



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 32 (2017)
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)
doi: 10.7161/omuanajas.290191



Bursa'da *plum pox virus* (Şarka)'ün yaygınlığının ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi

Kahraman GÜRCAN

Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, Turkey
Sorumlu yazar/corresponding author:kgurcan@erciyes.edu.tr

Geliş/Received 21/01/2016 Kabul/Accepted 15/03/2016

ÖZET

Plum pox virus (PPV) tarafından oluşturulan Şarka hastalığı, sert çekirdekli meyve türlerinin en önemli viral hastalığı olarak görülmektedir. Son yıllarda yapılan nükleotid dizileme çalışmaları ile PPV'nin Türkiye'de şehir merkezi ev bahçelerinde sanıldığından daha fazla yaygınlık ve genetik çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir. Ev bahçeleri Türkiye tipi PPV-D ve PPV-T ırkları ile bulaşık iken, kapama bahçeler Avrupa tipi PPV-M ırkı ile bulaşmıştır. Bursa ili Türkiye'de önemli bir şeftali ve fidan üretim bölgesi olup, aynı zamanda Avrupa'dan gelen fidanların Türkiye içinde dağıtım merkezidir. Bu nedenle iyi izlenmesi gereken bir ildir. Bu çalışmada, Bursa ilinde surveyler yapılmış, tespit edilen PPV-pozitif örnekler ait izolatlar, Türkiye'nin diğer bölgelerinde ve Avrupa'da PPV izolatları ile karşılaştırılmıştır. Bursa ili ve civarında, 50 kapama bahçeden 118 örnek DASI-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile test edilmiş, 32 bahçeden alınan 64 örnek pozitif bulunmuştur. Bu örneklerin 664 nt uzunluğunda P3-6K1 bölgesi ve 969 nt uzunluğunda CT-3'UTR bölgesi dizilenmiş, GenBank'a kayıtlı 200 adet izolat ile birlikte analiz edilmiştir. Otuz şeftali bahçesinden alınan 56 izolatin, Türkiye kapama bahçelerinde tespit edilen Avrupa PPV-M izolatı olduğu belirlenmiştir. Bursa'da iki erik bahçesinden alınan 8 adet izolat ise PPV-D olarak tespit edilmiş olup, bu izolatlar Türkiye tipi PPV-D izolatları ile aynı grupta yer almıştır. Sonuç itibarıyla, Bursa kapama şeftali bahçelerinin Avrupa tipi PPV-M ile yaygın olarak bulaşık olduğu ve bu izolatların PPV'nin yeni giriş yaptığı Aydın, Denizli, Çanakkale, Isparta ve Kayseri illeri kapama bahçe izolatları ile yakın genetik benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, PPV-M ırkının Türkiye'de yayılmasında, Bursa-Türkiye üzerinden olan fidan trafiğinin rolüne işaret etmiştir.

Anahtar Sözcükler:

Şarka
Şeftali
Sert Çekirdekli meyveler
PPV-Marcus
PPV-Dideron

Determination of prevalence and genetic diversity of *plum pox virus* (sharka) in peach orchards in Bursa

ABSTRACT

Plum pox virus (PPV) is the most important viral disease of stone fruit species. Recent nucleotide sequencing studies have revealed that PPV is prevalent and exhibits high genetic diversity in residential gardens of several provinces in Turkey. Trees in residential gardens have been found to be infected by Turkish type PPV-D and PPV-T while trees in professional orchards in several cities have been found to be affected by the European strain PPV-M. The province Bursa is main peach producer region in Turkey but moreover Bursa hosts big nursery industry and is the distribution center of seedlings imported from European countries. In this research, surveys were made in the orchards of Bursa and surrounding regions, and comparisons were made in order to investigate genetic relationships among the isolates of Bursa and other PPV isolates determined in Turkey as well as European PPV isolates. A total of 118 samples from 50 orchards were examined by DASI-ELISA and RT-PCR methods. Of the all, 64 samples from 32 orchards were found to be infected with PPV. The P3-6K1 gene region with 664 nt length and the CP-3'UTR with 970 nt of the 64 isolates were sequenced and analyzed along with 200 sequence records in the GenBank database. Fifty-six isolates were identified as European type PPV-M. Eighth isolates from two plums orchard in Bursa were identified as PPV-D and grouped with Turkish type PPV-D. These results indicate that Bursa-Turkey seedlings traffic pathway seems to be the source of PPV-M infection in the orchards in the country.

Keywords:

Sharka
Peach
Stone fruits
PPV-Marcus
PPV-Dideron

1. Giriş

Plum pox virus (PPV) sert çekirdekli meyvelerin en önemli viral etmeni olarak kabul edilmekte olup (Cambra ve ark., 2006), moleküler bitki patolojisinde en çok çalışılan 10 bitki virüsü arasında yer almaktadır (Scholthof ve ark., 2011). PPV, şu anda bilinen bitki virüslerinin yaklaşık % 30'unu kapsayan Potyvirus cinsinin bir üyesidir. PPV sert çekirdekli meyve ağaçları için öldürücü değildir, fakat olgunlaşmadan meyve dökümüne neden olur, verimi düşürür ve meyve pazar değerini yok eder. Hastalığın belirtileri olarak klorotik lekeler, yaprak veya meyve halkaları, yapraklarda bükülme, meyvelerde koflaşma, şişkinlikler, renk açılmaları, kayısı çekirdeklerinde halkalı lekeler, şeftali çiçeklerinde renk açılmaları sayılabilir. Enfeksiyon bir kez başladıktan sonra, virüsün sert çekirdekli meyve üreten bölgelerde kontrolü oldukça zordur (Cambra ve ark., 2006).

PPV'nin sekiz ırkı tanımlanmıştır: C (Chery), Cr (Cherry Russia), D (Dideron), M (Marcus), EA (El Amar), Rec (Recombinant), T (Turkey) ve W (Winona) (García ve ark., 2014). Son olarak An (Ancestor Marcus), yeni bir ırk olarak önerilmiştir (Palmisano ve ark., 2012; García ve ark., 2014). PPV-D ve PPV-M epidemiyolojik olarak ilk tanımlanan (Kerlan ve Dunez, 1979) iki yaygın gruptur. PPV-M, Güney, Doğu ve Orta Avrupa'da oldukça yaygındır (Myrta ve ark., 2001). PPV-M ilk olarak Yunanistan'da şeftaliden izole edilmiştir. Şeftalide yaygın olduğu gibi kayısı ve erik ağaçları da yaygın konukçusudur. Bir çok ülkede PPV-D ırkı rapor edilmiştir (James ve ark., 2013). PPV-D, Avrupa'dan sonra Kuzey Amerika (Levy ve ark., 2000), Güney Amerika (Roy ve Smith, 1994) ve Japonya'da (Maejima ve ark., 2011) rapor edilmiştir. PPV-Rec, PPV-D ve M'den sonra en yaygın ırk olup, Orta ve Doğu Avrupa'da yayılmış (Glasa ve ark., 2004); Türkiye'de (Candresse ve ark., 2007; Gürcan ve Ceylan, 2016b) ve Kanada'da (Thompson ve ark., 2001) tespit edilmiştir. PPV-An Arnavutluk'ta (Palmisano ve ark., 2012); PPV-C, Moldova'da (Kalashyan ve ark., 1994) ve Güney İtalya'da (Crescenzi ve ark., 1997); PPV-CR, Rusya'da (Glasa ve ark., 2013); PPV-EA, Mısır'da kayısı ağaçlarında (Wetzel ve ark., 1991) rapor edilmiştir. PPV-T, Türkiye (Ulubaş Serçe ve ark., 2009); PPV-W, Kanada (James ve ark., 2003) ve Avrupa'da (Glasa ve ark., 2011) rapor edilmiştir.

Türkiye'de PPV ilk olarak yaklaşık yarım yüzyıl önce Edirne'de erikte tespit edilmiştir (Şahtiyancı, 1969; Kurçman, 1973). Sonraki yıllarda, Adana, Aydın, Ankara, Antalya, Aksaray, Edirne, Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çanakkale, Denizli, Eskişehir, Kayseri, Kırklareli, Konya, İstanbul, İzmir, İzmit, Manisa, Mersin, Sakarya, Samsun, Tekirdağ ve Yalova illerinde (Akbaş ve ark., 2011; Candresse ve ark., 2007; Ceylan ve ark., 2014; Çelik ve Topkaya Kütük 2013; Çıtır ve İlbağı, 2008; Deligöz ve ark., 2015; Elibüyük 2004; Gümüş ve ark., 2007; Gürcan ve ark., 2016; Gürcan ve

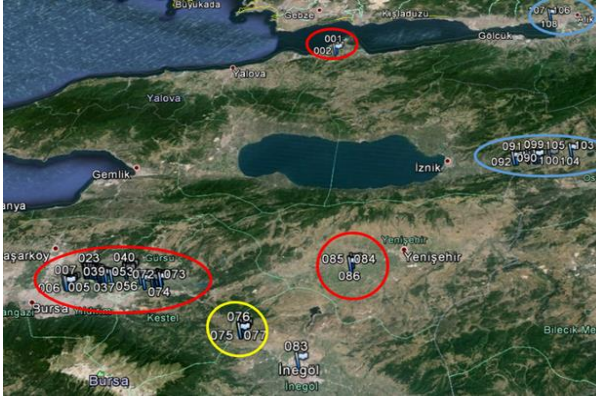
Ceylan, 2016b; İlbağı ve Çıtır, 2014; İlbağı ve ark., 2008; İlbağı ve Çıtır, 2014; Koç ve Baloğlu, 2006; Ulubaş Serçe ve ark., 2011) PPV tespit edilmiştir. Türkiye'de PPV birçok kez rapor edilmesine rağmen, genelde serolojik test kullanılması, ırk belirlemeye yönelik antikörlerin piyasada yeterince bulunmaması ve dizi analizi çalışmalarının son yıllara kadar mümkün olmaması gibi nedenlerden dolayı birçok bölgede PPV ırkı ve genetik varyasyonları rapor edilememiştir. Son yıllarda yapılan nükleotid dizileme çalışmaları, Türkiye'de PPV-D, M ve T ırklarının yaygın olduğunu göstermiştir. Nükleotid dizilemeye dayalı olarak PPV-M izolatu, Bursa, Aydın, Çanakkale, Denizli, Isparta ve Kayseri (Gürcan ve Ceylan, 2016b) illeri kapama bahçelerinde saptanmıştır. Bu illerde bulunan M izolatlarının filogenetik ağaçta Avrupa M izolatları ile birlikte grup oluşturduğu görülmüştür. Aynı zamanda, Türkiye'ye özgün bir PPV-M gurubu ise, sadece İstanbul'da bulunmuştur (Gürcan ve ark., 2016). Türkiye'ye özgün İstanbul-M ırkının 10 izolatının tüm genomu dizilenmiştir (Teber ve Gürcan, 2016). Dizilemeye dayalı olarak PPV-D ırkı Türkiye'de; Aksaray/Ortaköy ve yakın köylerinde, Ankara, Bursa, Eskişehir, İstanbul, Konya ve Tekirdağ illerinde rapor edilmiştir (Gürcan ve Ceylan, 2016b). D izolatlarının 6 âdetinin tüm genomu dizilenmiş, filogenetik ağaçta Türkiye PPV-D izolatlarının bir grup, dünyanın geri kalan ülkelerinin izolatlarının ise, ayrı bir grup oluşturduğu görülmüştür. Sonuçlar, Türkiye D izolatlarının Avrupa D izolatlarından farklı bir evrim tarihine sahip olabileceğine işaret etmiştir (Gürcan ve Ceylan, 2016a). Türkiye dışında sadece Arnavutluk'ta rapor edilen (Palmisano ve ark., 2015) PPV-T ırkı, Türkiye'de Ankara, İzmir, İstanbul, Kayseri, Konya, Tekirdağ ve Samsun illerinde tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe ve ark., 2009; Ulubaş Serçe ve ark., 2011; İlbağı ve Çıtır, 2014; Deligöz ve ark., 2015; Gürcan ve Ceylan, 2016b).). Son yıllarda, Türkiye T izolatlarının 15 âdetinin tüm genomu dizilenmiştir (Ulubaş Serçe ve ark., 2009; Ceylan ve ark., 2015). PPV-Rec ise, Isparta (Candresse ve ark., 2007) ve Bursa'da (Gürcan ve Ceylan, 2016b) rapor edilmiştir.

Türkiye'de önemli bir şeftali üretim bölgesi olan Bursa, aynı zamanda oldukça önemli bir fidan üretim yeri ve Avrupa'dan gelen fidanların Türkiye içinde dağıtım merkezilerinden biridir. Bursa ili, Türkiye fidan trafiğinde ve dolayısıyla bitkisel materyal ile taşınan meyve hastalıklarının Türkiye içinde yayılmasında önemli potansiyele sahiptir. Bursa'da PPV'nin mevcut olduğu 2011 ve 2016 yıllarında yayımlanan çalışmalarla belirlenmiştir. (Akbaş ve ark., 2011; Gürcan ve Ceylan, 2016b). Bu çalışmada farklı şehirlerde kapama bahçelerde hastalık yapan PPV izolatları ile Bursa izolatları arasındaki moleküler benzerlik araştırılmış, böylece PPV'nin kapama bahçelere bulaşma rotası belirlenmeye çalışılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Survey

Bursa ili ve civarında kapama sert çekirdekli meyve bahçeleri, 2015 ve 2016 Mayıs aylarında PPV belirtileri bakımından incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda 50 bahçede surveyler yapılmış ve PPV'nin yapraklarda tipik belirtileri, sarıdan açık yeşile değişen halka ve lekeler, çizgi ve bantlar; meyvede deformasyon, halka ve şişkinlik belirtileri araştırılmıştır. Survey yapılan bölgenin Google Earth görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Örneklerin alındığı bölgeleri gösteren Google Earth görüntüsü

Şekil 1. de kırmızı daire içine alınan üç bölge PPV-M ile bulaşık alanları göstermektedir. Sarı daire PPV-D ile bulaşık örneklerin toplandığı, mavi ise örneklerin negatif çıktığı iki bölgeyi göstermektedir. GPS rakamlarının yoğunluğu ile pozitif örnek yoğunluğu orantılı değildir. En çok örnek Bursa Merkez ve Gürsu civarındaki bahçelerden alınmıştır. Google Earth genişletilip bu bölge odaklandığında tüm örneklerin alındığı noktalar görülebilmektedir.

2.2. Double Antibody Sandwich Indirect (DASI)-ELISA Testi

Surveyler sırasında toplanan yaprak örnekleri araba tipi buzdolabı içinde Kayseri'ye getirilmiş ve laboratuvarında Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Teşkilatı (European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) protokolüne göre 1 gr yaprak, 20 ml ekstraksiyon çözeltisi içinde homojenize edilmiştir (EPPO 2004). Ekstraksiyon çözeltisi, Phosphate buffer saline (PBS), % 2 Polyvinylpyrrolidone (PVP-10) ve % 0.2 sodium diethyl dithiocarbamate (DIECA) karıştırılarak hazırlanmıştır. Homojenize edilmiş örnekler -20 °C'de muhafaza edilmiştir. DASI-ELISA, PPV'ye özgü antikor 5B-IVIA kullanılarak yapılmıştır. DASI-ELISA kitleri, Real, (Valencia, İspanya) şirketinden satın alınmış ve testler, üretici firmanın talimatlarına ve EPPO protokolü (2004)'ne göre yapılmıştır. Testler 96 kuyuluk ELISA pleytlerinde

yapılmış ve her örnek için ikişer kuyu kullanılmıştır. Her ELISA pleytinde negatif, pozitif ve tampon kontrol bulunmuş ve okumalar, PowerWave 200 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda, 30, 60 ve 90'inci dakikalarda olmak üzere üçer kez yapılmıştır. Negatif kontrolün en az 2 katı ve üzeri optik yoğunluğa (optical density; OD) sahip örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

2.3. RT-PCR

Homojenize örneklerden alınan 300 µl ekstrakt RNA izolasyonu için kullanılmıştır. Total RNA'lar Geneaid marka ticari kit (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan) kullanılarak izole edilmiştir. RNA miktarı NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. cDNA'lar Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) ters transkriptaz (Invitrogen, ON, Kanada) kullanarak üretici firmanın protokolü modifiye edilerek elde edilmiştir. Özetle, 1 µl 70 µM Oligo(dT)23 ve 1 µl 10 mM dNTP, 10 µl RNA (ortalama 30 ng/ml RNA) ile karıştırılıp, 5 dakika 65°C'de tutulmuş, daha sonra buzun üzerinde soğutulmuştur. Üzerine karışım B [4 µl 5X First-Strand Buffer, 2 µl 0.1 M DTT ve 1 µl (200 U) M-MLV] eklenmiş ve 37 °C'de 50 dk, 70 °C 'de 15 dk tutulmuştur. PPV'ye özgün iki primer çifti kullanılarak PCR yöntemiyle cDNA çoğaltılmıştır. Birinci primer çifti PPV genomunda 2915 ve 3750 nt arasındaki 835 nükleotidlik bölgeyi çoğaltmakta olup (Numaralandırma GenBank AJ243957 numaralı izolata göre yapılmıştır), P3 genin 3' bölgesini (580 nt), 6K1 geninin tamamını (156 nt) ve CI geninin 100 nt 5' bölgesini içermektedir. Bu bölge için 5' primer PP3 ve 3' primer PCI primer dizisi Glasa ve ark., (2002) tarafından geliştirilmiştir. İkinci bölge olarak ise PPV Genomunda 8727-9784 nt arası (Numaralandırma GenBank emb|HF585104.1 numaralı izolata göre yapılmıştır) çoğaltılmıştır. Bu bölge PPV genomunun 3' kılıf proteini (842nt) bölgesini ve 3' UTR (215 nt)'sini içermektedir. Bu bölge için 5' primer (5'-CCAGCAACAACCTCAGCCTGC-3') ve 3' primer (5'-CTCTTGACAAAGAACTAT-3') Primer3 programı kullanılarak geliştirilmiştir.

PCR karışımı 25 µl toplam hacimde: 2.5 µl 10X Taq Buffer, 25 mM MgCl₂, 5 mM dNTP 0.5 µl Taq polimeraz (5 U), 25 µM 5' primer, 25 µM 3' primer ve 2.5 µl cDNA içerecek şekilde hazırlanmış ve Thermal Cycler cihazında (T100 Termal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) çoğaltım gerçekleştirilmiştir. PCR programı 94 °C'de 3dk ve 35 döngü 94 °C'de 30 sn, 60 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1,5 dk ile son olarak 72 °C'de 15 dk son uzama olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR ürünlerinden 7'şer µl'si 0.5 µg/ml oranında ethidium bromid içeren % 2'lik agaroz jele yüklenmiş ve 1X TBE tamponu içinde 100 V' ta 3 saat süre ile yürütülmüştür. Sonuçlar, DNA görüntüleme cihazında UV ışık altında gerçekleştirilmiştir. Kalan PCR ürünleri nükleotid dizileme çalışması için

kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.4. Dizi analizi

PCR ürünleri önce ExoSap uygulanarak temizlenmiştir. Bunun için Exonuclease I'den 0,5 µl ve Shrimp Alkaline Phosphatase enziminden 1 µl, 5 µl PCR ürünü ile karıştırılıp 37 °C'de 30 dk ve 80 °C'de 15 dakika inkube edilmiştir. Parçaların dizinlenmesinde BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılmıştır. Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) ile konsantrasyonu belirlenen bir önceki aşamanın ürününden 8 ng alınmış, 2 µl BigDye reaksiyon karışımı, 2 µl Sequencing Buffer ve 1.2 pM primer eklenmiş, saf su ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. PCR döngüsü olarak 95 °C'de 1 dk tutulmuş ve 35 döngü çoğaltım aşaması (95°C'de 1 dk, 50 °C'de 15sn, 60 °C'de 4 dk) gerçekleştirilmiştir. Sekans PCR'ından çıkan ürün ve BigDye Xterminator saflaştırma kiti

(Applied Biosystems) kullanılarak temizlenmiştir. Bunun için 40 µl SAM solüsyonu ve 10 X Terminator solüsyonu ile karıştırılıp 30 dk 2200 rpm'de tutulmuş ve sonra 1000 rpm'de 2 dakika çöktürüldükten sonra ABI 3500 DNA Analiz (Applied Biosystems) cihazına yüklenmiştir. DNA dizileri öncelikle BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) programı kullanılarak görselleştirilmiş ve hatalı üretilen diziler çalışmadan çıkarılmıştır. Bu çalışmada 64 izolatın 116 parça dizi elde edilmiş ve diziler GenBank'a kaydedilmiştir (Çizelge 1). İzolatların isimlendirilmesinde önce şehir ismi kısaltması, sonra meyve türü kısaltması, daha sonra ise GPS numarası kullanılmıştır. Örneğin BrPc10 isimli izolatta Br= Bursa, Pc= Şeftali (Peach), ve 10= GPS numarasını göstermektedir (Çizelge 2). Referans olarak ilk başta GenBank'ta bulunan tüm izolatlar ait P3-6K1 veya CP-3'UTR bölgeleri indirilmiş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Çizelge 1. Örnek bilgileri ve GenBank kayıt numaraları

GenBank Kayıt No					
Bahçe No.	Tür	Yer	Strain	P3-6K1	Kılıf+3'UTR
1, 4	Şeftali	Yalova/Subaşı	M	KX423842-846	KX423897-901
6	Şeftali	Bursa/Samanlı	M	KX423847-850	KX423902-905
10,12,13,14,15,16	Şeftali	Bursa/Kumlukalanı	M	KX423851-858	KX423906-915
17,18,19,20	Şeftali	Bursa/Gürsu	M	KX423859-862	KX423916-920
21,22,23,24,25	Şeftali	Bursa/Hasanköy	M	KX423863-869	KX423921-930
26,27	Şeftali	Bursa/Adaköy	M	KX423870-872	KX423931-935
28,29,31,32,33,34	Şeftali	Bursa/Serme	M	KX423873-881	KX423936-944
35,36	Erik	Bursa/Şehitler	D	KX423882-889	KX423945-952
39	Şeftali	Bursa/Çeltikli	M	-	KX423953
40	Şeftali	Bursa/Yolören	M	KX423890	KX423954
49,50	Şeftali	Bursa	M	KX423891-896	KX423955-957

Fakat özellikle PPV-D ve PPV-M ırkları için CP-3' UTR bölgesi; PPV-T ırk için ise P3-6K1 bölgesi fazla olduğunda, GenBank örnek sayısı azaltılarak tekrar filogenetik ağaç kurulmuştur. Örnek sayısı azaltılırken PPV'de genetik çeşitliliği temsil edecek, filogenetik ağaç üzerinde mesafeli dağılmış, farklı ülkelerden izolatların seçilmesine dikkat edilmiştir. PPV-an, PPV-C, PPV-CR, PPV-EA, PPV-Rec, PPV-W ırklarından ise, bulunan tüm örnekler alınmıştır. Son kertede bu çalışma kapsamında sunulan filogenetik ağaçlarda 199 adet PPV izolatının kayıtlı P3-6K1 veya CP-3'UTR Bursa dizileri ile birlikte çalışılmıştır. GenBank izolatlarının kayıt numaraları Çizelge 2.' de verilmiştir. GenBank İzolatlarından 100 adeti daha önce Türkiye'den rapor edilenler olup, bunların 37 adeti Türkiye' D izolatı, 25 adeti Avrupa PPV-M izolatı, 21 adeti İstanbul-M izolatı, ve 17 adeti PPV-T izolatıdır. Geriye kalan 99 örnek ise farklı ülkelerden rapor edilen

GenBank'a kaydedilmiş izolatlardır. Tüm diziler öncelikle BioEdit (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) programı kullanılarak eşleştirilmiş, 664 bazlık konsensuslar üretilmiştir. Konsensus parçalar Mega 6 (Tamura ve ark., 2013) 1000 Bootstrap değeri seçilerek Neighbour-joining (NJ) filogenetik ağacı elde edilmiştir. Maximum Likelihood, Minimum Evolution, UPGMA ve Maximum Parsimony ağaçları da üretilmiş, fakat Neighbour-joining ağacından farklı bir ağaç elde edilmediği için Neighbour-joining filogenetik ağacı görüntüsü esas alınmıştır. Gruplar arası tahmini evrimsel benzerlik ve iraksaklık (Estimates of average evolutionary similarity and divergence) ve grup için genetik varyasyon değerleri (the intragroup genetic variability) Maximum Composite Likelihood modeli (Tamura ve ark., 2004) kullanılarak Mega 6 programında hesaplanmıştır.

Çizelge 2. Filogenetik Analizlerde Kullanılan GenBank İzolatları

İzolat	Şehir/Ülke	İrk	Konukçu*	GenBank No	
				P3-6K1	CP+3'UTR
AL11pl	Arnavutluk	An	<i>P. domestica</i>	HF674399	HF674399
BY101	Belarus	C	<i>P. hybrid cultivar L2</i>	HQ840517	HQ840517
BY181	Belarus	C	<i>P. hybrid cultivar OWP-6</i>	HQ840518	HQ840518
SoC	Buğdan	C	-	AY184478	AY184478
SwC	İtalya	C	-	Y09851	Y09851
Volk143	Rusya	C	<i>P. cerasus</i>	-	KJ787006
RU-17sc	Rusya	CR	Vişne	KC020124	KC020124
RU-18sc	Rusya	CR	Vişne	KC020125	KC020125
RU-30sc	Rusya	CR	Vişne	KC020126	KC020126
92011	Fransa	D	-	AF357545	-
93080	Fransa	D	-	AF357546	-
48-922	Kanada	D	<i>P. persica</i>	-	AY912058
48-922	Kanada	D	<i>P. persica</i> (Redhaven peach)	AY912058	-
Ak1	Japonya	D	<i>P. mume</i> cv. Nanko	-	AB576045
Ak3	Japonya	D	<i>P. mume</i>	AB576047	-
AkOrAp166	Aksaray/Türkiye	D	Kayısı	KM410026	-
AkOrAp187	Aksaray/Türkiye	D	Kayısı	KM410029	-
AkOrPl284	Aksaray/Türkiye	D	Erik	KM410027	-
AnCnAp14	Ankara/Türkiye	D	Kayısı	KM409736	-
AnCnAp56	Ankara/Türkiye	D	Kayısı	KM410040	-
AnCnAp57	Ankara/Türkiye	D	Kayısı	KM410037	-
AnCnAp63	Ankara/Türkiye	D	Kayısı	KM410038	-
AnCnAp64	Ankara/Türkiye	D	Kayısı	KM410039	-
AnCnPl10	Ankara/Türkiye	D	Erik	KM409735	-
BIII/2	Slovakya	D	<i>P. domestica</i> (plum)	-	GU461890
BrInPl241	Bursa/Türkiye	D	Erik	KM410030	-
BrInPl243	Bursa/Türkiye	D	Erik	KM410028	-
BrInPl244	Bursa/Türkiye	D	Erik	KM410031	-
Ca123-1	Kanada	D	<i>P. persica</i>	AY953267	-
Ca3	Kanada	D	<i>P. persica</i>	AY953262	-
Cdn 12	Kanada	D	<i>P. domestica</i>	-	AY953266
Cdn 4	Kanada	D	<i>P. persica</i>	-	AY953263
Cdn 5	Kanada	D	<i>P. persica</i>	AY953264	AY953264
Cdn1	Kanada	D	<i>P. domestica</i>	AY953261	AY953261
Cdn7-2	Kanada	D	<i>P. glandulosa</i>	AY953265	-
D	Fransa	D	-	-	X16415
EsGrAp260	Eskişehir/Türkiye	D	Kayısı	KM410033	-
EsMrAp258	Eskişehir/Türkiye	D	Kayısı	KM410034	-
EsMrAp259	Eskişehir/Türkiye	D	Kayısı	KM410041	-
Fantasia	Kanada	D	<i>P. persica</i> var. nectarina	-	AY912056
Ha2	Japonya	D	<i>P. mume</i>	AB576049	AB576049
Ha3	Japonya	D	<i>P. mume</i>	AB576050	-
Ha4	Japonya	D	<i>P. mume</i>	AB576051	AB576051
Hi2	Japonya	D	<i>P. mume</i> cv. Shirokaga	-	AB576053
IsUsAp219	İstanbul/Türkiye	D	Kayısı	KM410032	-
isAp34	İstanbul/Türkiye	D	Kayısı	KT230757	KT827117
isAp95	İstanbul/Türkiye	D	Kayısı	KT230781	-
isPl150	İstanbul/Türkiye	D	Erik	KT230806	KT827161
isPl174	İstanbul/Türkiye	D	Erik	KT230810	KT827168
isPl192	İstanbul/Türkiye	D	Erik	KT230816	KT827174
isPl215	İstanbul/Türkiye	D	Erik	KT230824	KT827181
isPl237	İstanbul/Türkiye	D	Erik	KT230828	KT827184
isPl5	İstanbul/Türkiye	D	Erik	KT230749	KT827109
KnAnPl152	Konya/Türkiye	D	Erik	KM410036	-

Çizelge 2 (Devamı). Filogenetik analizlerde kullanılan GenBank izolatları

İzolat	Şehir/Ülke	İrk	Konukçu*	GenBank No	
				P3-6K1	CP+3'UTR
KnMrAp152	Konya/Türkiye	D	Kayısı	KM410035	-
KnMrAp18	Konya/Türkiye	D	Kayısı	KM409733	-
KnMrAp33	Konya/Türkiye	D	Kayısı	KM409734	-
KnMrAp6	Konya/Türkiye	D	Kayısı	KM409731	-
KnMvAp335	Konya/Türkiye	D	Kayısı	KM410043	-
KnMvAp336	Konya/Türkiye	D	Kayısı	KM410044	-
KnMvAp343	Konya/Türkiye	D	Kayısı	KM410042	-
Ok2	Japonya	D	<i>P. mume</i>	AB576057	-
Ou1	Japonya	D	<i>P. mume</i> cv. Nanko	-	AB545926
Ou14	Japonya	D	<i>P. mume</i> cv. Kurenai	-	AB576068
Ou16	Japonya	D	<i>P. mume</i>	-	AB576070
Ou7	Japonya	D	<i>P. mume</i>	AB576063	-
PENN2	ABD	D	<i>P. domestica</i>	-	AF401296
Penn3	ABD	D	Şeftali	-	DQ465242
Penn4	ABD	D	-	EF611248	-
Penn4	ABD	D	Şeftali	-	DQ465243
Penn7	ABD	D	Şeftali	-	EF640935
Penn9	ABD	D	Şeftali	-	EF640937
SK-272pe	Slovakya	D	<i>P. persica</i>	-	HF585098
TkCoAp16	Tekirdağ/Türkiye	D	Kayısı	KM409738	-
TkCoAp19	Tekirdağ/Türkiye	D	Kayısı	KM409744	-
TkCoP115	Tekirdağ/Türkiye	D	Erik	KM409737	-
TkMtAp1	Tekirdağ/Türkiye	D	Kayısı	KM409745	-
TkMtAp2	Tekirdağ/Türkiye	D	Kayısı	KM409746	-
Vulcan	Kanada	D	<i>P. persica</i>	-	AY912057
ElAmar	-	EA	-	AM157175	AM157175
ElAmar	Mısır	EA	<i>P. armeniaca</i>	-	DQ431465
91003	-	M	-	AF357548	-
91006	-	M	-	AF357549	-
94061	-	M	-	AF357547	-
AyMcAp191	Aydın/Türkiye	M	Kayısı	KM409962	-
AyMcAp192	Aydın/Türkiye	M	Kayısı	KM409963	-
AyYpAp199	Aydın/Türkiye	M	Kayısı	KM409966	-
AyYpAp200	Aydın/Türkiye	M	Kayısı	KM409967	-
AyYpAp201	Aydın/Türkiye	M	Kayısı	KM409960	-
AyYpAp202	Aydın/Türkiye	M	Kayısı	KM409964	-
AyYpAp203	Aydın/Türkiye	M	Kayısı	KM409959	-
AyYpAp204	Aydın/Türkiye	M	Kayısı	KM409961	-
BG1	Bulgaristan	M	Erik	EF626559	-
BG2	Bulgaristan	M	Şeftali	EF626560	-
BG3	Bulgaristan	M	Şeftali	EF626561	-
BG4	Bulgaristan	M	Şeftali	EF626562	-
BG5	Bulgaristan	M	Şeftali	EF626563	-
BG6	Bulgaristan	M	-	EF626564	-
CnKlPc26	Çanakkale/Türkiye	M	Şeftali	KM409952	-
CnKlPc264	Çanakkale/Türkiye	M	Şeftali	KM409954	-
CnKlPc265	Çanakkale/Türkiye	M	Şeftali	KM409948	-
CnKlPc27	Çanakkale/Türkiye	M	Şeftali	KM409953	-
CnKlPc28	Çanakkale/Türkiye	M	Şeftali	KM409950	-
CY1	Kıbrıs	M	-	EF626584	-
CY2	Kıbrıs	M	-	EF626585	-
CZ1	Çek Cumhuriyeti	M	Kayısı	EF626566	-
CZ2	Çek Cumhuriyeti	M	Şeftali	EF626565	-
DnKoAp189	Denizli/Türkiye	M	Kayısı	KM409955	-
DnKoAp190	Denizli/Türkiye	M	Kayısı	KM409956	-

Çizelge 2 (Devamı). Filogenetik analizlerde kullanılan GenBank izolatları

İzolat	Şehir/Ülke	İrk	Konukçu*	GenBank No	
				P3-6K1	CP+3'UTR
FR3	Fransa	M	Şeftali	EF626568	-
FR4	Fransa	M	Şeftali	EF626569	-
GR0019	Yunanistan	M	-	FM955843	FM955843
GR1	Yunanistan	M	-	EF626580	-
GR2	Yunanistan	M	-	EF626578	-
GR3	Yunanistan	M	Kayısı	EF626579	-
IpMrPc168	İstanbul/Türkiye	M	Şeftali	KM409946	-
IpMrPc169	Isparta/Türkiye	M	Şeftali	KM409951	-
IpMrPc170	Isparta/Türkiye	M	Şeftali	KM409949	-
IpMrPc171	Isparta/Türkiye	M	Şeftali	KM409968	-
IpMrPc40	İstanbul/Türkiye	M	Şeftali	KM409947	-
IpMrPc42	Isparta/Türkiye	M	Şeftali	KM409969	-
IsInAp246	İstanbul/Türkiye	M	Kayısı	KM409957	-
IT1	İtalya	M	Erik	EF626581	-
IT2	İtalya	M	Erik	EF626582	-
IT3	İtalya	M	Şeftali	EF626583	-
isAp140	İstanbul/Türkiye	M	Kayısı	KT230800	KT827155
isAp156	İstanbul/Türkiye	M	Kayısı	KT230808	KT827163
isAp165	İstanbul/Türkiye	M	Kayısı	-	KT827165
isAp97	İstanbul/Türkiye	M	Kayısı	-	KT827139
isPI109	İstanbul/Türkiye	M	Erik	-	KT827144
isPI129	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230793	-
isPI130	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230794	KT827150
isPI141	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230801	-
isPI152	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230807	-
isPI189	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230815	-
isPI195	İstanbul/Türkiye	M	Erik	-	KT827175
isPI199	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230818	KT827176
isPI2	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230748	KT827108
isPI201	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230819	KT827177
isPI29	İstanbul/Türkiye	M	Erik	-	KT827114
isPI32	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230756	KT827116
isPI50	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230761	-
isPI54	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230765	KT827124
isPI60	İstanbul/Türkiye	M	Erik	-	KT827126
isPI92	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230779	KT827136
isPI98	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KT230784	-
KyYhPI2	Kayseri/Türkiye	M	Erik	KM409958	-
KyYhPI3	Kayseri/Türkiye	M	Erik	KM409965	-
KyYhPI5	İstanbul/Türkiye	M	Erik	KM409945	-
PS	Sırbistan ve Karadağ	M	P. sp.	AJ243957	AJ243957
RS1	Sırbistan ve Karadağ	M	Şeftali	EF626570	-
RS2	Sırbistan ve Karadağ	M	Erik	EF626571	-
RS3	Sırbistan ve Karadağ	M	Erik	EF626572	-
RS4	Sırbistan ve Karadağ	M	Kayısı	EF626573	-
RS5	Sırbistan ve Karadağ	M	Şeftali	EF626574	-
RS6	Sırbistan ve Karadağ	M	Şeftali	EF626575	-
SK 68	Macaristan	M	-	-	M92280
SK1	Slovakya	M	Şeftali	EF626576	-
SK2	Slovakya	M	Şeftali	EF626577	-
VAR-2/531	Slovakya	M	<i>P. persica</i>	HF585100	HF585100
VAR-2/551	Slovakya	M	<i>P. persica</i>	HF585101	HF585101
VAR-2/B23	Slovakya	M	<i>P. persica</i>	HF585104	-
VAR-2/M13	Slovakya	M	<i>P. armeniaca</i>	HF585103	-
VAR-2/SE	Slovakya	M	<i>P. domestica</i>	HF585102	-

Çizelge 2 (Devamı). Filogenetik analizlerde kullanılan GenBank izolatları

İzolat	Şehir/Ülke	İrk	Konukçu*	GenBank No	
				P3-6K1	CP+3'UTR
BOR-3	Slovakya	Rec	<i>P. armeniaca</i>	JQ794501	AY028309
BULG	Bulgaristan	Rec	<i>P. domestica</i> (<i>plum</i>)	GU461889	GU461889
Cdn08	Kanada	Rec	<i>Plum rootstock</i> <i>cultivar</i>	HG964685	HG964685
Cdn10	Kanada	Rec	<i>Plum rootstock</i> <i>cultivar</i>	HG964686	-
IsHkPc218	İstanbul/Türkiye	Rec	Şeftali	KM409970	-
J4c	Polonya	Rec	<i>P. domestica</i>	EU117116	EU117116
Kisl-1pl	Rusya	Rec	<i>P. domestica</i>	-	KM273015
KRN-1	Slovakya	Rec	<i>P. domestica</i>	AF450314	-
MYV-1	Slovakya	Rec	<i>P. domestica</i>	AF450315	-
o6	Sırbistan	Rec	<i>P. persica</i> (<i>peach</i>)	GU474956	GU474956
Rec(K18)	Ukrayna	Rec	<i>P. cerasifera</i>	-	KF472134
SK-514	Slovakya	Rec	<i>P. armeniaca</i>	-	LN614587
Valjevka	Hırvatistan	Rec	<i>P. domestica</i>	JX013532	JX013532
AbTk	Türkiye	T	<i>P. armeniaca</i>	-	EU734794
Ap39	Türkiye	T	Kayısı	EU734797	-
isAp70	İstanbul/Türkiye	T	Kayısı	KT230771	-
isAp85	İstanbul/Türkiye	T	Kayısı	KT230775	-
isAp87	İstanbul/Türkiye	T	Kayısı	KT230776	KT827134
isAp88	İstanbul/Türkiye	T	Kayısı	KT230777	-
isAp89	İstanbul/Türkiye	T	Kayısı	KT230778	KT827135
isAp93	İstanbul/Türkiye	T	Kayısı	KT230780	KT827137
isPc75	İstanbul/Türkiye	T	Şeftali	KT230772	KT827131
isP117	İstanbul/Türkiye	T	Erik	KT230788	KT827146
isP1121	İstanbul/Türkiye	T	Erik	KT230789	-
isP1122	İstanbul/Türkiye	T	Erik	KT230790	-
isP1123	İstanbul/Türkiye	T	Erik	KT230791	KT827147
isP165	İstanbul/Türkiye	T	Erik	KT230769	KT827129
isP166	İstanbul/Türkiye	T	Erik	KT230770	KT827130
isP176	İstanbul/Türkiye	T	Erik	KT230773	-
PI45	Türkiye	T	Erik	EU734802	-
LV-141pl	Letonya	W	Erik	-	HQ670746
LV-145bt	Letonya	W	Erik	HQ670748	HQ670748
UKR44189	Ukrayna	W	<i>P. spinosa</i>	N596110	N596110
W3174	Kanada	W	<i>P. domestica</i>	AY912055	AY912055
Winona	Rusya	W	<i>P. domestica</i>	-	KC347608

*Konukçu ismi GenBank'da belirtildiği gibi verilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Bursa ili ve civarında kapama bahçelerde PPV enfeksiyonu incelenmiş, 50 ticari bahçeden 102'ü şeftali ve 16 erik olmak üzere 118 örnek toplanmıştır. Bursa'da beklendiği gibi şeftali bahçelerinin yoğun olduğu görülmüştür. Survey güzergâhında diğer sert çekirdekli meyve türlerinden sadece erik türünde kapama bahçelere rastlanmış, kapama badem, kayısı, kiraz ve vişne bahçesi görülmemiştir. PPV belirtisi taşıyan yapraklar üzerinde lekeler, damar boyu renk açılmaları, renkli halkalar olarak gözlenmiştir. Örnek toplama Mayıs ayında gerçekleştirildiğinden olgunlaşmış meyvelerde belirtisi gözleme imkânı olmamıştır. 118 örnek DASI-ELISA ve RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir. Her örnek DASI-ELISA ile iki kez test edilmiş ortalama değerler alınmıştır. Ortalama OD değerleri 0.07 ile 2.835 arasında değişmiştir. Pozitif örneklerin OD değerinin 0.532 üzerinde olduğu

gözlenmiştir. Survey çalışmasında PPV belirtisi gösteren 55 örnek ve belirti göstermeyen 9 örnek olmak üzere toplamda 64 (% 54) örnek serolojik yöntem sonucunda da pozitif çıkmıştır. 50 kapama bahçenin 32 (%64)'sinde pozitif örnek tespit edilmiştir. 118 örneğin tamamı için cDNA elde edilmiş ve daha sonra bu cDNA örnekleri iki primer çifti ile çoğaltılmıştır. Serolojik yöntem ile pozitif bulunan 64 örneğin tamamı için iki amplikon bölgesinden en az biri başarılı olarak çoğaltılmış ve PPV varlığı moleküler yöntem ile de desteklenmiştir.

RT-PCR ile çoğaltılan amplikonlar dizilenmiş, toplamda 55 örneğin P3-6K1 bölgesi, 61 örneğin CP-3'UTR bölgesi temiz olarak dizilenmiştir. 55 adet P3-6K1 bölgesi için ilk sekans ürünlerinin 5' ve 3' bölgesindeki belirsiz nükleotidleri içeren uç kısımları temizlendikten sonra 664 nt uzunluğunda temiz diziler elde edilmiştir. Dizisi elde edilen 644nt'lik bölgenin 551 bazlık kısmı P3 geninin 3' bölgesini içerirken, 153 bazlık kısmı ise 6K1 geninin 5' bölgesine denk

gelmektedir. Altmış bir adet ham CP-3'UTR bölgesi dizileri temizlendikten sonra 786 nt kısmı kılıf geni, ve 183 nt ise 3' UTR olmak üzere güvenilir 969 nt uzunluğunda parça elde edilmiştir. Temiz nükleotidler GenBank'a kaydedilmiş ve kayıt numaraları Çizelge 1'de verilmiştir. Erik bahçelerine survey güzergâhında fazla rastlanılmamış şeftali bahçelerinin ise çok yaygın olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle daha fazla şeftali ağacı incelenmiştir.

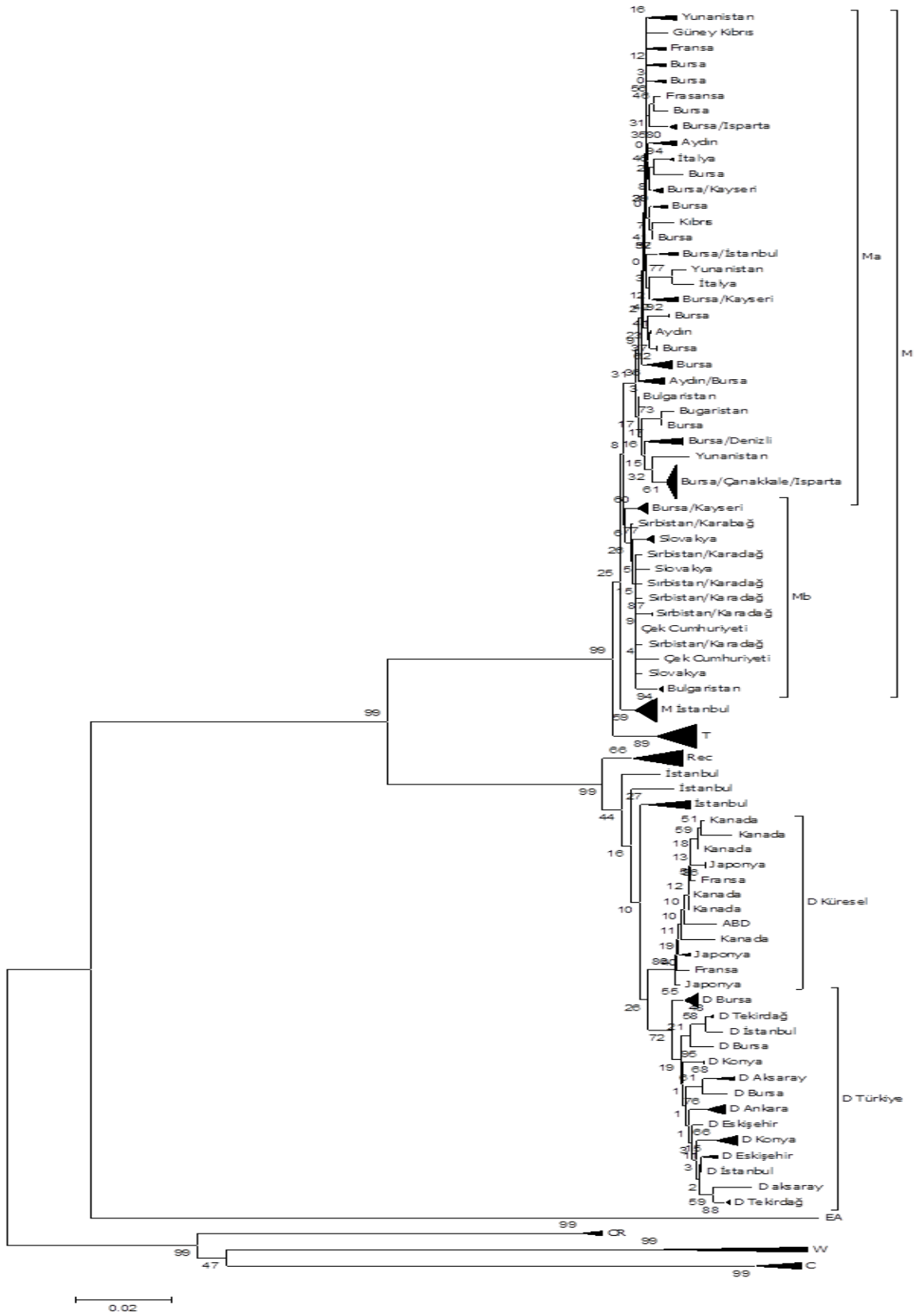
İç Anadolu Ankara ve Kayseri şehir merkezlerinin PPV ile yoğun bulaşık olduğu bilinmektedir. Elibüyük (2004) Ankara il merkezinde yürüttüğü çalışmada 935 örneği taramış, 523'ünün (286 kayısı, 172 erik, 65 şeftali) PPV ile bulaşık olduğunu rapor etmiştir. Örneklerin % 88'inde (%71 kayısı, % 60 erik ve % 48 şeftali) hastalık semptomları gözlemlenmiştir. Araştırmacı diğer bir çalışmada Ankara'daki değişik semtlerden 129 şeftali ağacından toplanan örneklerden 59'unun (% 45) bulaşık olduğunu rapor etmiştir (Elibüyük 2006). Kayseri il merkezinde kayısı örneklerinin % 89 oranında PPV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Ceylan ve ark., 2014). Ankara ve Kayseri'ye ilaveten, Aksaray'ın Ortaköy ilçesi ve civarı köyleri, Konya şehir merkezinin ve İstanbul şehir merkezinin PPV ile oldukça bulaşık olduğu rapor edilmiştir (Gürcan ve Ceylan, 2016b, Gürcan ve ark., 2016). Yapılan bu çalışma ile Bursa ili ve civarından ekonomik olarak yoğun şeftali yetiştiriciliği yapıldığı bahçelerden alınan örneklerin % 64 oranında PPV-pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler Bursa ilinin Ankara, Kayseri, Konya ve Aksaray/Ortahisar bölgesi gibi PPV ile yoğun bulaşık olduğunu göstermektedir.

İrk belirleme ve genetik varyasyon çalışmaları için her PPV ırkına ait GenBank örnekleri indirilmiş, Bursa örnekleri ile analiz edilmiş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Tüm izolatlar ırklarına göre beklendiği gibi gruplanmıştır. Her iki bölgenin filogenetik ağacında da Bursa izolatları Avrupa PPV-M ve Türkiye PPV-D ırkları ile gruplanmıştır. P3-6K1 bölgesinde 43 Bursa izolatı, Avrupa GenBank M izolatları ve daha önceki çalışmalarda Türkiye meyve bahçelerinden toplanan M izolatları ile gruplaşmıştır (Şekil 2). 8 izolat ise GenBank ve Türkiye PPV-D kayıtları ile grup oluşturmuştur. CP+3'UTR bölgesinde ise Bursa'nın 40 izolatı (Bursa m1) Avrupa M izolatları ve Türkiye'de yayılan PPV-M izolatları ile gruplaşırken, aynı şekilde Bursa'nın 8 izolatı (Bursa m1) GenBank' ta kayıtlı PPV-D izolatları ve Türkiye D izolatları ile grup oluşturmuştur (Şekil 3). Sonuç itibarıyla şeftali ağaçlarından toplanan örneklerin dizi benzerlik ve filogenetik analiz sonucunda Avrupa M ırkından oldukları belirlenmiştir. Türkiye'deki erik, kayısı ve şeftali bahçelerindeki izolatlar ile Bursa izolatlarının filogenetik karşılaştırması, aralarındaki ilişkiyi belirlemek açısından önemli olmuştur. 2013 yılında rapor edilen bir çalışmada dört ilin (Çanakkale, Hatay, Isparta illerinde şeftali ve Kayseri ili Yahyalı ilçesi

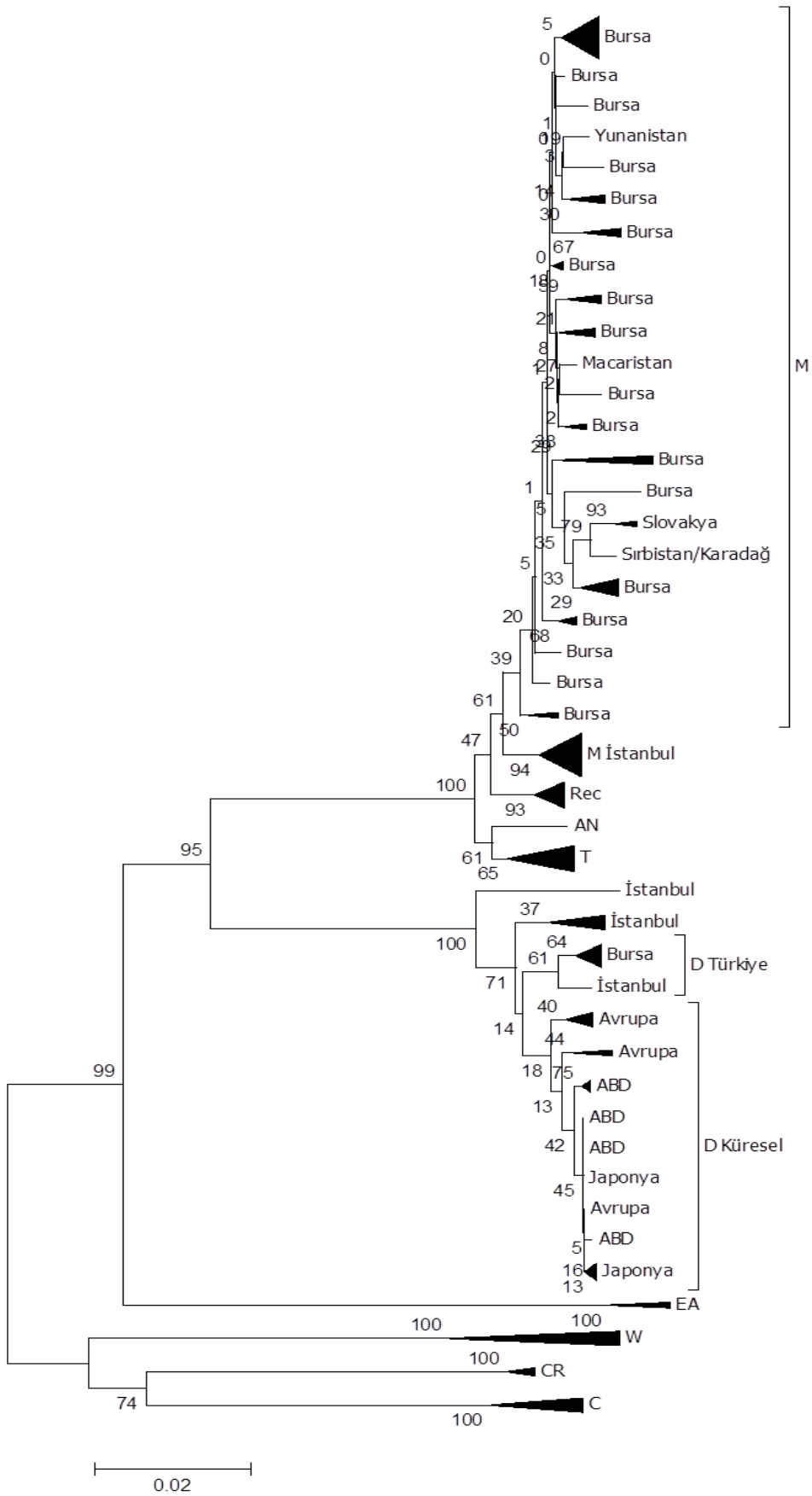
erik) ticari bahçelerinde belirlenen PPV izolatlarının Avrupa M ırkı olduğu ve bahçe sahiplerinin fidan kaynağı olarak Bursa ilini işaret ettikleri belirtilmiştir (Ceylan ve ark., 2013). Daha sonra yapılan bir çalışmada Aydın, Denizli, Isparta illeri meyve bahçeleri örneklerinin de Avrupa PPV-M ırkı oldukları belirlenmiştir (Gürcan ve Ceylan, 2016b). Bu çalışmalarda üretilen P3-6K1 gen bölgesi dizileri Bursa örnekleri ile birlikte analiz edildiğinde, Bursa M izolatlarının, Türkiye'de ekonomik bahçelerde bulunan izolatlarla genetik olarak yakın olduğu ve filogenetik ağaçta M ırkı grubu altında gruplandıkları görülmektedir. Filogenetik analiz Bursa izolatları ile ülkenin geri kalan meyve bahçelerinden alınan izolatlar arasındaki yakın ilişkiyi göstermektedir. PPV-M' nin ilk olarak Yunanistan'da şeftaliden izole edildiği ve şeftali ağaçlarında yaygın olduğu belirtilmiştir (Levy ve ark. 2000). Türkiye'de de PPV-M'nin genelde şeftali ve erik bahçelerinde bulunması bir tesadüften ziyade Avrupa PPV-M ırkının şeftali ve erik fidanları yoluyla Türkiye'de yayıldığını işaret etmektedir.

Bursa PPV izolatlarının dizileri GenBank' da kayıtlı PPV dizileri ile birlikte analiz edilmiş, yeni katılan Bursa örnekleri ile beraber her bir ırk grubunda genetik varyasyon belirlenmiştir. Toplamda 144 izolatın CP-3'UTR bölgesi analiz edilmiş ve toplam genetik varyasyon % 7,1 bulunmuştur. GenBank'da kayıtlı P3-6K1 bölgesi daha fazla olduğu için bu bölgenin genetik varyasyon analizinde toplamda 219 izolat kullanılmış ve toplam genetik varyasyon % 8,8 bulunmuştur (Çizelge 3). 8 adeti bu çalışmada elde edilmek üzere toplamda 15 önekten oluşan Türkiye D grubu, CP-3'UTR bölgesinde % 1,6 varyasyon göstermiştir. Yine D ırkında, 8 adeti yine bu çalışmada elde edilen toplamda 45 adet P3-6K1 bölgesinde % 1,7 varyasyon belirlenmiştir. Türkiye'den katılan bu yeni örneklerle D ırkı grubu, PPV-W ve C'den sonra en yüksek genetik varyasyon gösteren grup olmuştur. Dünyada D grubu izolatları birçok ülkeden toplanmasına rağmen oldukça düşük varyasyon göstermiştir. Diğer taraftan Türkiye'ye has olan PPV-M İstanbul (15 örnek) her iki genomik bölge için Türkiye örneklerinin de içinde bulunduğu PPV-M (P3-6K1 bölgesi için 58 örnek ve CP-3'UTR bölgesi için 108 örnek) grubundan daha düşük varyasyon göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen ve GenBank örnekleri birlikte analiz edildiğinde, PPV-M gurubu örnek sayısı en fazla olan grup olmasına rağmen genetik varyasyon P3-6K1 bölgesi için % 1,3 ve CP-3'UTR bölgesi için % 1,4 olarak hesaplanmıştır.

Bursa'dan elde edilen örnekler ve GenBank kayıtları birlikte analiz edilerek her iki bölge için ırk grupları arası benzerlik ve iraksaklık (divergence) değerleri belirlenmiştir.



Şekil 2. Bursa ve GenBank izolatlarının P3-6K1 bölgesi NJ filogenetik analiz görüntüleri



Şekil 3. Bursa ve GenBank izolatlarının CP-3'UTR bölgesi NJ filogenetik analiz görüntüleri

P3-6K1 bölgesi için PPV ırk grupları arası benzerlik ve ıraksaklık (divergence) değerleri Çizelge 4'de ve CP-3'UTR bölgesi için ise Çizelge 5'de verilmiştir. İstanbul dışında Türkiye M izolatları GenBank M izolatları ile tek grup oluşturduğundan benzerlik ve ıraksaklık hesaplamalarında İstanbul M izolatları ve tüm M izolatları iki ayrı grup olarak alınmıştır. Türkiye D izolatları ise filogenetik ağaçta küresel D izolatlarından farklı bir grup oluşturduğundan her iki grubun benzerlik ve ıraksaklık değerini görmek amacıyla ayrı gruplar olarak değerlendirilmiştir. Böylece İstanbul M ve Türkiye D gruplarının GenBank M ve D örnekleriyle kıyaslama imkanı sağlanmıştır. Türkiye D izolatları, küresel D izolatları ile P3-6K1 bölgesinde % 97.8 ve CP-3'UTR bölgesinde ise % 98.2 benzerlik göstermektedir. İstanbul M izolatları, Avrupa M izolatı grubu ile P3-6K1 bölgesinde % 98 ve CP-3'UTR bölgesinde 97.7 benzerlik göstermektedir. Türkiye D izolatları ile küresel D izolatlarının PPV-T ırkına benzerlikleri çok yakın bulunmuştur. Türkiye D izolatları, PPV-T ile CP-3'UTR bölgesinde % 90.2 benzerlik gösterirken küresel D izolatları aynı bölge için PPV-T ile %90,4 benzerlik göstermiştir. P3-6K1 bölgesinde ise aynı değerler yine çok yakın olup sırası ile % 86.4 ve % 86.7'dir.

Bursa'nın Şehitler yerleşim yerinden 2 erik bahçesinden toplanan 8 örneğin PPV-D ırkı ile bulaşık olduğu görülmüştür. PPV-D dünyada en yaygın olan ırktır

(García ve Cambra, 2007). PPV' nin tespit edildiği hemen her ülkede PPV-D ırkı rapor edilmiştir (James ve ark., 2013). Ancak, PPV-D ırkı ilginç bir şekilde dünya da en yaygın ırk olmasına rağmen diğer ırklara nazaran düşük genetik varyasyon göstermektedir (James ve ark., 2013). Fakat Türkiye'de yapılan PPV-D çalışmaları bu ırkın diğer ülkelere farklı olduğunu ve Türkiye'de PPV-D varyasyonunun dünya toplamından daha yüksek olduğunu göstermektedir (Gürcan ve Ceylan, 2016b). PPV-D ilk olarak serolojik testler sonucunda Ankara'da rapor edilmiştir (Elibüyük, 2004). Sonrasında moleküler testler ile PPV-D Ankara yanı sıra Aksaray, Bursa, Eskişehir, İstanbul, Konya ve Tekirdağ'da tespit edilmiştir (Gürcan ve Ceylan, 2016b). Bu izolatların birçoğunun P3-6K1 gen bölgesi dizilenmiş, aynı zamanda D izolatlarından 6 adetinin tüm genom dizi analizi yapılmış, Türkiye PPV-D izolatlarının filogenetik ağaçta bir grup, dünyanın geri kalan ülkelerinin ise ayrı bir grup oluşturduğu görülmüştür (Gürcan ve Ceylan, 2016a). Bu çalışmada yapılan iki filogenetik analizde de Bursa D izolatları Türkiye D izolatlarının yanında konumlanmıştır. Türkiye D grubunun en dış kısmında İstanbul D izolatları yer almıştır. Bursa D izolatları da eklendiğinde de sonuç değişmemiş, Türkiye D izolatları üzerine yapılan önceki filogenetik çalışmalarda olduğu gibi (Gürcan ve Ceylan, 2016ab) Türkiye D izolatları küresel D grubundan genetik olarak farklı çıkmıştır.

Çizelge 3. PPV izolat gruplarında grup içi evrimsel ıraksaklık değerleri

İrk	Kılıf + 3'UTR		İrkı	PP3-6K1	
	İzolot Sayısı	Genetik Diversity		İzolot Sayısı	Genetik Diversity
PPV-An	1	n/c	PPV-CR	3	0.006
PPV-D Küresel	22	0.006	PPV-D Küresel	15	0.007
PPV-CR	3	0.007	PPV-M İstanbul	15	0.009
PPV-Rec	9	0.009	PPV-T	15	0.012
PPV-M İstanbul	15	0.010	PPV-M**	108	0.014
PPV-T	9	0.011	PPV-C	4	0.014
PPV-M*	58	0.013	PPV-Rec	10	0.016
PPV-EA	2	0.015	PPV-D Türkiye	45	0.017
PPV-D Türkiye	15	0.016	PPV-W	3	0.040
PPV-C	5	0.022	PPV-EA	1	n/c
PPV-W	5	0.040			
Toplam	144	0.071	Toplam	219	0.088

*5 GenBank örneği ve 53 Adet Bursa örneğini içermektedir

** 36 GenBank ve 72 adet Türkiye örneğini içermektedir

Türkiye'de iki M grubu bulunmaktadır. Biri Avrupa'dan fidancılık yoluyla Türkiye'ye yayıldığı varsayılan Avrupa PPV-M ırkıdır. Diğeri ise sadece İstanbul'da keşfedilmiş olan M ırkının bir alt grubu sayılan PPV-M İstanbul grubudur. Bu gruptan 10 izolatın tüm genomu dizilenmiş ve Avrupa M grubundan genetik olarak farklı olduğu rapor edilmiştir (Teber ve Gürcan, 2016). PPV-M İstanbul grubunun kökenine dair bir hipotez geliştirilmemiştir. Avrupa

PPV-M ırkı ise, Güney, Doğu ve Orta Avrupa'da (Myrta ve ark. 2001) oldukça yaygındır. Serolojik ve moleküler veriler Avrupa'da iki PPV-M alt grubunun (PPV-Ma ve PPV-Mb) var olabileceğini işaret etmektedir (Myrta ve ark., 2001, Dallot ve ark., 2011). García ve ark., (2014) PPV-M'nin güvenilir dizi analizleri ile Avrupa dışında tespit edilmediğini belirtmişlerdir. Aslında serolojik tanımlama ile PPV-M'nin Türkiye'de özellikle de Ankara'da mevcut olduğu rapor edilmiştir (Elibüyük,

2004). Fakat bu çalışmalarda PPV-M'ye özgün antikolar kullanılmıştır. PPV-M ve PPV-D rekombinantı olan PPV-T'nin PPV-M'ye özgün antikolara reaksiyon gösterdiği bilinmektedir. Gerçekten de güvenilir nükleotid dizilme yöntemi ile yapılan bir çalışmada Ankara şehir merkezinin farklı semtlerinde tesadüfî olarak alınan 122 örnek toplanmış ve P3-6K1 gen bölgesi dizilenmiş 115 örneğin PPV-T ve 7 örneğin PPV-D olduğu görülmüştür. Çalışma Ankara şehir merkezindeki ağaçlarda PPV-M ırkının değil PPV-T ırkının olduğunu göstermiştir (Gürcan ve Ceylan, 2016b). Türkiye dışında sadece Arnavutluk'ta rapor edilen (Palmisano ve ark. 2015) PPV-T ırkı Türkiye'de Ankara, İzmir, İstanbul, Kayseri, Konya, Tekirdağ ve Samsun illerinde tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe ve ark. 2009; Ulubaş Serçe ve ark. 2011; İlbâğ ve

Çıtır, 2014; Deligöz ve ark. 2015, Gürcan ve ark. 2013b, Gürcan and Ceylan 2016b). Türkiye T izolatının ilk genom dizilemesi Ulubaş Serçe ve ark. (2009) tarafından yapılmış, daha sonra 14 adetinin tüm genomu dizilenmiş, farklı filogenetik gurupların olduğu görülmüştür (Ceylan ve ark. 2015). Sonuç itibarıyla bu çalışmada Bursa'da PPV-T ırkının belirlenmemiş olması, Türkiye'de ekonomik meyve bahçelerinde PPV-M ırkı olduğu yaklaşımını desteklemiştir. Daha önceki araştırmamızda, Bursa'da bir adet izolatın PPV-Rec olduğu rapor edilmiş (Gürcan ve Ceylan, 2016b) ise de PPV-Rec izolatının belirlendiği bölgeye tekrar rastlanmamış, örneklerde PPV-Rec ırkı saptanmamıştır. Bu da Bursa ilinde PPV-Rec ırkının muhtemelen yaygın olmadığına, yeni giriş yaptığımıza işaret etmiştir.

Çizelge 4. CP-3'UTR bölgesi gruplar arası evrimsel benzerlik ve iraksaklık değerleri

	D-Tr	D-Kr	M-İst	M	T	CR	W	C	Rec	An	EA
D-Tr		0.982	0.896	0.9	0.902	0.855	0.852	0.852	0.898	0.901	0.867
D-Kr	0.018		0.897	0.902	0.904	0.854	0.85	0.853	0.9	0.904	0.867
M-İst	0.104	0.103		0.977	0.976	0.856	0.843	0.85	0.977	0.975	0.866
M	0.100	0.098	0.023		0.971	0.858	0.843	0.85	0.975	0.972	0.869
T	0.098	0.096	0.024	0.029		0.86	0.845	0.847	0.977	0.98	0.872
CR	0.145	0.146	0.144	0.142	0.140		0.873	0.893	0.859	0.866	0.848
W	0.148	0.150	0.157	0.157	0.155	0.127		0.868	0.845	0.854	0.845
C	0.148	0.147	0.150	0.150	0.153	0.107	0.132		0.85	0.854	0.818
Rec	0.102	0.100	0.023	0.025	0.023	0.141	0.155	0.150		0.978	0.875
An	0.099	0.096	0.025	0.028	0.020	0.134	0.146	0.146	0.022		0.874
EA	0.133	0.133	0.134	0.131	0.128	0.152	0.155	0.182	0.125	0.126	

Tr: Türkiye, Kr: Küresel, İst: İstanbul

Çizelge 5. P3-3'UTR bölgesi gruplar arası evrimsel benzerlik ve iraksaklık değerleri

	D-Tr	D-Kr	M-İst	M	T	CR	W	C	Rec	EA
D-Tr		0.978	0.871	0.874	0.864	0.739	0.7	0.707	0.968	0.714
D-Kr	0.022		0.875	0.876	0.867	0.726	0.7	0.701	0.974	0.731
M-İst	0.129	0.125		0.98	0.973	0.739	0.691	0.691	0.875	0.727
M	0.126	0.124	0.020		0.971	0.739	0.69	0.691	0.876	0.729
T	0.136	0.133	0.027	0.029		0.727	0.691	0.681	0.872	0.72
CR	0.261	0.274	0.261	0.261	0.273		0.796	0.781	0.721	0.685
W	0.300	0.300	0.309	0.310	0.309	0.204		0.757	0.691	0.689
C	0.293	0.299	0.309	0.309	0.319	0.219	0.243		0.696	0.677
Rec	0.032	0.026	0.125	0.124	0.128	0.279	0.309	0.304		0.731
EA	0.286	0.269	0.273	0.271	0.280	0.315	0.311	0.323	0.269	

Tr: Türkiye, Kr: Küresel, İst: İstanbul

4. Sonuç

Sonuç itibarıyla, bu çalışmada Bursa'da ekonomik olarak yetiştiriciliğin yapıldığı şeftali ve erik bahçelerinde surveyler yapılmış, DASI-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile örnekler test edilmiş, PPV-pozitif alanlar belirlenmiş ve nükleotid dizilme çalışmaları ile virüs ırkları ve genetik varyasyonu çalışılmıştır. Yapılan

çalışma ile birkaç önemli sonuç ortaya konmuştur. Bunlardan biri Bursa ilindeki enfeksiyon seviyesinin önceki çalışmalara göre daha ayrıntılı olarak ortaya konmasıdır. İkinci olarak Türkiye'de daha önceki çalışmalarda PPV ile bulaşık olduğu rapor edilen ticari bahçe izolatları ile Türkiye'nin önemli fidan üretim merkezi olan Bursa ili izolatlarının ilişkisi belirlenmiştir. Ayrıca Türkiye'de PPV ırk

epidemiolojisi ve zengin genetik varyasyonu destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Bursa ili Türkiye’de önemli bir şeftali üreticisi bölge olmasının yanısıra oldukça önemli bir fidan üretim merkezidir. Fidanlığa uygun iklim koşulları ve görece gelişmiş tarımsal ticaret potansiyeli bu bölgede hem fidan üretimini arttırmış hem de Avrupa’dan gelen fidanların Türkiye içinde dağıtım merkezi olmasını sağlamıştır. Bursa ili fidan trafiğinde ve dolayısıyla fidan ile hastalıkların ülke içerisinde taşınmasında önemli bir konumda bulunmaktadır.

Kaynaklar

- Akbaş, B., Değirmenci, K., Çiftçi, O., Kaya, A., Yurtmen, M., Uzunoğulları, N., Çelik, N., Türkölmez, Ş., 2011. Update on Plum pox virus distribution in Turkey. *Phytopathology Meditterian*, 50: 75–83.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., Llácer, G., 2006. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bull.* 36: 202–204.
- Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Çağlayan, K., Çevik, B., 2007. First report of the presence of Plum pox virus Rec strain in Turkey. *Plant Dis.* 91: 331.
- Ceylan, A., Gürcan, K., 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*, S.50, 8-12 Haziran, Morioka, Japonya.
- Ceylan, A., Gürcan, K., Akbulut, M., 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., Ulubaş Serçe, Ç., 2013. Transmission route of new plum pox virüs in Turkey. *2nd International Symposium on Plum Pox Virus*, S.19, 3-6 September, Olomouc, Czech Republic.
- Crescenzi, A., D’aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., 1997. Charecterisation of the sweet cherry isolate of Plum pox potyvirus, *Plant Dis.* 81(7): 711-714.
- Çelik, N., Topkaya Kütük, B., 2013. Antalya ilinde şarka virüs hastalığının belirlenmesi. *Derim*, 30(2):1-10.
- Çıtır, A., 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 Hortic.* 781: 103-106.
- Dallot, S., Glasa, M., Jevremovic, D., Kamenova, I., Paunovic, S., Labonne, G., 2011. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of Plum pox virus strain M. *Arch. Vir.* 156: 539–542.
- Deligöz, İ., Değirmenci, K., Sökmen, M., 2015. Samsun İlinde Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Şarka Hastalığı Etmeninin (Plum pox virus) Belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 30(3):227-235.
- 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.
- EPPO, 2004. Standard PM 7/32 Plum pox potyvirus. *Bulletin EPPO Bull.* 34: 247–256.
- García, J.A. Glasa M., Cambra, M., Candresse, T., 2014. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15(3): 226-41.
- García, J. A., Cambra, M., 2007. Plum pox virus and sharka disease. *Plant Viruses*, 1:69–79.
- Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Moury, B., Kúdela, O., Quiot, J.B., 2002. Molecular variability 17 of the P3-6K1 genomic region among geographically and biologically distinct 18 isolates of Plum pox virus. *Arch Virol.* 147:563–575.
- Glasa, M., Malinowski T., Predajna L., Pupola N., Dekena D., Michalczuk, L., 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., Prikhodko, Y., Predajna, L., Nagyova, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Subr, Z., Cambra, M., Candresse, T., 2013. Characterization of sour cherry isolates of Plum pox virus from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103(9): 972–979.
- Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T., 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: 2671-81.
- 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.
- Gürcan, K., Ceylan, A., 2016a. Full Genome Analysis of Plum pox virus-D isolates of Turkey. *3rd International Symposium on Plum Pox Virus*, S. 19, 9-13 Mayıs, Antalya, Türkiye.
- Gürcan, K., 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., Teber, S., Değirmenci, K., 2016. High Sequence variability of Plum pox virus: A new divergent group of Marcus strain. *Romanian*

- Biotechnological Letters (kabul edildi).
- İlbağ, H., Çıtır, A., 2014. Detection and partial molecular characterization of Plum pox virus on almond trees in Turkey. *Phytoparasitica*, 42(4): 485–491.
- İlbağ, H., Çıtır, A., 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 Hort.*, 781, 33-36.
- James, D., Varga, A., Thompson, D., Hayes, S., 2003. Detection of a new and unusual isolate of Plum pox virus (*Prunus domestica* virus in). *Plant Dis.* 87: 1119–1124.
- James, D., Varga, A., Sanderson, D., 2013. Genetic diversity of Plum pox virus: strains, disease and related challenges for control. *Can. J. Plant Pathol.* 35: 431–441.
- Kalashyan, Y.A., Bilkey, N.D., Verderevskaya, T.D., Rubina, E.V., 1994. Plum pox virus on sour cherry in Moldavia. *EPPO Bull.* 24: 645–649.
- Kerlan, C., Dunez, J., 1979. Différenciation biologique et sérologique des souches du virus de la sharka. *Annales de Phytopathologie*, 11:241–250.
- Koç, G., Baloğlu, S., 2006. First report of sharka in the Çukurova region of Turkey. *J. of Plant Pathol.*, 88 (3 suppl.): 68.
- Levy, L., Damsteegt, V., Welliver, R., 2000. First report of Plum pox virus (sharka disease) in *Prunus persicae* in the United States. *Plant Dis.* 84: 202.
- Kurçman, S., 1973. Detection of sharka virus on apricot and plum trees in Ankara. *Journal of Turkish Phytopathology*, 2:124–129.
- Maejima, K., Himeno, M., Komatsu, K., Takinami, Y., Hashimoto, M., Takahashi, S., Yamaji, Y., Oshima, K., Namba, S., 2011. Molecular epidemiology of Plum pox virus in Japan. *Phytopathology*, 101(5): 567–574.
- Myrta, A., Boscia, D., Potere, O., Kolber, M., Nemeth, M., Terlizzi, B., Cambra, M., Savino, V., 2001. Existence of two serological subclusters of Plum pox virus, strain M. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 845–848.
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A., Candresse, T., 2012. An atypical albanian isolate of Plum pox virus could be the progenitor of the Marcusstrain. http://icvf.jki.bund.de/dokumente/upload/74140_ icvf2012abstracts.pdf. Accessed 15 October 2014.
- Palmisano, F., Minafra, A., Myrta, A., Boscia, D., 2015. First Report Of Plum Pox Virus Strain PPV-T in Albania. *J. Plant Pathol.* 97(2): 391-403.
- Roy, A.S., Smith, I.M., 1994. Plum pox situation in Europe. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 24: 515-523.
- Sahtiyancı, S., 1969. Virus de la Sharka chez la prunier. *Bullet. Phytosan FAO*, 69.
- Scholthof, K.B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G.D., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant P.* 12: 938-954.
- Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular 6 Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Teber, S., Gürcan K., 2016. Recombination analysis of 51 PPV isolates including 10 genomes of PPV-M Istanbul, 3rd International Symposium on Plum Pox Virus, S. 33, 9-13, Antalya, Turkey.
- Thompson, D., McCann, M., MacLeod, M., Lye, D., Green, M., James, D., 2001. First report of Plum Sertkaya, G., Ulubaş, Ç., Çağlayan, K., 2003. Detection and characterization of Plum pox potyvirus (PPV) by DAS-ELISA and RTPCR/RFLP analysis in Turkey, *Turk. J. Agric. For.*, 27: 213-220.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by 4 using the neighbor-joining method. *PNAS* 101:11030-11035.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., pox virus in Ontario, Canada. *Plant Dis.* 85 (11): 97.
- Ulubaş Serçe, C., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., Çağlayan, K., 2009. Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Res.* 142 (1-2):121–126.
- Ulubaş Serçe Ç., Gazel, M., Çağlayan, K., 2011. Plum pox virus streynlerinin Türkiye’deki Dağılımı. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş s. 72.
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Delbos R.P., Mazyad H., Aboul-Ata A.E., Dunez, J., 1991. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA from a widely divergent strain (El Amar) of Plum pox potyvirus. *J. Gen. Vir.* 72: 1741–1746.