. Türkiye'de çeşitli araştırma grupları PPV'nin farklı şehirlerde bulunduğunu rapor etmişlerdir. Çeşitli bölgelerde yapılan tarama çalışmalarında örnekleme metotları farklı olduğu için şehirlere göre enfeksiyon oranının karşılaştırılıp yorumlanması sağlıklı bir yaklaşım olmayacaktır. Fakat bununla beraber kaba bir fikir vermesi açısından rapor edilen bulaşık bitki sayısına bakıldığında yapılan çalışmalarda en yüksek enfeksiyon oranının Kayseri ve Ankara'da olduğu görülmektedir. Bu çalışma sonucunda Edirne ve bazı Trakya yerleşim bölgelerinin Ankara ve Kayseri gibi yoğun bulaşık olduğu anlaşılmaktadır. Akbaş et al. (2011) farklı şehirlerden toplanan örnekleri test etmiş, 5762 örnekten 221 adetinin (%3,8) pozitif olduğunu belirtmişlerdir. Elibüyük (2004) Ankara il merkezinde yürüttüğü çalışmada 935 örneği taramış, 523'ünün (286 kayısı, 172 erik, 65 şeftali) PPV ile bulaşık olduğunu rapor etmiştir. Örneklerin %88'inde (%71 kayısı, %60 erik ve %48 şeftali) hastalık gözlemlenmiştir. Diğer bir çalışmada Ankara'daki değişik semtlerden 129 şeftali ağacından toplanan örneklerden 59'unun (%45) bulaşık olduğunu rapor etmiştir (Elibüyük 2006). Kayseri il merkezinde kayısılarda %89 enfeksiyon bulunmuştur. Son yıllarda Türkiye'de PPV bulaşık alanlarda ırkları ve genetik varyasyonu belirlemek için yapılan çalışmalarda Ankara ve Kayseri'ye ilaveten, Aksaray'ın Ortaköy ilçesi ve civarı köylerin, Konya şehir merkezinin ve İstanbul şehir merkezinin PPV ile oldukça bulaşık olduğu rapor edilmiştir (Gürcan and Ceylan 2016b, Gürcan et al. 2016). Trakya'daki illerden Edirne'de, PPV'nin varlığı uzun yıllardır bilinmektedir. 2008 yılından itibaren yapılan çalışmalarla Tekirdağ'ın farklı yerleşim yerlerinde de PPV rapor edilmiştir. İlbağı et al. (2008), Tekirdağ'da *Prunus spinosa* türünden 54 örneği test etmiş ve 13 tanesinin (%24) PPV bulaşık olduğu rapor etmiştir. Bir başka çalışmada 9 kayısı ağacından 4 (%44) tanesinin PPV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Çıtır and İlbağı 2008). Akbaş et al. (2011) Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ il merkezlerinde sırası ile 5, 2 ve 4 ağacın bulaşık olduğunu rapor etmiştir. Badem ağaçlarında yapılan bir çalışmada Çorlu'da 3, Keşan'da 1 ve Alpul'da 1 adet olmak üzere 5 adet bademde PPV rapor edilmiştir (İlbağı and Çıtır 2014). Yine Kırklareli'nde 1, Tekirdağ Çorlu ve Tekirdağ Muratlı'dan 8 örneğin pozitif olduğu rapor edilmiştir (Gürcan and Ceylan 2016b). Bu çalışmada bulaşık olduğu tespit edilen 17 yerleşim yerinden 4'ünde (Edirne, Tekirdağ/Çorlu, Tekirdağ/Muratlı, Kırklareli) daha önceden PPV'nin olduğu rapor edilmiş fakat sınırlı sayıda pozitif örnek rapor edilmiştir. Bu çalışma ile Edirne (%88), Tekirdağ/Çorlu (%88) ve Tekirdağ/Muratlı (%100)'nın oldukça yoğun bulaşık olduğu, fakat Kırklareli'ne ise PPV'nin yeni giriş yaptığı anlaşılmaktadır. Diğer 13 yerleşim yerinde ise (Büyük Gerdeli, Cevizköy, Dambaslar, Evrensekiz, Kandımaş, Lüleburgaz, Pınarhisar, Sinanköy, Süloğlu, Taşlıkeban, Tozaklı, Yörükler ve Yertbekler) PPV ilk defa tespit edilmiştir.

Trakya’da PPV ile bulaşık alanlar belirlenmiştir. Ancak PPV ırkları hakkında detaylı bilgi yoktur. İlbağı and Çıtır (2014) Trakya’da 5 bademde PPV-T bulmuşlardır. Oldukça önemli olan bu çalışma bademin PPV-T konukçusu olduğunu göstermiştir. Gürcan and Ceylan (2016b) Çorlu ve Muratlı’da 8 örneği çalışmış, 5 örneğin PPV-D, iki örneğin PPV-T ve bir örneğin PPV-M olduğunu rapor etmiş olup, çalışmaları dar bir alanda zengin genetik çeşitliliği göstermiştir. Muratlı ve Çorlu dışında bu çalışmada pozitif bulunan yerleşim yerlerinde PPV genetik çeşitliliği bilinmemektedir. Bu bölgede toplanan örneklerde PPV tüm genom dizi analizlerinin yapılması Türkiye’de PPV epidemiyolojisini anlamada önemli olacaktır. Çünkü Türkiye’de PPV zengin bir genetik çeşitlilik göstermekte olup, bu çeşitliliğin nasıl oluştuğu henüz muammadır (Gürcan and Ceylan 2016b, Gürcan et al. 2016). Türkiye dışında sadece Arnavutluk’ta rapor edilen (Palmisano et al. 2015) PPV-T irkin Türkiye’de Ankara, İzmir, İstanbul, Kayseri, Konya, Tekirdağ ve Samsun (Ulubaş Serçe et al. 2009, Ulubaş Serçe et al. 2011, İlbağı and Çıtır 2014, Deligöz et al. 2015, Gürcan et al. 2013a, Gürcan and Ceylan 2016b) illerinde tespit edilmiştir. Son yıllarda Türkiye T izolatlarının 20 adetinin tüm genomu dizilenmiş, alt filogenetik gurupların olduğu görülmüştür (Ceylan et al. 2015). PPV-M izolatı ise Bursa, Aydın, Çanakkale, Denizli, İstanbul, Isparta (Ceylan et al. 2013, Gürcan and Ceylan 2016b) illerinde bulunmuştur. Bu illerde bulunan M izolatlarının filogenetik ağaçta Avrupa M izolatları ile grup oluşturduğu görülmüştür. Fakat Türkiye’ye özgün bir PPV-M grubu ise sadece İstanbul’da bulunmaktadır. İstanbul M izolatları ise filogenetik ağaçta Türkiye + Avrupa M izolatlarından farklı bir grup oluşturmaktadır (Gürcan et al. 2016). Türkiye’ye özgün M irkinin 10 izolatının tüm genomu dizilenmiştir (Teber ve Gürcan 2016). Serolojik testler sonucunda PPV-D Ankara’da rapor edilmiştir (Elibüyük 2004). Sonrasında moleküler testler ile PPV-D Ankara’nın yanı sıra Aksaray, Bursa, Eskişehir, Konya, İstanbul ve Tekirdağ’da tespit edilmiştir (Gürcan et al. 2013b, Gürcan and Ceylan 2016a). Türkiye D izolatlarının 10 âdetinin tüm genomu dizilenmiş, Türkiye PPV-D izolatlarının filogenetik ağaçta küresel D izolatlarından farklı bir grup oluşturduğu görülmüştür (Gürcan and Ceylan 2016a). PPV-Rec Isparta (Candresse et al. 2007)’da ve Bursa (Gürcan and Ceylan 2016b)’da rapor edilmiştir.

Diğer önemli bir konuda Türkiye’de PPV keşfinin daha çok ev bahçelerinde olmasıdır. Bu çalışmada PPV tespit edilen tüm bahçeler ev bahçesi olup Trakya’da ekonomik anlamda yetiştiricilik yapılan sert çekirdekli meyve bahçesine rastlanmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda da yoğun enfeksiyonlar genelde ev bahçelerinde bulunmuş, ekonomik bahçelerde ise daha düşük enfeksiyon düzeyi tespit edilmiştir. Adana ili meyve bahçelerinde (Koç and Baloğlu 2006), Çanakkale, Mersin, Hatay meyve bahçelerinde (Ulubaş Serçe et al. 2011), Kayseri’nin Yahyalı ilçesinde (Ceylan ve ark. 2012), Antalya (Çelik ve Topkaya Kütük 2013) Bursa, Aydın, Çanakkale, Denizli, İstanbul, Isparta kayısı ve şeftali bahçelerinde (Gürcan and Ceylan 2016b) PPV rapor edilmiş ise de yoğun bulaşıklığın Ankara ve Kayseri şehir merkezlerinde olduğu bilinmektedir.

Sürvey, DASI-ELISA ve RT-PCR çalışmaları ile Trakya'da Edirne, Çorlu merkezlerinin ve bu iki yerleşim yeri arasındaki küçük yerleşim yerlerinin Şarka hastalığıyla bulaşık olduğunu göstermektedir. Son yapılan çalışmalar Türkiye'nin zengin bir PPV havuzu içerdiğini göstermektedir. Türkiye'de PPV virüsü ilk defa Edirne'de keşfedilmiştir ve bu çalışma göstermektedir ki PPV Edirne dışında da Trakya'nın bazı yerleşim yerlerinde yaygın bir yayılım alanına sahiptir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, ileriki çalışmalarda yani Trakya örneklerinde ırk tayininin ve tüm genom analizlerinin yapılmasında ve bu bölgenin Türkiye PPV genetik havuzuyla ilişkisinin belirlenmesinde önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akbaş B., Değirmenci K., Çiftçi O., Kaya A., Yurtmen M., Uzunoğulları N., Çelik N. and Türkölmez Ş. 2011. Update on Plum pox virus distribution in Turkey, *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 75–83.
- Atanassov D. 1932. Plum pox: A new virus disease. *Annals of the University Sofia, Faculty of Agriculture and Silviculture*, 11: 49-69.
- Azeri T. 1994. Detection of Virus Diseases of Stone Fruits in Aegean Region of Turkey. 9th Congress of Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası, Aydın, Türkiye, 511-513.
- Bousalem M., Candresse T., Quiot-Douine L. and Quiot J.B. 1994. Comparison of three methods for assessing plum pox virus variability: further evidence for the existence of two major groups of isolates. *Journal of Phytopathology*, 142 (2), 163–172.
- Cambra M., Asensio M., Gorrís M.T., Perez E., Camarasa E., Garcia J.A., Moya J.J., Lopez-Abella D., Vela C. and Sanz A. 1994. Detection of Plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *EPPO Bulletin*, 24: 569-577.
- Cambra M., Capote N., Myrta A. and Llácer G. 2006. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin*, 36: 202–204.
- Candresse T., Cambra M., Dallot S., Lanneau M., Asensio M., Gorrís M. T., Revers F., Macquaire G., Olmos A., Boscía D., Quiot J. B. and 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., Çağlayan K. and Çevik B. 2007. First report of the presence of Plum pox virus Rec strain in Turkey. *Plant Disease*, 91: 331.
- Çelik N. ve Topkaya Kütük B. 2013. Antalya ilinde şarka virüs hastalığının belirlenmesi. *Derim*, 30 (2), 1-10.
- Ceylan A., Gürçan K. and Akbulut M. 2015. Complete nucleotide sequence analysis of Plum Pox Virus 'Turkey' isolates. *International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Disease of Fruit Crops*, 8-12 June 2015, Morioka, Japonya, p.50.

- Ceylan A., Gürcan K., Akbulut M. ve Ghaderi M. 2014. Kayseri’de yüksek şarka enfeksiyonu. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 30 (2): 80-85.
- Ceylan A., Gürcan K., Ghaderi M., Akbulut M. and Ulubaş Serçe Ç. 2013. Transmission route of new plum pox virüs in Turkey. 2nd International Symposium on Plum Pox Virus, 3-6 September 2013, Olomouc, Czech Republic, p.19.
- Çıtır A. and İlbağı H. 2008. 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 Horticulturae, 781, 103-106.
- Crescenzi A., D’aquino L., Comes S., Nuzzaci M. and Piazzolla P. 1997. Characterisation of the sweet cherry isolate of Plum pox potyvirus, Plant Disease, 81 (7), 711-714.
- Dal Zotto A., Ortego J.M., Raigon J.M., Calogero S., Rossini M. and Ducasse D.A. 2006. First report in Argentina of Plum pox virus causing sharka disease in Prunus. Plant Disease, 90: 523.
- Dallot S., Glasa M., Jevremovic D., Kamenova I., Paunovic S. and Labonne G. 2011. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of Plum pox virus strain M. Archive of Virology, 156 (3), 539-542.
- Damsteegt V.D., Stone A.L., Luster D.G., Levy L., Gildow F.E. and Welliver R. 2001. Preliminary characterization of a North American isolate of Plum pox virus from naturally infected peach and plum orchards in Pennsylvania, USA. Acta Horticultuae, 550: 145-152.
- Deligöz İ., Değirmenci K. ve Sökmen M. 2015. Samsun İlinde Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Şarka Hastalığı Etmeninin (Plum pox virus) Belirlenmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 30 (3), 227-235.
- Dunez J. 1986. Preliminary observations on virus and virus like diseases of stone fruit trees in Mediterranean and near east countries. FAO Plant Protection Bulletin, 34: 43-48.
- Elibüyük İ. Ö. 2003. Natural spread of Plum pox virus in Ankara, Turkey. J. Phytopathology, 151: 617-619.
- Elibüyük İ.Ö. 2004. Current situation of sharka disease in Ankara, Turkey. Phytoparasitica, 32 (4), 417-420.
- Elibüyük İ.Ö. 2006. Detection of Plum Pox Virus in Ornamental Prunus Cerasifera. Phytoparasitica, 34 (4), 347- 352.
- Elibüyük İ.Ö. ve Erdiller G. 1991. Ankara ilinde kayısı, erik ve şeftali ağaçlarında görülen şarka hastalığının yayılış alanlarının tespiti ve tanısı üzerinde araştırmalar. 6. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. 7-11 Ekim 1991, İzmir, 411-414.
- EPPO. 2004. Standard PM 7/32 Plum pox potyvirus. Bulletin EPPO Bulletin 34: 247-256.
- EPPO. 2006. Current status of Plum pox virus and sharka disease worldwide. EPPO Bulletin, 36: 205-218.
- Erdiller G. 1988. Investigation on the causes of fruit dropping of apricot and plum trees in Ankara province. Journal of Turkish Phytopathology, 17 (3), 98.

- García J.A., Glasa M., Cambra M. and Candresse T. 2014. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15 (3), 226-41.
- Glasa M., Malinowski T., Predajna L., Pupola N., Dekena D., Michalczuk L. and Candresse T. 2011. Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of Plum pox virus. *Phytopathology*, 101 (8), 980-985.
- Glasa M., Marie-Jeanne V., Moury B., Kúdela O. and Quiot J. B. 2002. Molecular variability of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct isolates of Plum pox virus. *Archives of Virology*, 147 (3), 563-575.
- Glasa M., Prikhodko Y., Predajna L., Nagyova A., Shneyder Y., Zhivaeva T., Subr Z., Cambra M. and 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.
- Glasa M., Palkovics L., Komínek P., Labonne G., Pittnerová S., Kúdela O., Candresse T. and Subr Z. 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus are genetically very similar and form a unique PPV. *Journal of General Virology*, 85 (9), 2671-81.
- Glasa M., Paunovic S., Jevremovic D., Myrta A., Pittnerova S. and Candresse T. 2005. Analysis of recombinant Plum pox virus (PPV) isolates from Serbia confirms genetic homogeneity and supports a regional origin for the PPV-Rec subgroup. *Archives of Virology*, 150 (10), 2051-2060.
- Gümüş M., Paylan I.C., Matic S., Myrta A., Sipahioglu H.M. and 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.
- Gürcan K. and Ceylan A. 2016a. Full Genome Analysis of Plum pox virus-D isolates of Turkey. 3rd International Symposium on Plum Pox Virus, 9-13 May 2016, Antalya, Turkey, 32.
- Gürcan K. and Ceylan A. 2016b. Strain identification and sequence variability of plum pox virus in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. doi:10.3906/tar-1509-97
- Gürcan K., Ceylan A., Akbulut M. and Değirmenci K. 2013a. PPV-T is common in home gardens of Central Anatolia. 2nd International Symposium on Plum Pox Virus, 3-6 September 2013, Olomouc, Czech Republic, 21.
- Gürcan K., Ceylan A., Akbulut M., Comart S., Akbaş B. and Ghaderi M. 2013b. Plum Pox Virus D in Turkey. 2nd International Symposium on Plum Pox Virus, 3-6 September 2013, Olomouc, Czech Republic, 22.
- Gürcan K., Teber S. and Değirmenci K. 2016. High sequence variability of Plum pox virus: A new divergent group of Marcus strain. Submitted to *Romanian Biotechnological Letters* (accepted).
- Herrera G. 1994. Detection of Sharka disease (plum pox virus) in an old stone fruit collection at Los Tilos Experimental Substation (INIA), Chile. *Agricultura Técnica* 54: 187-191.

- İlbağlı H. and Çıtır A. 2014. Detection and partial molecular characterization of Plum pox virus on almond trees in Turkey. *Phytoparasitica*, 42 (4), 485–491.
- İlbağlı H., Çıtır A. and Bostan H. 2008. *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 Horticulturae*, 781, 33-36.
- James D., Varga A., Thompson D. and Hayes S. 2003. Detection of a new and unusual isolate of Plum pox virus (*Prunus domestica* virus in). *Plant Disease*, 87: 1119–1124.
- Koç G. and Baloğlu S. 2006. First report of sharka in the Çukurova region of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 88 (3 suppl.): 68.
- Kurçman S. 1973. Detection of sharka virus on apricot and plum trees in Ankara. *Journal of Turk. Phytopathology*, 2: 124–129.
- Maejima K., Himeno M., Komatsu K., Takinami Y., Hashimoto M., Takahashi S., Yamaji Y., Oshima K. and Namba S. 2011. Molecular epidemiology of Plum pox virus in Japan. *Phytopathology*, 101 (5), 567–574.
- Matic S., Al-Rwahneh M. and Myrta A. 2006. Diversity of Plum pox virus isolates in Bosnia and Herzegovina. *Plant Pathology*, 55 (1), 11-17.
- Mavrodieva V., James D., Williams K., Negi S., Varga A., Mock R. and Levy L. 2013. Molecular analysis of a Plum pox virus W isolate in plum germplasm hand carried into the USA from the Ukraine shows a close relationship to a Latvian isolate. *Plant Disease*, 97, 44-52.
- Myrta A., Potere O., Boscia D., Candresse T., Cambra M. and Savino V. 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of Plum pox virus. *Acta Virology*, 42 (4), 248–250.
- Navratil M., Safarova D., Karesova R. and Petrzik K. 2006. Plum pox virus (PPV) in China. *EPPO Bulletin*, 36:207.
- Olmos A., Dasi M. A., Candresse T. and Cambra M. 1996. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 24 (11), 2192-2193.
- Palmisano F., Minafra A., Myrta A. and Boscia D. 2015. First Report of Plum Pox Virus Strain PPV-T in Albania. *Journal of Plant Pathology*, 97 (2), 391-403.
- Şahitiyancı S. 1969. Virus de la Sharka chez la prunier. *Bulletin Phytosan., FAO*, 69.
- Sheveleva A., Ivanov P., Prihodko Y., James D. and Chirkov S. 2012 Occurrence and genetic diversity of Winona-like Plum pox virus isolates in Russia. *Plant Disease*, 96 (8), 1135–1142.
- Teber S. and Gürcan K. 2016. Recombination analysis of 51 PPV isolates including 10 genomes of PPV-M Istanbul, 3rd International Symposium on Plum Pox Virus, 9-13 May 2016, Antalya, Turkey, 33.
- Thompson D., McCann M., MacLeod M., Lye D., Green M. and James D. 2001. First report of Plum pox virus in Ontario, Canada. *Plant Disease*, 85 (11), 97.

- Ulubaş Serçe C., Candresse T., Svanella-Dumas L., Krizbai L., Gazel M. and 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.
- Ulubaş Serçe Ç., Gazel M. ve Çağlayan K. 2011. Plum pox virus streynlerinin Türkiye' deki dağılımı. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş, 72.
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Delbos R.P., Mazyad H., Aboul-Ata A.E. and Dunez J. 1991. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA from a widely divergent strain (El Amar) of Plum pox potyvirus. *Journal of General Virology*, 72: 1741–1746.
- Yürektürk M. 1984. Marmara Bölgesinde Sert Çekirdekli Meyvelerde Görülen Şarka Hastalığı Üzerinde Araştırmalar. Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Yayınları, 37 s.