



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE ÖNEMLİ KİRAZ ÜRETİM ALANLARINDA PRUNE
DWARF VIRUS (PDV)'NİN TESPİTİ ve GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ**

Pelin GÜNDOĞAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HATAY
AĞUSTOS - 2023



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE ÖNEMLİ KİRAZ ÜRETİM ALANLARINDA PRUNE
DWARF VIRUS (PDV)'NİN TESPİTİ ve GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ**

Pelin GÜNDOĞAN
ORCID:0000-0001-6122-1403

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof.Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
ORCID: 0000-0002-4381-4149

HATAY
AĞUSTOS - 2023

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’DE ÖNEMLİ KIRAZ ÜRETİM ALANLARINDA PRUNE DWARF
VIRUS (PDV)’NİN TESPİTİ ve GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ**

Pelin GÜNDOĞAN
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Mona Gazel ve Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 31/08/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN

Başkan

Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA

Üye

Prof. Dr. Mukaddes KAYIM

Üye

Doç. Dr. Fatih Mehmet TOK

Üye

Doç. Dr. Eminur ELÇİ

Üye

Kod No:

Doç. Dr. Cengiz KARACA

Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 21.D.004

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

31/08/2023

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Pelin GÜNDOĞAN

ÖZET

TÜRKİYE'DE ÖNEMLİ KIRAZ ÜRETİM ALANLARINDA PRUNE DWARF VIRUS (PDV)'NİN TESPİTİ ve GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ

Bu çalışmada, Türkiye'nin önemli kiraz yetiştiriciliği yapılan illerinden İzmir, Konya, Kahramanmaraş, Niğde, Bursa, Manisa, Osmaniye, Adana ve Antalya'da kiraz ağaçlarını enfekte eden ve önemli viral patojenler arasında yer alan PDV'nin yaygınlığı ve izolatların genetik çeşitliliği araştırılmıştır.

Yapılan sörvey çalışmasında 9 il ve 14 ilçeden virüs semptomu gösteren ve göstermeyen toplam 468 kiraz ve 4 vişne ağacından yaprak örnekleri alınmış ve bu örnekler hem DAS-ELISA hem de RT-PCR yöntemleriyle testlenmiştir. DAS-ELISA yöntemiyle testlenen toplam 472 örneğin 25 tanesinde PDV saptanırken RT-PCR analizleri ile 52 örnek pozitif bulunmuştur. Böylece testlenen örneklerde PDV'nin yaygınlık oranı DAS-ELISA yöntemiyle %5,3 olarak bulunurken bu oran RT-PCR analizlerinde %11,02 olarak tespit edilmiştir. RT-PCR analizleri sonucunda pozitif bulunan örneklerin tamamı kısmi hareketlilik protein genini (movement protein-MP) çoğaltan primerlerle testlendiği için aynı örnekler kılıf protein (CP) kısmi gen bölgesini çoğaltan primerlerle testlendiğinde 44 örnekte beklenen düzeyde amplifikasyon gözlenmiştir. Öte yandan, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) kısmi gen bölgesini çoğaltan primerlerle örnekler testlendiğinde 39 örnekte beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilmiştir. Testlenen örneklerde PDV'nin tespit edilme oranları PDV-MP spesifik primer çifti ile %11,01, PDV- CP spesifik primer çifti ile %9,32 ve PDV- RdRp spesifik primer çifti ile ise %8,26 olarak saptanmıştır. Üç farklı gen bölgesine ait kısmi gen dizileri, gen bankasında kayıtlı PDV referans izolatının yanı sıra ülkemizden ve dünyanın diğer ülkelerinden kayıtlı PDV izolatlarıyla kıyaslanarak filogenetik analizleri yapılmıştır. Yapılan BLASTn ve BLASTp analizi sonucunda, bu çalışmada elde edilen PDV kiraz izolatlarının referans PDV izolatıyla MP- nükleotid düzeyinde %88,02-99,57 ve aminoasit düzeyinde %84,91- 99,57; CP- nükleotid düzeyinde %77,13- 100 ve aminoasit düzeyinde %54,87- 100; RdRp- nükleotid düzeyinde %74,62-99,26 amino asit düzeyinde %63,33- 100 arasında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen PDV izolatlarının MP, CP ve RdRp kısmi gen dizilerine göre çizilen filogenetik ağaçlarda iki genomik bölgede iki filogenetik grup oluşumu gözlenmiştir. Bu çalışma ile Türkiye'de kirazlarda ilk kez MP ve RdRp kısmi gen bölgelerine ait nükleotid ve aminoasit dizileri elde edilerek gen bankası kaydı oluşturulmuştur. PDV izolatlarının nükleotid ve aminoait dizileme ve filogenetik analizleri sonucu, 732 bp'lik 244 aa uzunluktaki MP, 587 bp'lik 195 aa uzunluktaki CP ve 271 bp'lik 90 aa uzunluktaki RdRp'a karşılık gelen nükleotid dizileri elde edilerek gen bankasına kayıtlı PDV izolatlarıyla filogenetik kıyaslamaları yapılmıştır.

2023, 121 sayfa

Anahtar Kelimeler: Prune dwarf virüs, *Prunus avium* L., DAS-ELISA, RT-PCR, filogenetik analiz

ABSTRACT

DETECTION of and GENETIC DIVERSITY of PRUNE DWARF VIRUS (PDV) in IMPORTANT CHERRY PRODUCTION AREAS in TURKEY

Cherry is an important fruit crop in Turkey and all over world. In this study, the prevalence of PDV, which is one of the important viral pathogens that infects cherry trees was investigated in different provinces of Turkey where cherry production is important such as İzmir, Konya, Kahramanmaraş, Niğde, Bursa, Manisa, Osmaniye, Adana and Antalya.

In this study, totally 472 plant samples, of which 468 were cherry and four were sour cherry, with and without virus symptoms were collected from 9 provinces and 14 districts. These samples were tested both by DAS-ELISA and RT-PCR assays. As a result of DAS-ELISA analysis, PDV was detected in 25 of 468 cherry samples while it was 52 by RT-PCR. The PDV infection rate of tested cherry samples was 5.3 % by DAS-ELISA and 11.20% by RT-PCR. When all RT-PCR positive samples which were tested by primers amplifying partial movement protein gene (MP) (756 bp) were tested by primers amplifying partial CP gene (874 bp), 44 samples were found positive. On the other hand, when samples were tested with primers that amplify the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) partial gene (382 bp), the expected level of amplicons were observed in 39 samples. The PDV positive samples among tested plants were found in 11.01% for the PDV-MP specific primer pair, 9.32% for the PDV-CP specific primer pair, and then 8.26% for the PDV-RdRp specific primer pair, respectively.

Phylogenetic analysis were performed by using partial sequences belonging to three different genes obtained in this study together with the other Turkish isolates and as well as world isolates of PDV deposited in GeneBank. As a result of the BLASTn and BLASTp analysis, the sequences of PDV reference isolate and cherry isolates obtained in this study had 88.02-99.57% similarity at MP-nucleotide level and 84.91-99.57% at amino acid level; 77.13%-100% at the CP-nucleotide level and 54.87-100% at the amino acid level; RdRp- nucleotide level 80.59% - 99.26% and amino acid level 59.09 - 100%.

In the phylogenetic trees constructed according to the MP, CP and RdRp partial gene sequences of the PDV isolates obtained in this study, two phylogenetic groups were observed in two genomic regions, accordingly all the studied isolates were divided into two clusters. With this study, nucleotide and amino acid sequences belonging to MP and RdRp partial gene sequences were obtained for the first time in cherries in Turkey and they were deposited in GenBank. As a result of nucleotide and amino acid sequencing and phylogenetic analysis of PDV isolates, nucleotide sequences corresponding to MP of 732 bp of 244 aa length, CP of 587 bp to 195 aa of length and RdRp of 90 aa length of 271 bp were obtained in this study and the sequences were compared with other world isolates of PDV deposited in GeneBank.

2023, 121 pages

Key Words: Prune dwarf virüs, *Prunus avium* L., DAS-ELISA, RT-PCR, phylogenetic analysis

TEŞEKKÜR

Mesleki ve akademik hayatımda önemli kararlar almam gerektiğinde sürekli yanımda olan ve varlığı ile benim için önemli bir rol model oluşturan, gerek doktora tez konumunun belirlenmesinde gerek araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmalarına ışık tutan ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takibinde profesyonel yaklaşımları ve öngörülleri ile doktora çalışmalarımı zenginleştiren ve özveri ile yardımlarını esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyesi Doç.Dr.Eminur ELÇİ'ye, tez çalışmalarım sırasında desteklerinden dolayı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine (Proje no: **21.D.004**) ve bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan HMKÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığına ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na ve HMKÜ FBE Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, 6 Şubat tarihinde yaşanan deprem felaketinde hayatını kaybeden değerli hocam Prof. Dr. Mona GAZEL'i ve BAP biriminde görevli Hatice HANCI'yı saygıyla anıyorum.

Sörvey çalışmaları esnasında bana rehberlik eden Andırın İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Akşehir İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Ereğli İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Hadim İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Şehzadeler İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Akşehir İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü'ne ve sörvey bölgesinde yer alan tüm Tarım ve Orman İlçe Müdürlükleri yönetici ve çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım süresince, tüm arazi çalışmalarımdaya yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle Tarım ve Gıda Üniversitesi Mütevelli Heyeti Başkan V. Sayın Ali Konukseven'e, K.O.P . Koordinatörü M. Ümit Yorgancılar'a, Dicle Üniversitesi Dekanı Prof. Dr. Öner Çetin'e, F.A.O. Koordinatörü Dr. Süleyman Karahan'a, Trakya Ünivesitesi Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Yalçın Kaya'ya, Ankara

Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden Prof. Dr. Fikret Demirci'ye, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden Dr. Öğr. Üyesi Serkan Önder'e, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü'nden Dr. Öğr. Üyesi Ali Çelik'e, Cumhuriyet Üniversitesi Öğretim Görevlisi Dr. Ayşenur Pektaş'a ve bahçe sahipleri değerli çiftçilerimize çok teşekkür ederim.

6 Şubat tarihinde gerçekleşen deprem afeti sonrası tezimin tamamlanmasında bana maddi ve manevi destek olan çok değerli arkadaşlarım özellikle Necati Temur'a, Özlem Çağlar Yılmaz'a ve nişanlım Ali Özkan'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen ve daima yanımda olan değerli annem Gade Gündoğan'a sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. PDV'nin Simptomatolojisi ve Genom Organizasyonu	9
2.1.1. Prune dwarf virus (PDV)'nin tanımı ve simptomalojisi	9
2.1.2. Genom organizasyonu	13
2.1.3. PDV'nin Tespiti ve Teşhisi.....	16
2.2. Dünya'da PDV konusunda yapılan çalışmalar	18
2.3. Türkiye'de PDV konusunda yapılan çalışmalar	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal.....	32
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması	32
3.2.2. DAS-ELISA Analizleri	35
3.2.3. Moleküler Çalışmalar.....	36
3.2.3.1. Kiraz Yaprak Örneklerinden Total Nükleik Asit İzolasyonu	36
3.2.3.2. Ters transkripsiyon PCR (Reverse Transcription; RT-PCR) analizleri	37
3.2.3.2.1. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	37
3.2.3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	38
3.2.3.3. Nükleotid Dizileme ve Filogenetik Analizler	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	41
4.1. Arazi çalışması ve ağaçlarda gözlenen belirtiler.....	41
4.2. DAS-ELISA Testleri Sonuçları.....	49
4.2.1. Moleküler Çalışmalar.....	52
4.2.1.1. Ters Transkripsiyon (Reverse Transcription: RT) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri	52
4.2.1.2. Nükleotid Dizileme	62
4.3. Filogenetik Analiz Sonuçları	62
4.3.1. MP Gen Bölgesi için Yapılan Filogenetik Analizler	63
4.3.1.1. CP Gen Bölgesi için Yapılan Filogenetik Analizler	76
4.3.2. RdRp Gen Bölgesi için Yapılan Filogenetik Analizler.....	88
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	100
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	116
EKLER.....	117

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. TÜİK verilerine göre 2016-2021 yılları arasında ton bazında en çok kiraz üretimi yapılan iller (Anonim, 2022).	3
Çizelge 2.1. Virüs karakterlerinin değerlendirilmesine dayalı dört <i>Ilarvirus</i> alt grubu. (Pallas ve ark., 2013)	9
Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kiraz örneklerinin toplandığı iller, çeşit adları ve örnek sayıları.	34
Çizelge 3.2. PDV'nin 3 farklı gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla yapılan PCR analizlerinde kullanılan primerlerin nükleotid dizilimleri, çoğaltıldığı bölge, baz büyüklükleri	38
Çizelge 4.1. Toplanan örneklerin DAS-ELISA testi sonucu belirlenen enfeksiyon oranları	49
Çizelge 4.2. Kiraz yetiştiriciliği yapılan farklı illerden toplanan kiraz örneklerinin prune dwarf virus (PDV)'nin üç farklı gen bölgesini kısmi olarak çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları	53
Çizelge 4.3. Çalışma kapsamında üç farklı primerle yapılan RT-PCR analizleri a sonucunda PDV pozitif bulunan kiraz örneklerinin semptomları ve RT-PCR sonuçları	57
Çizelge 4.4. Filogenetik analizlerde kullanılan ve gen bankası veri tabanında kayıtlı PDV-MP izolatlarının listesi	66
Çizelge 4.5. Bu çalışmada karakterize edilen ve gen bankası veri tabanından filogenetik ağaç çiziminde kullanılan PDV-CP izolatlarının listesi	79
Çizelge 4.6. Bu çalışmada karakterize edilen ve gen bankası veri tabanından kullanılan PDV- RdRp izolatlarının listesi	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünyada kiraz üreticisi ülkelerin durumu (FAO, 2022).....	2
Şekil 2.1. İlarvirüslerde genom organizasyonu (Pallas ve ark., 2013, Bonilla F.R. ve Cieniewicz E., 2022).....	8
Şekil 2.2. PDV genom organizasyon yapısı (Kozieł ve ark., 2017).....	14
Şekil 3. 1. Kiraz örneği toplanan iller	32
Şekil 3.2. Kiraz örneklerinin ekstraksiyon tamponunda ezilerek ependorf tüplere alınması ve ELISA plakalarına yerleştirilmesi.....	35
Şekil 4.1. Kiraz yapraklarında damar aralarında sararma, nekroz oluşumu, sarı haleli benekler ve koyu pas rengi benek oluşumu	42
Şekil 4.2. Konya ilinden toplanan kiraz ağaçlarının yapraklarında gözlenen (A) sarı ve açık yeşil damar bantlaşması (B) sarı- açık yeşil beneklenmeler, halkalı benekler ve mozaik belirtiler	42
Şekil 4.3. Kahramanmaraş-Andırın ilçesinde iki farklı kiraz bahçesinde kiraz ağaçlarında gözlemlenen PDV benzeri belirtiler (A) sarp kenarlı bahçe (B) ticari üretim yapılan bahçe	43
Şekil 4.4. İzmir ilinde virüs belirtisi gösteren yapraklarda (A) şekil bozulmaları (B) renk değişiklikleri, nekroz oluşumu	43
Şekil 4.5. (A) Konya ve (B) Kahramanmaraş illerinde kiraz ağaçlarının sürgünlerinde gözlenen sararma ve kuruma belirtileri	44
Şekil 4.6. (A) İzmir, (B) Konya , (C) ve (D) Kahramanmaraş illerinden farklı bahçelerdeki kiraz ağaçlarında görülen virüs benzeri belirtiler.....	44
Şekil 4.7. Konya ilindeki kiraz ağaçlarında gözlenen (A) sarı damar bantlaşması, (B) mozaikleşme ve (C) nekroz belirtileri	45
Şekil 4.8. İzmir Kemalpaşa ilçesinden alınan pozitif örneklerin (A) 3 yaprak ana damar büzülmesi ve (B) 4, (C) 17, (D) 18 numaralı PDV pozitif bulunan semptomsuz örnekler	45
Şekil 4.9. Konya ilinden toplanan kiraz örneklerinde gözlenen prune dwarf virüs (PDV) benzeri belirtiler	46
Şekil 4.10. Konya ilinden toplanan ve PDV benzeri belirtiler gösteren yapraklarda damar açılması. PDV'nin kirazda olgun yaprakların orta damar etrafında genel kloroz belirtileri belirtileri belirtileri gözlenmiştir (A, B, C ve D)	46
Şekil 4.11. Konya ilinden toplanan kiraz yapraklarında görülen (A) bronzlaşma, yaprağın yarısında kızarıklık (B) damar bantlaşması (C) nekrozlanma (D) damarlarda büzülme belirtileri	47
Şekil 4.12. Manisa ili Şehzadeler ilçesinde kiraz yapraklarında gözlenen (A) nekroz, büzülme, pas şeklinde beneklenmeler (B) ana damarda büzülme, pas şeklinde beneklenme belirtileri	48
Şekil 4.13. Kahramanmaraş ili Andırın ilçesinden alınan kiraz ağaçlarının yapraklarında gözlenen (A) sarı renkli benekler (B) yaprak şekil bozuklukları ve nekrozlar (C) nekroz (D) beneklenme ve yaprak kenarında nekroz belirtileri	48
Şekil 4.14. 219- 245 numaralı örneklerin DAS-ELISA analizleri sonucunda gözlenen pozitif reaksiyonlar.....	49
Şekil 4.15. DAS-ELISA sonuçlarına göre il bazında PDV enfeksiyon oranları.....	51

Şekil 4.16. İzmir ili Kemalpaşa ilçesinden alınan 17 no'lu örnekten izole edilen RNA'nın nanodrop spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon 128,0 ng/ml; 260/280).....	52
Şekil 4.17. Manisa ili Şehzadeler ilçesinden alınan 294 no'lu örnekten izole edilen RNA'nın nanodrop spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon 204,6 ng/ml; 260/280).....	52
Şekil 4.18. İzmir ili Kemalpaşa ilçesinden toplanan kiraz örneklerinin prune dwarf virus (PDV)'nin MP bölgesini çoğaltan PD3-331F ve PD3-1086R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin jel görüntüsü. M: Marker; (M: 100 bp DNA ladder, , 3-18: Testlenen kiraz örnekleri : +C: Pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol W: Su kontrol.....	54
Şekil 4.19. Antalya ilinden Korkuteli toplanan kiraz örneklerinin prune dwarf virus (PDV)'ünün tespiti için PD3-331F ve PD3-1086R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin 756 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü. M: Marker; (M: 100 bp DNA ladder, 1: AntK1, 2: 3: 4: 5: 6: 7: 8: 9: 10: 11: 12: 13:467(AntK10) 14:,11 15:+C: Pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol W: Su kontrol.	54
Şekil 4.20. Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinden toplanan kiraz örneklerinde prune dwarf virus (PDV)'üne spesifik primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. M: Marker SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD; 1-10: Osmaniye, 11-14: Kahramanmaraş kiraz örnekleri, +C: Pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol, W: Su kontrol (Gündoğan ve ark., 2022).....	55
Şekil 4.21. Konya, Osmaniye ve Kahramanmaraş izolatlarından prune dwarf virus (PDV)'ünün tespiti için PDV-CP-F ve PDV-CP R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin çoğaltma sonucu 874 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü. M: Marker; (M: 100 bp DNA ladder, 4:96, 5: 96, 6:96, 7:106, 8:106, 9:106, 10:107, 11:107, 12:107, 13:135, 14:135, 15:135, 16:361, 17:361, 18:361, 19:365, 20: 365, 21:365, 25:314, 26:314 +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol.....	55
Şekil 4.22. PDV-RdRp spesifik primer çifti ile yapılan PCR sonucu elde edilen 382 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü (M: 100 bp DNA ladder, 3:MS296, 4: 4, 5: 4, 6:4, 10:8, 11:8, 12:8, 19:305, 20:305, 21:305, 22:320, 23:320, 24:320, +C: Pozitif kontrol, W:Su kontrol).....	56
Şekil 4.23. PDV-RdRp spesifik primer çifti ile yapılan PCR çoğaltma sonucu elde edilen 382 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü (M: 100 bp DNA ladder, 1:11, 2:11, 3:11, 4: 4, 5: 4, 6:4, 10:8, 11:8, 12:8, 19:305, 20:305, 21:305, 22:320, 23:320, 24:320, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol)	56
Şekil 4.25. PDV-MP amino asit dizileri hizalanmış ekran görüntüleri.....	64
Şekil 4.26. AK17 (Adana) nolu izolattan elde edilen 732 baz büyüklüğündeki kısmi MP-nükleotid dizisinin Gen Bankasına kayıtlı NC008038 numaralı refeans izolat dizileri ile Geneious programında karşılaştırılması ve eşleşen bölgenin gösterilmesi	64
Şekil 4.27. MP kısmi gen bölgesi referans gen bölgesi ile eşleştirildiğinde referans genomda 380 ile 1112 baz çiftleri arasında yer almaktadır (elde edilen toplam uzunluk 732 bp).....	65
Şekil 4.28. PDV-MP'nin nükleotid seviyesinde SDT analizi yapılan renklendirilmiş benzerlik matrisi.....	69

Şekil 4.30. Kirazlardan izole edilen PDV-MP gen bölgesine ait aminoasit dizilerinin NCBI gen bankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir. (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV).....	72
Şekil 4.31. MP geni için Türkiye kiraz izolatları arasındaki uzaklık/yakınlık ilişkisini tespit etmek için SplitsTree programında NeighbourNet algoritması ile elde edilen filogenetik ağaç	73
Şekil 4.32. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-MP kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi yakın olan değerler	74
Şekil 4.33. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-MP kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi uzak olan değerler.....	75
Şekil 4.34. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-MP kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi yakın olan değerler.....	75
Şekil 4.35. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-MP kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi uzak olan değerler	75
Şekil 4.36. PDV-CP nükleotid dizileri hizalanmış ekran görüntüleri.....	77
Şekil 4.37. PDV-CP amino asit dizileri hizalanmış ekran görüntüleri	77
Şekil 4.38. MK3 (Kahramanmaraş) nolu izolatından elde edilen 874 baz büyüklüğündeki nükleotid dizisinin Gen Banka kayıtlı NC008038 numaralı refeans sekansı ile Geneious programında karşılaştırılması ve eşleşen bölgenin gösterilmesi	78
Şekil 4.40. PDV-CP'nin nükleotid seviyesinde SDT analizi yapılan renklendirilmiş benzerlik matrisi.....	82
Şekil 4.41. Kirazlardan izole edilen PDV-CP gen bölgesine ait nükleotid dizilerinin NCBI genbankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV).....	84
Şekil 4.42. Kirazlardan izole edilen PDV-CP gen bölgesine ait aminoasit dizilerinin NCBI genbankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV).....	85
Şekil 4.43. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-CP kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi uzak olan değerler.....	86
Şekil 4.44. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-CP kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi uzak olan değerler.....	86
Şekil 4.45. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-CP kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi yakın olan değerler.....	87
Şekil 4.46. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-CP kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi uzak olan değerler	87
Şekil 4.47. PDV-RdRp nükleotid dizileri hizalanmış ekran görüntüleri	89
Şekil 4.48. PDV-RdRp amino asit dizileri hizalanmış ekran görüntüleri	89
Şekil 4.50. PDV- RdRp'nin nükleotid seviyesinde SDT analizi yapılan renklendirilmiş benzerlik matrisi.....	92
Şekil 4.51. Kirazlardan izole edilen PDV-RdRp gen bölgesine ait nükleotid dizilerinin NCBI genbankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli	

	kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV).....	93
Şekil 4.52.	Kirazlardan izole edilen PDV-RdRp gen bölgesine ait aminoasit dizilerinin NCBI genbankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV).....	94
Şekil 4.53.	MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-RdRp kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi uzak olan değerler.....	96
Şekil 4.54.	MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-RdRp kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi yakın olan değerler	97
Şekil 4.55.	MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu RdRp kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi uzak olan değerler.....	97
Şekil 4.56.	MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-RdRp kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi yakın olan değerler.....	98

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Derece Celsius
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre
aa	: Aminoasit
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	: Basic Local Alignment Search Tool nükleotid
BLASTp	: Basic Local Alignment Search Tool protein
bp	: Base pair (Baz çifti)
da	: Dekar
Da	: Dalton
dak.	: Dakika
g	: Gram
H ₂ O	: Su
Ha	: Hektar
kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
min	: Dakika
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nt	: Nükleotid
pmol	: Pikomolar
ppm	: Part per million (Milyon birimde bir birim)
rpm	: Rotation per minute (Dakikadaki dönme sayısı)
sn	: Saniye
vol	: Volume (Hacim)

KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACLSV	: Apple chlorotic leaf spot virus
ApMV	: Apple mosaic virüs
C:I:A	: Chloroform-isoamilalkol

CAP	: Ortak Tarım Politikası
cDNA	: Komplementer (Tamamlayıcı) DNA
CLRV	: Cherry leaf roll virüs
CMV	: Cucumber mosaic virus
CP	: Kılıf proteini
CTAB	: Setil trimetilamonyum bromür
d ₂ H ₂ O	: Steril bi-destile su
DAS-ELISA	: Double antibody sandwich ELISA
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dNTP	: 2'-Deoxynucleotide 5'-triphosphate
DR	: Dimerizasyon bölgesi
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü
EtBr	: Ethidium bromide (Etidyum bromür)
EU	: European Union
EUROSTAT	: Avrupa İstatistik ofisi
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
HEL	: Helikaz
HR	: Hidrofobik bölge
IgG	: Immunoglobulin G
K.Maraş	: Kahramanmaraş
LiCl	: Lityum klorür
MET	: Metiltransferaz
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ML	: Maximum Likelihood
MP	: Hareket proteini
NaOAc	: Sodium acetat
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ORF	: Açık okuma alanı (Open reading frame)
P1	: Protein 1
P2	: Protein 2
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PDV	: Prune dwarf virüs
pH	: Power of Hydrogen (Çözeltinin asitlik bazlık seviyesi)
PLMVd	: Peach latent mosaic viroid
pNPP	: P-nitrophenyl phosphate
PNRSV	: Prunus necrotic ring spot virus
PPV	: Plum pox virüs
RBD	: RNA bağlama alanı
RdRp	: RNA'ya bağımlı RNA polimeraz
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Revers (Ters) transkriptaz
RT-qPCR	: Kantitatif PCR

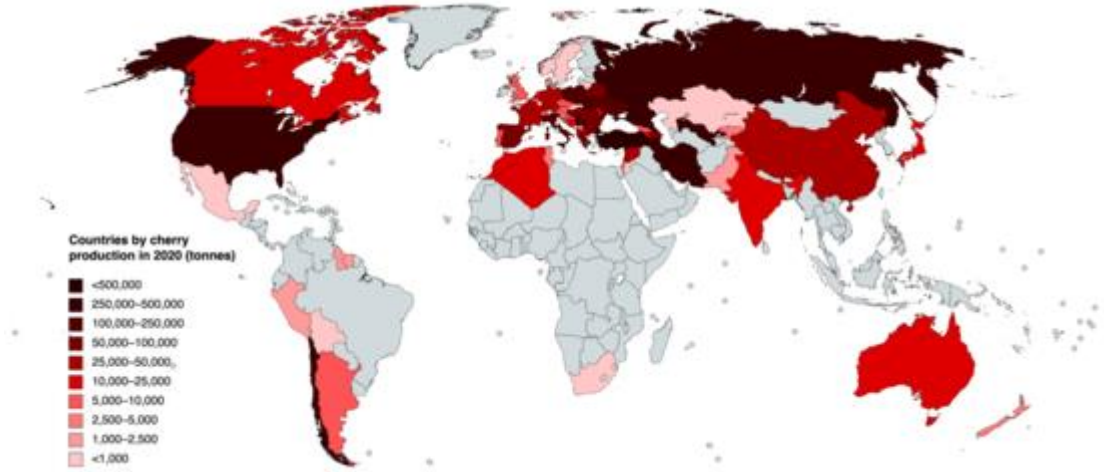
SDT	: Sequence Demarcation Tool
SLRSV	: Strawberry latent ringspot virus
ss	: Single stranded (Tek iplikli)
TAMV	: Tulare elma mozaik virüsü
TAS-ELISA	: Triple antibody sandwich ELISA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
U.S.A.	: United States of America
USDA	: U.S. Department of Agriculture A.B.D. Tarım Bakanlığı)
UV	: Ultraviyole (Morötesi)
V	: Volt
WHO	: World Health Organization



1. GİRİŞ

Gülgiller (*Roseceace*) familyası, Prunoideae alt familyası, *Prunus* cinsine giren kiraz (*Prunus avium*), Giresun, Güney Kafkasya, Hazar Denizi ve Kuzeydoğu Anadolu'da doğal olarak bulunan meyve ağacı olup anavatanı Anadolu'dur (Öz, 1998). Dünyanın doğusuna ve batısına, bu gen merkezlerinden yayılan geniş bir üretim alanı vardır. Bu yüzden kirazın orijin merkezlerinden biri Anadolu'dur.

İhracat pazarlarında Türk kirazına olan talebin teşvik ettiği yeni yatırımlar sayesinde Türkiye'de kiraz üretim alanı kademeli olarak artmaya devam etmektedir. Kiraz ağaçları Türkiye'de ağırlıklı olarak Ege, İç Anadolu, Marmara ve Akdeniz bölgelerinde yetiştirilmektedir. Kirazın en çok üretildiği iller İzmir, Konya ve Manisa'dır. Konya ve Manisa bölgelerindeki yüksek verim, Afyon ve Balıkesir bölgelerindeki iklimden kaynaklanan hasarlardan dolayı azalan verimi kısmen telafi etmiştir. Üretimdeki genel artışlara rağmen, çiçeklenme ve çiçeklenme dönemlerinde şiddetli rüzgarların üretimde düşüşe neden olduğu İzmir'in Kemalpaşa ilçesi gibi bazı bölgelerde verim kayıpları da yaşanmıştır. Kiraz ağaçları, Türkiye'nin farklı bölgelerinde, farklı fiziksel ve iklimsel koşullara sahip olarak yetiştirilebilmektedir. Bu nedenle ekim yapılan bölgeye göre hasat süresi 40-45 gün arasında değişebilmektedir. Son zamanlarda; yeni çeşitler, anaçlar, eğitim sistemleri ve yetiştirme teknikleri kullanılarak modern ve yüksek yoğunluklu meyve bahçeleri kurulmuştur. Ayrıca, yüksek yoğunluklu dikim kiraz bahçelerine artan ilgiye rağmen, çoğu kiraz üretimi, aile çiftçileri tarafından işletilen tarımsal işletmeler arasında ağırlıklı olarak geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler arasında uzun ağaçların ve yerel çeşitlerin düzenli eğitim olmadan kullanılması, budama ve modern sulama sistemlerinin daha az kullanılması yer almıştır. Ancak, daha küçük aileye ait bahçeler, istikrarlı bir işgücü arzı avantajına sahiptir, bu da bahçelerin daha bakımlı olmasına olanak vermiştir (Anonymous, 2022).



Şekil 1.1. Dünyada kiraz üreticisi ülkelerin durumu (FAO, 2022)

Dünyadaki tahmini toplam kiraz üretimi 2020 yılı için 4,088,595 ton olarak tahmin edilmiş olup, Türkiye küresel üretimin %22'sinden fazlasını oluşturan en büyük kiraz üreticisidir (Anonymous, 2022). Avrupa Birliği (AB), kiraz ithalatının yaklaşık yüzde 75'ini oluşturmakta ve bu gereksinimini çoğunlukla Türkiye'den temin etmektedir.

Türkiye, dünya ülkeleri arasında kiraz üretiminin de %26'sını gerçekleştiren ilk sıradaki ülke konumundadır. Kiraz ülkemizin en önemli ihraç meyve ürünlerinden biri olup, üretimde 2021 TÜİK verilerine göre 22.154.903 adet meyve veren ağaç sayısı ile 689.834 tonluk üretim kapasitesindedir. Türkiye'nin bölgelere göre kiraz üretiminde ilk sırada 235.974 ton ile Ege Bölgesi, ikinci sırada toplam 137.473 ton ile Batı ve Doğu Marmara Bölgesi, üçüncü sırada 121.615 ton ile Akdeniz Bölgesi, 37.832 ton ile İç Anadolu Bölgesi 4. sırada yer almaktadır (Anonim, 2022). Ancak, kiraz üretimi 2022 yılında 2021 yılına göre %4,9 oranında azalmış olup 656.041 ton olmuştur (Anonymous, 2022).

Çizelge 1.1. TÜİK verilerine göre 2016-2021 yılları arasında ton bazında en çok kiraz üretimi yapılan iller (Anonim, 2022).

İller	2016	2017	2018	2019	2020	2021
İzmir	46.574	68.509	57.892	66.136	108.495	87.667
Bursa	32.468	34.524	52.235	60.854	55.652	52.971
Konya	55.426	56.294	68.204	68.213	64.086	51.942
Afyonkarahisar	40.387	35.818	41.043	37.282	41.329	50.793
Isparta	55.657	33.353	36.275	36.533	40.746	50.281
Manisa	46.648	43.638	47.348	48.465	50.934	49.343
Amasya	25.008	39.694	36.444	38.542	34.926	41.084
Çanakkale	13.542	19.722	20.906	21.953	34.797	29.830
Niğde	23.386	23.660	27.012	28.458	32.887	20.068

Türkiye'nin 2016-2021 yıllarındaki kiraz üretim miktarına bakıldığında ise yıllara göre İzmir ilimizde gözle görülür bir artışın olduğu ve daha sonra 2021 yılında azaldığı, diğer illerde ise önemli bir değişiklik olmadığı görülmektedir (Çizelge 1.1, Anonim, 2022). Kiraz ülkemizin en önemli ihraç ürünlerinden biri olup üretimde 2021 TÜİK verilerine göre 22.154.903 adet meyve veren ağaç sayısı ile 689.834 tonluk üretim ile dünya kiraz üretiminin de %26'sını gerçekleştiren bir ülke durumundadır. Ancak, kiraz üretimi 2022 yılında 2021 yılına göre %4,9 oranında azalmış olup 656.041 ton olmuştur (Anonymous, 2022) . Türkiye'nin bölgelere göre kiraz üretiminde ilk sırada 235.974 ton ile Ege Bölgesi, ikinci sırada toplam 137.473 ton ile Batı ve Doğu Marmara Bölgesi, üçüncü sırada 121.615 ton ile Akdeniz Bölgesi, 37.832 ton ile İç Anadolu Bölgesi 4. sırada yer almaktadır (Anonim, 2022).

Kiraz diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi virüs hastalıklarından zarar görmekte ve bundan dolayı önemli ürün kayıpları görülmektedir (Karaca ve ark., 1972; Gökçe, 1998; Spotts ve ark., 1990). Kirazlarda görülen başlıca virüs hastalıkları; prune dwarf virus (PDV), plum pox virus (PPV), cherry leaf roll virus (CLRV), cherry green ring mottle virus (CGRMV), cherry mottle leaf virus (ChMLV), cherry rasp leaf virus (CRLV), cherry twisted leaf associated virus (CTLaV), cherry virus A (CVA), little cherry virus-1 (LChV-1), little cherry virus -2 (LChV-2), cherry necrotic rusty mottle

virus (CNRMV), cherry rusty mottle virus (CRMV), europa cherry rasp leaf virus (ECRLV), apple mosaic virus (ApMV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV), plum bark necrotic stem pitting associated virus (PBNSPaV), apple stem grooving virus (ASGV), apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), apple stem pitting virus (ASPV), arabis mosaic virus (ArMV), petunia asteroid mosaic tombusvirus (PAMV) and carnation Italian ringspot tombus virus, causing cherry detrimental canker virus (CIRV), raspberry ringspot virus (RpRSV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tomato black ring virus (TBRV) en önemlileridir.

Ülkemizde son yıllarda kiraz üretimindeki artışla birlikte sorunlar da artmaktadır. Bu sorunların en önemlilerinden bir tanesi de virüs hastalıklarıdır. Kimyasal mücadelesi olmaması ve ciddi anlamda ekonomik kayba neden olması, virüs hastalıklarının önemini arttırmaktadır. Virüs hastalıklarının yayılmasının en önemli sebeplerinin başında hastalıktan ari üretim materyalinin kullanılmaması gelmektedir. Ekonomik olarak ülke gelirine büyük katkıları olan bu meyve türlerinde önüne geçilemeyen virüs hastalıkları büyük sorunlar yaratmaktadır (Öztekin, 2006). Ayrıca virüsler dışında viroid ve fitoplazmalar da ciddi zararlar oluşturmaktadır. Kiraz virüs etmenlerinin sebep olduğu zararların boyutu; meyvenin çeşidine, virüsün ırkı ile virülenslik durumuna göre değişebilmektedir (Myrta ve ark, 1996). Virüslerin sebep olduğu etmenlerin çoğu latent enfeksiyona neden olmakta, farklı iklim ve ekolojik koşullarda belirtiler verebilmekte, bahçe tesisi yapılırken yapılan yanlış uygulamalardan dolayı viral hastalıkların hızlı bir şekilde ülkemizde yayılmasına ve ticari bahçelerde daha kurulum aşamasında fidan ölümlerine neden olmaktadır (Sipahioğlu ve ark., 2007). Bu durumların ana nedeni, üretim materyallerinin (anaç ve kalem) kontrolsüz bir biçimde dağıtılması ve bunun ardından da bazı hastalıkların vektörlerle yayılmasıdır. Virüs etmenlerinin yol açtığı hastalıklar; ağaçların zayıflamasına ve ölümüne, ürünün kalite ve miktarının düşmesine, aşı tutma ve köklenme oranında azalmaya neden olabilmektedir (Candresse, 1995). Virüs hastalıkları ise genel olarak bitkilerin yapraklarında klorozlar ve nekrozlar, bitki büyümesinde duraklama, meyve ağaçlarının gelişimini sınırlandırarak meyve verim ve kalitesini düşürmekte ve sonuçta ağaçların ekonomik ömürlerini azaltmaktadır.

Kirazlarda görülen bu virüs hastalıklarının önce etmenlerini her yönüyle tanımak, ırklarını ve konukçu dizisini belirlemek ve hızlı tanı yöntemleri ile etmeni saptamak kontrol açısından önemlidir. Bu etmenlerin önemi; adı geçen etmenlere yönelik pratik

olarak uygulanabilir doğrudan kimyasal mücadele yöntemlerinin olmaması, kolayca tanılama yapılamaması, çoğunun vektörlerle, üretim materyali ve aşı ile kolayca taşınabilmesi gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır (Baumgartnerova, 1996). Prune dwarf virus (PDV), hem kirazlarda hem de vişnelerde oldukça yaygın olarak bulunan ve ekonomik açıdan önemli bir patojendir. PDV, vişne sarılığı hastalıklarına neden olur (Halk ve Fulton, 1978). Kirazda ve diğer gülgiller familyasına ait ağaçlarda önemli bir virus hastalığı olan PDV'nin belirtileri virüs izolatına, iklime, türlere, konukçuya ve çeşitlere göre değişir (Vašková ve ark., 2000). Bitki, belirtileri değişkenlik gösterse de yaygın olarak ağaçta bodurluk, yapraklarda nekroz ve kloroz görülmektedir. Özellikle şeftalide görülen PDV belirtisi, boğum aralarının kısalması, hem bitki hem de meyve büyümesinde azalma, koyu yeşil yapraklar, ve gelişen sürgünlerde rozet oluşumuna neden olabilmektedir (Scott ve ark., 2001).

PDV ile bulaşık bitkilerin bazen belsimsiz seyredebileceği fakat vişne ve kirazda belsim görölme olasılığının yüksek olduğu görölmüştür. Bu belirtilerin kiraz yapraklarında klorotik lekeler şeklinde olabileceği bildirilmiştir (Massart ve ark., 2008).

Öte yandan PDV, çekirdekli meyve ağaçlarına PNRSV'ye kıyasla çok daha fazla zarar verir ve bu ürünlerde ekonomik açıdan en önemli virüslerden biridir (Nemeth, 1986; Uyemoto ve Scott, 1992). Genellikle PDV, ya tek başına ya da Ilarvirüslerden PNRSV veya ApMV ile karışık enfeksiyonlar şeklinde ortaya çıkar. (Ulubaş-Serçe ve ark., 2009).

PDV ve PNRSV'nin aşılama yoluyla bulaşmasına ek olarak, polen yoluyla da hem yatay (yani ağaçtan ağaca) hem de dikey (yani ebeveynden döle) olarak iletilerek yayılımı tespit edilmiştir (Das ve ark., 1961; Gilmer 1965; Mink 1993; Milne ve Walter, 2003, Card ve ark., 2007). Bu patojenlerin her biri için tohumla taşınma farklı sert çekirdekli meyve türlerinde de doğrulanmıştır. (Boari ve ark., 1998; Amari ve ark., 2009).

PDV ve PNRSV'nin yayılmasında polenlerin etkisi bilinmekle birlikte polenle taşınmada böceklerin rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak thrips türlerinden *Frankliniella occidentalis*'in bulaşmayı kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Greber, 1992).

PDV, 2016 yılında ülkemizin de üyesi olduğu Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO)'nun A2 karantina listesinde yer almıştır. PDV'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda virüsün kısmi kılıf proteini (CP) (Vašková ve ark., 2000; Youssef ve ark., 2002; Ulubaş Serçe ve ark., 2009; Öztürk ve Çevik, 2015) ve hareket proteininin (Predajňa ve ark., 2017) baz dizileri esas alınmaktadır. PDV varlığının tespitinde yönelik yürütülen çalışmalarda Akdeniz ülkelerindeki enfeksiyon oranının %67.2-80 arasında değiştiği bildirilmiştir (Myrta ve Savino, 2008).

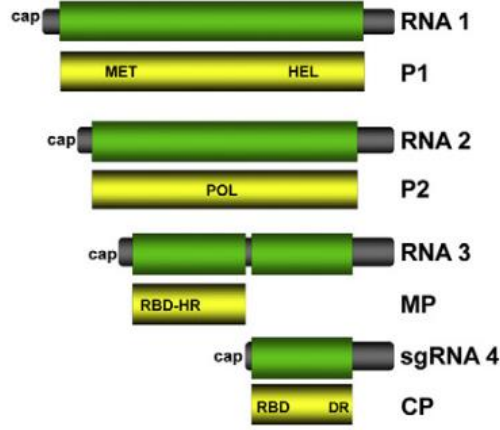
Sırbistan'da yapılan bir çalışmada ise bu oranın %37.6 olduğu tespit edilmiştir (Mandic ve ark., 2007). Vašková ve ark., (2000) farklı sert çekirdekli konukçulardan izole edilen 11 PDV izolatının kılıf protein gen bölgesinin oldukça korunan bir bölge olduğunu bildirmiş ve yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda coğrafik orijin, konukçu ve izolatlar arasında herhangi bir özelleşme belirlenmemiştir. 32 PDV izolatı ile yapılan analizlerde kılıf protein bölgesinin referans izolatlar ile yüksek oranda (%86-96) benzerlik gösterdiği belirlenmiş olup, oluşturulan filogenetik ağaçta ağacında 4 farklı grup gözlenmiştir (Boulila, 2010). Türkiye'de yapılan çalışmalarda enfeksiyon oranının bölgelere göre %5-55 arasında değiştiği görülmüştür (Çağlayan-Yıldızgördü ve Hurigil, 1996; Gümüş ve ark., 2007; Çevik ve ark., 2011 ; Öztürk ve Çevik, 2015). Dokuz kayısı ve bir kiraz izolatı dizilenerek elde edilen filogenetik ağaçta izolatlar 4 farklı grupta toplanmıştır (Ulubaş Serçe ve ark., 2009). Öztürk ve Çevik (2015) tarafından Türkiye'nin göller yöresinde PDV izolatlarının yaygınlığı ve genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla toplanan 521 kiraz numunesinin 316'sında PDV tespit edilirken (%60.27) yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda 3 ana grup altında alt grupların varlığına değinilmiştir.

Bu çalışmanın amacı ülkemizin önemli kiraz yetiştiriciliği yapılan illerinden İzmir, Konya, Kahramanmaraş, Niğde, Bursa, Manisa, Osmaniye, Adana ve Antalya'da kiraz ağaçları için önemli viral patojenler arasında yer alan PDV'nin yaygınlığını DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle tespit etmek ve elde edilen PDV izolatlarının MP, CP ve RdRp kısmi gen bölgelerine ait DNA dizileri kullanılarak genetik çeşitliliğini araştırmak ve dünya izolatlarıyla kıyaslamasını yapmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Pallas ve ark. (2012) *Ilarvirus* cinsi, *Bromoviridae* familyasına ait virüs türlerinden oluşmaktadır. Ilarvirüsler genellikle meyve ağaçlarını etkilerken, latent patojenler olarak kabul edilmiştir ve bu nedenle ekonomik önemlerinin hafife alındığını bildirmiştir. Zhang ve Qu, (2015) diğer bromovirüsler gibi ilarvirüslerin de genomik yapısının 3 tane pozitif polariteli tek kollu RNA'dan (RNA1, RNA2, RNA3) oluştuğunu bildirmişlerdir. Pallas ve ark. (2012), RNA1'in metiltransferaz ve helikazı, RNA-2'nin de RdRp'yi, RNA-3'ün de kılıf proteinini ve hareket proteinini (MP) kodladığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, virüs replikasyonu sırasında, bir subgenomik (genlerin hepsini değil bir kısmını taşıyan) RNA4'ün kopyalandığını ve kılıf proteininin (CP) translasyonundan sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Waterworth ve Fulton (1964), PDV'ne ait farklı biyolojik, serolojik özelliklere sahip PDV izolatları ve moleküler özellikler tanımlanmıştır (Paduch-Cichal, 2000; Vaskova ve ark., 2000; Fonseca ve ark., 2005; Ulubaş Serçe ve ark., 2009).

Pallas ve ark. (2012), *Bromovirüslerde* kılıf proteininin virüs genomunu koruma ve viral enfeksiyonu başlatma gibi ikili bir işlevi olduğunu bildirmişlerdir. Pallas ve ark., (2013), *Bromovirüs* partiküllerinin genellikle ikosahedral (kübik simetri) olduğunu, ancak prune dwarf virüs (PDV), prunus necrotic ring spot virus (PNRSV), Tulare apple mosaic virus (TAMV), apple mosaic virus (ApMV) ve spinach latent virus (SpLV) ile enfekte olmuş bitkilerde bacilliform partiküllerin gözlemişlerdir.



Şekil 2.1. İlarvirüslerde genom organizasyonu (Pallas ve ark., 2013, Bonilla F.R. ve Cieniewicz E., 2022).

Pallas ve ark. (2013), genomun 3 ana RNA dizisinden ve RNA-3'ten eksprese edilen bir subgenomik RNA-4'ten oluştuğunu bildirmişlerdir. Eksprese edilen proteinlerin, P1 (Protein 1), P2 (Protein 2), MP (Hareket proteini) ve CP (Kılıf protein) olduğu ve her alanın metiltransferaz (MET), helikaz (HEL), RNA'ya bağlı RNA polimeraz (POL) RNA bağlama alanı (RBD), hidrofobik bölge (HR) ve dimerizasyon bölgesi (DR) olarak temsil edildiğini rapor etmişlerdir (Bonilla ve Cieniewicz, 2022).

Fauquet ve ark. (2005), benzer genom organizasyonuna sahip olmalarına rağmen PNRSV ve PDV, İlarvirus cinsinin farklı alt gruplarına ait olduğu (Şekil 2.1) ve cins içindeki türlerin sınırlarını belirlemek için kullanılan kriterlerin seroloji ve konukçu dizisindeki benzerliklerden oluştuğunu bildirilmişlerdir. Bu kriterlere göre prunus necrotic ring spot virus (PNRSV) ve apple mosaic virus (ApMV) 3.alt grupta, prune dwarf virüs (PDV) ise 4. Alt grupta yer aldığı gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Virüs karakterlerinin değerlendirilmesine dayalı dört *Ilarvirus* alt grubu. (Pallas ve ark., 2013) .

1.Altgrup	2.Altgrup
Blackberry chlorotic ringspot	Aparagus virus 2
Parietaria mottle virus	Citrus leaf rugose virus
Strawberry necrotic shock virus	Citrus variegation virus
Tobacco streak virus	Elm mottle virus
Potential members	Lilac ring mottle virus
Bacopa chlorosis virus	Spinach latent virus
Tomato necrotic ringspot virus	Tulare apple mosaic virus
3.Altgrup	4.Altgrup
Apple mosaic virus	Fragaria chiloensis latent virus
Blueberry shock virus	Prune dwarf virus
Lilac leaf chlorosis virus	Potential members
Prunus necrotic ringspot virus	Viola white distortion virus

Uyemoto ve ark. (2003), *Ilarvirüslerin* doğada yayılmasını, enfekte olmuş gametlerden embriyoya dikey olarak (ebeveynden döl) veya enfekteli fidanlardan sağlıklı ağaçlara yatay yolla taşındığını bildirmişlerdir. Yatay (aynı nesil) yayılmanın, polen yoluyla da gerçekleşebildiğini, *ilarvirüslerin* yatay geçişinin bazen thrips ve tozlayıcılar gibi çiçekleri ziyaret eden böceklerle de ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Örneğin, thrips ile *Ilarvirüs* taşınmasının , sert çekirdekli meyvelerden biri olan şeftali ağaçlarında enfeksiyona neden olurken doğaları gereği mekanik taşınma gibi görüldüğünü, ancak bu grup böceklerle polen bulaşma mekanizmasının çok iyi anlaşılmadığını göstermişlerdir. Bu hipotezde, polen taneleri ile beslenen tripslerin, sitoplazmik içeriğinin dışarı sızmasına ve çiçeklerin iç yüzeylerindeki beslenme yaralarını istila etmesine neden olduğunu tespit etmişlerdir.

2.1. PDV'nin Simptomatolojisi ve Genom Organizasyonu

2.1.1. Prune dwarf virus (PDV)'nin tanımı ve simptomalojisi

PDV, ilk olarak Thomas ve Hildebrand (1936), tarafından bodurluk ve yaprakta şekil bozukluğu belirtileri gösteren eriklerde (*Prunus domestica*) tanımlanmıştır.

Genellikle PDV, diğ er ilarvir slerle birlikte karışık enfeksiyonlar olarak ortaya çıkmaktadır. Kiraz ve vişnede polen geçişi en yüksek bulaşma oranlarını göstermektedir (George ve Davidson, 1964; Gilmer 1965).

PDV, özellikle kiraz, vişne, şeftali, erik ve badem gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarına ekonomik açıdan zarar veren en önemli virüslerinden biridir (Nemeth, 1986; Uyemoto ve Scott, 1992). PDV'nin doğal konukçu aralığı, *Prunus avium*, *P. cerasus*, *P. cerasifera*, *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. insititia*, *P. mahaleb* ve *P. persica*'yı içerir (Nemeth, 1986). Virüs mekanik inokulasyon, aşı, üretim materyali nakli ve polen ile yeni konuk lara yayılabilmektedir (Nemeth, 1986).

Kirazda ise, PDV yapraklarda klorotik lekeler, halkalara, yaygın beneklenmelere, gövde  ukurlaşmasına neden olabilir. Meyvelerde şekil bozukluklarına ve üretim azalmasına sebep olur. Virüs, özellikle kiraz, vişne, badem ve şeftali gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarında ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Nolasco ve ark., 1991; Uyemoto ve Scott, 1992, Rampitsch ve ark, 1995). PDV enfeksiyonu, verim azalmasına neden olur ve bademde (Nolasco ve ark., 1991), şeftali ve kirazda önemli kayıplara neden olmaktadır (Uyemoto ve Scott, 1992 , Rampitsch ve ark, 1995).

PDV'nin, polen yoluyla kolayca yayılma yeteneği ve enfekte olmuş konuk ları tedavi edecek bir tedavi yöntemi olmaması gerçeği, meyve bahçesindeki bir ağaca bulaştığında da hastalığı yönetmeyi zorlaştırır. Polen yoluyla taşınmada, sadece *Frankliniella occidentalis* isimli bir thrips türünün de PDV'nin kiraz poleninden diğ er bir konuk  olan salatalığa geçişini kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (Greber, 1992).

PDV, özellikle kiraz ve vişne yetiştirilen yerlerde dünya çapında bir dağılıma sahiptir (Parakh ve ark., 1995).

Scott ve ark. (1998), PDV ve PNRSV'nin birlikte enfeksiyonları sonucunda meydana gelebilecek verim kaybının %60'lara kadar çıkabileceğini bildirmiştir.

PDV ile bulaşık ağaçların yapraklarında genellikle küçülme ve daralma, damar bölgesinde kırışma, sürgün aralarında kısılma, özellikle kiraz ve vişnelerin yapraklarında klorotik halka ve lekeler meydana gelmektedir (Sutic ve ark., 1999).

PDV'nin belirtileri iklime, virüs türüne, konuk  türlere ve çeşide bağlı olarak büyük  l de değişir (Vařková ve ark., 2000).

Sert  ekirdekli meyvelerin önemli bir viral hastalık etmeni olan PDV'nin ApMV ve PNRSV ile bitkilerde karışık enfeksiyon halinde olabileceği bildirilmiştir. PDV'nin

yayılımında aşı, polen ve üretim materyalinin etkin bir rol oynadığı bildirilmiştir (Fonseca ve ark., 2005). Sert çekirdekli meyve tarımının yapıldığı yerlerde PDV enfeksiyonu yoğun olarak gözlenmekte olup, özellikle bulaşık kiraz ve vişne ağaçlarında ciddi oranda verim ve kalite kayıplarının görülebileceği bildirilmiştir (Myrta ve Savina, 2005).

Mandic ve ark. (2007), yaptıkları bir çalışmada kiraz ağaçlarında buldukları virüsleri mekanik inokulasyon ile otsu indikatör bitkilerden *Nicotiana occidentalis*, *N. benthamiana*, *Cucumis sativus*, *Chenopodium quinoa* ve *C. amaranticolor*'a bulaştırmış ; 45 pozitif örnekten sadece 5'inde PDV ve PNRSV ELISA ile tespit edilmiştir. Aynı çalışmada otsu indikatör bitki olarak *P. serrulata* (süs kirazı) kullanıldığında ise bitkilerde yaprak deformasyonları, epinasti (organların yukarı doğru kıvrılması) ve nekrotik belirtiler oluşmuştur.

Erikte PDV, bodurluğa, yapraklarda şekil bozukluğuna ve boğum aralarının kısılmasına neden olmuştur. PDV, İtalyan eriğinde sürgünlerin uzunluğunu, çaplarını, yaprak sayısını ve fotosentetik toplam alanını azaltmıştır (Hadidi ve Barba, 2011).

PDV'nin CP genine karşılık gelen birçok dizi, farklı coğrafi kökenlerden (Arjantin, Brezilya, Kanada, Almanya, Macaristan, İsrail, Moldova, Polonya, Portekiz, Rusya, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye) ve konukçulardan (badem, elma, kayısı, kiraz, şeftali, erik, vişne, kiraz ve yabani kiraz) karakterize edilmiştir (Pallas ve ark. 2012).

PNRSV ve PDV enfeksiyonunun görüldüğü, ortalama on yaşlarındaki şeftali ağaçlarından elde edilen örneklerde, klorotik lekeler, damarlarda renk açılması, nekrotik alanlar ve bodurlaşma belirtilerinin görüldüğü bildirilmiştir (Zindović ve ark., 2013).

Sanchez ve ark. (2015), ise PDV'nin kirazda olgun yaprakların orta damar etrafında genel kloroz belirtileri meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Enfekteli bitkilerde kıvrılmış yapraklar, kısa internodlar görülebileceği bildirilmiş olup çoğunlukla kiraz ve vişnede klorotik halkaların daha belirgin olabileceği rapor edilmiştir (Kamenova ve ark., 2019).

Portekiz'de badem izolatlarından elde edilen PDV-CP nükleotid dizileri, diğer sert çekirdekli meyve (şeftali, kiraz ve erik) gibi ikinci konukçular için daha yoğun bir arındırıcı seçim önermektedir (Fonseca ve ark. 2005). Bulgaristan'da, kiraz ve vişnelerden 14 PDV-CP izolatının filogenetik analizi, nispeten düşük derecede

nükleotid dizi çeşitliliği göstermiştir. Bulgar izolatlarının, sırasıyla nükleotid ve amino asit seviyesinde iki ve üç filogrup halinde filogenetik gruplandırılması, farklı coğrafi bölgelerden kiraz izolatlarının bildirilen filogruplaması ile uyumludur. Filogenetik gruplama ile ifade edilen simptomlar veya coğrafi köken arasında bir ilişki tespit edilememiştir (Kamenova ve ark. 2019).

Farklı taksonomik gruplardan olmakla birlikte, sert çekirdekli meyveleri enfekte edebilen 30'dan fazla virüsün olduğu bildirilmiştir. Bu virüsler arasında yer alan PDV, Bromoviridae familyası *Ilarvirus* cinsi içerisinde yer almakta olup sert çekirdekli meyve ağaçlarının (kiraz, vişne, şeftali, erik, badem) ekonomik açıdan en önemli virüslerinden biri olarak kabul edilmektedir. EPPO kayıtlarına göre, kirazlarda PDV yerine kullanılan diğer yaygın isimleri chlorotic necrotic ringspot virus of cherry, chlorotic ringspot of cherry, necrotic leaf mottle of cherry, ring mottle of cherry, yellow mottle of cherry olup vişnelerde yellows of sour cherry olarak da adlandırılmıştır (Anonymous, 2022) .

Ülkemizde PDV ilk kez Kurçman (1977), tarafından simptomolojik olarak tespit edilmiş, daha sonra yapılan çalışmalarda (Dunez, 1988; Azeri, 1994) PDV'nin yurdumuzun tüm sert çekirdekli meyve üretimi yapılan bölgelerinde yaygın bir şekilde bulunduğu bildirilmiştir.

Hurigil-Gazel (1997)'in *Prunus* türlerinde yaptığı bir çalışmada PNRSV, ACLSV, PDV, ApMV'ünü DAS-ELISA ile tespit etmiş, bulunan virüsleri *Cucumis sativus*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *Chenopodium quinoa* ve *C. amaranticolor* test bitkilerine mekanik olarak inokule etmiştir. Test bitkilerinden sadece *C. sativus* PDV, PNRSV ve ApMV ile enfekte olmuştur. PNRSV ile enfekteli bitkilerden 15 gün sonra yaprak damarlarında renk açılması, PDV ile enfekteli bitkilerden damar açılması ile birlikte yapraklarda küçülme ve deformasyonlar gözlenmiştir.

Kiraz, vişne, mahlep ve mirobalanda tohumdan geçişi meydana gelir, ancak enfeksiyon oranları türlere göre değişir (Çağlayan ve ark., 2006).

Yaygın simptomlar arasında nekroz, kloroz ve bodurluk bulunur. PDV'nin neden olduğu hasarın boyutu, etkilenen *Prunus* türüne veya çeşidine ve virüs ırkına bağlıdır (Çağlayan ve ark., 2011).

Türkiye'de 2016 yılından itibaren A2 karantina listesinde bulunan önemli bir virüstür (Anonymous 2022b).

2.1.2. Genom organizasyonu

Virüsün protein kılıfı (CP), bir genomun aktivasyonu için gerekli olan virüs partiküllerinin replikasyonunu ve kapsidasyonunu etkiler (Bachman ve ark, 1994).

Monosistronik (tek bir protein kodlayan mRNA) PDV-RNA-1, ilk kez Ramptish ve Estwell (1997) tarafından sekanslanmıştır (Ramptish ve Estwell, 1997). Kanada'dan kirazın Salomo çeşidinden elde edilen izolatlardan PDV nükleotid dizisi sekanslanmıştır. PDV izolatından elde edilen RNA-1; 3374 nükleotid uzunluğunda olup, tek açık okuma alanı (ORF1) içerir. RNA-1'in 3374 uzunluğundaki nükleotidin ORF1 olarak tanımlanan tek açık okuma alanı, 3168 nükleotid içeren ve yapısal olmayan bir proteine P1 (varsayılan replikaz) kodlanarak bağlanır. PDV-RNA-2'nin monosistronik olarak ORF2 ile taşınması, RNA-1'e benzer. RdRp, RNA-1'e benzer şekilde olan PDV-RNA-2 içeren, ORF 2 taşıyan monosistronik bir moleküldür.

Scott ve ark.(1998) tarafından belirlenen ORF2, 2367 nükleotitten oluşan yapısal olmayan bir protein olan P2 ile kodlanıp, RdRp bileşenini oluşturur. RNA'ya bağlı olarak çoğalan RdRp enzimi RNA2'nin tüm nükleotid dizisi olan 2593 nükleotidden oluşur.

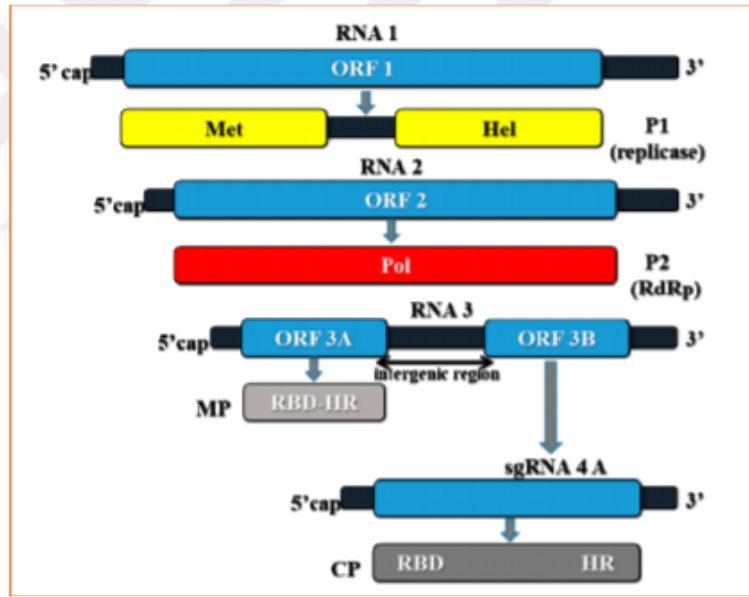
Orta Avrupa ülkelerinden erik, kiraz ve şeftali ağaçlarından elde edilen 11 PDV izolatının, kılıf protein geninin nükleik asit dizileri ve intergenik bölgeleri belirlenmiş ve bu izolatlar daha önce başka araştırmacılar tarafından yayınlanan iki izolat ile nükleik asit dizilimleri karşılaştırılmıştır. Nükleotid karşılaştırması ile kılıf proteinin %88 oranında korunduğu tespit edilmiştir. CP'nin C-terminal ucunun yarısında yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bu bölgede 13 amino asit yer değişimi gözlenirken N-terminal ucunun yarısında 22 adet olduğunu belirlemişlerdir. PDV izolatlarının moloküler ağırlıkları arasındaki en büyük farkın 27.7 kDa olduğu ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar, amino asit yer değişimleri ile konukçu türü ya da coğrafik orijine bağlı bir ilişki tespit edemediklerini bildirmişlerdir (Vaskova ve ark., 2000). Bachman ve ark. (1994)'nın daha önce RNA-3'ün CP geninin dizilimini yaptığı ve PDV ile enfekteli Amerika-şeftali izolatıyla Mısır ve Amerika'dan ikişer izolatının baz dizisini belirlemiş ve karşılaştırmışlardır. Mısır'dan şeftali ve erik izolatını, Amerika'dan 2 kiraz izolatını yapılan bu çalışmada kullanmışlardır. Dizileme sonucunda, Mısır ve Amerika kiraz

izolatlarının, Amerika şeftali izolatu ile sırası ile %97 ve %98 arasında benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir (Youssef ve ark., 2002).

PDV genomu, RNA1, RNA2 ve RNA3 olarak adlandırılan üç pozitif tek kollu RNA (ssRNA) segmentinden oluşmaktadır. Viral kompleksin ilk bileşeni, RNA1 segmenti tarafından kodlanan P1 proteindir (Pallas ve ark, 2012). RNA2, replikasyon yapısının bir elemanı olan RdRp kaynağı olan P2 proteinini kodlar (Pallas ve ark, 2013).

PDV genomu, RNA1 (1.3×10^{-6} Da), RNA2 (0.95×10^{-6} Da) (Kajati, 1976; Fulton, 1983) ve RNA3 (0.76×10^{-6} Da) segmenti olmak üzere 3'e bölünmüş pozitif tek kollu RNA'dan oluşur (Kalinowska, 2014). Her bir RNA içeriği viral kapsid içindedir (Lee, 2014).

Toplam 8096 bp uzunluğundaki PDV'nin ayrıntılı her üç bölgesinin tüm genomlarının açıklaması ve referans sekansları Şekil 2.2' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. PDV genom organizasyon yapısı (Kozieł ve ark., 2017)

PDV'nin, hücreden hücreye yayılımında plazmodesmata yoluyla viral replikasyon veya hücreden hücreye hareket düzenlenmesinde rol oynayan ana bileşenler hala bilinmemektedir. PDV'nin geniş bir yelpazedeki konukçu bitkilerde doğal savunma mekanizmalarının üstesinden gelme konusunda büyük bir yeteneğe sahip olduğu görülmüştür. PDV enfeksiyonunun ilk belirtilerinin meydana gelişinin, spesifik hücre zarı değişiklikleri ve hücreler içerisinde PDV RNA replikasyonunu destekleyen

replikaz komplekslerinin oluşumu olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte yaşam döngüsünün her aşamasında virüsün, bitki bünyesinde yayılmak için hücre bileşenlerini kullandığı bildirilmiştir (Kozieł ve ark., 2017).

MP, plasmodesmata yoluyla hücreden hücreye viral taşımayı mümkün kılan boru şeklindeki yapıları oluşturur (Kozieł ve ark, 2018).

CP ve hareket proteini (MP), PDV genomunun üçüncü bölümü olan RNA3 tarafından kodlanır (Kozieł ve ark, 2020).

Farklı taksonomik gruplardan olmakla birlikte sert çekirdekli meyveleri enfekte edebilen 30'dan fazla virüsün olduğu bildirilmiştir. Bu virüsler arasında yer alan PDV, Bromoviridae familyası *Ilarvirus* cinsi içerisinde yer almakta ve sert çekirdekli meyve ağaçlarının (kiraz, vişne, şeftali, erik, badem) ekonomik açıdan en önemli virüslerinden biri olarak kabul edilmektedir. EPPO kayıtlarına göre, kirazlarda PDV yerine kullanılan diğer yaygın isimleri chlorotic necrotic ringspot virus of cherry, chlorotic ringspot of cherry, necrotic leaf mottle of cherry, ring mottle of cherry, yellow mottle of cherry olup vişnelerde yellows of sour cherry olarak da adlandırılmıştır (Anonymous, 2022).

Ulubaş-Serçe ve ark. (2009a), Portekiz'den 9 badem izolatu ve 20 kiraz izolatından elde edilen PDV izolatları arasında CP nükleotid sekanslarının tam karşılaştırmalı analizini gerçekleştirmişlerdir. PDV-RNA2, RNA1'e benzeyen şekilde ORF2 taşıyan monosistronik bir molekül olarak bildirmişlerdir. Ayrıca; Türkiye, Almanya, Kanada, A.B.D., Macaristan ve Polonya'dan kirazlardan toplam 20 izolat elde ettikten sonra bu PDV izolatlarının arasında CP nükleotid diziliminin tam karşılaştırmalı analizini gerçekleştirmişlerdir. Nükleotid dizilimi benzerliği veya homojenitesi kiraz 1 izolatında %95-99, kiraz 2 izolatında %89-98 olarak belirlemişlerdir. Elde edilen bu sonuçlara göre izolatların homojenitesine göre kirazlar için, kiraz1 ve kiraz2 olarak iki grup olarak bildirmişlerdir. Ulubaş Serçe ve ark. (2009b)'nın yapmış oldukları başka bir çalışmada ise 10 PDV izolatının CP genini içeren 657 nükleotidden oluşan bölgenin dizilimini belirleyerek analizini yapmışlar ve Türk izolatlarının gen bankasındaki diğer izolatlarla yapılan filogenetik analizi sonucuna göre dört grup oluştuğunu belirlemişlerdir. Kiraz izolatlarının olduğu ilk grubun korunduğunu ve aminoasit dizileriyle diğer gruplardan ayrıldığını görmüşlerdir. Türk izolatlarının çok sayıda olduğu 2. grupta ise kayısı ve kiraz izolatlarının yer aldığı, 3. grupta da erik, şeftali,

kiraz, bir kayısı izolatları ve 4. grupta ise sadece badem ağaçlarından elde edilen bir grup oluştuğunu görmüşlerdir.

2.1.3. PDV'nin Tespiti ve Teşhisi

Bitki virüs hastalıklarının tanısında biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerden sıkça yararlanılmaktadır.

Chenopodium quinoa gibi bazı otsu konukçular da PDV ve PNRSV ile enfekte olabilir ve bu da enfeksiyonları ayırt etmek için gösterge olarak kullanılabilir. PNRSV, *C. quinoa*'da küçük nekrotik lokal lezyonlar üretir, ardından sistemik olarak enfekte olmuş yapraklarda ciddi bozulma meydana gelir (Davidson ve Rundans, 1972).

Kirazda görülen PNRSV ve PDV'nin genellikle birlikte enfeksiyon yaptıkları belirlenmiştir (Nyland ve ark., 1976; Brunt ve ark., 1996).

Ayrıca ELISA testi uygulanarak kiraz tohumlarında PDV'nin varlığı ilk olarak 1977 yılında Casper (1977) tarafından rapor edilmiştir.

Erik ve kirazlarda PDV, genç yapraklarda veya yeni oluşan tomurcuklarda tüm vejetasyon dönemi boyunca tespit edilebilir (Torrance ve Dolby, 1984).

Kirazlarda görülen PDV, %50-%70 oranında ürün kaybına sebep olarak oldukça yıkıcı etki oluşturduğu bildirilmiştir (Fulton, 1985; Çağlayan ve ark., 2011).

Farklı yöntemlerin virüslerin tanılanmasındaki duyarlılıkları birbirinden farklılık gösterir. Özellikle, PDV ve PNRSV için çeşitli teşhis yöntemleri geliştirilmiştir. Enzimle bağlantılı immünosorbent yöntemi (ELISA) ve ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) şu anda bitki virüs teşhisi için kullanılan en yaygın tekniklerdir. Bazı bitki RNA virüsleri için RT-PCR, özellikle virüsün düşük titrede bulunduğu veya kaliteli antiserumların bulunmadığı durumlarda ELISA'dan daha etkilidir (MacKenzie ve ark., 1997).

Serolojik bir test yöntemi olan ELISA yönteminin güvenilirliği ile birlikte kullanımı da bazı sınırlamalara bağlıdır. Özellikle, odunsu bitkilerde oluşan düşük virüs konsantrasyonu ile virüsün ağaçtaki heterojen dağılımı gibi durumlar dikkate alındığında, bu yöntemin mevsimsel olarak yanlış sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Torrance, 1981). Daha duyarlı ve güvenilir teknik olarak bilinen ve özellikle de

mevsime bağılı farklı virüs konsantrasyonlarından az etkilenen PCR sayesinde ELISA’da yaşanan birçok problem ortadan kalkmıştır (Smith ve ark., 1998).

PDV, İsrail’de yapılan çalışmalarda kirazlarda saptanmıştır (Spiegel ve ark., 1998).

RT-PCR, genç yaprak ve çiçek tomurcuklarının damar dokusu içinde ve ayrıca gelişen çiçek organlarındaki mezofilde ve badem polen tanelerinin üretken ve vejetatif hücrelerinde PDV’yi tespit edebilir (Silva ve ark., 2003).

Dünya kiraz üretiminin yaklaşık %38’ini karşılayan Akdeniz ülkelerinde kiraz ağaçlarında serolojik yöntemlerle gerçekleştirilen testlerde virüs enfeksiyon oranı %48 olarak bulunmuştur. Bu oran güney Akdeniz ülkelerinde %10 civarındayken, Kuzey Akdeniz ülkelerinde %60’lara kadar çıkmıştır. En sık görülen virüsler sırası ile PDV, PNRSV, ACLSV ve ApMV olmuştur. Enfekteli ağaçların %80’inde tespit edilen PDV büyük bir farkla kirazda en yaygın görülen virüs olmuştur (Myrta ve Savino, 2008).

Ticari meyve bahçelerinde ve fidanlıklarda, 2006-2008 yıllarında Çek Cumhuriyeti’nin önemli kiraz yetiştirme alanlarında PDV ve PNRSV virüsü için arazi araştırmaları gerçekleştirilmiştir. 1.198 kiraz ağacından ve 240 vişne ağacından olmak üzere Toplamda 1.438 numune ELISA ile analiz edilmiştir. Her iki virüsün genel ortalama enfeksiyon seviyesi %17.7 olarak tespit edilmiştir. En fazla enfeksiyon oranı %22.5 ile vişne ağaçlarında saptanmıştır. En çok örnekte saptanan virüs %10,9 oranıyla PDV, daha sonra %6.3 oranıyla PNRSV olmuştur (Suchá ve Svobodová, 2010).

Çek Cumhuriyeti’ndeki ticari vişne bahçelerinde ve fidanlıklarda yapılan bir başka çalışmada ise, toplu ölçekte virüs testi için ELISA’nın; hızı, doğruluğu ve özgüllüğü nedeniyle yaygın olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Kapoor ve Handa, 2018).

ELISA yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda sert çekirdekli meyvelerden kirazda en sık görülen virüsün PDV olduğu ve enfeksiyon oranının %5-55 arasında değiştiği ortaya konmuştur (Azeri, 1994; Çağlayan Yıldızgördü ve Hurigil, 1996; Fidan ve Özdemir, 2000; Paylan, 2006).

Çağlayan ve Ulubaş (2003), Türkiye’de sert çekirdekli meyvelerde (kiraz, vişne, kayısı) bulunan virüsleri tespit etmek amacıyla ELISA testine ek olarak RT-PCR tekniğini kullanmışlar ve PNRSV, PDV, PPV ve ApMV virüslerinin varlıklarını saptamışlar ve özellikle İzmir ve Ankara illerinde en yaygın virüs olarak da tespit etmişlerdir.

Sipahioğlu ve ark., (2004)'nın, Van ve civarında sert çekirdekli meyvelerde sorun olan viral hastalıklar üzerine yapmış oldukları çalışmalarda prunus necrotic ringspot (PNRSV), apple chlorotic leaf spot (ACLSV), apple mosaic (ApMV), prune dwarf (PDV) ve plum pox (PPV) virüslerinin tespiti için yapılan çalışmalar kapsamında DAS-ELISA ile test edilen 306 meyve ağacının 154'ü kayısı, 45'i kiraz, 23'ü şeftali, 41'i erik ve 32'si vişne oluşturmuştur. DAS-ELISA testleri ile ortaya konan virüslerden biri olan PDV'nin enfeksiyon oranı kayısıda %0.6, kirazda %7.1 ve vişnede ise %31.2 olarak tespit edilmiştir

İlkbahar döneminde ağaçların tomurcuklanması ile birlikte DAS-ELISA analizi sonucu okunan absorbans değerleri yükselerek devam etmiştir. Mayıs ayında en yüksek okuma değerine ulaşılmış olup, Haziran ve Temmuz aylarında düşük değerler elde edilmiş ve bu tarihe kadar pozitif sonuçlar vermiştir. Temmuz ayında ise sıcaklığın yükselmesi ile virüs konsantrasyonu düşmüş, Ağustos ve Eylül aylarında yapılan testlerde negatif absorbans değerlerine ulaşılmıştır. Sonbaharda Ekim-Kasım ve Aralık aylarında alınan örnekler tekrar yüksek absorbans vererek pozitif sonuç vermiştir. Aralık ayında yaprakların iyice sararıp döküldüğü dönemde alınan yaprak örnekleri tekrar negatif okuma değeri vermiştir. Bu sonuçlara göre genelleme yapacak olursak PDV'nin en uygun örnekleme zamanının ilkbahar ayları ile sonbaharın geç dönemi olduğu söylenebilir (Yegül, 2017).

2.2. Dünya'da PDV konusunda yapılan çalışmalar

En yaygın olarak bulunan kiraz virüsleri PDV, PNRSV ve ACLSV olarak tespit edilmiştir (Jordovic, 1955; Jordovic,1958; Rankovic, 1976; Mandic ve ark., 2007). Kirazda görülen PNRSV ve PDV'nün genellikle birlikte enfeksiyon yaptıkları belirlenmiştir (Nyland ve ark., 1976; Brunt ve ark., 1996).

Kirazlarda görülen PDV, %50-%70 oranında ürün kaybına sebep olarak oldukça yıkıcı etki oluşturduğu bildirilmiştir (Fulton, 1985; Çağlayan ve ark., 2011).

PDV, dünyada sert çekirdekli meyvelerin yetiştirildiği tüm alanlarda yaygın olarak tespit edilmiştir. Son zamanlarda PDV enfeksiyonları, Şili (Herrera, 1991), Portekiz (Nolasco ve ark, 1991), Lübnan (Jawhar ve ark, 1996), Tunus (Zeramini ve ark, 1996), Türkiye (Çağlayan ve ark, 1996), Kıbrıs (Gavriel, 1998), İsrail (Spiegel ve

ark, 1998), Malta (Gatt ve ark, 1998) ve Filistin (Jarrar ve ark, 2001) gibi çok çeşitli ülkelerde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, PDV'nin çok yaygın dağılımı göz önüne alındığında, bu raporlar muhtemelen virüsün önceden PDV'siz bilinen ülkelere gelişinden ziyade önceden var olan PDV enfeksiyonunun keşfini yansıtmaktadır. Kirazlarda, Arnavutluk'ta %25 (Myrta ve ark., 1996) , Güney İtalya'da %75 (Saponari, 1999) ve Lübnan'da %42 (Choueiri, 2003) oranında bulaşma rapor edilmiştir.

Scott ve ark., (1998), PDV ve PNRSV'nin birlikte enfeksiyonları sonucunda meydana gelebilecek verim kaybının %60'lara kadar çıkabileceğini bildirmiştir.

İspanya'nın Murcia bölgesindeki kayısı ağaçlarında moleküler hibridizasyon teknikleri ve serolojik yöntemler kullanılarak, ACLSV, ApMV, PNRSV ve PDV'ye karşı testlenmiştir. Testlenen 450 kayısı ağacının yaklaşık % 30'unun en az bir virüsle enfekteli olduğu tespit edilmiştir. ACLSV ile % 22,6, ApMV ile % 15,7, PNRSV ile % 10 ve PDV ile % 0,4 oranında enfekteli olduğu saptanırken, % 23,6'sının iki farklı virüsle enfekteli, %2,9'unun üç farklı virüs ile karışık enfeksiyon halinde olduğu bildirilmiştir (Dominguez ve ark, 1998).

Vašková ve ark. (2000), Orta Avrupa'daki erik, kiraz ve şeftali ağaçlarından elde edilen 11 PDV izolatının kaplama proteini gen dizilerini belirlemişlerdir. Tüm izolatların karşılaştırılması sonucunda kılıf protein geninin yüksek oranda (%88) korunmuş bir bölge olduğu belirlendi. Analiz sonucunda, aminoasit ikameleri ile konukçu tür ve izolatların coğrafi kökeni arasında makul bir ilişki gözlenmemiştir. Diğer ilarvirüslerin kılıf protein genleri ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, PDV nükleik asit dizilerinin en çok apple mosaic virus (ApMV), Elm mottle virus (EMoV), lilac ring mottle virus (LiRMoV) ve prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)'une benzediği belirlenmiştir.

PDV, hem tek başına hem de PNRSV ile meydana getirdiği enfeksiyonlarda, kiraz meyvelerinin kimyasal bileşimini olumsuz etkiler (Maxim ve Papp, 2000).

Badem ağaçlarında PDV ve PNRSV varlığının tespiti için yapılan bir çalışmada, DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerini karşılaştırmak için 175 badem ağacında virüs varlığı 3 yıl boyunca test edilmiştir. Çalışma sonucunda, RT-PCR tekniğinin DAS-ELISA'ya göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. RT-PCR'ın herhangi bir mevsimde PDV'yi tespit etmede büyük bir avantaja sahip olduğu belirlenmiştir (Mekuria ve ark., 2003).

En yaygın bulunan virüsler, kirazda PDV ve vişnede PNRSV olarak bulunmuş olup, karışık enfeksiyonlar da yaygın olarak tespit edilmiştir. Japonya (Isogai ve ark., 2004) ve Kaliforniya (Sabanadzovic ve ark., 2005) gibi diğer bölgelerde karışık enfeksiyonlu kiraz ağaçları bildirilmiştir.

Fonseca ve ark. (2005), badem izolatlarından izole ettikleri PDV'nün 12 izolatının kılıf protein bölgelerinin dizilemelerini ortaya çıkarmışlardır. PDV'nin, aynı bölgedeki farklı sert çekirdekli meyve çeşitlerinden izole edilenler ile diğer PDV izolatlarından genetik olarak oldukça farklı olduğu bulunmuştur. Hedef bölgedeki büyük çeşitliliğe rağmen, kılıf protein bölgesinin N-terminalinde amfipatik bir bölge olduğu ve bu bölgenin viral bağlanmada yer aldığı bildirilmiştir. Sert çekirdekli meyvelerin önemli bir viral hastalık etmeni olan PDV'nin ApMV ve PNRSV ile bitkilerde karışık enfeksiyon halinde olabileceği bildirilmiştir. PDV'nin yayılımında aşı, polen ve üretim materyalinin etkin bir rol oynadığı bildirilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada ise güney Bulgaristan'da %15,8, Suriye'de %87, İtalya'nın Bari şehrinde Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nün 2003 yılında yaptığı bir çalışmada Akdeniz bölgesinde yetiştirilen kirazlarda %67,2 oranında PDV saptanmıştır (Myrta ve ark., 2003). Ayrıca A.B.D.'de yapılan diğer bir çalışmada, PDV'nin PNRSV ve CLRV ile karışık enfeksiyona neden olduğunu kanıtlamışlardır (Gentkow ve ark., 2005).

Bulgaristan'ın güneyinde, farklı tür sert çekirdekli meyve ağaçlarından toplanan 2592 adet örnekte PDV ve PNRSV'nin varlığı DAS-ELISA ile belirlenmiş olup, PDV enfeksiyonu en yüksek kirazda (%15,8) bulunmuştur (Milusheva ve Borisova, 2005).

Sırbistan'da ise 125 vişne ve kiraz ağacı DAS-ELISA yöntemi ile PNRSV, PDV, ACLSV, ApMV ve PPV açısından testlenmiş olup uygulanan ELISA testi sonucuna göre PDV, ACLSV ve PNRSV'nin bulunma oranı %63 olarak bulunmuştur (Mandic ve ark., 2007).

Sırbistan'da kiraz virüsleri için yapılan ilk kapsamlı bu araştırmada, kiraz ve vişne koleksiyonunda bulunan yüksek virüs enfeksiyonu oranları Arnavutluk (Digiaro ve ark., 1994) ve Bosna ve Hersek'ten (Matic ve ark., 2008) bildirilen sonuçlara benzer bulunmuştur.

Dünya kiraz üretiminin yaklaşık %38'ini karşılayan Akdeniz ülkelerinde kiraz ağaçlarında serolojik yöntemlerle gerçekleştirilen testlerde virüs enfeksiyon oranı %48

olarak bulunmuştur. Bu oran güney Akdeniz ülkelerinde %10 civarındayken, kuzey Akdeniz ülkelerinde %60'lara kadar çıkmıştır. En sık görülen virüsler sırası ile PDV, PNRSV, ACLSV ve ApMV olmuştur. Enfekteli ağaçların %80'inde tespit edilen PDV büyük bir farkla kirazda en yaygın görülen virüs olmuştur (Myrta ve Savino, 2008).

Uluslararası gen bankası veri tabanlarından elde edilen 31 izolatın PDV dizisi ile Tunus'dan elde edilen yeni bir PDV izolatı da kullanılarak analiz edilmiştir. İki farklı analiz programının kullanıldığı genetik çeşitlilik çalışmasında, 15 virüsün kılıf proteini bölgelerinde birkaç genetik çeşitlenme tespit edilmiştir. MEGA 4 (Boulila, 2009) programı kullanılarak, nükleotid dizisi boyunca belirli ekleme/silme bölgeleri bulunmuştur.

PDV'yi sert çekirdeklielerde tespit etmek için, one step RT-PCR ve real-time PCR yöntemleri kullanılmıştır. Farklı bölgelerin farklı konukçularından izole edilen 55 izolatın kullanıldığı bu çalışmada farklı tanı yöntemlerinin duyarlılıkları kıyaslanmıştır. Herhangi bir dokuda virüs yoğunluğunu belirlemek için, kullanılan real-time PCR yönteminde referans gen familyası olarak 18s ribozomal RNA (rRNA) ve actin genleri kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda, birden fazla housekeeping gen familyasının kontrol olarak kullanılmasının daha doğru sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (Jarošová ve Kundu, 2010).

Çek Cumhuriyeti'nde PDV ve PNRSV enfeksiyonlarını saptamak için, 2006-2008 yılları arasında yapılan sörvey çalışmalarında 1438 hastalıklı bitki örneği temin edilmiştir. Bu örneklerde, serolojik çalışmalar yapılarak saptanan toplam enfeksiyon oranının %17,7 olduğu belirlenmiş olup, PDV enfeksiyonunun %10,9 ve PNRSV enfeksiyonunun %6,3 oranında olduğu tespit edilmiştir (Suchá ve Svobodová, 2010).

Yunanistan'da ilk defa yapılan bir çalışmada PDV, PNRSV ve ApMV tespiti için, daha önceden ilarvirüsleri belirlenmesine özgü analizi modifiye ederek nested PCR yöntemini kullanmışlar ve badem ile kiraz ağaçlarında ilarvirüslerinin tanılmasını gerçekleştirmişlerdir. Badem ve kiraz ağaçlarında ilarvirüslerin bulaşıklılığını belirlemek için, farklı bölgelerden yapılan sörvey çalışmaları sonucunda toplanan badem örneklerinde PNRSV % 41 ve PDV % 21,5 bulunmuştur. Kiraz bahçelerinde ise daha yaygın bir virüs olan PNRSV % 19,4 bulunmasına rağmen PDV % 56,6 oranında saptanmıştır. Bu iki virüsle karışık enfeksiyon badem örneklerinde % 10 ve kirazda ise

%17 olarak bulunmuştur. Çalışmada toplanan hiç bir örnekte ApMV için pozitif sonuç alınamamıştır (Maliogka ve ark., 2010).

Çok sayıda monoklonal antikorların (Mabs) kullanımı ile farklı ülkelerden PDV izolatları arasındaki serolojik değişkenlik, Paduch-Cichał ve ark. (2011a) tarafından rapor edilmiştir.

Serolojik yöntemle PDV'nin tespit edildiği başka bir çalışmada ise Almanya'dan 1, İtalya'dan 7, Polonya'dan 13 ve Amerika'dan 1 izolat kullanılarak serolojik değişkenlikler ortaya konulmuş olup, elde edilen sonuçlar ile virüsün 13 farklı serolojik karakterinin görüldüğü tespit edilmiştir (Paduch-Cichał ve ark., 2011a).

Şeftali ağaçlarından elde edilen örneklerde, PNRSV ve PDV enfeksiyonunun gözlemlendiği ortalama 10 yaşlarındaki ağaçlarda klorotik lekeler, damarlarda renk açılması, nekrotik alanlar ve bodurlaşma belirtilerinin görüldüğü bildirilmiştir (Zindović ve ark., 2013).

PDV'nin tespiti için, İran'ın Charmahal-va-Bakhtiari eyaletinden 2011 ve 2012 yıllarında sert çekirdekli meyve bahçelerinden temin edilen 251 yaprak örneği kullanılmıştır. DAS-ELISA testiyle serolojik olarak tespit edilen PDV varlığı örneklerden total RNA ekstre edilerek ve PDV'nin moleküler karakterizasyonu yapılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam 251 örneğin 181'inde serolojik ve iki aşamalı RT-PCR analizleri kullanılmış olup, PDV enfeksiyonu doğrulanmıştır. Bu çalışma, Charmahal-va-Bakhtiari bölgesindeki sert çekirdekli meyve bahçelerinde PDV'nin ilk raporu olarak kaydedilmiştir (Soltani ve ark., 2013; Çelik, 2020).

Çin'deki kiraz bahçelerinde, PNRSV ve PDV varlığını araştırmak için virüs hastalığına benzer belirtiler gösteren toplam 57 yaprak örneği toplanmıştır. CTAB bazlı bir yöntemle elde edilen total RNA ile kurulan RT-PCR testleri sonucunda, 57 örneğin 34'ünde PNRSV (%59,6) ve 27'sinde PDV (%47,4) tespit edilmiştir. Örneklerin 22'sinin aynı anda her iki virüs tarafından da enfekte edildiği ve bitkilerde yapısal bodurluk, kısalmış boğum araları ve meyve çatlaması gibi belirtiler görülmüştür (Zong ve ark., 2013).

Kılıf protein bölgesinin tüm nükleotid dizisinin elde edilmesinin amaçlandığı bir çalışmada, 23 izolat farklı sert çekirdekli meyvelerden izole edilmiş izolatlar, gen bankasında yer alan 57 referans izolat ile karşılaştırılmıştır. Sekans analizi yapılmış tüm

virüs izolatlarının karşılaştırılması, nükleotid seviyesinde %86-100 ve aminoasit seviyesinde %79-100 benzerlik göstermiştir (Kalinowska ve ark., 2014).

Çeşitli *Prunus* spp.(sert çekirdekli meyve) türlerinde enfeksiyon oluşturmuş PDV'nin nükleotid dizileme çalışmalarında genellikle kılıf proteini bölgesi üzerinden çalışmalar yapılmış olup, son zamanlarda virüsün hareket proteini sentezinden sorumlu gen bölgesi üzerine bazı çalışmalar da yapılmaktadır Bu çalışmada, kılıf protein bölgesinden farklı olarak RNA-3 üzerinde yer alan hareket proteinine özgü primer dizayn etmek suretiyle virüsün moleküler karakterizasyonunu ortaya koyulmuştur. Çalışmada yeni dizayn edilen primer çiftinin daha yüksek pozitif sonuç veren izolat sayısına sahip veriler ürettiği tespit edilmiştir. İzolatların kısıtlı bir coğrafi bölgeden elde edilmesine rağmen, elde edilen dizilerin izolatlar arasında yüksek derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan değerlendirmeler neticesinde, konukçu ve coğrafi farklılıklar açısından önemli değişkenlik gözlemlenmemiştir. Veriler, PDV'nin genetik çeşitliliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (Predajna ve ark., 2017).

Kinoti ve ark. (2018) tarafından Avustralya'da sert çekirdekli meyve türlerinde yürütülen bir çalışmada, 127 adet virüsle bulaşık olduğu düşünülen örnek toplanmış ve ApMV ve PDV varlığı açısından testlenmiştir ve bunun sonucunda 4 ApMV ile 10 PDV izolatı tespit edilmiştir. Yapılan dizileme çalışmaları sonucunda, PDV ve ApMV izolatlarının filogenetik analizleri yapılmış ve dünya izolatları ile olan ilişkileri ortaya konulmuştur.

Bulgaristan'ın altı bölgesinde 10 farklı lokasyonda 43 ticari ve 3 koleksiyon kiraz ve vişne bahçesinde PDV sürveyleri yapılmıştır. PDV enfeksiyonunun varlığının tespiti için, virüs benzeri belirtiler gösteren ve göstermeyen 2090 ağaçtan alınan yaprak örnekleri DAS-ELISA ile test edilmiştir. Kiraz ve vişne de, ortalama PDV enfeksiyonu seviyesi %14,4 olarak belirlenmiş olup, %92,4'ünde PDV tek patojen iken %7,6'sında PNRSV ile karışık enfeksiyon şeklinde görülmüştür. Belirtileri PDV enfeksiyonu ile ilişkilendirmek için görsel gözlemler yapılmış, enfekte ağaçların %56,2'sinde PDV belirtileri varken, %43,8'inde herhangi bir belirtmeye rastlanmamıştır. Dört bölgeden 14 izolatın 654 nükleotitten oluşan CP nükleotid dizileri belirlenmiştir. Nükleotid ve aminoasit sekans karşılaştırmaları referans izolatlar ile sırasıyla %87-100 ile %93-100 benzerlik göstermiştir. Bulgaristan'dan PDV izolatlarının kılıf proteini genlerinin ve gen bankası veri tabanından elde edilen 38 kiraz izolatının kılıf proteini genlerinin nükleotid

ve amino asit dizileri ile oluşturulmuştur. Filogenetik analizler, sırasıyla üç ve iki filogenetik grubun varlığını göstermiştir. Çalışılan izolatların filogenetik gruplaması ile enfekte ağaçların ve/veya örnekleme bölgesinin semptomları arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir (Kamenova ve ark., 2019).

Kiraz, Bulgaristan'da geleneksel ve önemli bir meyve mahsulüdür. Daha önceki araştırmalar da kiraz ve vişnelerde, PDV'nin en yaygın virüs enfeksiyonu olduğunu göstermiştir (Kamenova ve ark., 2020).

5 PDV kiraz izolatının biyolojik ve moleküler özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, şüpheli ağaçlar DAS-ELISA ile testlenmiş ve PDV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Enfekteli konukçu ağaçlardan ikisi semptomsuz olup, diğer üç ağaç da ise klorotik çizgiler ve lekeler ile uzun yapraklar şeklinde deformasyon gözlemlenmiştir. Özellikle odunsu bitkilerde gözlemlenen PDV, serada yetiştirilen 22 otsu test bitkisinde de araştırılmıştır. Bunlardan *Prunus tomentosa* ve *Prunus cerasifera* olduğu belirlenmiştir. Ancak, *Cucumis sativus* Amelia, *C. sativus* cv. Levina, *C. sativus* cv. Tessa ve *Prunus tomentosa* bitkilerinin en uygun test bitkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Test edilen PDV izolatlarının biyoanalizi sonucu, 657 bp'lik uzunluktaki CP nükleotid dizisine karşılık gelen nükleotid dizileri elde edilmiştir. CP'de çalışılan izolatlar arasındaki benzerlik, nükleotid ve aminoasit seviyelerinde sırasıyla %95,5-100 ve %97,4-100 olarak gözlemlenmiştir. Hareket proteini (MP) dizileri ise 753 nükleotid uzunluğunda olup, 251 aminoasidi ortak %94,1–98,4 nükleotid ve %96,8–99,2 amino asit özdeşliği. Hem MP hem de nükleotid dizileriyle oluşturulmuş ağaçlar çalışılan izolatların ve referans PDV kiraz varyantlarının CP genleri, iki filogrup oluşumu göstermiştir. Çalışılan tüm izolatların grup I'de iki kümeye ayrıldığı gözlemlenmiştir. Filogenetik gruplama ve biyolojik özelliklerin yanı sıra coğrafi köken de gözlemlenmiştir (Kamenova ve Borisova, 2022).

Bulgaristan'da yapılmış olan bir çalışmada, kiraz ağaçlarında, deneysel olarak aşılınmış otsu bitkilerde ve 5 adet odunsu indikatör bitki semptomlarına göre değerlendirilmiş olup, elde edilen bu PDV izolatlarında yayılmış olduğu saptanmıştır. Kılıf proteini ve hareket proteini genleri dizilenmiştir. Dizileme sonucu, coğrafi bölgelerden belirlenen kiraz çeşitlerinden elde edilen PDV dizileri ile karşılaştırılmıştır (Kamenova ve ark., 2022).

Sert çekirdekli meyve ağaçlarını enfekte eden ilarvirüsler ve viroidler, A.B.D.'nin güneydoğusunda şeftali üretiminde karşılaşılan önemli patojenlerdir. Güney Carolina ve Georgia'daki potansiyel inokulum kaynaklarını belirlemek için, iki ilarvirüs PNRSV ve PDV ayrıca bir viroid olan PLMVd (Peach latent mosaic viroid) için bir araştırma yapılmış ve hepsinin polen ile bulaşabilir olduğu öne sürülmüştür. Yabani *Prunus* türlerinde yapılmış olan bu çalışmada, *P. serotina*'da PDV ve PLMVd virüs/viroid enfeksiyonu ile ağaç yaşı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Toplanan materyallerde PDV ve PLMVd analiz edilmiş olup, ancak hiçbir pozitif sonuç bulunmamıştır. RT-PCR ve RT-qPCR analizlerinde pozitif kontroller çalıştığından dolayı, negatif sonuçların yanlış olması olasılığı olmamıştır (Bonilla ve Cieniewicz, 2022).

2.3. Türkiye’de PDV konusunda yapılan çalışmalar

Dunez (1986), yaptığı çalışmada ACLSV, PNRSV, PDV, PPV ve SLRSV'nin İzmir ve Yalova'daki sert çekirdekli meyve ağaçlarında bulunduğunu bildirmiştir.

Ülkemizde Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen sert çekirdekli meyve ağaçlarının %22.2'si ApMV, %17.1'i PNRSV, %15.5'i PDV ve %13.3'ü ACLSV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Çağlayan ve Gazel, 1998).

Sert çekirdekli meyve ağaçlarından (kiraz, vişne, erik, nektarin, şeftali, kayısı) 13 ilden (Adana, Afyon, Ankara, Amasya, Burdur, Bursa, Çanakkale, Hatay, Isparta, İzmir, Tokat, Yalova) alınan toplam 488 örnek DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. DAS-ELISA yöntemi ile serolojik olarak testlenen örneklerin 31 adedinde PNRSV, 71 adedinde PDV saptanmıştır. PDV enfeksiyonu %27.4 (60 pozitif) enfeksiyon oranı ile en çok kirazda saptanır iken %22.2 (6 pozitif) ile ikinci sırada vişnede tespit edilmiştir. Testlenen diğer tüm sert çekirdekli meyve çeşitlerindeki (erik, kayısı, nektarin, şeftali) PDV oranı %3'ün altındadır. PNRSV için testlenen diğer örneklerdeki oran ise %23.52 ile en fazla oran ile nektarinde, daha sonra %12,19 ile şeftalide saptanmıştır. Diğer sert çekirdekli meyve çeşitlerinde %10'un altında tespit edilmiştir. ApMV virüsüne karşı DAS-ELISA ile testlenen tüm örnekler negatif sonuç vermiştir. PNRSV için DAS-ELISA sonucunda pozitif ve negatif çıkanlar, RT-PCR le de aynı sonucu vermiştir. Ancak DAS-ELISA ile pozitif bulunan 31 örneğe ilaveten RT-PCR sonucunda 51 örnek

enfekteli bulunmuştur. Fakat örnekler PDV için RT-PCR ile tespit edilememiştir (Ulubaş, 2003).

Sertkaya ve ark. (2004), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sert çekirdekli meyve türlerinde apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), cherry leaf roll virus (CLRV), prune dwarf virus (PDV), prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) virüslerini araştırırken, bademde de Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)'nü saptamışlardır.

Van ve civarında yetiştiriciliği yapılan sert çekirdekli meyve türlerinde sorun olan viral ve fungal hastalıkların belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada; PNRSV, ACLSV, ApMV, PDV ve PPV virüslerinin tespiti için yapılan sörveyler kapsamında toplanan 154 kayısı, 45 kiraz, 23 şeftali, 41 erik ve 32 vişne ağacının ELISA ile testlenmesi sonucunda örneklerde PDV ve ACLSV enfeksiyonları tespit edilmiştir. PDV'nin enfeksiyon oranı kayısıda %0.6, kirazda %7.1 ve vişnede ise %31.2 olarak belirlenmiştir (Sipahioğlu ve ark., 2004).

Türkiye Cumhuriyeti Tarım Bakanlığı'na ait çeşitli koleksiyonları olan ticari meyve bahçelerinde, 2000 ve 2001 yıllarının başında ilkbaharda saha denetimleri sırasında alınan siptom gösteren yapraklı sürgün örnekleri ile çalışma yapılmıştır. Afyon, Ankara, Amasya, Burdur, Çanakkale Isparta, İzmir, Tokat ve Yalova illerinin bahçelerinde toplam 240 kiraz örneklerinde ACLSV, PPV, PNRSV ve PDV varlıkları DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenerek tespit edilmiştir. Sonuçlar, tüm örneklerin % 31.7'sinin bir veya daha fazla virüs ile enfekteli olduğunu ortaya koymuştur. En yaygın virüs enfeksiyon oranı % 25.0 PDV olarak tespit edilmiştir. Bunu, ACLSV ve PNRSV izlemiştir. PDV+PNRSV (3 örnek) ve PDV+ACLSV'nin (6 örnek) karışık enfeksiyonları da saptanmıştır. Ancak, PPV ile enfekteli örnek tespit edilmemiştir (Ulubaş, 2005).

İzmir ili ve ilçelerinde kiraz alanlarında yapılan bir çalışmada ELISA testlerinin sonucunda, 400 örneğin 49'unda PDV, 9'unda ACLSV, 24'ünde PNRSV ve 3'ünde de birden çok virüs tespit edilmiştir. Testlenen 400 örnekte CLRV, PPV ve ApMV enfeksiyonları saptanmamıştır. Bu verilere göre, PDV %12.7 ile kiraz alanlarında en çok görülen virüs olmuşken %68,5'lik kısımda ise herhangi bir virüs tespit edilmemiştir (Paylan, 2006).

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi deneme alanlarında yer alan badem ağaçlarında viral enfeksiyonlar araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, 222 örnek DAS-

ELISA yöntemi ile olası virüslerin varlığı açısından testlenmiştir. Testlenen örnekler arasında PDV enfeksiyonuna rastlanmamıştır (Öztekin, 2006).

Doğu Akdeniz Bölgesi illerinde 2000-2003 yılları arasında ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde virüs ve virüs benzeri simptom gösteren 240 kiraz ve 73 vişne örneklerinde PNRSV, PDV, PPV ve Avrupa sert çekirdekli sarı meyve fitoplazmaları (ESFY) varlığını saptamak amacıyla DAS-ELISA ve RT-PCR testlemeleri yapılmıştır. DAS-ELISA testlemeleri sonucunda en yaygın virüs %10.8 oranında PDV iken, %3.8 oranında PNRSV saptamışlardır. Tüm pozitif örnekler kirazlardan elde edilmiş olup, vişne örneklerinin hepsi negatif olarak saptanmıştır. DAS-ELISA sonuçlarına göre, 1 kiraz örneği PPV ile bulaşık tespit edilmesine rağmen RT-PCR sonucunda negatif çıkmıştır. DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonuç olarak, PDV'nin kiraz ağaçlarında çok yaygın olduğunu (% 10.8) gösterirken bunun tersine vişnede hiç bir enfeksiyon bulunmamıştır. Ayrıca, PNRSV sadece kirazlarda (% 3.8) tespit edilmiştir. DAS-ELISA sonuçlarına göre ise sadece 1 kiraz PPV ile enfekteli bulunmuş olup, aynı örnek RT-PCR yöntemi negatif sonuç vermiştir. Fitoplazmaya benzer simptomlar sadece simptomatik olarak gözlemlenmiş, ancak RT-PCR testlerinin sonuçlarına göre negatif sonuç elde edilmiştir (Çağlayan ve ark., 2008).

Türkiye'den 10 PDV izolatının kılıf protein bölgesinden 657 nükleotid uzunluğunda diziler elde etmek suretiyle filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir. Dünya referans izolatları ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda izolatların 4 grup altında dağılım gösterdikleri görülmüştür. Konukçularına göre izolatlar cherry I, cherry II, mixed and almond olarak sınıflandırılmıştır (Ulubaş Serçe ve ark., 2009a).

Bademde sert çekirdekli virüslerin tespitine yönelik yapılan bir çalışmada Trakya Bölgesi'nden toplanan 418 bitki örneğinde yapılan serolojik testler sonucunda %4,3 oranında PDV enfeksiyonu tespit edilmiştir (Karabacak, 2012).

Isparta ilinin 10 ilçesinde 142 kiraz bahçesinde ApMV, PDV, PNRSV, CLRV, ACLSV ve PPV virüslerinin varlığını belirlemek amacıyla 521 kiraz yaprak örneği öncelikle DAS-ELISA yöntemiyle test edilmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda, örneklerin 269'u PDV, 23'ü ACLSV, 7'si PNRSV, 36'sı PDV+ACLSV, 8'i PDV+PNRSV, 1'i PDV+ApMV, 3'ü ACLSV+PNRSV, 2'si PDV+PNRSV+ApMV olmak üzere toplamda 349 örnek enfekteli bulunmuştur. En yaygın görülen virüs PDV olurken, CLRV ve PPV'ne hiç bir örnekte rastlanmamıştır. DAS-ELISA sonuçlarında

şüpheli veya pozitif çıkan örneklerin bir kısmı bölgeleri ve virüsleri temsil edecek şekilde seçilerek total RNA izolasyonları yapılmıştır. RNA izolasyonunun ardından PDV, PNRSV ve ACLSV'nün CP genlerini içeren bölge, RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. 22 PDV, 5 PNRSV ve 7 ACLSV izolatından sırasıyla 862 bp, 616 bp ve 677 bp büyüklüğünde hedeflenen bölgeye spesifik DNA'lar elde edilmiştir. Test edilen PPV, CLRV ve ApMV örneklerinin hiç birinde virüslere spesifik bant çoğaltılamamıştır. RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan PDV, PNRSV ve ACLSV'ye ait bantlar saflaştırılarak doğrudan dizileme için kullanılmıştır. Dizileme sonucunda bu virüslere ait CP genlerinin nükleotid dizileri ve kodladıkları amino asit dizilimleri belirlenmiştir. Bu diziler karşılaştırılıp analiz edilerek Isparta ilinin farklı ilçelerinden elde edilen PDV, PNRSV ve ACLSV izolatlarının birbirleriyle ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden izolatlarla benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Buna göre PDV, PNRSV ve ACLSV Isparta izolatları sırasıyla %86-98 ile %82 -%99, %86-99 ile %89-100 ve %80-98 ile %88-%100 arasında değişen oranlarda kılıf protein genlerinin nükleotid dizilerinde ve amino asit dizilerinde benzerlik olduğu bulunmuştur. Nükleotid dizilimine göre ACLSV Isparta izolatı en fazla benzerliği Yunanistan kiraz izolatları ile göstermiştir. PNRSV Isparta izolatları ise en çok benzerliği Çek Cumhuriyeti kiraz ve vişne, Polonya, ABD ve Şili kiraz izolatlarıyla, Türkiye şeftali izolatlarıyla göstermiştir. PDV Isparta izolatları ise en fazla benzerliği ABD ve İsrail kiraz ve İtalya badem izolatları ile göstermiştir. Aminoasit dizilimine göre ise ACLSV Isparta izolatı en çok benzerliği Yunanistan kiraz izolatı ile gösterirken, PNRSV Isparta izolatı daha çok Tunus şeftali ve Polonya kiraz izolatıyla benzerlik göstermiştir. PDV Isparta izolatlarına en çok benzerlik gösterenler ise İtalya ve Polonya vişne ve İtalya badem izolatları olmuştur. Filogenetik analizler sonucunda ise ACLSV izolatlarının coğrafik bölgelere ve konukçuya göre gruplandığı ve Isparta izolatların Avrupa izolatlarıyla gruplanarak Avrupa kaynaklı olabileceğini gösterirken, PNRSV ve PDV izolatlarının filogenetik analizleri coğrafik bölge ve konukçuya göre gruplanmadığını göstermiştir (Öztürk, 2012).

Bir başka çalışmada ise , Bilecik ve Bursa illerinden 2010 ve 2011 yıllarında kiraz üretimi yapılan ilçelerden ilkbahar aylarında (Nisan ve Mayıs) zamanında alınan, Early Burlat ve 0900 Ziraat çeşitlerinin kapsadığı kiraz bahçelerinden örnekler alınmıştır. Bilecik ili Gölpazarı ilçesinden 250, Bursa ili Keles ilçesinden 150 olmak üzere toplam

400 adet ağaçtan yaprak örneği toplanmış olup, örnekler DAS-ELISA yöntemi ile prune dwarf virus (PDV)'una karşı test edilmiştir. Enfeksiyon oranları sırasıyla, Bilecik ili Gölpazarı ilçesinden alınan 0900 Ziraat kiraz çeşidinde %45, Early Burlat çeşidinde %52 oranında bulunmuştur. Bursa ili Keles ilçesinden alınan 0900 Ziraat kiraz çeşidinde ise %36 ve Early Burlat kiraz çeşidinde %43 oranında enfeksiyon saptanmıştır (Uzunoğulları ve ark., 2012).

Karabacak ve İlbağı (2013), Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde yaptıkları çalışmada, badem virüs hastalıklarının saptanması ve virüslerin tanılanması için, bölgede 10 ilçeden 158 ağaçtan çiçek ve 260 ağaçtan yaprak örnekleri temin etmişler ve tüm örneklerle DAS-ELISA ve Triple antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (TAS-ELISA) ile RT-PCR testleri uygulamışlardır. Yapılan çalışmada PNRSV, PDV ve PPV virüsleri için bölgedeki badem ağaçlarında bireysel olarak % 31.15 oranında PNRSV, % 4.23 oranında PDV, % 1.92 oranında PPV saptamış olup ağaçların % 1.54'ünde ise PNRSV+PDV ve PNRSV+PPV virüslerinin karışık enfeksiyonlarını da tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, Türkiye'nin Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarında % 38,85 oranında virüs enfeksiyonu saptadıklarını bildirmişlerdir.

Türkiye'de Isparta ilinde yürütülen bir çalışmada 142 farklı bahçeden 521 kiraz örneği toplanmıştır. DAS-ELISA ve RT-PCR çalışmaları sonucunda 37 örneğin PDV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Seçilen 21 izolat çoğaltılmış ve dizilenmiştir. Sekans verileri referans izolatlar ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Isparta PDV izolatlarının, referans izolatlar ile nükleotid ve aminoasit düzeyinde sırasıyla %84- 99 ve %81-100 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Farklı konukçulardan ve coğrafi bölgelerden elde edilen izolatlarla oluşturulan filogenetik analizler sonucunda izolatların konukçu ve coğrafi konum açısından herhangi bir anlamlı gruplanma oluşturmadığı görülmüştür (Öztürk ve Çevik, 2015).

Niğde ilinde yapılmış olan bir çalışmada, kiraz üretim alanları PDV varlığı açısından taranmıştır. Yapılan moleküler düzeyindeki çalışmalar sonucunda toplanan 90 örnekten hiçbirinde PDV enfeksiyonuna rastlanmamıştır (Sajid, 2018).

Bursa ili şeftali üretim alanlarında görülen sert çekirdekli virüslerin tespiti amacıyla yapılmış olan bu tez çalışmasında, Bursa ilinden 460 adet şeftali yaprağı toplanmış ve PDV enfeksiyon oranının yaklaşık %4 olduğu tespit edilmiştir. Yapılan moleküler karakterizasyon ve dizileme çalışmaları ile Türkiye şeftali PDV izolatlarına

ait ilk kısmi nükleotid dizileri elde edilmiştir. Gen bankasında kayıtlı referans izolatlar ile yapılan filogenetik analiz çalışmaları konukçu ve coğrafik orijin farklılıkları açısından izolatlar arasında herhangi bir filogenetik ilişkinin olmadığını göstermiştir (Çelik ve Ertunç, 2020).

Bursa, Bilecik ve Bolu illerinde, şeftali üretimi yapılan bölgelerde çalışılmıştır. Sörvey yapılan alanlardan toplanan örnekler ile serolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, en yüksek enfeksiyon oranı PPV ile %52,05 olup, PDV %3,90 ve PNRSV %2,88 olarak bulunmuştur. Temin edilen 486 örnekten 286 örnekte %58,84 oranında, virüslerden en az bir tanesi tespit edilmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmaları ile 24 PPV, 11 PDV ve 8 PNRSV izolatlarına ait toplam 43 kısmi nükleotid dizisi elde edilmiştir. Daha sonra bu izolatlar, gen bankasında kayıtlı referans izolatlar ile kıyaslanmıştır. Gen bankasında kayıtlı referans izolatlara ait nükleotid dizileri ile yapılan kıyaslamalar sonucunda PPV izolatlarının %97-99, PDV izolatlarının %87-97 PNRSV izolatlarının ise %96-100 oranında sekans benzerliği gösterdiği görülmüştür. Filogenetik analiz çalışmaları sonucunda, referans izolatlar ile PPV, PDV ve PNRSV izolatlarının filogenetik ağaç üzerinde uyumlu bir dağılım gösterdiği görülmüştür (Çelik ve Ertunç, 2020).

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, Türkiye'nin Doğu Akdeniz Bölgesi'nde kiraz üretiminin yapıldığı Adana, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerde kiraz ağaçlarını enfekte eden ve önemli viral patojenler arasında yer alan PDV'nin yaygınlığı araştırılmıştır. Adana, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinden 173 semptomlu ve semptomsuz kiraz yaprakları DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle testlenmiştir. DAS-ELISA yöntemiyle testlenen tüm örneklerde PDV tespit edilmemiştir. RT-PCR ile yapılan testlemeler sonucunda ise 15 örnek virüsün kılıf protein gen bölgesine ait 874 bp uzunluğunda nükleotid dizileri elde edilerek pozitif bulunmuştur. Nükleotid diziler elde edildikten sonra gen bankasında kayıtlı olan Türkiye ve dünyanın farklı ülkelerindeki PDV referans izolatlarıyla kıyaslanmıştır. Yapılan BLASTn analizi sonucunda, PDV kiraz Türkiye izolatlarının, PDV referans sekans verileriyle nükleotid düzeyinde %89.58-99.32 arasında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların nükleotid dizilerinin filogenetik analizi yapılmış olup, dünyanın farklı ülkeleri ile Türkiye PDV kiraz izolatlarıyla ilişkisi belirlenmiştir. Çalışma sonucunda

Doğu Akdeniz PDV kiraz izolatlarının kılıf protein kısmi gen bölgesine ait nükleotid dizileri elde edilmiştir (Gundogan ve ark., 2022).

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de kiraz üretimi ile ön plana çıkan bölgelerde PDV varlığının tespiti açısından sorveyler yapılmış olup, virüs varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmiştir. Sörvey bölgesini temsil edecek özellikte ve sayıda izolata ait nükleotid dizisi belirlenerek farklı konukçu ve farklı coğrafyadan referans izolatlar ile kıyaslanmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı, ülkemizde ekonomik önemi yüksek olan kiraz ağaçlarında prune dwarf virus (PDV)’nin yaygınlığının araştırılarak, moleküler karakterizasyonunun yapılmasıdır. Bu kapsamda, virüsün kılıf proteini (CP), hareket proteini (MP) ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) bölgelerine spesifik primerlerle PCR analizi yapılmış ve izolatların filogenetik analizlerinin yapılmış, virüsün genetik çeşitliliğinin belirlenmiş ve karantina ve sanitasyon çalışmalarında yaygınlığın araştırılması için uygun primer çiftleri belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada Konya, İzmir, Bursa, Manisa, Niğde, Kahramanmaraş, Osmaniye, Adana ve Antalya illerinin farklı ilçelerinden semptom gösteren ve göstermeyen kiraz ağaçlarından örnekler toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Kiraz örneği toplanan iller

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması

2019-2021 yılları arasında Mayıs-haziran ve eylül-ekim aylarında Türkiye'nin dört bölgesindeki en çok kiraz üretimi yapılan İzmir, Konya, Kahramanmaraş, Niğde, Bursa, Manisa, Osmaniye, Adana ve Antalya illerine bağlı bazı ilçelerde periyodik olmayan arazi gözlemleri ve numune toplama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kiraz bahçelerinden ticari kiraz bahçeleri, organik tarım yapılan kiraz bahçeleri, sahipsiz kiraz bahçeleri, fidanlıklar ve Kahramanmaraş-Andırın Tarım İlçe Müdürlüğüne bağlı Entegre Mücadele yapılan kiraz bahçelerindeki koleksiyonları içeren sörvey çalışmaları

yapılmıştır. Kiraz virüsleri sörveyi metodunun uygulanmasında literatürden de faydalanılmıştır (Uzunoğulları ve Akçay, 2012; Koç ve ark., 2011) .

Ev bahçelerinde yetişen kiraz ve vişne ağaçları da denetlenmiş ve örneklenmiştir. Hem bahçelerdeki ağaçlar hem de toplanan her yaprak örneği laboratuvarda belirtiler açısından ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Virüs benzeri belirtiler gösteren ve göstermeyen ağaçlardan, virüs ile enfekteli olduğundan şüphelenilen kiraz ağaçlarının dört farklı yönünden 20-25 cm.'lik yapraklı sürgünler kesilerek alınmıştır. Toplam 472 örnek bu şekilde toplanmıştır. Ağaçların dört bir yanından birkaç farklı daldan rastgele örnekler alınmış olup, çalışma kapsamında kiraz örneklerinin toplandığı iller, bahçe sahibi isimleri, mevkisi, kiraz ağaçlarının yaşı, çeşidi, ağaç sıra numarası, toplanma tarihi ve örnek sayısı not edilerek polietilen şeffaf poşetlere yerleştirilmiştir. Araziden örnekler laboatuvara getirilirken kuru buz ile soğuk şartlar altında saklanarak getirilmiştir. Örnekler, testten önce laboratuvarda 4°C'de saklanmıştır. Tüm örnekler porselen havanlarda sıvı azot ile ezilerek, 1,5 ml'lik ependorf tüplerde DAS-ELISA ve moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Çalışma kapsamında kiraz örneklerinin toplandığı iller, çeşit adı ve toplam örnek sayıları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kiraz örneklerinin toplandığı iller, çeşit adları ve örnek sayıları.

Örnek Toplanan İller	Toplanan Örnek Sayısı	Çeşit Adı
İzmir	66	Ziraat0900
		Regina
		Early Lory
		Ziraat0900
		Starks Gold
Konya	114	Regina
		Sweet hearth
		Vişne
Kahramanmaraş	62	Ziraat0900
Niğde	26	Ziraat0900
		Starks Gold
		Sweet heart
Bursa	47	Ziraat0900
Manisa	30	Early Lory
		Star Giant
Osmaniye	67	Ziraat0900
Adana	44	Ziraat0900
		Ziraat0900
Antalya	15	North Wonder
		Regina
		Prime Giant

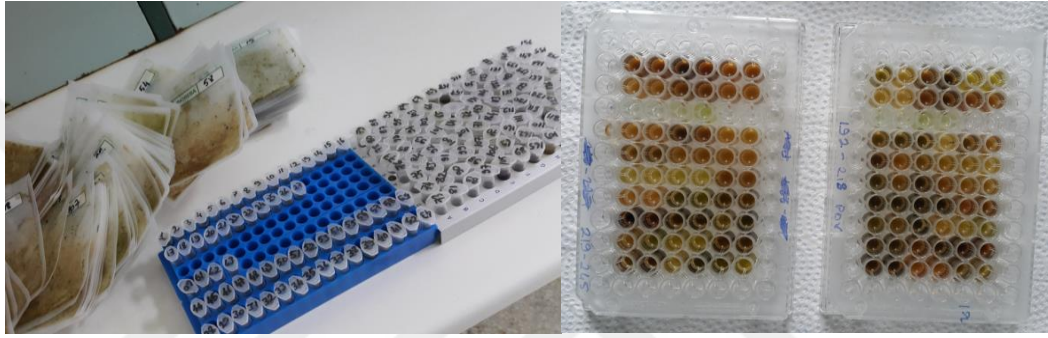
Sörvey kapsamında, virüs benzeri simptomlar gösteren ve göstermeyen ağaçlardan toplam 472 kiraz örneği toplanmıştır. Toplanan kiraz örnekleri, şeffaf poşetlere etiketlenerek, buz içeren kutularda laboratuvara getirilmiştir. Bitki materyali temin edilecek bahçe sahibi isimleri, mevkisi, kiraz ağaçlarının yaşı, çeşidi, toplanma tarihi yazılarak, simptomları kaydedilmiştir. Araziden toplanan örnekler, polietilen şeffaf poşetler içinde buz kutularında soğuk şartlar altında laboratuvara getirilmiştir. Örnekler porselen havanlarda sıvı azot ile ezilerek 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış ve DAS-ELISA ve moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DAS-ELISA Analizleri

Serolojik çalışmalarda, -80°C’de muhafaza edilen bitki örnekleri kullanılarak toplam 472 örnek DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir (Clark ve Adams, 1977).

ELISA testlerinde, Nunc-Immuno Plates MaxiSorp F96 ELISA plakaları ve BIOREBA AG (İsviçre) firmasından temin edilen PDV antiserum kiti kullanılmıştır.

PDV için firma protokolünde belirtilen antiserum sulandırma oranları dikkate alınarak standart DAS-ELISA testi uygulanmıştır. DAS-ELISA testi için kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri EK1’ verilmiştir.



Şekil 3.2. Kiraz örneklerinin ekstraksiyon tamponunda ezilerek eppendorf tüplere alınması ve ELISA plakalarına yerleştirilmesi

Örnekler, Bioreba firma protokolünde yazdığı gibi hazırlanan özel yıkama solüsyonuyla (washing buffer) (EK1) ekstraksiyon poşetlerinde silindirli ezme aparatı ile ezilmiştir ve daha sonra bitki özsuğu eppendorf tüplere aktarılmıştır (Şekil 3.2). IgG, kaplama tampon çözeltisi-1’de (Coating buffer) (EK1) 1: 1000 oranında seyreltilmiş ve her çukuruna 100 µl seyreltilmiş IgG konulmuştur ELISA plakasının üzeri plaka kapağı ile kapatılarak 30°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Ardından, yıkama tamponu (washing buffer) (EK1) ile her yıkama 3’er dakika olacak şekilde plakadaki tüm kuyucuklar 3 kere yıkanmıştır.

Ekstraksiyon tamponunda ezilen bitki örnekleri ELISA plakalarının her bir çukuruna ikişer tekrarlı olmak üzere 100 µl eklenmiştir. Eş zamanlı olarak aynı plakaya iki tekrarlı olmak üzere 100’er µl pozitif, negatif kontrol ve ekstraksiyon tamponundan eklenmiştir. Plakalar, plaka kapağı ile kapatılmış ve gece boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra, yıkama tamponu (washing buffer) (EK1) ile her yıkama 3’er dakika olacak şekilde plakadaki tüm kuyucuklar 3 kere yıkanmıştır.

Konjugat, kaplama tampon çözeltisi-2'de (Conjugate buffer) (EK1) 1: 1000 oranında seyreltilerek plakanın her bir çukuruna 100 µl eklenmiştir. Daha sonra plakalar, plaka kapağı ile kapatılarak 30°C'de 5 saat inkübe edilmiştir. Yıkama tamponu (Washing buffer) (EK1) ile her yıkama 3'er dakika olacak şekilde plakadaki tüm kuyucuklar 3 kere yıkanmıştır.

Son olarak; substrat olarak PNPP (P-nitrophenyl phosphate) kullanılarak 1 mg/ml olacak şekilde substrat tampon çözeltisi (Substrate buffer) (EK1) içinde hazırlanmıştır. Daha sonra substrat tampon çözeltisinden (Substrate buffer) (EK1) her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir. Plaka, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir.

Renk değişimi görsel olarak takip edilip ilk 30 dak. ve sonra ilk 1, 2 ve 3 saat sonra olacak şekilde ELISA okuyucusunda 405 nm'de okunmuştur. Okumalar sonucunda, absorbans değerleri negatif kontrol ortalamasının iki katı ve daha fazla olan örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Clark, 1981, Barba ve Riccioni, 1993; Helguera ve ark., 2002).

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1. Kiraz Yaprak Örneklerinden Total Nükleik Asit İzolasyonu

Mayıs-haziran ve eylül-ekim aylarında kiraz ağaçlarından toplanan sürgünlü yapraklardan total nükleik asit izolasyonu Morante-Carriel ve ark. (2014)'na göre yapılmış ve izole edilen total nükleik asitler PCR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. İzole edilen RNA'ların kalitesi Nanodrop spektrofotometre (Nanodrop 1000c, Thermo Sci., USA) ile ölçülmüştür. Morante-Carriel ve ark. (2014) yöntemiyle total nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılan tampon çözelti ve içerikleri EK2 ve EK3'de verilmiş olup aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

Her örnekten toplam 150 mg bitki dokusu alınmıştır ve üzerine 1,5 ml yıkama tampon çözeltisi (washing buffer) (EK2) eklenerek havanda ezilmiştir. Daha sonra 2 ml'lik eppendorf tüpe aktarılmıştır ve vorteks ile karıştırılmıştır. Toplam 6000 rpm de 15 dak +4°C'de santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım atılmıştır.

Önceden 65°C'ye ısıtılmış olan izolasyon tampon çözeltisi (isolation buffer) (EK2) her bir örneğe 1.5 ml olacak şekilde eklendikten sonra tüpler vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 65°C'de 10 dak. süreyle tüpler alt üst olacak şekilde

karıştırılarak inkübe edilmiştir. Örnekten 1 ml çekilerek yeni tüpe aktararak, üzerine eşit hacimde kloroform-isoamilalkol (C:I:A) (24:1) eklenmiştir. Tüpler süt beyaz olana kadar karıştırılmış ve daha sonra tüpler 7000 rpm 10 dak. +4°C’de santrifüj edilmiştir. Üst kısım dikkatlice yeni tüplere alınarak tekrar eşit hacimde C:I:A eklenmiştir ve ardından iyice karıştırılmıştır. Tüpler 10000 rpm de 10 dak. süreyle +4°C’de santrifüj edilmiş olup üst kısım yeniden tüpe alınmıştır ve üzerine sodyum asetat (NaOAc)(0,1 vol, 3M , pH:5,2) ve isopropanol (0,6 vol) eklenerek karıştırılmıştır ve daha sonra tüpler -80°C’de 30 dak. süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüpler 14000 rpm de 20 dak. süreyle +4°C’de santrifüj edilmiştir.

Elde edilen pelletin üzerine 100 µl d₂H₂O eklenerek pellet çözündürülmüş ve üzerine 0,3 vol 10 M LiCl eklenerek 1 gece +4°C’de inkübe edilmiştir. Tüpler 14000 rpm de 30 dak. +4°C’de santrifüj edilmiş ve santrifüjden sonra sıvı faz dökülmüştür. Pellet üzerine 100 µl d₂H₂O eklenerek çözündürülmüştür. Üzerine 0.1 vol NaOAc (3M) ve 2 vol soğuk etanol (%96) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Tüpler 14000 rpm de 20 dak +4°C’de santrifüj edilmiştir. Pellet 200 µl %70 lik soğuk alkolle yıkanarak kısa bir santrifüjün ardından alkol dökülmüştür. Pellet 20 dak. oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve pellet 40 µl d₂H₂O ile çözündürülmüştür. Ekstrakte edilen RNA’lar RT-PCR testlemelerinde kullanılmıştır.

3.2.3.2. Ters transkripsiyon PCR (Reverse Transcription; RT-PCR) analizleri

Enfekteli bitki dokusundan izole edilen toplam RNA’lardan virüslerin MP, CP ve RdRp genlerinin çoğaltılması iki aşamalı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (RT-PCR) ile yapılmıştır.

3.2.3.2.1. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA’lardan ters transkriptaz enziminin sağlandığı firmanın önerilerine göre komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Bu amaçla, tek bir reaksiyon için 6,5 µl d₂H₂O, 1 µl Random primer ve 5µl RNA ile son hacim 12,5 µl olacak şekilde PCR tüpünde karıştırılmış ve tüpler 94°C’de 5 dak. süreyle inkübe edildikten hemen sonra buz üzerine konulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda her bir tüp içine son hacmi 4 µl 5x RT Buffer reaksiyon ortamı, 0,5 µl 10 mM dNTP mix, 1

μ l RT 200 U RevertAid M-MuLV ters transkriptaz enzimi ve 2 μ l d₂H₂O eklenmiştir. Tüpler 42°C’de 1 saat ve 72°C’de 10 dak. tutulmuş ve cDNA aşaması tamamlanmıştır. Örnekler son adım PCR analizlerinde kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PDV’nin üç farklı gen bölgesinin testlenmesinde kullanılan primerler, baz büyüklükleri ve çoğaltıldığı bölge çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. PDV’nin 3 farklı gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla yapılan PCR analizlerinde kullanılan primerlerin nükleotid dizilimleri, çoğaltıldığı bölge, baz büyüklükleri

Gen Bölğ.	Primer adı	Primer dizilimi (5’-3’)	Amp. uzunluğu	Referans
MP	PDV/MP-F (PD3-331F)	5’-AGTTTCCGCTGAAGATTGG-3’	756 bp	Predajna ve ark., 2017
	PDV/MP-R (PD3-1086R)	5’-ACAGACTCGGCTTCCTTGA-3		
CP	PDV/CP-F	5’-GTGTAGAAAGAAGAGAAGTCCGACAAG-3’	874 bp	Vaskova ve ark., 2000
CP	PDV/CP-R	5’-ATCTAGAAGCAGCATTTCCAACACTACGA-3’		
RdRp	PDV/Rd1-F	5’-CGTTTCTGGAAGGAAGTGG-3’	382 bp	Kinoti ve ark., 2018
RdRp	PDV/Rd2-R	5’-TTGCTTCGAAATTGAACAA-3’		

Spiegel ve ark.(1996)’na göre uygulanan bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilen Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) , her bir reaksiyon karışımı 23 μ l olacak şekilde yapılmıştır.

Tanı primeri olarak, MP spesifik primer çiftleri kullanılmıştır. MP spesifik primer çiftleri ile yapılan PCR analizi için ise; 16,8 μ l d₂H₂O , 2,5 μ l 10XB, 1,5 μ l MgCl₂, 2 μ l dNTP (2,5), 10 pmol/ μ l konsantrasyondaki primerden 0,5 μ l virüs spesifik primer, 0,2 μ l

Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific) karışımı hazırlanıp PCR aletine (SENSOQUEST Labcycler, Thermoblock 96, Germany) yerleştirilmiştir. Ancak tek bir reaksiyon için yarım doz uygulaması yapılmıştır. Sıcaklık döngüsünde 1 döngü 98°C'de 3 dak., sonra 94°C'de 30 sn., 55°C'de 45 sn., 72°C'de 1 dak da 35 döngü, 72°C'de 10 dak. ve 4 °C'de soğutma şeklinde PCR programı uygulanmıştır. PCR ürünleri, %1-1,5 agaroz jelde (EK3) elektroforezi yapıldıktan sonra etidyum bromid (EK3) ile DNA boyanarak UV transillüminatörde elde edilen sonuçlar gözlenmiştir.

16,8 µl d₂H₂O, yarım doz için 1,2 µl cDNA (tam doz için 2 µl), 10 pmol/µl konsantrasyondaki primerden CP bölgesi için, 0,5 µl virüs spesifik primer ve 0,5 µl, 0,5 µl 10 mM dNTP, 2 µl 25 mM MgCl₂, 2,5 µl 10XB reaksiyon ortamı, 0,2 µl Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific) ile hazırlanmıştır ve PCR aletine yerleştirilmiştir. Fakat tek bir reaksiyon için yarım doz uygulaması yapılmıştır. PCR aletinde, 1 döngü 94°C'de 2 dak., sonra 94°C'de 30 sn., 50°C'de 30 sn., 72°C'de 1,5 dak da 40 döngü, 72°C'de 10 dak. ve 4 °C'de soğutma şeklinde PCR programı uygulanmıştır. PCR ürünleri %1-1,5 agaroz jelde (EK3) elektroforezi yapıldıktan sonra etidyum bromid (EK3) ile DNA boyanarak UV transillüminatörde elde edilen sonuçlar gözlenmiştir.

RdRp spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR analizi için, 17,3 µl d₂H₂O , 2,5 µl 10XB, 1,5 µl MgCl₂, 0,5 µl dNTP₍₁₀₎, 10 pmol/µl konsantrasyondaki primerden 0,5 µl virüs spesifik primer ve 0,5 µl, 0,2 µl Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific) karışımı hazırlanmış olup PCR aletine yerleştirilmiştir. Ancak tek bir reaksiyon için yarım doz uygulaması yapılmıştır. PCR aletinde, 1 döngü 94°C'de 3 dak., sonra 94°C'de 30 sn., 52°C'de 45 sn., 72°C'de 1 dak.' da 35 döngü, 72°C'de 10 dak. ve 4 °C'de soğutma şeklinde PCR programı uygulanmıştır. PCR ürünleri %1-1,5 agaroz jelde (EK3) elektroforezi yapıldıktan sonra etidyum bromid (EK3) ile DNA boyanarak UV transillüminatörde elde edilen sonuçlar gözlenmiştir.

3.2.3.3. Nükleotid Dizileme ve Filogenetik Analizler

PCR analizleri sonucunda beklenen düzeyde bant veren her bir gen bölgesine ait PCR ürünleri DNA dizileme yapan ticari bir firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş ve çift yönlü olarak dizilenmiştir. Dizileme sonuçları, online alınmış olup, kaba baz dizisi kromotogramları birleştirilmiştir (Bonfield ve ark., 1995).

MEGA 11 programı (Tamura ve ark., 2021) kullanılarak, dizilemesi yapılan izolatlar referans izolatlar ile birlikte Neighbor-Joining tree modeli (Saitou ve Nei, 1987) kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Daha sonra dizilme sonuçları BLASTn analizi yapılarak benzerlik oranları tespit edilmiştir. Elde edilen izolatlar, gen bankası (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) veritabanında kayıtlı izolatlar ile kıyaslanmış olup, benzerlikleri ortaya konulmuştur.

Daha sonra, Türkiye ve dünyanın farklı bölgelerinden kıyaslanan bu veriler nükleotid düzeyindeki benzerlik oranları Sequence Demarcation Tool (SDT) v.1.2 programı kullanılarak hesaplanmış ve renklendirilmiş matrisleri oluşturulmuştur (Muhire ve ark., 2014; Çelik, 2020).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi çalışması ve ağaçlarda gözlenen semptomlar

Araştırma materyalini oluşturan kiraz örneklerinin toplanması amacıyla 2019-2021 yıllarında en fazla ticari kiraz üretimi yapılan İzmir, Konya, Kahramanmaraş, Niğde, Bursa, Manisa, Osmaniye, Adana ve Antalya illerine bağlı ilçelerde sorvey yapılmış, virüs benzeri semptom gösteren ve bunun yanında semptomsuz ağaçlardan da örnek alınmıştır. İlkbahar mevsiminde Mayıs-haziran aylarında ve sonbahar mevsiminde Eylül-ekim aylarında örnekler toplanmıştır. Örnekler, ticari üretim yapılan bahçelerden ve bunun yanında bakımsız bahçelerden alınmıştır. İzmir'in Kemalpaşa, Kiraz ve Bergama ilçelerinden toplam 66, Konya'nın Hadim, Akşehir, Taşkent, Ereğli ilçelerinden 110 kiraz ve 4 vişne olmak üzere toplam 114, Kahramanmaraş'ın Andırın ilçesinden toplam 62, Niğde'nin Çamardı ilçesinden 26, Bursa'nın Osmangazi ilçesinden 47, Manisa'nın Şehzadeler ilçesinden 30, Osmaniye ili Bahçe ilçesinden 67, Adana ilinin Pozantı ilçesinden 45 ve Antalya ilinin Korkuteli ilçesinden 15 olmak üzere toplam 472 örnek toplanmıştır.

Konya ilinden toplanan kiraz örneklerinde, genç yapraklarda ana damar büzülmesi, ana damar etrafında sararma, koyu renkli sararma, benek şeklinde sararmalar, koyu renk benekler renk açılmaları, yapraklarda şekil bozuklukları semptomları gözlenmiştir. Konya ili Hadim ilçesinden alınan ve enfekteli bulunan örnek de, sarı benek şeklinde belirgin semptomlar, damarlar arası sararma ve özellikle ana damar ve bağlantılı yan damarlarda belirgin şiddetli sararmalar görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kiraz yapraklarında damar aralarında sararma, nekroz oluşumu, sarı haleli benekler ve koyu pas rengi benek oluşumu

Konya ili Hadim ilçesinden toplanan kiraz örneklerinde sarı benek şeklinde belirgin belirtiler, damarlar arası sararma ve özellikle ana damar ve bağlantılı yan damarlarda belirgin sararmalar görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.2. Konya ilinden toplanan kiraz ağaçlarının yapraklarında gözlenen **(A)** sarı ve açık yeşil damar bantlaşması **(B)** sarı- açık yeşil beneklenmeler, halkalı benekler ve mozaik belirtiler

Kahramanmaraş ilinin Andırın ilçesinde kiraz ağaçlarında gözlemlenen belirtiler sarı beneklenmeler ve nekrozlar şeklindedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kahramanmaraş-Andırın ilçesinde iki farklı kiraz bahçesinde kiraz ağaçlarında gözlemlenen PDV benzeri belirtiler (A) sahihsiz bahçe (B) ticari üretim yapılan bahçe

İzmir ili Kemalpaşa ilçesinde, yapraklarda şekil bozuklukları ve renk açılmaları gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. İzmir ilinde virüs belirtisi gösteren yapraklarda (A) şekil bozulmaları (B) renk değişiklikleri, nekroz oluşumu

Konya ve Kahramanmaraş illerindeki kiraz ağaçlarında bazı sürgünlerde sararma gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. **(A)**Konya ve **(B)** Kahramanmaraş illerinde kiraz ağaçlarının sürgünlerinde gözlenen sararma ve kuruma belirtileri

Konya ili Hadim ilçesi kiraz bahçelerine yakın, vişne ağaçlarında ve farklı meyve ağaçlarında benzer belirtiler gözlemlenmiştir ve Kahramanmaraş ili Andırın ilçesi bahçe kontrollerinde de kiraz ağaçlarının bazılarının tepe ve yan sürgünlerinde sararmalar ile birlikte kurumalar ve renk değişimleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. **(A)** İzmir, **(B)** Konya, **(C)** ve **(D)** Kahramanmaraş illerinden farklı bahçelerdeki kiraz ağaçlarında görülen virüs benzeri belirtiler



Şekil 4.7. Konya ilindeki kiraz ağaçlarında gözlenen (A) sarı damar bantlaşması, (B) mozaikleşme ve (C) nekroz belirtileri



Şekil 4.8. İzmir Kemalpaşa ilçesinden alınan pozitif örneklerin (A) 3 yaprak ana damar bükülmesi ve (B) 4, (C) 17, (D) 18 numaralı PDV pozitif bulunan semptomsuz örnekler

İzmir ili Kemalpaşa ilçesinden toplanan örneklerden semptomlu ve semptomsuz olup pozitif sonuç veren bazı örnekler Şekil 4.8. de gösterilmiştir. PDV, semptom göstermeyen örneklerde de saptanmıştır.

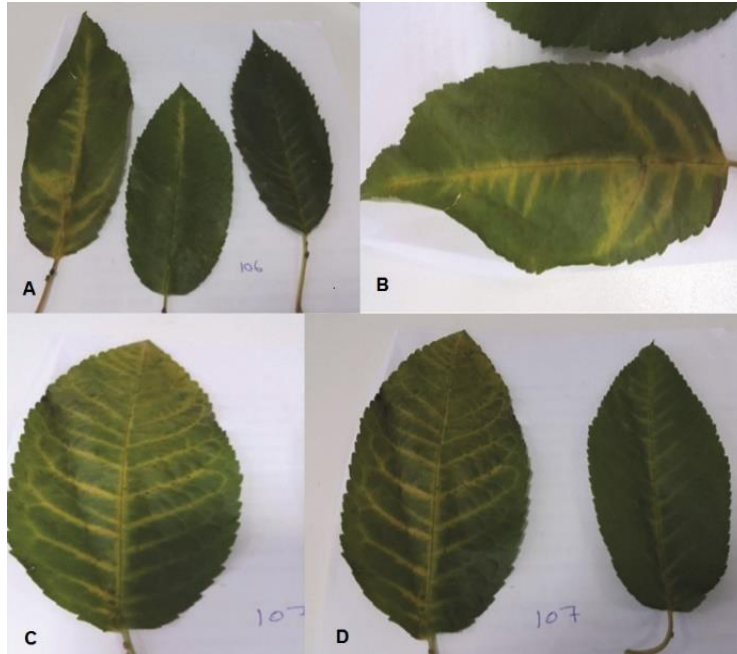
Konya ilinden toplanan yapraklarda halkalı lekeler, mozaik, damar bantlaşmaları, şekil bozuklukları, renk bozuklukları ve sarı ve açık yeşil renkte beneklenmeler şeklinde belirtiler gözlemlenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



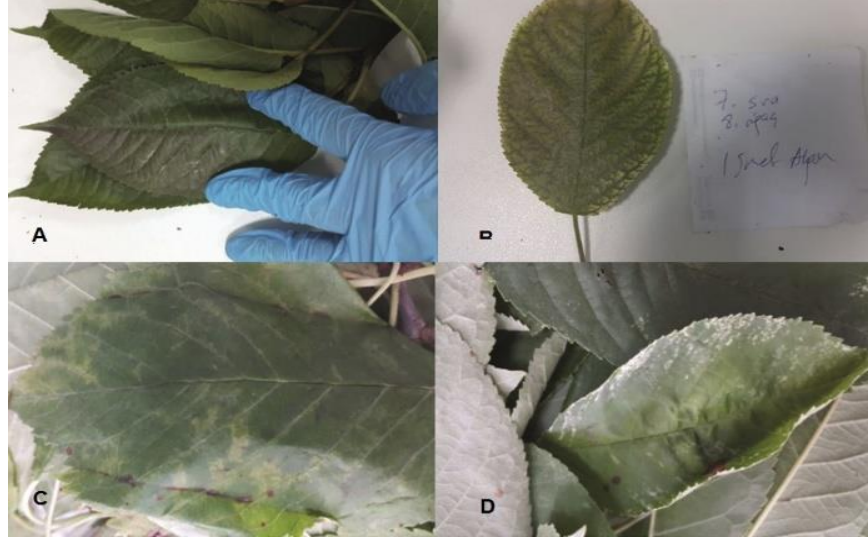
Şekil 4.9. Konya ilinden toplanan kiraz örneklerinde gözlenen prune dwarf virüs (PDV) benzeri belirtiler

İzmir'den toplanan ve PDV pozitif bulunan örneklerin bazılarında belirtiler gözlenmiştir. Belirtiler gözlenmeyen örneklerde de RT-PCR analizleri ile PDV saptanmıştır (Şekil 4.9).

Konya ilinden alınan ve gerek DAS-ELISA gerekse RT-PCR analizlerinde pozitif saptanan örneklerde damar bantlaşması ve halkalı leke belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Konya ilinden toplanan ve PDV benzeri belirtiler gösteren yapraklarda damar açılması. PDV'nin kirazda olgun yaprakların orta damar etrafında genel kloroz belirtileri belirtileri gözlenmiştir (A, B, C ve D).



Şekil 4.11. Konya ilinden toplanan kiraz yapraklarında görülen **(A)** bronzlaşma, yaprağın yarısında kızarıklık **(B)** damar bantlaşması **(C)** nekrozlanma **(D)** damarlarda büzüşme belirtileri

Konya ilinden toplanan yapraklarda mozaik, damar bantlaşmaları, şekil bozuklukları, renk bozuklukları ve sarı ve açık yeşil renkte beneklenmeler şeklinde belirtiler gözlemlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

Konya ili Hadim, Taşkent, Ereğli ve Akşehir ilçelerinde kiraz yapraklarında bronzlaşmalar, damarlarda büzüşme, yaprağın yarısında kızarıklık ve damar bantlaşması belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.11).

Manisa ili Şehzadeler ilçesinde kiraz ağaçlarının yapraklarında ise nekroz belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Manisa ili Şehzadeler ilçesinde kiraz yapraklarında gözlenen (A) nekroz, büzüşme, pas şeklinde beneklenmeler (B) ana damarda büzüşme, pas şeklinde beneklenme belirtileri



Şekil 4.13. Kahramanmaraş ili Andırın ilçesinden alınan kiraz ağaçlarının yapraklarında gözlenen (A) sarı renkli benekler (B) yaprak şekil bozuklukları ve nekrozlar (C) nekroz (D) beneklenme ve yaprak kenarında nekroz belirtileri

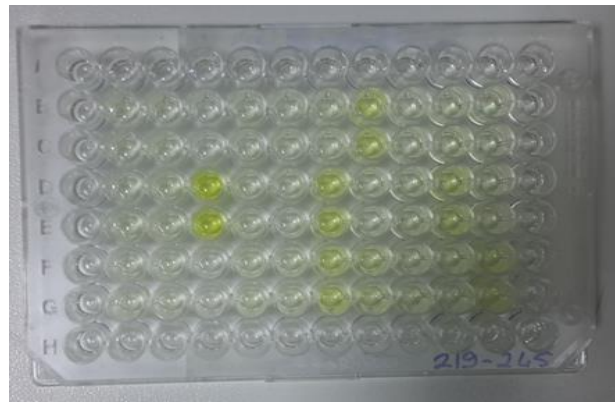
Bu çalışmada da, diğer çalışmalarda olduğu gibi kiraz yapraklarında PDV benzeri belirtiler yapraklarda klorotik lekeler, halkalar, damar açılmaları şeklinde gözlenmiştir (Nolasco ve ark., 1991; Uyemoto ve Scott, 1992, Rampitsch ve ark., 1995, Sutic ve ark., 1999). Bu belirtiler Kamenova ve ark., (2019) tarafından da bildirilen yaygın PDV belirtileriyle büyük benzerlik göstermiştir.

4.2. DAS-ELISA Testleri Sonuçları

İzmir, Konya, Kahramanmaraş, Niğde, Bursa, Manisa, Osmaniye, Adana ve Antalya illerinde kiraz ağaçlarındaki PDV'nin saptanma amacıyla yapılan sorvey kapsamında toplam 472 örnek DAS-ELISA ile testlendiğinde 25 kiraz örneği PDV açısından pozitif bulunmuş olup, testlenen 4 vişne örneği ise negatif bulunmuştur. (Çizelge 4.1). Testlenen tüm kiraz örneklerinin PDV enfeksiyon oranı %5,3 olarak tespit edilmiştir.

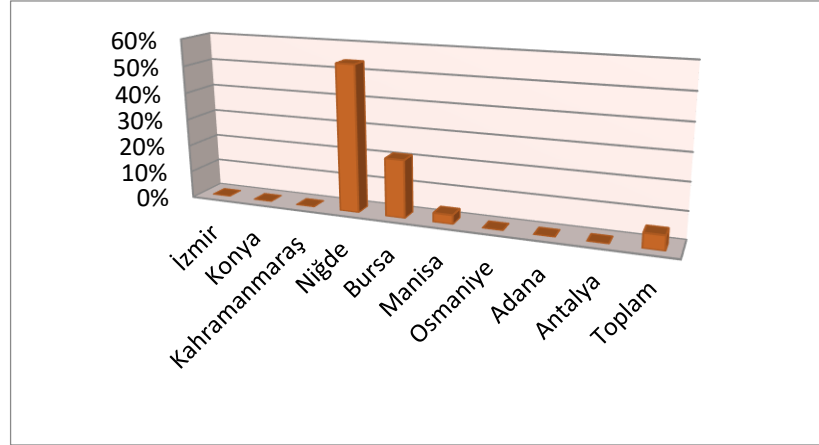
Çizelge 4.1. Toplanan örneklerin DAS-ELISA testi sonucu belirlenen enfeksiyon oranları

İller	Bitki	Enfekteli örnek/ testlenen örnek	Enfeksiyon oranı (%)
İzmir	Kiraz	0 / 66	%0
Konya	Kiraz ,Vişne	0 / 114	%0
Kahramanmaraş	Kiraz	0 / 62	%0
Niğde	Kiraz	14 / 26	%53,8
Bursa	Kiraz	10 / 47	%21,2
Manisa	Kiraz	1 / 30	%3,3
Osmaniye	Kiraz	0 / 67	%0
Adana	Kiraz	0 / 44	%0
Antalya	Kiraz	0 / 15	%0
	472		
Toplam	(468 Kiraz, 4 Vişne)	25 / 472	%5,3



Şekil 4.14. 219- 245 numaralı örneklerin DAS-ELISA analizleri sonucunda gözlenen pozitif reaksiyonlar

ELISA plakalarında renk değişimi görsel olarak takip edilerek substrat eklendikten sonra ilk 30 dak. 1, 2 ve 3 saat olacak şekilde bekletilerek ELISA okuyucusunda 405 nm’de okuma yapılmıştır. Son değerlendirme olarak 3 saat sonra yapılan okumalara göre PDV ile enfekteli bulunan örnekler çizelge 4.1’de iller bazında gösterilmiştir. Toplam 472 örnekten 25 kiraz örneği PDV açısından pozitif olarak saptanmış olup vişnelerde enfeksiyon tespit edilememiştir. DAS-ELISA sonucuna göre testlenen örneklerde PDV enfeksiyon oranı %5,3 olarak belirlenmiştir. Özellikle bakımsız bahçelerde bu oranın yüksek olduğu görülmüştür. Çeşit bazlı bakıldığı zaman ise, pozitif sonuçlar bir çok çeşitte saptanmış ve herhangi bir çeşide özel bir durum gözlemlenmemiştir. Serolojik bir test yöntemi olan ELISA yöntemi, son derece hızlı ve güvenilir bir yöntem olmakla birlikte bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Özellikle, odunsu bitkilerde oluşan düşük virüs konsantrasyonu ile virüsün ağaçtaki heterojen dağılımı gibi durumlar dikkate alındığında, bu yöntemin mevsimsel olarak bazı durumlarda yanlış sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (Torrance, 1981). Sonuçlar, değerlendirildiğinde bakımsız ve organik tarım yapılan bahçelerde virüsün daha yaygın olduğu saptanmıştır. DAS-ELISA yöntemi kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda da, sert çekirdekli meyvelerden kirazda en sık görülen virüsün PDV olduğu ve enfeksiyon oranının %5-55 arasında değiştiği bildirilmiştir (Azeri, 1994; Çağlayan Yıldızgördü ve Hurigil, 1996; Fidan ve Özdemir, 2000; Paylan, 2006). Karabacak ve İlbağı (2013), Türkiye’nin Trakya Bölgesinde badem virus hastalıklarının saptanması ve virüslerin tanılanması için, bölgedeki 10 ilçeden 158 ağaçtan çiçek ve 260 ağaçtan yaprak örnekleri toplayarak PNRSV, PDV ve PPV açısından testlediklerinde testlenen örneklerin % 31.15 oranında PNRSV, % 4,23 oranında PDV, % 1,92 oranında PPV ile bulaşık olduğunu tespit etmişlerdir. Örneklerin % 1,54’ünde ise PNRSV+PDV ve PNRSV+PPV virüslerinin karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.15. DAS-ELISA sonuçlarına göre il bazında PDV enfeksiyon oranları

Sipahioğlu ve ark. (2004)'nın Van ve civarında yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, DAS-ELISA testi ile kirazlarda PDV enfeksiyonu %7,1 oranında tespit edilmiştir.

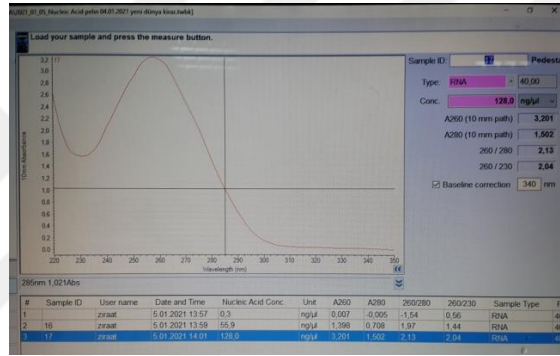
Çağlayan ve ark. (2008)'nin yapmış oldukları DAS-ELISA testlemeleri sonucunda kirazlarda en yaygın virüsün %10,8 oranında PDV olduğu saptanmış olup testlenen vişne örneklerinin hepsi negatif olarak saptanmıştır. Bu çalışma da da testlenen 4 vişne örneği PDV açısından negatif bulunarak benzer bir sonuç alınmıştır.

Öztürk ve Çevik (2015) tarafından Isparta ilinde yapılan bir sörvey çalışmasında ise 10 ilçede 142 kiraz bahçesi ziyaret edilerek 521 kiraz örneği DAS-ELISA yöntemiyle PDV tespiti amacıyla testlenmiştir. Testlenen örneklerden 269 tanesi PDV ile enfekteli bulunmuştur. Ayrıca, Uzunoğulları ve Akçay (2012) Bursa ili Keles ilçesinden alınan 150 adet 0900 Ziraat kiraz çeşidinde PDV enfeksiyon oranını %36 olarak tespit ederken Early Burlat kiraz çeşidinde de %43 oranında enfeksiyon tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da Bursa ilinden toplanan Ziraat0900 örneklerinde PDV enfeksiyonu %21,277 olarak oldukça yüksek bir oranda saptanmıştır (Şekil 4.15).

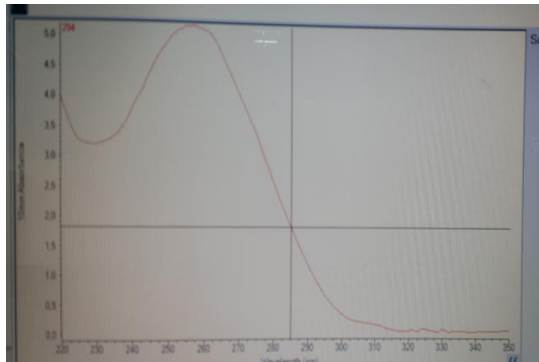
4.2.1. Moleküler Çalışmalar

4.2.1.1. Ters Transkripsiyon (Reverse Transcription: RT) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri

Mayıs-haziran ve eylül-ekim aylarında kiraz ağaçlarından toplanan sürgünlü yapraklardan nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Kiraz yapraklarından ekstrakte edilen toplam nükleik asitlerin kalitesini belirlemek için, elde edilen RNA'lar ve toplam nükleik asitler nanodrop spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD, Rott ve Jelkmann, 2001) yardımıyla ölçülmüştür. Bu RNA'ların bazılarının spektrofotometre ile ölçüm grafiği şekil 4.16 ve şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.16. İzmir ili Kemalpaşa ilçesinden alınan 17 no'lu örnekten izole edilen RNA'nın nanodrop spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon 128,0 ng/ml; 260/280).



Şekil 4.17. Manisa ili Şehzadeler ilçesinden alınan 294 no'lu örnekten izole edilen RNA'nın nanodrop spektrofotometre ile ölçüm grafiği (Konsantrasyon 204,6 ng/ml; 260/280).

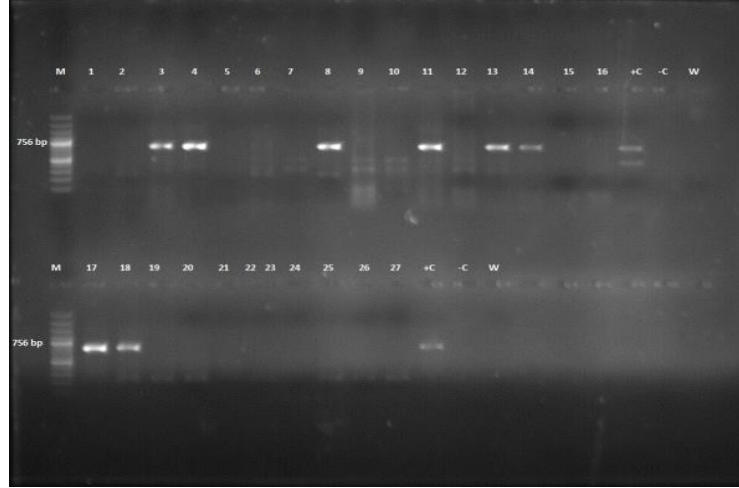
MP (756 bp), CP (874 bp), ve RdRp (382 bp) primer çiftleri ile yapılan RT-PCR analizleri sonucunda PDV pozitif olduğu saptanan ve sekans analizleriyle doğrulanan örnekler Çizelge 4.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Kiraz yetiştiriciliği yapılan farklı illerden toplanan kiraz örneklerinin prune dwarf virus (PDV)'nin üç farklı gen bölgesini kısmi olarak çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

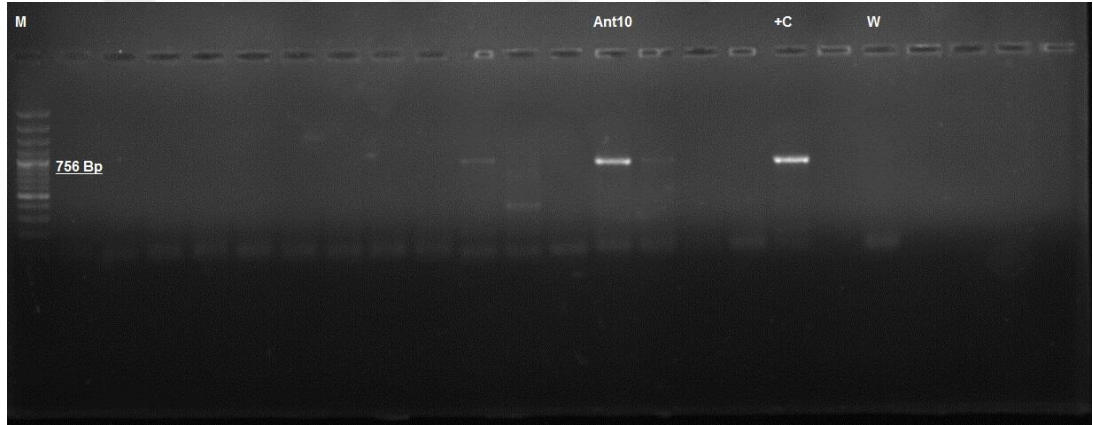
İl sayısı	Toplanan il	RT-PCR (MP)	RT-PCR (CP)	RT-PCR (RdRp)
1	İzmir	9 / 66	4 / 66	9 / 66
2	Konya	16 / 114	10 / 114	6 / 114
3	K.maraş	7 / 62	7 / 62	7 / 26
4	Niğde	5 / 26	4 / 26	3 / 26
5	Bursa	8 / 47	7 / 47	6 / 47
6	Manisa	1 / 62	3 / 30	3 / 62
7	Osmaniye	2 / 67	5 / 67	3 / 67
8	Adana	3 / 44	3 / 44	3 / 44
9	Antalya	1 / 15	1 / 15	1 / 15
	Toplam	52 / 472	44 / 472	39 / 472

Elde edilen cDNA'lar ile, prune dwarf virus (PDV)'nin kısmi CP (RNA-3), MP (RNA-3) ve RdRp (RNA-2) bölgelerine spesifik primer çiftleriyle PCR analizleri yapılmıştır. Her bir RNA bölgesi için kullanılan primer çiftleri ile ilk önce optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon işlemlerinde farklı bağlanma sıcaklıkları, döngü sayıları, dNTP ve MgCl₂ değişiklikler yapılmış ve pozitif kontrolde en kuvvetli DNA bandı elde edilen PCR koşulları belirlenmiştir. Optimizasyon işlemleri sonrası, RNA ekstraksiyonu yapılan 472 örnek, PDV'ye spesifik üç farklı gen bölgesine ait primerlerle (Çizelge 4.2) testlenmiş olup, başarılı bir amplifikasyon tespit edilen örneklerle ait jel fotoğrafları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.18 - 4.23).

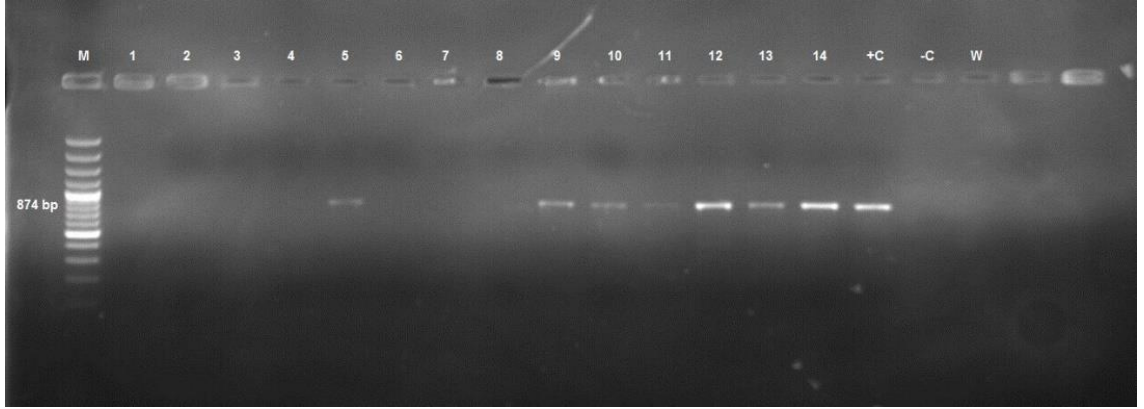
Bu çalışmada, MP'ye özgü Predajna ve ark. (2017)'nin tasarlamış olduğu primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde 472 örnekten 52 tanesinde beklenen düzeyde (756 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).



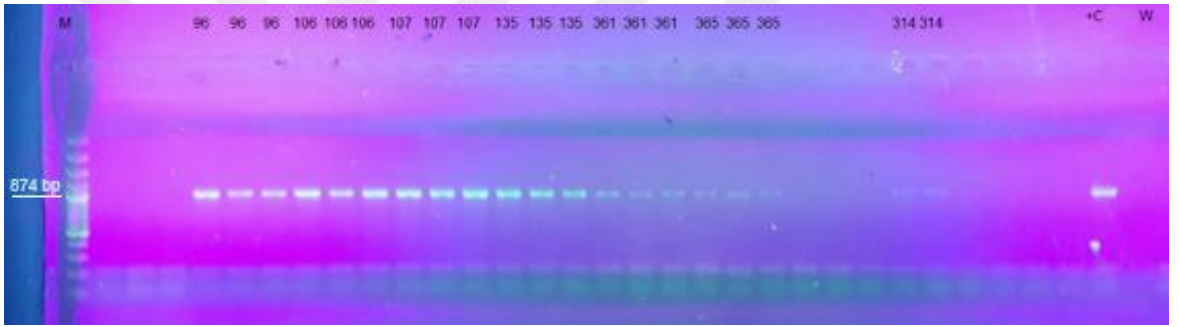
Şekil 4.18. İzmir ili Kemalpaşa ilçesinden toplanan kiraz örneklerinin prune dwarf virus (PDV)'nin MP bölgesini çoğaltan PD3-331F ve PD3-1086R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin jel görüntüsü. M: Marker; (M: 100 bp DNA ladder, , 3-18: Testlenen kiraz örnekleri : +C: Pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol W: Su kontrol.



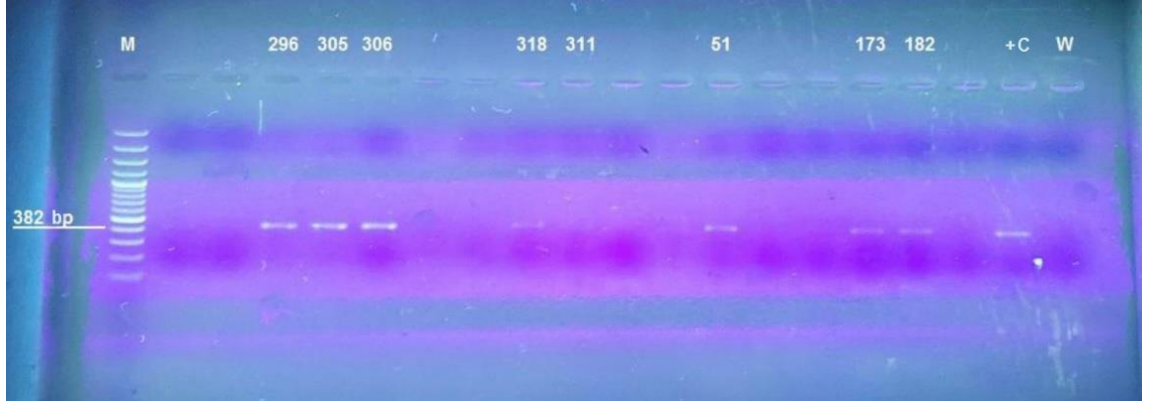
Şekil 4.19. Antalya ilinden Korkuteli toplanan kiraz örneklerinin prune dwarf virus (PDV)'ünün tespiti için PD3-331F ve PD3-1086R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin 756 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü. M: Marker; (M: 100 bp DNA ladder, 1: AntK1, 2: 3: 4: 5: 6: 7: 8: 9: 10: 11: 12: 13:467(AntK10) 14:,11 15:+C: Pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol W: Su kontrol.



Şekil 4.20. Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinden toplanan kiraz örneklerinde prune dwarf virus (PDV)'üne spesifik primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. M: Marker SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD; 1-10: Osmaniye, 11-14: Kahramanmaraş kiraz örnekleri, +C: Pozitif kontrol, -C: Negatif kontrol, W: Su kontrol (Gündoğan ve ark., 2022).



Şekil 4.21. Konya, Osmaniye ve Kahramanmaraş izolatlarından prune dwarf virus (PDV)'ünün tespiti için PDV-CP-F ve PDV-CP R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizinin çoğaltma sonucu 874 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü. M: Marker; (M: 100 bp DNA ladder, 4:96, 5: 96, 6:96, 7:106, 8:106, 9:106, 10:107, 11:107, 12:107, 13:135, 14:135, 15:135, 16:361, 17:361, 18:361, 19:365, 20: 365, 21:365, 25:314, 26:314 +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol.



Şekil 4.22. PDV-RdRp spesifik primer çifti ile yapılan PCR sonucu elde edilen 382 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü (M: 100 bp DNA ladder, 3:MS296, 4: 4, 5: 4, 6:4, 10:8, 11:8, 12:8, 19:305, 20:305, 21:305, 22:320, 23:320, 24:320, +C: Pozitif kontrol, W:Su kontrol)



Şekil 4.23. PDV-RdRp spesifik primer çifti ile yapılan PCR çoğaltma sonucu elde edilen 382 bp büyüklüğündeki bant görüntüsü (M: 100 bp DNA ladder, 1:11, 2:11, 3:11, 4: 4, 5: 4, 6:4, 10:8, 11:8, 12:8, 19:305, 20:305, 21:305, 22:320, 23:320, 24:320, +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol)

MP (756 bp), CP (874 bp), ve RdRp (382 bp) kısmi gen bölgelerini çoğaltan primerlerle PCR ürünü elde edilen örnekler çoğaltılarak sekans analizine gönderilmiştir.

Çizelge 4.3. Çalışma kapsamında üç farklı primerle yapılan RT-PCR analizleri a sonucunda PDV pozitif bulunan kiraz örneklerinin simptomları ve RT-PCR sonuçları

Örnek No	İzolat no	Toplandığı İl/ İlçe	RT-PCR (MP)	RT-PCR (CP)	RT-PCR (RdRp)	Simptomlar
3	IK3	İzmir/ Kemalpaşa	+	-	+	Hafif renk açılması, genç yapraklarda büzülme
4	IK4	İzmir/ Kemalpaşa	+	-	+	Genç yapraklarda ana damarda büzülme, koyu renk benekler, renk açılması, sararma
6	IK6	İzmir/ Kemalpaşa	+	-	+	Simptomsuz
8	IK8	İzmir/ Kemalpaşa	+	-	+	Hafif sararma
11	IK11	İzmir/ Kemalpaşa	+	-	+	Simptomsuz
13	IK13	İzmir/ Kemalpaşa	+	+	+	Simptomsuz
14	IK14	İzmir/ Kemalpaşa	+	+	+	Genç yapraklarda kıvrılma, renk açılması
17	IK17	İzmir/ Kemalpaşa	+	+	+	Simptomsuz
18	IK18	İzmir/ Kemalpaşa	+	+	+	Simptomsuz
30	KH30	Konya/ Hadim	-	+	-	Emgi zararı benzeri nekrozlu renk açılmaları
38	KH38	Konya/ Hadim	+	-	-	Simptomsuz
39	KH39	Konya/ Hadim	+	-	-	Simptomsuz
41	KE41	Konya/ Ereğli	+	-	-	Simptomsuz
43	KE43	Konya/ Ereğli	+	+	+	Simptomsuz
46	KE46	Konya/ Ereğli	+	-	-	Simptomsuz

Çizelge 4.3. (Devamı) Çalışma kapsamında üç farklı primerle yapılan RT-PCR analizleri a sonucunda PDV pozitif bulunan kiraz örneklerinin semptomları ve RT-PCR sonuçları

Örnek No	İzolat no	Toplandığı İl/ İlçe	RT-PCR (MP)	RT-PCR (CP)	RT-PCR (RdRp)	Semptomlar
48	KH48	Konya/ Hadim	+	-	-	Yapraklarda sararma, yaprak kenarlarında nekroz
49	KH49	Konya/ Hadim	+	-	-	Yapraklarda sararma
51	KH51	Konya/ Hadim	-	+	+	Yapraklarda sararma
52	KH52	Konya/ Hadim	+	-	-	Yapraklarda sarı beneklenme ve delinme
53	KH53	Konya/ Hadim	+	-	-	Yaprak kenarlarına renk açılması ve büzülme
56	KH56	Konya/ Hadim	+	+	+	Sarı beneklenme, hafif büzülme
93	KH93	Konya/ Hadim	+	+	+	Semptomsuz
95	KH95	Konya/ Hadim	+	+	+	Semptomsuz
96	KH96	Konya/ Hadim	+	+	-	Semptomsuz
106	KH106	Konya/ Hadim	+	+	-	Sarı benek şeklinde belirgin semptomlar, damarlar arası sararma
107	KH107	Konya/ Hadim	+	+	+	Damar arası sararma
135	KA135	Konya/ Akşehir	+	+	-	Semptomsuz

Çizelge 4.3. (Devamı) Çalışma kapsamında üç farklı primerle yapılan RT-PCR analizleri a sonucunda PDV pozitif bulunan kiraz örneklerinin semptomları ve RT-PCR sonuçları

Örnek No	İzolat no	Toplandığı İl/ İlçe	RT-PCR (MP)	RT-PCR (CP)	RT-PCR (RdRp)	Semptomlar
167	NC167	Niğde/Çamardı	+	+	-	Yapraklarda aşırı klorotik sararmalar
170	NC170	Niğde/Çamardı	+	+	+	Yapraklarda aşırı klorotik sararmalar
172	NC172	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
173	NC173	Niğde/Çamardı	+	+	+	Semptomsuz
174	NC174	Niğde/Çamardı	+	-	-	Semptomsuz
175	NC175	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
176	NC176	Niğde/Çamardı	+	-	-	Semptomsuz
178	NC178	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
180	NC180	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
181	NC181	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
182	NC182	Niğde/Çamardı	-	+	+	Semptomsuz
184	NC184	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
185	NC185	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
186	NC186	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
187	NC187	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
190	NC190	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
191	NC191	Niğde/Çamardı	-	-	-	Semptomsuz
232	BK232	Bursa/ Osmangazi	+	+	+	Semptomsuz
233	BK233	Bursa/ Osmangazi	+	+	+	Semptomsuz
234	BK234	Bursa/ Osmangazi	+	+	+	Semptomsuz
236	BK236	Bursa/ Osmangazi	+	+	+	Semptomsuz
241	BK241	Bursa/ Osmangazi	-	-	-	Semptomsuz
245	BK245	Bursa/ Osmangazi	+	-	-	Semptomsuz
247	BK247	Bursa/ Osmangazi	+	-	-	Semptomsuz
251	BK251	Bursa/ Osmangazi	-	-	-	Semptomsuz
262	BK262	Bursa/ Osmangazi	-	-	-	Semptomsuz
266	BK266	Bursa/ Osmangazi	-	-	-	Semptomsuz

Çizelge 4.3. (Devamı) Çalışma kapsamında üç farklı primerle yapılan RT-PCR analizleri a sonucunda PDV pozitif bulunan kiraz örneklerinin semptomları ve RT-PCR sonuçları

Örnek No	İzolat no	Toplandığı İl/ İlçe	RT-PCR (MP)	RT-PCR (CP)	RT-PCR (RdRp)	Semptomlar
294	MS294	Manisa/ Şehzadeler	-	+	-	Ana damar etrafı sararma, yaprak kenarları kuruma, bronz kahverengi benekler ve lekeler
295	MS295	Manisa/ Şehzadeler	-	+	-	Ana damar büzülmesi,bronz kahverengi benekler
296	MS296	Manisa/ Şehzadeler	+	+	+	Ana damar büzülmesi,bronz kahverengi benekler
304	BK304	Bursa/ Osmangazi	-	+	-	Semptomsuz
305	BK305	Bursa/ Osmangazi	+	+	+	Semptomsuz
306	BK306	Bursa/ Osmangazi	+	+	+	Semptomsuz
311	MK3	K.maraş/Gaffarlı Köyü	+	+	+	Semptomsuz
313	MK5	K.maraş/Gaffarlı Köyü	+	+	+	Semptomsuz
314	MK6	K.maraş/Gaffarlı Köyü	+	+	+	Semptomsuz
315	MK7	K.maraş/Gaffarlı Köyü	+	+	+	Semptomsuz
318	MK10	K.maraş/Dulkadiroğlu	+	+	+	Semptomsuz
320	KMA158	K.maraş/Andırın/Çokak	+	+	+	Semptomsuz

Çizelge 4.3. (Devamı) Çalışma kapsamında üç farklı primerle yapılan RT-PCR analizleri a sonucunda PDV pozitif bulunan kiraz örneklerinin semptomları ve RT-PCR sonuçları

Örnek No	İzolat no	Toplandığı İl/ İlçe	RT-PCR (MP)	RT-PCR (CP)	RT-PCR (RdRp)	Semptomlar
324	KMA162	K.maraş/ Andırın/Çokak	+	+	+	Semptomsuz
351	OK6	Osmaniye/ Bahçe	+	+	+	Yapraklarda sararma
352	OK7	Osmaniye/ Bahçe	-	+	-	Damarlar arasında sararma
361	OK16	Osmaniye /Bahçe	-	+	+	Yapraklarda hafifçe kızarma ve sarı leke oluşumları
365	OK20	Osmaniye/ Bahçe	+	+	+	Yapraklarda kızarma
406	OK61	Osmaniye/ Bahçe	-	+	-	Semptomsuz
426	AK14	Adana/ Pozantı	+	+	+	Semptomsuz
429	AK17	Adana/ Pozantı	+	+	+	Semptomsuz
432	AK20	Adana/ Pozantı	+	+	+	Semptomsuz
462	AntK462	Antalya/ Korkuteli	-	-	+	Yapraklarda grimsi lekeler
467	AntK467	Antalya /Korkuteli	+	+	-	Semptomsuz
Toplam			52/ 472	44 / 472	39/ 472	

İller bazında DAS-ELISA ve RT-PCR analizi sonucuna göre PDV pozitif bulunan örneklerin durumu değerlendirildiğinde, 4 örnek BK233 (Bursa), BK234 (Bursa), BK236 (Bursa), MS296 (Manisa) her iki tanı yöntemiyle de pozitif bulunurken 20 örnek İK13 (İzmir), İK14 (İzmir), KH56 (Konya), KH93 (Konya), KH107 (Konya), NC173 (Niğde), BK233 (Bursa), BK234 (Bursa), BK236 (Bursa), MS296 (Manisa), BK305 (Bursa), BK306 (Bursa), MK3 (Kahramanmaraş), MK6 (Kahramanmaraş), MK10 (Kahramanmaraş), KMA158 (Kahramanmaraş), KMA162 (Kahramanmaraş), OK20 (Osmaniye), AK14 (Adana), AK17 (Adana) sadece RT-PCR analizleriyle pozitif bulunmuştur (Çizelge 4.3.).

PDV-MP spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR ile analizi sonucu elde edilen veriler ile DAS-ELISA analizi sonucu bulunan pozitif sonuçlar oransal olarak en fazla Niğde ilinde gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada, CP spesifik primer çifti kullanarak yapılan RT-PCR analizi sonucunda Niğde bölgesinde 26 izolattan 4 pozitif sonuç elde edilmiştir. Daha önce bu bölgede Sajid (2018) tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise kiraz üretim alanlarında PDV varlığının teşhis edilmesi için yapılan moleküler çalışmalar sonucunda toplanan 90 izolattan hiçbirinde enfeksiyona rastlanmamıştır.

PDV'nin MP, CP ve RdRp spesifik primer çiftleri ile analiz edilen sonuçlar incelendiğinde, PDV-MP kısmi gen bölgesinin diğer kısmi gen bölgelerine oranla daha fazla pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Böylece, Predajna ve ark. (2017)'nin çalışmasında yeni dizayn edilen MP primer çiftinin de RT-PCR analizlerinde kullanılabilir olduğu bu çalışma ile örtüşmüştür.

4.2.1.2. Nükleotid Dizileme

PCR sonucunda beklenen düzeyde ürün elde edilen örnekler arasından farklı il ve ilçeleri temsil edecek şekilde seçim yapılmış ve DNA dizi analizine gönderilmiştir.. Ham sekans verilerinin düzenlenmesi, hizalanması ve konsensüs verilerin elde edilmesi Chromas programında yapılmıştır. Daha sonra, dizileme sonucunda gelen sonuçların BLASTn ve BLASTp analizi yapılmış olup, en yüksek benzerlik değerleri PDV-MP için nükleotid düzeyinde %99,57 ve aminoasit düzeyinde %99,57, PDV-CP için nükleotid düzeyinde %100 ve aminoasit düzeyinde % 100 ve RdRp için nükleotid düzeyinde %99,26 ve aminoasit düzeyinde %100 oranları tespit edilmiştir.

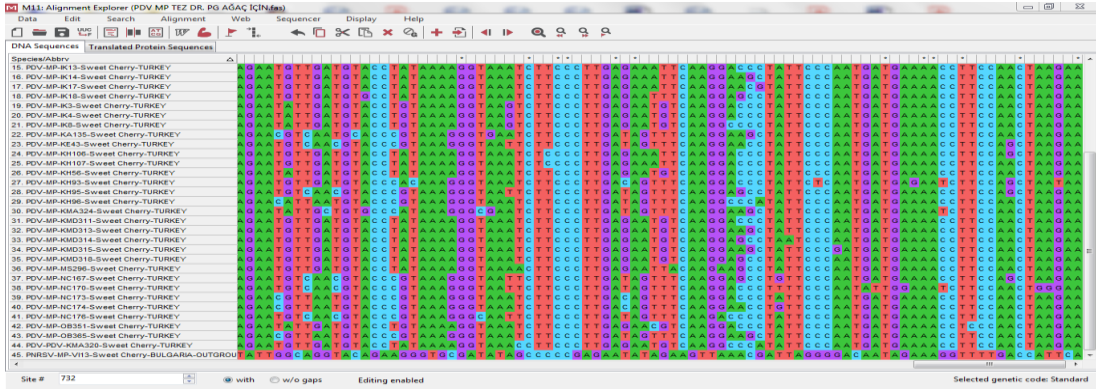
4.3. Filogenetik Analiz Sonuçları

PDV'nin kısmi MP, CP ve RdRp kısmi gen bölgelerini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak PCR ürünlerinin nükleotid ve aminoasit dizileri elde edilmiştir. Daha sonra gerek ülkemiz gerekse dünyanın diğer farklı ülkelerinden gen bankasına kaydedilmiş olan PDV'ye ait nükleotid ve aminoasit dizilerinin yer aldığı filogenetik analizler yapılmıştır. Ülkemizde önceki yıllarda farklı araştırma grupları tarafından PDV'nin sadece CP'nin kısmi gen bölgesine ait nükleotid dizileri (Ulubaş-Serçe ve ark., 2009,

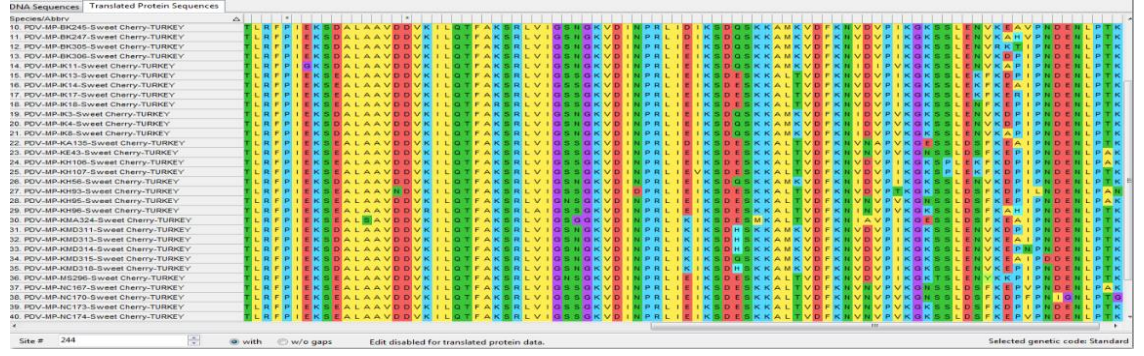
Öztürk ve Çevik, 2015, Gündoğan ve ark., 2022) gen bankasına kaydedilmiş olup MP ve RdRp kısmi gen bölgelerine yönelik nükleotid ve aminoasit dizileri ilk kez bu çalışma kapsamında elde edilmiştir.

4.3.1. MP Gen Bölgesi için Yapılan Filogenetik Analizler

MP'nin kısmi gen bölgesini çoğaltan primerlerle testlenen kiraz izolatlarından 52 izolat pozitif bulunmuş olup bu izolatlardan seçilen 43 izolat sekans analizine gönderilmiş ve PDV-MP'nin kısmi gen dizileri 732 bp nükleotid ve 244 aa (aminoasit) uzunluğunda NCBI gen bankası veri tabanına kaydedilerek erişim numaraları alınmıştır (OP433515-OP433557). Yapılan BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda elde edilen nükleotid ve aminoasit dizileri PDV referans izolatıyla kıyaslandığında nükleotid düzeyinde %88,02-99,57 ve aminoasit düzeyinde ise %84,91-99,57 arasında benzerlik göstermiştir. Çalışma kapsamında elde edilip dizilenen 43 PDV-MP izolatının kısmi gen bölgesine ait sekans bilgileri, Türkiye'de kirazlarda ve tüm sert çekirdekli meyvelerde ilk nükleotid ve aminoasit dizi kayıtlarıdır. Ülkemizde kıyaslanacak veri olmadığından dolayı, ancak farklı ülkelerden elde edilen toplam 21 PDV izolatıyla hem nükleotid hem de aminoasit düzeyinde filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.24 ve 4.25).

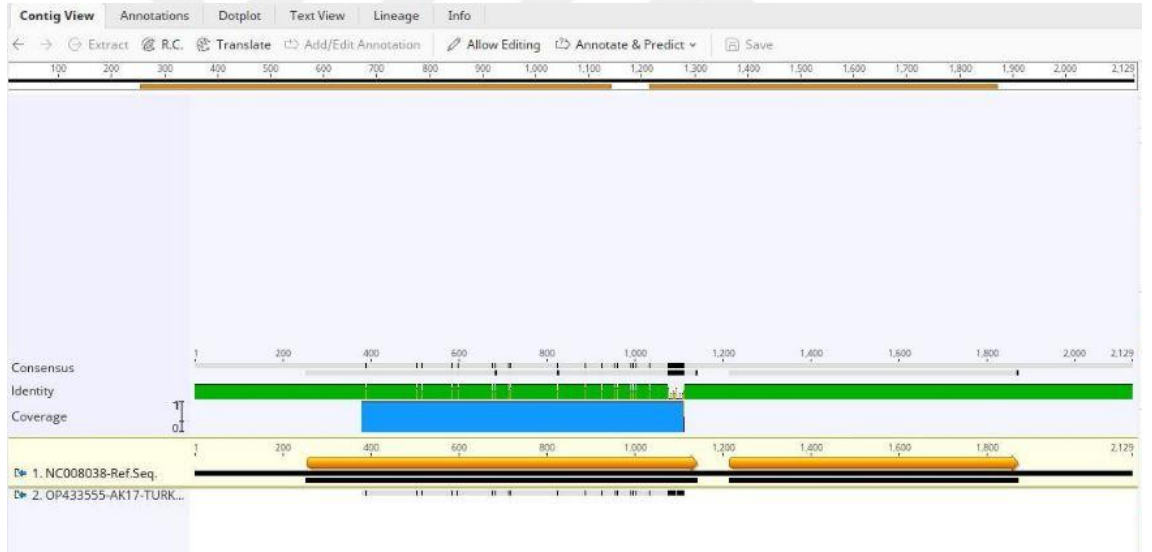


Şekil 4.24. PDV-MP nükleotid dizileri hizalanmış ekran görüntüleri

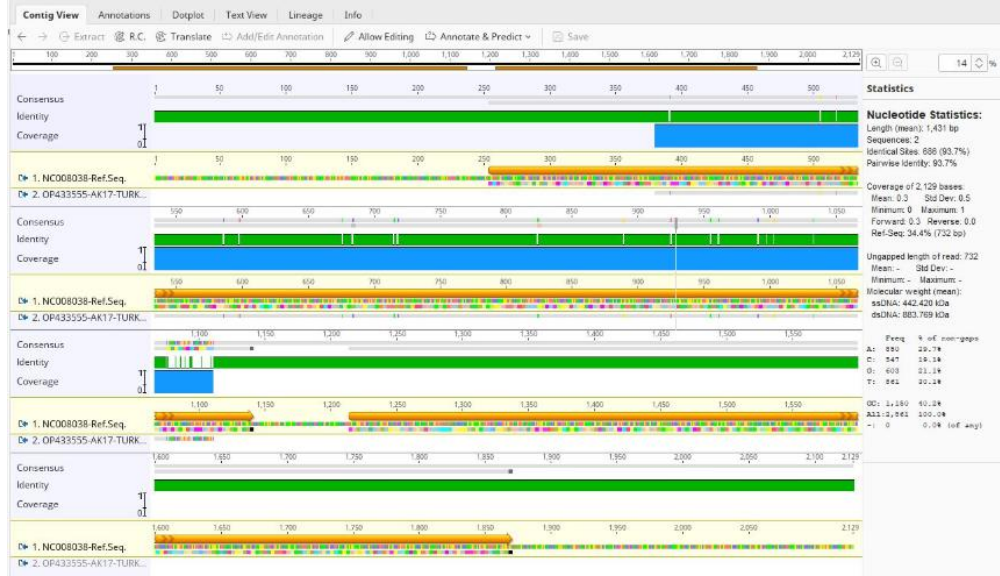


Şekil 4.24. PDV-MP amino asit dizileri hizalanmış ekran görüntüleri

PDV-MP kısmi gen bölgesi referans gen ile eşleştirildiğinde referans genomda 380 ile 1112 baz çiftleri arasında yer aldığı görülmüştür (elde edilen toplam uzunluk 732 bp). MP kısmi gen bölgesi Koziel (2017)'in çalışmasında gösterdiği üzere ORF3A bölgesinde yer almaktadır (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. AK17 (Adana) nolu izolattan elde edilen 732 baz büyüklüğündeki kısmi MP-nükleotid dizisinin Gen Bankasına kayıtlı NC008038 numaralı referans izolat dizileri ile Geneious programında karşılaştırılması ve eşleşen bölgenin gösterilmesi



Şekil 4.26. MP kısmi gen bölgesi referans gen bölgesi ile eşleştirildiğinde referans genomda 380 ile 1112 baz çiftleri arasında yer almaktadır (elde edilen toplam uzunluk 732 bp).

Çizelge 4.4. Filogenetik analizlerde kullanılan ve gen bankası veri tabanında kayıtlı PDV-MP izolatlarının listesi

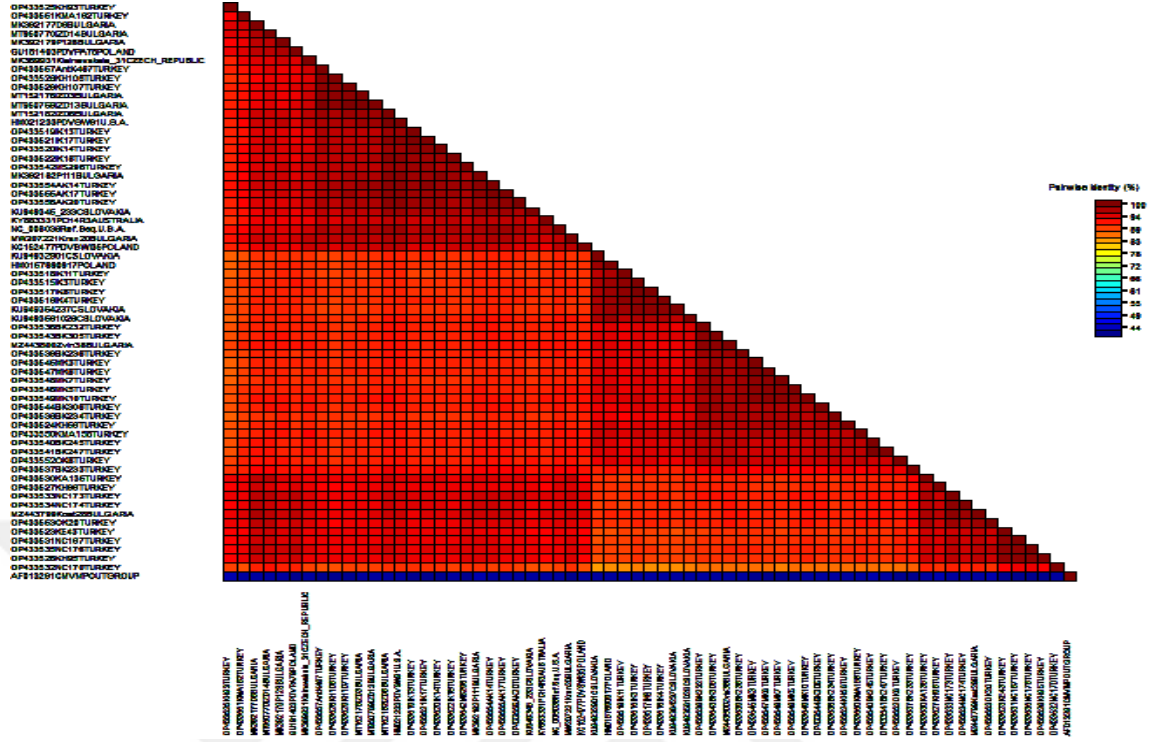
Erişim	İzolat	Lokasyon	Referans
Numarası	No/Konukçu		
OP433515	IK3-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OP433516	IK4-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OP433517	IK8-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OP433518	IK11-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OP433519	IK13-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OP433520	IK14-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OP433521	IK17-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OP433522	IK18-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OP433523	KE43-Kiraz	Konya-Ereğli	Bu çalışma
OP433524	KH56-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OP433525	KH93-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OP433526	KH95-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OP433527	KH96-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OP433528	KH106-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OP433529	KH107-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OP433530	KA135-Kiraz	Konya-Akşehir	Bu çalışma
OP433531	NC167-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OP433532	NC170-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OP433533	NC173-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OP433534	NC174-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OP433535	NC176-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OP433536	BK232-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OP433537	BK233-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OP433538	BK234-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OP433539	BK236-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OP433540	BK245-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OP433541	BK247-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OP433542	MS296-Kiraz	Manisa-Şehzadeler	Bu çalışma
OP433543	BK305-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OP433544	BK306-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OP433545	MK3-Kiraz	K.Maraş-Andırın	Bu çalışma

Çizelge 4.4. (Devamı) Filogenetik analizlerde kullanılan ve gen bankası veri tabanında kayıtlı PDV-MP izolatlarının listesi

Erişim	İzolat	Lokasyon	Referans
Numarası	No/Konukçu		
OP433546	MK5-Kiraz	K.Maraş-Andırın	Bu çalışma
OP433547	MK6-Kiraz	K.Maraş-Andırın	Bu çalışma
OP433548	MK7-Kiraz	K.Maraş-Andırın	Bu çalışma
OP433549	MK10-Kiraz	K.Maraş-Andırın	Bu çalışma
OP433550	KMA158-Kiraz	K.Maraş-Andırın	Bu çalışma
OP433551	KMA162-Kiraz	K.Maraş-Andırın	Bu çalışma
OP433552	OK6-Kiraz	Osmaniye-Bahçe	Bu çalışma
OP433553	OK20-Kiraz	Osmaniye-Bahçe	Bu çalışma
OP433554	AK14-Kiraz	Adana-Pozantı	Bu çalışma
OP433555	AK17-Kiraz	Adana-Pozantı	Bu çalışma
OP433556	AK20-Kiraz	Adana-Pozantı	Bu çalışma
OP433557	AntK467-Kiraz	Antalya-Korkuteli	Bu çalışma
MZ443800	Zvin38-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2022 (Yayınlanmamış bilgi)
KU949329	01C-Kiraz	Slovakya	Glasa ve Predajna,2017 (Yayınlanmamış bilgi)
KU949356	1028C-Kiraz	Slovakya	Glasa ve Predajna,2017 (Yayınlanmamış bilgi)
HM015769	0917-Kiraz	Polonya	Malinowski,2010 (Yayınlanmamış bilgi)
KU949364	237C-Kiraz	Slovakya	Glasa ve Predajna,2017 (Yayınlanmamış bilgi)
MW207221	Kran20-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2021 (Yayınlanmamış bilgi)
MT152176	IZD3-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2021 (Yayınlanmamış bilgi)
MT950769	IZD13-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2021 (Yayınlanmamış bilgi)

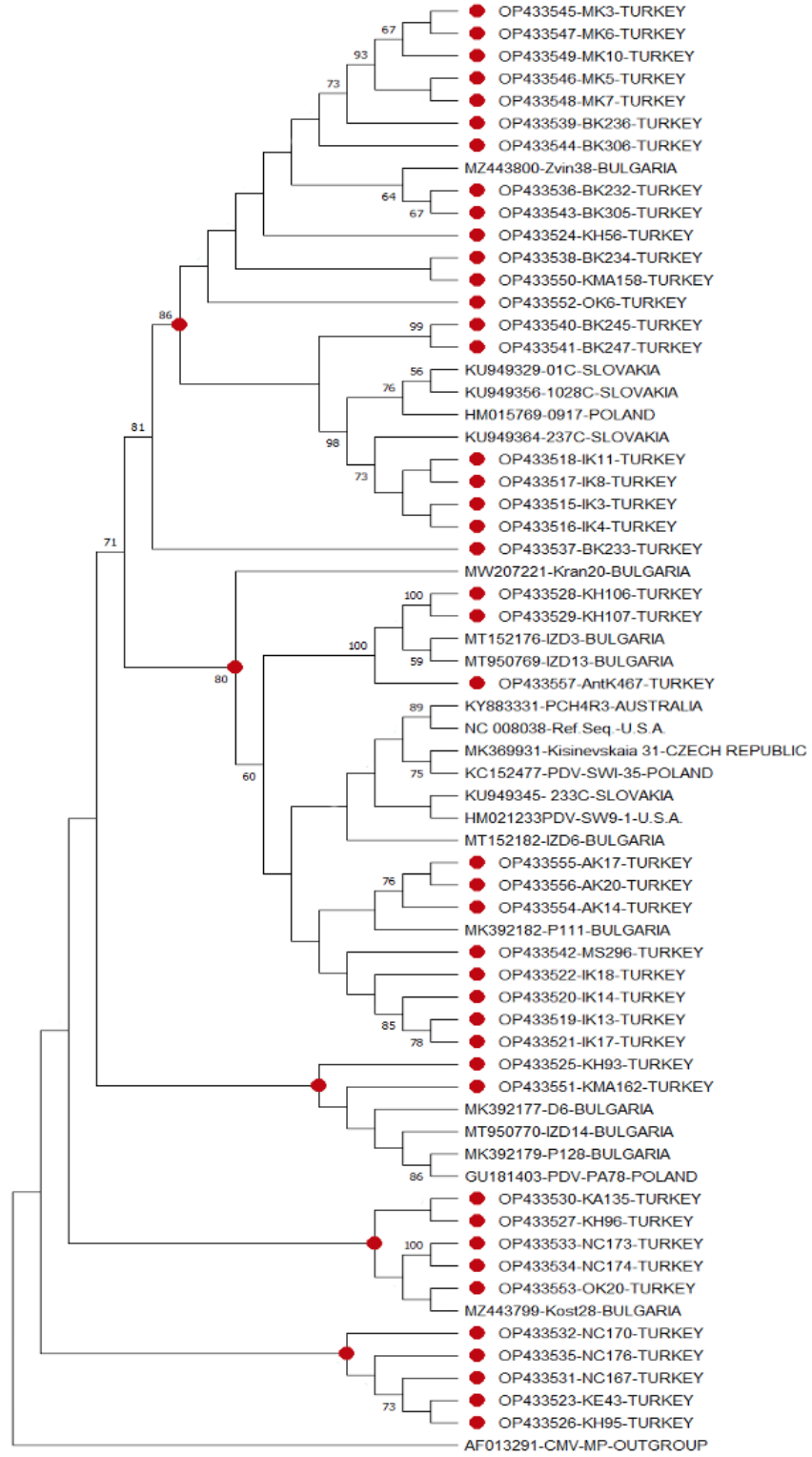
Çizelge 4.4. (Devamı) Filogenetik analizlerde kullanılan ve gen bankası veri tabanında kayıtlı PDV-MP izolatlarının listesi

Erişim Numarası	İzolat No/Konukçu	Lokasyon	Referans
KY883331	PCH4R3-Kiraz	Avustralya	Kinoti ve ark.,2017 (Yayınlanmamış bilgi)
MK369931	Kisinevskaia 31- Kiraz	Çek Cumhuriyeti	Lenz ve ark.,2019 (Yayınlanmamış bilgi)
KC152477	PDV-SWI-35- Kiraz	Polonya	Mroczkowska ve Paduch- Cichal,2013
KU949345	233C-Kiraz	Slovakya	Glasa ve Predajna,2017 (Yayınlanmamış bilgi)
HM021233	PDV-SW9-1- Kiraz	A.B.D.	Mroczkowska ve ark.,2010 (Yayınlanmamış bilgi)
MT152182	IZD6-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2021 (Yayınlanmamış bilgi)
MK392182	P111-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2019 (Yayınlanmamış bilgi)
MK392177	D6-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2019 (Yayınlanmamış bilgi)
MT950770	IZD14-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2021 (Yayınlanmamış bilgi)
MK392179	P128-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2019 (Yayınlanmamış bilgi)
GU181403	PDV-PA78-Kiraz	Polonya	Mroczkowska ve ark.,2012 (Yayınlanmamış bilgi)
MZ443799	Kost28-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova,2022 (Yayınlanmamış bilgi)
NC008038	Ref.Sekans-RNA3	A.B.D.	Bachman ve ark., 1994
AF013291	CMV-Dışgrup	Güney Kore	Kim and Park, 1997 (Yayınlanmamış bilgi)



Şekil 4.27. PDV-MP'nin nükleotid seviyesinde SDT analizi yapılan renklendirilmiş benzerlik matrisi

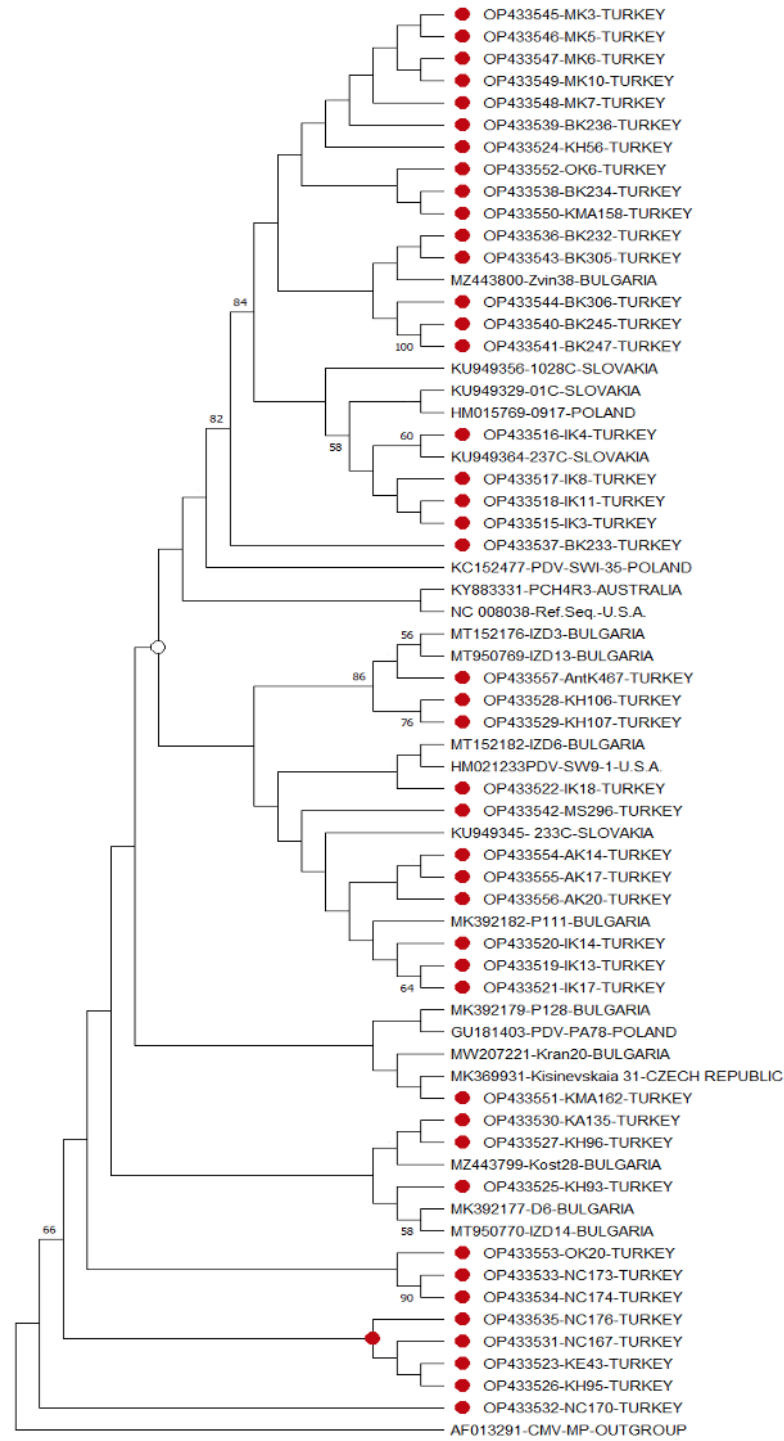
PDV-MP kısmi gen bölgesinin nükleotid ve aminoasit dizileri kullanılarak elde edilen filogenetik ağaçlar Şekil 4.29'da verilmiştir. Hem nükleotid dizileri hem de amino asit dizileri ile çizilen filogenetik ağaç gruplaması birbirine benzer olarak bulunmuştur. Filogenetik ağaçlarda, bu çalışmadan elde edilen Türkiye örnekleri kırmızı nodlarla gösterilmiştir. Filogenetik analizlerde farklı ülkelerden gen bankasına kaydedilmiş 21 PDV izolatı ve dış grup olarak da CMV kullanılmıştır.



Şekil 4.29. Kirazlardan izole edilen PDV-MP gen bölgesine ait nükleotid dizilerinin NCBI gen bankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV)

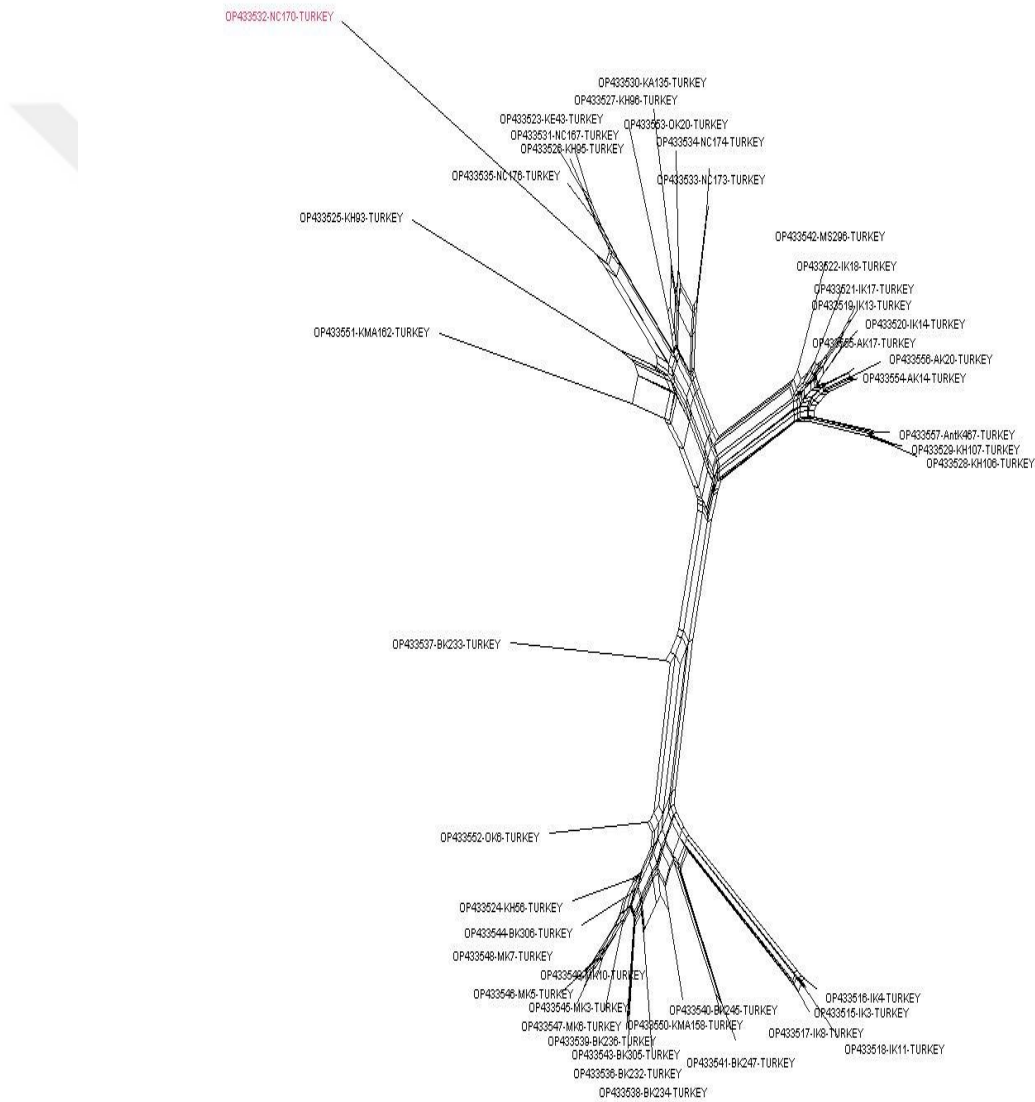
Nükleotid dizileri ile oluşturulan dendrogramda Türkiye izolatları ile diğ r ülkelerin izolatlarının birlikte dağılım gösterdiği görülmektedir. Filogenetik analiz sonucunda izolatların iki ana gruba ve beş alt gruba ayrıldığı ayrıca dış grup olarak kullanılan izolatın tüm dizilerden ayrıldığı görülmüştür. Bu ağacın dal bağlantı değerlerine ve gruplaşmalara bakıldığında, Türkiye  rneklerinin Bulgaristan, Slovakya ve Polonya  rnekleri ile birlikte olduğu ancak diğ r ülkelerden de çok uzak olmadığı aynı gruplarda toplandığı görülmektedir (şekil 4.29).





Şekil 4.28. Kirazlardan izole edilen PDV-MP gen bölgesine ait aminoasit dizilerinin NCBI gen bankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir. (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV)

Aminoasit dizileri ile oluşturulan dendrogramda ise Türkiye izolatları ile diğer ülkelerin izolatlarının nükleotid dizilerinin birlikte dağılım gösterdiği görülmektedir. Bu izolatların iki ana gruba ve beş alt gruba ayrıldığı, ayrıca NC170 (Niğde) izolatının diğer izolatlardan ayrılmış olduğu görülmüştür. Görülen bu ağaçta dal bağlantı değerlerine ve gruplaşmalara bakıldığında Türkiye izolatlarının Bulgaristan, Slovakya ve Polonya izolatları ile birlikte olduğu ancak diğer ülkelerin izolatlarından çok uzak olmadığı ve aynı gruplarda toplandığı görülmektedir. Yine dış grup olarak kullanılan izolatın tüm dizilerden ayrılmış olduğu görülmüştür (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. MP geni için Türkiye kiraz izolatları arasındaki uzaklık/yakınlık ilişkisini tespit etmek için SplitsTree programında NeighbourNet algoritması ile elde edilen filogenetik ağaç

Daha sonra, yine bu PDV-MP kısmi geni için Türkiye izolatları arasındaki uzaklık/yakınlık ilişkisini tespit etmek için SplitsTree programında NeighbourNet algoritması kullanılarak şekildeki network elde edilmiştir. Buna göre tüm Türkiye izolatları içinde en farklı olan en çok varyasyona sahip izolat NC-170 (Niğde) bulunmuştur (Şekil 4.31). BLASTn analizi sonucunda da NC170 (Niğde) numaralı izolatın benzerlik oranı %87,17 olarak analiz edilmiştir.

Ayrıca, tanı primeri olarak kullanılan MP kısmi gen bölgesinin genetik uzaklık değerleri MEGA11 (Tamura ve ark., 2021) programı kullanılarak ve model olarak Tamura 3 (T92+G) parametresi kullanılmıştır. MEGA 11 Max. Protein uzaklık programı kullanılarak yapılan analiz sonucu, nükleotid düzeyinde genetik uzaklık değerleri incelendiğinde %0,00274'ten %22,188'e uzanan bir ölçekte geniş bir varyasyon gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34). Ayrıca, yakın ve uzak oranda ölçekler olduğundan genetik çeşitliliğin yüksek olduğu söylenebilmektedir. Bu sonuçlar, filogenetik ağaç sonuçları ile örtüşmektedir. Analizler sonucunda, dünyanın farklı ülkelerindeki diğer izolatların Türkiye'deki izolatlarla ağacın farklı dallarında yer aldığı ve bunun sonucunda genetik çeşitliliğin uluslararası anlamda da yüksek olduğu görülmüştür.

Species 1	Species 2	Dist	Std. E
OP433554-AK14-TURKEY	OP433555-AK17-TURKEY	0,00274	0,00197
OP433519-IK13-TURKEY	OP433521-IK17-TURKEY	0,00412	0,00241
OP433545-MK3-TURKEY	OP433547-MK6-TURKEY	0,00412	0,00245
OP433515-IK3-TURKEY	OP433516-IK4-TURKEY	0,00412	0,00236
OP433515-IK3-TURKEY	OP433517-IK8-TURKEY	0,00551	0,00282
OP433536-BK232-TURKEY	OP433543-BK305-TURKEY	0,00551	0,00282
OP433545-MK3-TURKEY	OP433546-MK5-TURKEY	0,00690	0,00304
OP433533-NC173-TURKEY	OP433534-NC174-TURKEY	0,00690	0,00305
OP433555-AK17-TURKEY	OP433556-AK20-TURKEY	0,00690	0,00320
OP433528-KH106-TURKEY	OP433529-KH107-TURKEY	0,00691	0,00303
OP433554-AK14-TURKEY	OP433556-AK20-TURKEY	0,00691	0,00319
OP433545-MK3-TURKEY	OP433549-MK10-TURKEY	0,00691	0,00324
OP433540-BK245-TURKEY	OP433541-BK247-TURKEY	0,00829	0,00352
OP433520-IK14-TURKEY	OP433521-IK17-TURKEY	0,00830	0,00335
OP433546-MK5-TURKEY	OP433548-MK7-TURKEY	0,00830	0,00351
OP433547-MK6-TURKEY	OP433549-MK10-TURKEY	0,00832	0,00358
OP433546-MK5-TURKEY	OP433547-MK6-TURKEY	0,00970	0,00380
OP433557-AntK467-TURKEY	OP433529-KH107-TURKEY	0,00971	0,00369

Şekil 4.30. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-MP kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi yakın olan değerler

OP433540-BK245-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,19855	0,02283
OP433547-MK6-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,19895	0,02331
OP433543-BK305-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20157	0,02315
OP433541-BK247-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20342	0,02357
OP433548-MK7-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20353	0,02381
OP433536-BK232-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20614	0,02373
OP433515-IK3-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21187	0,02443
OP433517-IK8-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21661	0,02482
OP433516-IK4-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21922	0,02524
OP433518-IK11-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,22188	0,02554

Şekil 4.31. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-MP kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi uzak olan değerler

Şekil 4.34 incelendiğinde NC170 numaralı izolatın nükleotid dizilimine göre NC170 numaralı izolatın diğer bölgelerin izolatlarından en uzak olduğu görülmektedir.

OP433545-MK3-TURKEY	OP433549-MK10-TURKEY	0,00399	0,00400
OP433546-MK5-TURKEY	OP433549-MK10-TURKEY	0,00399	0,00409
OP433544-AK14-TURKEY	OP433555-AK17-TURKEY	0,00400	0,00410
OP433547-MK6-TURKEY	OP433549-MK10-TURKEY	0,00401	0,00398
OP433536-BK232-TURKEY	OP433543-BK305-TURKEY	0,00797	0,00553
OP433554-AK14-TURKEY	OP433520-IK14-TURKEY	0,00797	0,00531
OP433515-IK3-TURKEY	OP433516-IK4-TURKEY	0,00798	0,00550
OP433515-IK3-TURKEY	OP433552-OK6-TURKEY	0,00798	0,00546
OP433554-AK14-TURKEY	OP433556-AK20-TURKEY	0,00800	0,00565
OP433545-MK3-TURKEY	OP433546-MK5-TURKEY	0,00800	0,00565
OP433515-IK3-TURKEY	OP433517-IK8-TURKEY	0,00801	0,00588
OP433520-IK14-TURKEY	OP433521-IK17-TURKEY	0,00803	0,00577
OP433545-MK3-TURKEY	OP433547-MK6-TURKEY	0,00803	0,00576
OP433546-MK5-TURKEY	OP433547-MK6-TURKEY	0,00804	0,00586
OP433540-BK245-TURKEY	OP433541-BK247-TURKEY	0,00809	0,00586
OP433544-BK306-TURKEY	OP433552-OK6-TURKEY	0,01199	0,00711
OP433524-KH56-TURKEY	OP433552-OK6-TURKEY	0,01201	0,00710

Şekil 4.32. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-MP kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi yakın olan değerler

OP433528-KH106-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20413	0,03825
OP433544-BK306-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20447	0,03671
OP433516-IK4-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20753	0,03687
OP433545-MK3-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20798	0,03765
OP433517-IK8-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20840	0,03772
OP433551-KMA162-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20888	0,03779
OP433539-BK236-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,20986	0,03744
OP433540-BK245-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21112	0,03724
OP433541-BK247-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21253	0,03772
OP433549-MK10-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21348	0,03818
OP433524-KH56-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21523	0,03725
OP433547-MK6-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21610	0,03900
OP433518-IK11-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21719	0,03924
OP433532-NC170-TURKEY	OP433550-KMA158-TURKEY	0,21774	0,03812
OP433546-MK5-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,21934	0,03850
OP433538-BK234-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,22249	0,03954
OP433548-MK7-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,22788	0,03866
OP433543-BK305-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,23023	0,03898
OP433536-BK232-TURKEY	OP433532-NC170-TURKEY	0,23489	0,03886

Şekil 4.33. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-MP kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi uzak olan değerler

Şekil 4.36’da görülmek üzere NC170 (Niğde) numaralı izolatın amimoasit dizilimine bakıldığında diğer izolatlardan uzak olduğu görülmektedir. NC170 (Niğde) numaralı izolatın aminoasit dizilimi olarak en uzak olduğu izolat BK232 (Bursa) numaralı izolat olarak rapor edilmiştir.

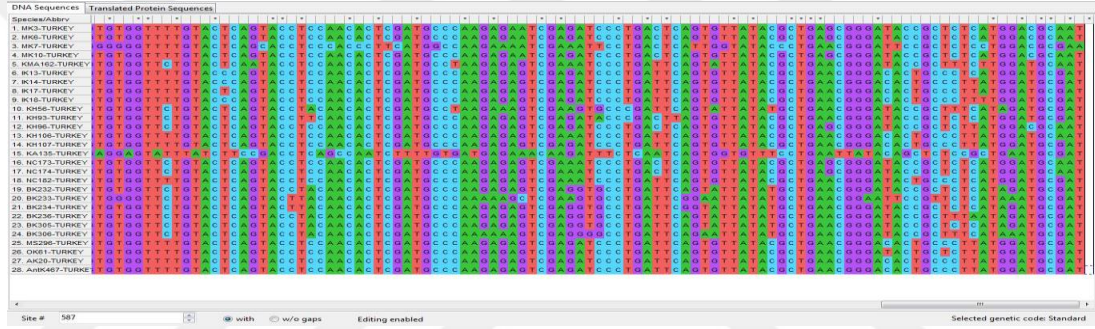
BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda MP için elde edilen sekans verileri referans veri ile nükleotid düzeyinde %88,02-99,57 ve aminoasit düzeyinde %84,91-99,57 arasında benzerlik görülmüştür. Homolojik dağılıma bakıldığında gen bankasında kayıtlı kiraz izolatlarıyla nükleotid seviyesinde homolojik dağılıma bakıldığında AntK467 (Antalya) numaralı izolatımızın da MT950769 (Bulgaristan) en yakın %99,57, NC170 (Niğde) numaralı izolatımızın da MZ221011 (Kanada), MZ221001 (Kanada), MZ220995 (Kanada), MZ220996 (Kanada) ve MT013235 (Çin) kiraz izolatları ile en uzak homolojiye sahip olduğu analiz edilmiştir. Ayrıca, BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda PDV-MP kısmi geni için elde edilen aminoasit seviyesinde ise homolojik dağılıma bakıldığında ise gen bankasında kayıtlı diğer kiraz izolatlarıyla kıyaslandığında IK14 (İzmir) numaralı izolatımızın da QDG08523 (Bulgaristan) en yakın %99,14, NC170 (Niğde) numaralı izolatımızın da ANA05724 (Slovakya), ANA05734 (Slovakya), ANA05750 (Slovakya), ANA05768 (Slovakya) kiraz izolatları ile en uzak homolojiye sahip olduğu analiz edilmiştir.

MP kısmi genleri dizilenmiş olup, dizileme sonucu coğrafi bölgelerden belirlenen kiraz çeşitlerinden elde edilen PDV dizileri ile Kamenova ve ark. (2022) tarafından ise karşılaştırılmış olup, benzerlik oranı nükleotid seviyesinde %94,1–98,4 ve amino asit seviyesinde %96,8–99,2 oranında bulunmuş olup, bu çalışma bulunan sonuçlara yakın olarak görülmüştür.

4.3.1.1. CP Gen Bölgesi için Yapılan Filogenetik Analizler

Tüm PCR analizleri sonucu elde edilen PDV-CP pozitif izolatlardan 33 izolatın sekans analizi yapılmıştır. Dizilerin MEGA11 programındaki görüntüsü aşağıdaki gibidir (Şekil 4.37 ve Şekil 4.38). Dizileme sonucunda gelen sonuçların BLASTn analizi yapılmış olup, benzerlik oranları tespit edilmiştir. Yapılan BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda elde edilen sekans verileri referans

veri ile nükleotid düzeyinde %77,13-100 arasında benzerlik görülmüştür. Homolojik dağılıma bakıldığında gen bankasında kayıtlı izolatlarla nükleotid seviyesinde, PDV izolatlarımızdan MK7 (Kahramanmaraş) nolu izolatımızın MT950771 (Bulgaristan), MZ220999 (Kanada), MZ221001 (Kanada), MZ291946 (Kanada) ve MZ221011 (Kanada) numaralı izolatlarla %77,13 oranıyla en uzak, AK17 (Adana) ON568343 (Türkiye) numaralı izolatımızın da %100 oranıyla en yakın oranda homolojiye sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca amino asit seviyesindeki benzerlik oranına bakıldığında; KA135 (Konya) numaralı izolatımızın ANA05739 (Slovakya) ile en uzak, AK14 (Adana) ve AK17 (Adana) numaralı izolatımızın da AAG35749 (Çekya) ile %100 oranıyla en yakın oranda homolojiye sahip oldukları görülmüştür.



Şekil 4.34. PDV-CP nükleotid dizileri hizalanmış ekran görüntüleri



Şekil 4.35. PDV-CP amino asit dizileri hizalanmış ekran görüntüleri

Ayrıca, BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda PDV-CP kısmı için elde edilen aminoasit seviyesinde ise homolojik dağılıma bakıldığında ise gen bankasında kayıtlı diğer kiraz izolatlarıyla kıyaslandığında AK14 (Adana) ve AK17 (Adana) numaralı izolatlarımızın AAG35749 (Çekya) en yakın %100, KA135 (Konya) numaralı izolatımızın da %54,36 ile AHC70773 (Türkiye) ile en uzak homolojiye sahip olduğu analiz edilmiştir.



Şekil 4.36. MK3 (Kahramanmaraş) nolu izolattan elde edilen 874 baz büyüklüğündeki nükleotid dizisinin Gen Banka kayıtlı NC008038 numaralı refeans sekansı ile Geneious programında karşılaştırılması ve eşleşen bölgenin gösterilmesi



Şekil 4.39. PDV-CP kısmi gen bölgesi referans gen ile (NC008038) eşleştirildiğinde referans genomda 1262 ile 1849 baz çiftleri arasında yer almaktadır (elde edilen toplam uzunluk 587 bp).

Dolayısıyla, CP kısmi gen bölgesi Koziel ve arkadaşlarının çalışmasında gösterdiği üzere ORF3B bölgesinde yer almaktadır.

Çizelge 4.5. Bu çalışmada karakterize edilen ve gen bankası veri tabanından filogenetik ağaç çiziminde kullanılan PDV-CP izolatlarının listesi

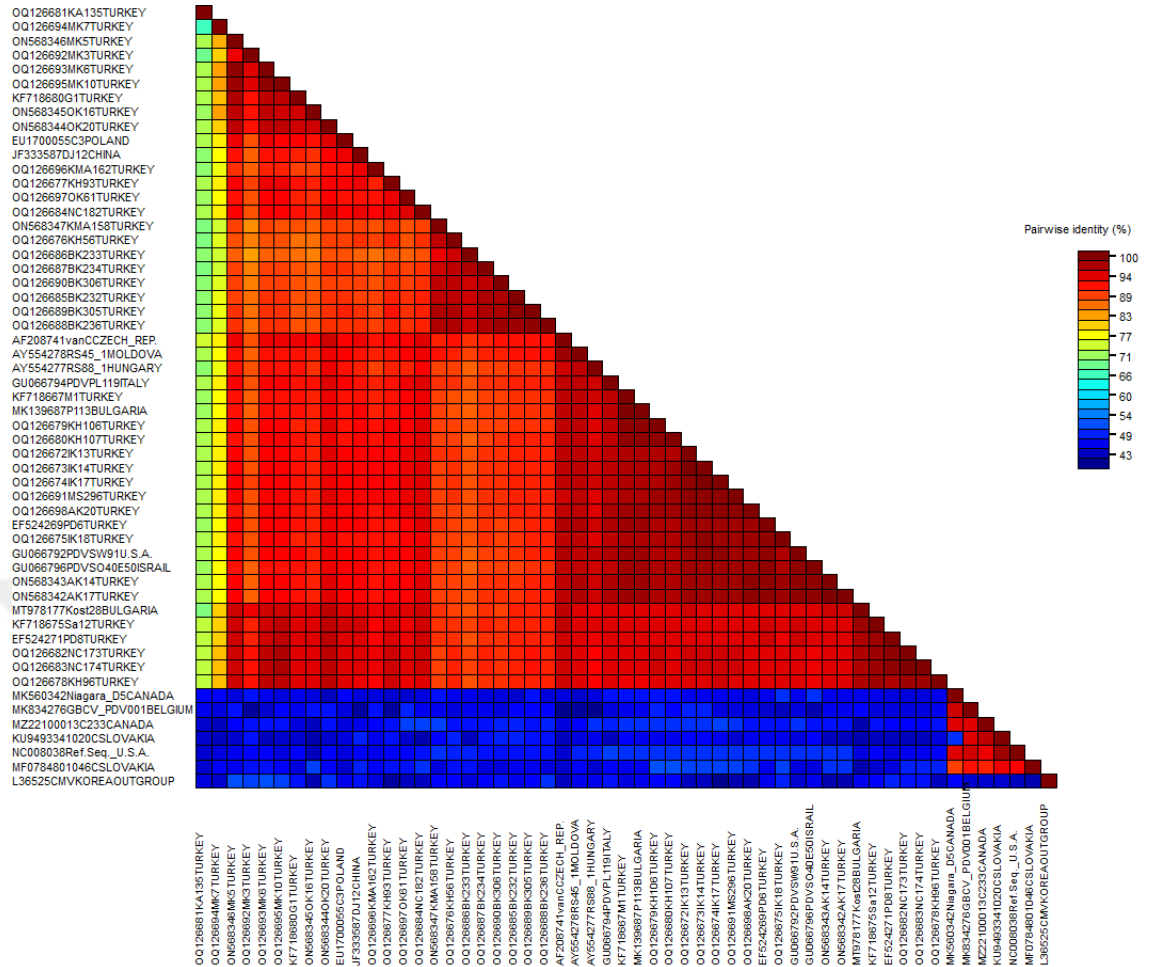
Erişim Numarası	İzolat No /Konukçu	Lokasyon	Referans
OQ126672	IK13-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126673	IK14-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126674	IK17-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126675	IK18-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126676	KH56-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126677	KH93-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126678	KH96-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126679	KH106-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126680	KH107-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126681	KA135-Kiraz	Konya-Akşehir	Bu çalışma
OQ126682	NC173-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OQ126683	NC174-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OQ126684	NC182-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OQ126685	BK232-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126686	BK233-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126687	BK234-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126688	BK236-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126689	BK305-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126690	BK306-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126691	MS296-Kiraz	Manisa-Şehzadeler	Bu çalışma
OQ126692	MK3-Kiraz	Kahramanmaraş	Bu çalışma
OQ126693	MK6-Kiraz	Kahramanmaraş	Bu çalışma
OQ126694	MK7-Kiraz	Kahramanmaraş	Bu çalışma
OQ126695	MK10-Kiraz	Kahramanmaraş	Bu çalışma
OQ126696	KMA162-Kiraz	Kahramanmaraş	Bu çalışma
OQ126697	OK61-Kiraz	Osmaniye-Bahçe	Bu çalışma
OQ126698	AK20-Kiraz	Adana-Pozantı	Bu çalışma
ON568342	AK17-Kiraz	Adana-Pozantı	Gündoğan ve ark.,2022
ON568343	AK14-Kiraz	Adana-Pozantı	Gündoğan ve ark.,2022
ON568344	OK20-Kiraz	Osmaniye-Bahçe	Gündoğan ve ark.,2022

Çizelge 4.5. (Devamı) Bu çalışmada karakterize edilen ve gen bankası veri tabanından filogenetik ağaç çiziminde kullanılan PDV-CP izolatlarının listesi

Erişim Numarası	İzolat No /Konukçu	Lokasyon	Referans
ON568345	OK16-Kiraz	Osmaniye-Bahçe	Gündoğan ve ark.,2022
ON568346	MK5-Kiraz	Kahramanmaraş	Gündoğan ve ark.,2022
ON568347	KMA158-Kiraz	Kahramanmaraş	Gündoğan ve ark.,2022
EF524269	PD6-Kiraz	Türkiye	Ulubaş-Serçe ve ak., 2009
EF524271	PD8-Kiraz	Türkiye	Ulubaş-Serçe ve ak., 2009
KF718675	Sa12-Kiraz	Türkiye	Öztürk ve Çevik,2015
KF718667	M1-Kiraz	Türkiye	Öztürk ve Çevik,2015
KF718680	G1-Kiraz	Türkiye	Öztürk ve Çevik,2015
EU170005	5C3-Kiraz	Polonya	Komorowska, 2007 (Yayınlanmamış veri)
JF333587	DJ1-2-Kiraz	Çin	Zong ve ark.,2011 (Yayınlanmamış veri)
GU066794	PDV-PL1-19-Kiraz	İtalya	Sala-Rejczak ve ark.,2011(Yayınlanmamış veri)
AY554277	RS-88/1-Kiraz	Macaristan	Krizbai ve Nemeth,2004 (Yayınlanmamış veri)
MK139687	P113-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova, 2019 (Yayınlanmamış veri)
GU066792	PDV-SW9-1-Kiraz	A.B.D.	Sala-Rejczak,2011 (Yayınlanmamış veri)
MK560342	Niagara D5-Kiraz	Kanada	Simkovich ve ark.,2019
MZ221000	13C233-Kiraz	Kanada	Rast ve ark., 2021
KU949334	1020C-Kiraz	Slovakya	Glasa ve Predajna,2017 (Yayınlanmamış veri)
MT978177	Kost28-Kiraz	Bulgaristan	Kamenova, 2021 (Yayınlanmamış veri)
MF078480	1046C-Kiraz	Slovakya	Glasa ve ark.,2018

Çizelge 4.5. (Devamı) Bu çalışmada karakterize edilen ve gen bankası veri tabanından filogenetik ağaç çiziminde kullanılan PDV-CP izolatlarının listesi

Erişim Numarası	İzolat No /Konukçu	Lokasyon	Referans
MK834276	GBCV-PDV001- Kiraz	Belçika	Tahzima ve ark., 2019
AF208741	vanC-Kiraz	Çek Cumhuriyeti	Vaskova,2000
AY554278	RS-45/1	Moldova	Krizbai ve Nemeth,2004 (Yayınlanmamış veri)
GU066796	PDVSO40E50- Kiraz	İsrail	Sala-Rejczak ve ark.,2011 (Yayınlanmamış veri)
NC008038	Ref.Sekans-RNA3	A.B.D.	Bachman ve ark., 1994
L36525	Dış grup(CMV)	Güney Kore	Hwang ve ark.,1994



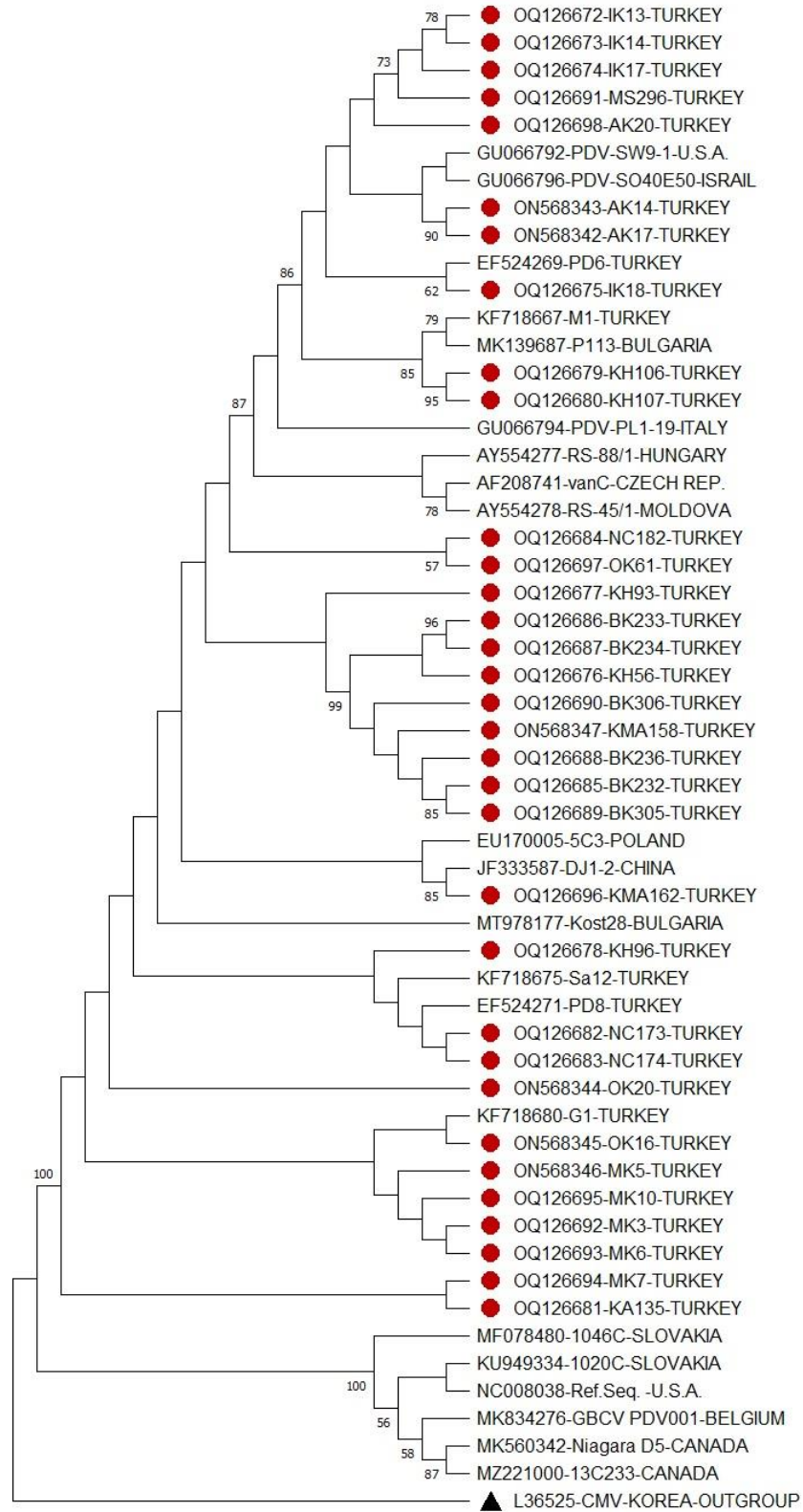
Şekil 4.37. PDV-CP'nin nükleotid seviyesinde SDT analizi yapılan renklendirilmiş benzerlik matrisi

Çalışma kapsamında elde edilen 33 PDV-CP izolatına ait sekans bilgisine ilave olarak, filogenetik analiz için gen bankasında kayıtlı Türkiye kiraz izolatlarından ve dünyanın farklı ülkelerinin izolatlarından olmak üzere toplam 20 PDV-CP izolatı seçilmiştir. İzolatların nükleotid ve aminoasit düzeyinde filogenetik analizleri yapılmıştır. Maximum Likelihood istatistiksel algoritması kullanılarak Kimura-2 (Kimura,1980) parametresinin GTR ve G+I modeli ile birlikte dal değerlerinin hesaplanması için 1000 bootstrap analizi uygulanmıştır.

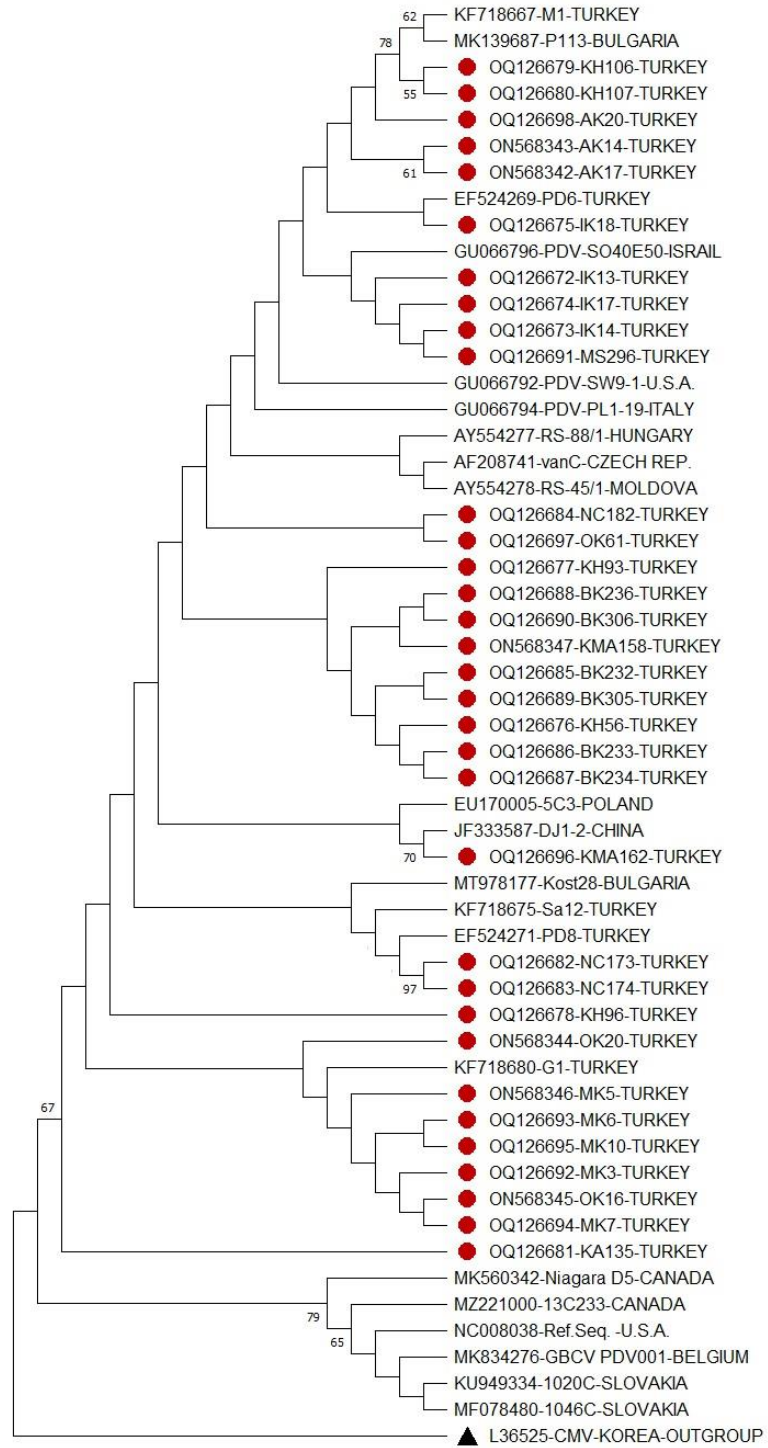
PDV-CP kısmi gen bölgesine ait izolatların 6 tanesinin elde edilen nükleotid dizileri gen bankasına daha önce kayıt edilmiş ve erişim numaraları (accession no.) **ON568342-ON568347** olarak alınmış olup, tezden üretilen makale de kullanılmıştır. PDV-CP pozitif izolatlardan geri kalan 27 izolata ait nükleotid dizileri gen bankasına kaydedilerek erişim numaraları **OQ126672-OQ126698** olarak alınmıştır.

PDV-CP kısmi gen bölgesi için nükleotid dizileri ve amino asit dizileri ile elde edilen dendrogramlar aşağıdaki gibidir. Filogenetik ağaçlarda bu çalışmadan elde edilen Türkiye izolatlarının diğer ülkelerin izolatlarından ayrı olarak gruplandığı görülmektedir. Dış grup olarak Kore CMV izolatı kullanılmıştır. Daha önce Türkiye'den kaydedilmiş PDV-CP izolatları, diğer ülkelerin izolatları ile aynı grupta yer almıştır.





Şekil 4.38. Kirazlardan izole edilen PDV-CP gen bölgesine ait nükleotid dizilerinin NCBI genbankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV)



Şekil 4.39. Kirazlardan izole edilen PDV-CP gen bölgesine ait aminoasit dizilerinin NCBI genbankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV)

Filogenetik analizlerin sonucuna bakıldığında, PDV izolatlarının dünya izolatları ile kıyaslandığında iki ana gruba ayrıldığı ve ana gruplar içerisinde alt grupların varlığı

görülmüştür. Toplamda 54 izolattan oluşan dendrogramda Türkiye’den 39 izolat, Bulgaristan’dan 2, Macaristan’dan 1, Slovakya’dan 2, Polonya’dan 2, Çek Cumhuriyeti’nden 1, Kanada’dan 2, A.B.D’nden 2, Çin’den, İtalya’dan 1 ve Belçika’dan 1 ayrıca bir dış grup (CMV-Korea) izolat yer almıştır. Türkiye’nin ve dünyanın farklı ülkelerinden elde edilen PDV izolatlarının, filogenetik ağaçta oluşan dallanmalarına bakıldığında lokasyon düzeyinde bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.42 ve Şekil 4.43).

Bulgaristan’da yapılan bir çalışmada PDV izolatlarının CP genlerinin ve gen bankası veri tabanından elde edilen 38 kiraz izolatının CP genlerinin nükleotid ve amino asit dizileri ile oluşturulan filogenetik analizler, sırasıyla üç ve iki filogenetik grubun varlığını göstermiştir. Bu çalışma ile Kamenova ve ark. (2019)’nın sonuçları birbirine kıyasla filogenetik gruplaması ile enfekte ağaçların ve/veya örnekleme bölgesinin semptomları arasında herhangi bir ilişki gözlenmemesi birbirine yakın sonuçlar verdiğini göstermiştir.

KH56-TURKEY	KA135-TURKEY	0,51078	0,05639
KA135-TURKEY	BK234-TURKEY	0,51078	0,05620
ON568347-KMA158-TURK	KA135-TURKEY	0,53315	0,05827
KA135-TURKEY	BK233-TURKEY	0,54158	0,06106
MK3-TURKEY	KA135-TURKEY	0,55294	0,05828
MK7-TURKEY	KA135-TURKEY	0,63746	0,06776

Şekil 4.40. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-CP kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi uzak olan değerler

Species 1	Species 2	Dist	Std. E
ON568343-AK14-TURKEY	ON568342-AK17-TURKEY	0,00000	0,00000
NC173-TURKEY	NC174-TURKEY	0,00000	0,00000
IK13-TURKEY	IK14-TURKEY	0,00171	0,00176
IK14-TURKEY	IK17-TURKEY	0,00343	0,00247

Şekil 4.41. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-CP kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi uzak olan değerler

Ayrıca, PDV-CP kısmi gen bölgesinin de genetik uzaklık değerleri MEGA11 (Tamura ve ark., 2021) programı Max. Protein uzaklık yöntemi ve model olarak Kimura 2 (K2+G) parametresi kullanılmıştır. Yapılan bu analiz sonucu, nükleotid düzeyinde

genetik uzaklık değerleri incelendiğinde %0,00000'dan %0,63746'ya uzanan bir ölçekte geniş bir varyasyon gösterdiği görülmüştür ve uzaklık değerleri olarak MK7 (Kahramanmaraş) ve KA135 (Konya) arasında en uzak mesafenin olduğu da görülmüştür (Şekil 4.44 ve Şekil 4.45)

Species 1	Species 2	Dist	Std. E
ON568343-AK14-TURKEY	ON568342-AK17-TURKEY	0,00000	0,00000
IK13-TURKEY	IK14-TURKEY	0,00000	0,00000
KH106-TURKEY	KH107-TURKEY	0,00000	0,00000
NC173-TURKEY	NC174-TURKEY	0,00000	0,00000
BK236-TURKEY	BK305-TURKEY	0,00000	0,00000
IK13-TURKEY	MS296-TURKEY	0,00000	0,00000
IK14-TURKEY	MS296-TURKEY	0,00000	0,00000

Şekil 4.42. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-CP kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi yakın olan değerler

KA135-TURKEY	OK61-TURKEY	1,00335	0,17275
ON568346-MK5-TURKEY	KA135-TURKEY	1,01234	0,17028
MK6-TURKEY	KA135-TURKEY	1,01576	0,17275
KA135-TURKEY	BK234-TURKEY	1,02042	0,16567
KA135-TURKEY	BK233-TURKEY	1,03580	0,16724
KA135-TURKEY	BK306-TURKEY	1,03648	0,16931
KMA162-TURKEY	KA135-TURKEY	1,04385	0,17414
ON568345-OK16-TURKEY	KA135-TURKEY	1,04462	0,17590
ON568347-KMA158-TURK	KA135-TURKEY	1,06453	0,17437
MK3-TURKEY	KA135-TURKEY	1,30995	0,22223
MK7-TURKEY	KA135-TURKEY	1,62615	0,25633

Şekil 4.43. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-CP kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi uzak olan değerler

PDV-CP kısmi gen bölgesinin, izolatların kendi aralarında amino asit düzeyinde de genetik uzaklık değerleri model olarak Jones-Taylor-Thornton (JTT+G) parametresi kullanılmıştır. Yapılan bu analiz sonucu, aminoasit düzeyinde de genetik uzaklık değerleri incelendiğinde %0,00000'dan %1,62615'e uzandığı ve geniş bir ölçekte varyasyon gösterdiği görülmüştür ve en uzak değerlerin MK7 (Kahramanmaraş) numaralı izolat ile KA135 (Konya) numaralı izolatlar arasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.46 ve Şekil 4.47).

Protein uzaklık analizi sonuçlarına göre, yakın ve uzak orandaki ölçeklerin nükleotid ve aminoasit dizileri açısından birbirini desteklediği ve genetik çeşitliliğin yüksek olduğu söylenebilmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğinde, dünyanın farklı ülkelerindeki nükleotid ve aminoasit dizileri ile Türkiye'deki nükleotid ve aminoasit dizilerinin filogenetik ağacın farklı dallarında yer aldığı ve bunun sonucunda genetik çeşitliliğin uluslararası anlamda da yüksek olduğu PDV-CP kısmi gen bölgesinde de görülmüştür.

4.3.2. RdRp Gen Bölgesi için Yapılan Filogenetik Analizler

Tüm PCR analizleri sonucu, PDV-RdRp'nin kısmi gen bölgesini çoğaltan primerlerle elde edilip testlenen kiraz izolatlarından 39 izolat pozitif bulunmuş olup bu izolatlardan seçilen 29 izolat sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi sonucunda gelen sonuçların BLASTn ve BLASTp analizi yapılmış olup, benzerlik oranları tespit edilmiştir. Yapılan BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda elde edilen sekans verileri referans veriler ile nükleotid düzeyinde %74,62-99,26 arasında benzerlik göstermiştir. Homolojik dağılıma bakıldığında gen bankasında kayıtlı izolatlarla nükleotid seviyesinde, PDV izolatlarımızdan MS296 (Manisa) nolu izolatımızın MZ220884 (Kanada) numaralı izolatla %99,26 oranıyla en yakın, OK16 nolu izolatımızın da FN556185 numaralı izolatla %74,62 oranıyla en uzak oranda homolojiye sahip oldukları görülmüştür.

Çalışma kapsamında elde edilen ve dizilenen 29 PDV-RdRp izolatının kısmi gen bölgesine ait sekans bilgileri, Türkiye'de PDV'nin kirazlarda ve tüm sert çekirdekli meyvelerde ilk nükleotid ve aminoasit dizisi kayıtlarıdır. Ülkemizde kıyaslanacak veri olmadığından dolayı, ancak farklı ülkelerden elde edilen toplam 11 ve biri de dış grup CMV olmak üzere PDV izolatıyla hem nükleotid hem de aminoasit düzeyinde filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Yapılan BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda ise elde edilen sekans verileri referans veriler ile aminoasit düzeyinde %63,33-100 arasında benzerlik göstermiştir. Ayrıca amino asit seviyesindeki benzerlik oranına bakıldığında; IK3 (İzmir), IK4 (İzmir), IK6 (İzmir), IK8 (İzmir), IK14 (İzmir), KH51 (Konya), KH56 (Konya), KH95 (Konya), KH107 (Konya), NC173 (Niğde), NC182 (Niğde), MK6

(Kahramanmaraş), MK10 (Kahramanmaraş), KMA158 (Kahramanmaraş) numaralı izolatlarımızın UCJ00319 (Kanada), UCJ00322 (Kanada), UCJ00333 (Kanada), QDK55536 (Belçika), AWT04805 (Slovakya) ayrıca MK10 (Kahramanmaraş) izolatımızın diğerlerine ek olarak QDZ71262 (Çek Cumhuriyeti) ile %100 oranıyla en yakın, OK16 (Osmaniye) numaralı izolatımızın da UCJ00320 (Kanada), UCJ00321 (Kanada), UCJ00335 (Kanada) ile %63,33 oranıyla en uzak oranda homolojiye sahip oldukları görülmüştür.

PDV-RdRp kısmi gen bölgesi için yapılan bu çalışmada 29 tane izolatın dizi bilgisi elde edilmiştir. PDV-RdRp kısmi gen bölgesinden elde edilen nükleotid ve aminoasit dizileri MEGA11 programında hizalanmış ve amino asit dizisine çevrilmiş görüntüleri aşağıdaki gibidir (Şekil 4.47 ve Şekil 4.48).

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrev

1. PDV-RdRp-MKS-Sweet_Cherry-TURKEY
2. PDV-RdRp-MS296-Sweet_Cherry-TURKEY
3. PDV-RdRp-BK306-Sweet_Cherry-TURKEY
4. PDV-RdRp-BK305-Sweet_Cherry-TURKEY
5. PDV-RdRp-BK236-Sweet_Cherry-TURKEY
6. PDV-RdRp-BK234-Sweet_Cherry-TURKEY
7. PDV-RdRp-BK233-Sweet_Cherry-TURKEY
8. PDV-RdRp-NC182-Sweet_Cherry-TURKEY
9. PDV-RdRp-NC173-Sweet_Cherry-TURKEY
10. PDV-RdRp-NC167-Sweet_Cherry-TURKEY
11. PDV-RdRp-KH107-Sweet_Cherry-TURKEY
12. PDV-RdRp-KH95-Sweet_Cherry-TURKEY
13. PDV-RdRp-KH93-Sweet_Cherry-TURKEY
14. PDV-RdRp-KH65-Sweet_Cherry-TURKEY
15. PDV-RdRp-KH51-Sweet_Cherry-TURKEY
16. PDV-RdRp-KE43-Sweet_Cherry-TURKEY
17. PDV-RdRp-K14-Sweet_Cherry-TURKEY
18. PDV-RdRp-K13-Sweet_Cherry-TURKEY
19. PDV-RdRp-K11-Sweet_Cherry-TURKEY
20. PDV-RdRp-K8-Sweet_Cherry-TURKEY
21. PDV-RdRp-K6-Sweet_Cherry-TURKEY
22. PDV-RdRp-K4-Sweet_Cherry-TURKEY
23. PDV-RdRp-K3-Sweet_Cherry-TURKEY
24. PDV-RdRp-AK17-Sweet_Cherry-TURKEY
25. PDV-RdRp-AK14-Sweet_Cherry-TURKEY
26. PDV-RdRp-OK16-Sweet_Cherry-TURKEY
27. PDV-RdRp-KMA158-Sweet_Cherry-TURKEY
28. PDV-RdRp-KMA155-Sweet_Cherry-TURKEY
29. PDV-RdRp-MK10-Sweet_Cherry-TURKEY
30. PDV-RdRp-BB233-Sweet_Cherry-TURKEY

Site # 271

with w/o gaps Editing enabled

Selected genetic code: Standard

Şekil 4.44. PDV-RdRp nükleotid dizileri hizalanmış ekran görüntüleri

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrev

1. PDV-RdRp-MKS-Sweet_Cherry-TURKEY
2. PDV-RdRp-MS296-Sweet_Cherry-TURKEY
3. PDV-RdRp-BK306-Sweet_Cherry-TURKEY
4. PDV-RdRp-BK305-Sweet_Cherry-TURKEY
5. PDV-RdRp-BK236-Sweet_Cherry-TURKEY
6. PDV-RdRp-BK234-Sweet_Cherry-TURKEY
7. PDV-RdRp-BK233-Sweet_Cherry-TURKEY
8. PDV-RdRp-NC182-Sweet_Cherry-TURKEY
9. PDV-RdRp-NC173-Sweet_Cherry-TURKEY
10. PDV-RdRp-NC167-Sweet_Cherry-TURKEY
11. PDV-RdRp-KH107-Sweet_Cherry-TURKEY
12. PDV-RdRp-KH95-Sweet_Cherry-TURKEY
13. PDV-RdRp-KH93-Sweet_Cherry-TURKEY
14. PDV-RdRp-KH65-Sweet_Cherry-TURKEY
15. PDV-RdRp-KH51-Sweet_Cherry-TURKEY
16. PDV-RdRp-KE43-Sweet_Cherry-TURKEY
17. PDV-RdRp-K14-Sweet_Cherry-TURKEY
18. PDV-RdRp-K13-Sweet_Cherry-TURKEY
19. PDV-RdRp-K11-Sweet_Cherry-TURKEY
20. PDV-RdRp-K8-Sweet_Cherry-TURKEY
21. PDV-RdRp-K6-Sweet_Cherry-TURKEY
22. PDV-RdRp-K4-Sweet_Cherry-TURKEY
23. PDV-RdRp-K3-Sweet_Cherry-TURKEY
24. PDV-RdRp-AK17-Sweet_Cherry-TURKEY
25. PDV-RdRp-AK14-Sweet_Cherry-TURKEY
26. PDV-RdRp-OK16-Sweet_Cherry-TURKEY
27. PDV-RdRp-KMA158-Sweet_Cherry-TURKEY
28. PDV-RdRp-KMA155-Sweet_Cherry-TURKEY
29. PDV-RdRp-MK10-Sweet_Cherry-TURKEY
30. PDV-RdRp-BB233-Sweet_Cherry-TURKEY

Site # 90

with w/o gaps Edit disabled for translated protein data.

Selected genetic code: Standard

Şekil 4.45. PDV-RdRp amino asit dizileri hizalanmış ekran görüntüleri



Şekil 4.49. NC173 (Niğde) no'lu izolattan elde edilen 382 baz büyüklüğündeki nükleotid dizisinin Gen Banka kayıtlı referans sekansı ile Geneious programında karşılaştırılması ve eşleşen bölgenin gösterilmesi

PDV-RdRp kısmi gen bölgesi referans gen bölgesi ile eşleştirildiğinde referans genomda bir ORF bölgesine değil ORF3A-3B'den önce yer almaktadır (elde edilen toplam uzunluk 271 bp).

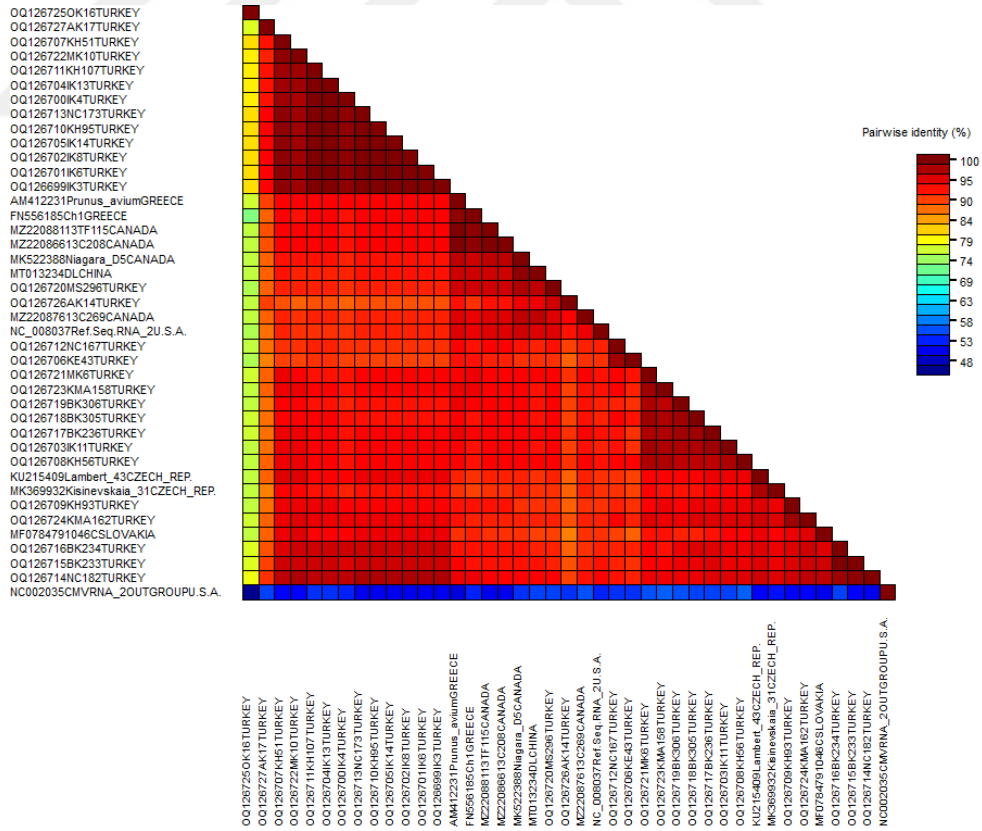
Koziel (2017)'nin de çalışmasında belirttiği üzere, RNA2 (RNAYA bağlı polimeraz) bölgesinde yer almaktadır.

Çizelge 4.6. Bu çalışmada karakterize edilen ve gen bankası veri tabanından kullanılan PDV- RdRp izolatlarının listesi

Erişim Numarası	İzolat no Konukçu	Lokasyon	Referans
OQ126699	IK3-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126700	IK4-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126701	IK6-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126702	IK8-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126703	IK11-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126704	IK13-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126705	IK14-Kiraz	İzmir-Kemalpaşa	Bu çalışma
OQ126706	KE43-Kiraz	Konya-Ereğli	Bu çalışma
OQ126707	KH51-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126708	KH56-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126709	KH93-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126710	KH95-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126711	KH107-Kiraz	Konya-Hadim	Bu çalışma
OQ126712	NC167-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OQ126713	NC173-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OQ126714	NC182-Kiraz	Niğde-Çamardı	Bu çalışma
OQ126715	BK233-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126716	BK234-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126717	BK236-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126718	BK305-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126719	BK306-Kiraz	Bursa-Osmangazi	Bu çalışma
OQ126720	MS296-Kiraz	Manisa-Şehzadeler	Bu çalışma
OQ126721	MK6-Kiraz	K.maraş-Andırın	Bu çalışma
OQ126722	MK10-Kiraz	K.maraş-Andırın	Bu çalışma
OQ126723	KMA158-Kiraz	K.maraş-Andırın	Bu çalışma
OQ126724	KMA162-Kiraz	K.maraş-Andırın	Bu çalışma
OQ126725	OK16-Kiraz	Osmaniye-Bahçe	Bu çalışma
OQ126726	AK14-Kiraz	Adana-Pozantı	Bu çalışma
OQ126727	AK17-Kiraz	Adana-Pozantı	Bu çalışma
MK522388	Niagara D5-Kiraz	Kanada	Simkovich ve
MT013234	DL-K-Kiraz	Çin	Li ve Song, 2021
MZ220876	13C269-Kiraz	Kanada	Rast ve Boyes,2021

Çizelge 4.6. (Devamı) Bu çalışmada karakterize edilen ve gen bankası veri tabanından kullanılan PDV- RdRp izolatlarının listesi

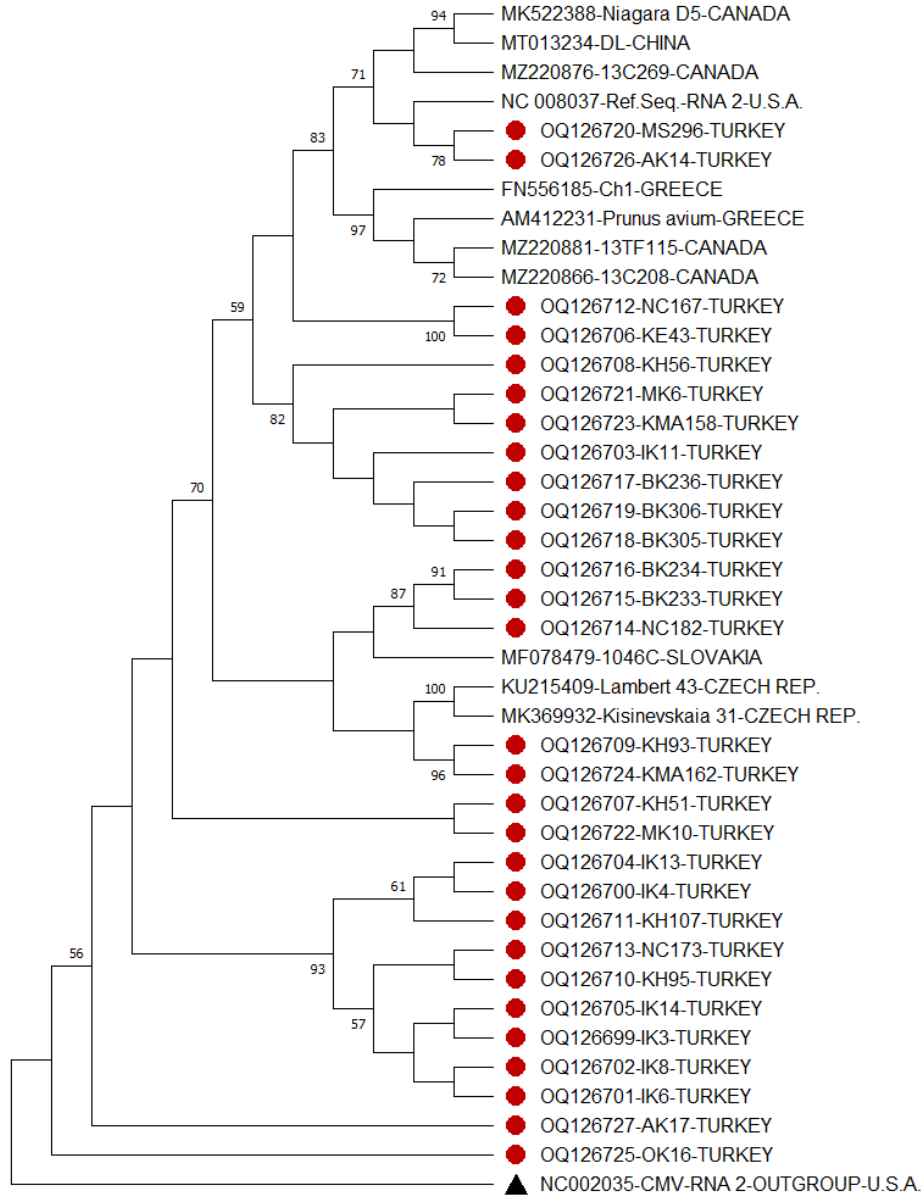
Erişim Numarası	İzolat no Konukçu	Lokasyon	Referans
FN556185	Ch1-Kiraz	Yunanistan	Maliogka ve ark. (yayınlanmamış)
AM412231	Prunus Avium-Kiraz	Yunanistan	Maliogka ve ark.,2016
MZ220881	13TF115-Kiraz	Kanada	Rast ve Boyes,2021
MZ220866	13C208-Kiraz	Kanada	Rast ve Boyes,2021
KU215409	Lambert43-Kiraz	Çek Cumhuriyeti	Lenz ve ark.,2016 (yayınlanmamış veri)
MK369932	Kisinevskaia31-Kiraz	Çek Cumhuriyeti	Lenz ve ark.,2019 (yayınlanmamış veri)
MF078479	1046C-Kiraz	Slovakya	Glasa ve ark.,2018
NC008037	Ref.Sekans RNA2	A.B.D.	Scott ve Zimmerman,2018
NC002035	CMV-RNA2 Dışgrup	A.B.D.	Rizzo ve Palukaitis,2018



Şekil 4.46. PDV- RdRp'nin nükleotid seviyesinde SDT analizi yapılan renklendirilmiş benzerlik matrisi

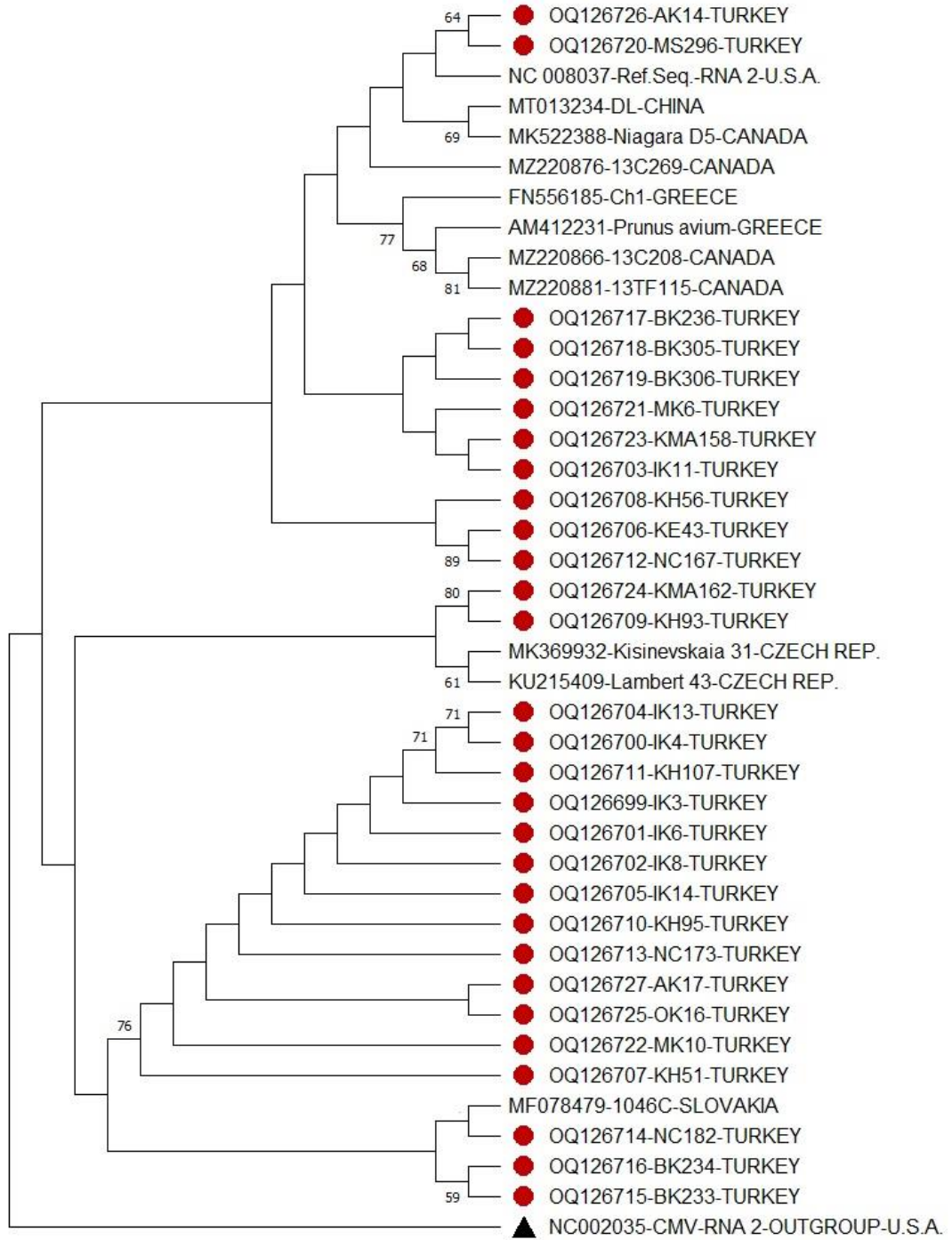
Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere biri dış grup olmak üzere toplam 12 izolat, gen bankasına kayıtlı nükleotid ve protein dizileri kullanılarak toplam 42 dizilik bir veri seti elde edilmiştir ve tüm analizler bu veri seti ile yapılmıştır.

PDV-RdRp kısmi gen bölgesi için elde edilen filogenetik ağaçlarda da PDV-MP ve PDV-CP filogenetik ağaçlarında olduğu gibi Türkiye örnekleri diğer ülkeler ile beraber gruplanmış olarak görülmektedir (Şekil 4.51 ve Şekil 4.52).



Şekil 4.47. Kirazlardan izole edilen PDV-RdRp gen bölgesine ait nükleotid dizilerinin NCBI genbankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV)

Filogenetik ağacın, RdRp geni üzerinden filogenetik kıyaslaması yapıldığında, diğer bölgelerle iç içe geçmiş yapının yüksek benzerlikten kaynaklandığı görülmektedir.



Şekil 4.48. Kirazlardan izole edilen PDV-RdRp gen bölgesine ait aminoasit dizilerinin NCBI genbankasına kayıtlı izolatlarla birlikte Neighbor-Joining tree modeli kullanılarak yapılan filogenetik analizi, 1000 tekrar sonunda elde edilen Bootstrap değerleri (%) dalların bağlantı noktalarında gösterilmiştir (Dış grup cucumber mosaic virus-CMV)

Yapılan analizler sonucu, 9 ili ve ilçelerini kapsayacak şekilde PDV- RdRp'nin PCR pozitif örneklerinden 29 izolatın kısmi gen dizileri 271 bp nükleotid ve 90 aa (aminoasit) uzunluğunda NCBI gen bankası veri tabanına kaydedilerek erişim numaraları **OQ126699-OQ126727** olarak alınmıştır. Yapılan BLASTn ve BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizleri sonucunda elde edilen sekans verileri referans izolat verileri ile nükleotid düzeyinde %74,62-99,26 ve aminoasit düzeyinde ise %63,33-100 arasında benzerlik göstermiştir. PDV-RdRp izolatlarının filogenetik analizleri sonucuna göre dünyanın farklı bölgelerindeki izolatlar ile kıyas edildiğinde 2 ana gruba ayrıldığı, ana grupların içinde de alt grupların da olduğu görülmüştür. Toplamda 41 izolattan meydana gelen ana grup içerisinde 1 dış grup (CMV-U.S.A.) olmak üzere Türkiye'den elde ettiğimiz izolatlar 29, Yunanistan'dan 2, Slovakya'dan 1, Çek Cumhuriyeti'nden 2, Kanada'dan 4, A.B.D'nden 1, Çin'den 1 izolat yer almıştır. Farklı coğrafik orijinlerden elde edilen PDV izolatlarının, filogenetik ağaçta oluşan dallanmalarına bakıldığı zaman lokasyon düzeyinde bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.51 ve Şekil 4.52).

29 izolatın PDV-RdRp kısmi gen bölgesinin de genetik uzaklık değerleri MEGA11 (Tamura ve ark., 2021) programı Max. Protein uzaklık yöntemi ve model olarak Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G) parametresi kullanılmıştır. Yapılan bu analiz sonucu, nükleotid düzeyinde genetik uzaklık değerleri incelendiğinde %0,00000'dan %0,39612'ya uzanan bir ölçekte geniş bir varyasyon gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.54 ve Şekil 4.55).

PDV-RdRp-NC182-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,31781	0,05641
PDV-RdRp-BK233-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,33336	0,05904
PDV-RdRp-AK17-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,33899	0,05787
PDV-RdRp-BK234-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,34077	0,05988
PDV-RdRp-BK236-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,34640	0,06057
PDV-RdRp-BK305-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,35391	0,06177
PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-KMA162-Sweet Cherry-TURKEY	0,35471	0,06298
PDV-RdRp-MK6-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,35746	0,06327
PDV-RdRp-BK306-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,36432	0,06358
PDV-RdRp-KH56-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,36648	0,06429
PDV-RdRp-İK11-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,36667	0,06491
PDV-RdRp-NC167-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,37436	0,06507
PDV-RdRp-KH93-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,37451	0,06662
PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-KMA156-Sweet Cherry-TURKEY	0,37632	0,06700
PDV-RdRp-AK14-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,38800	0,06845
PDV-RdRp-KE43-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,39222	0,06802
PDV-RdRp-MS296-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,39612	0,06993

Şekil 4.49. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-RdRp kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi uzak olan değerler

Ayrıca, 29 izolatin PDV-RdRp kısmi gen bölgesinin de genetik uzaklık değerleri MEGA11 (Tamura ve ark., 2021) programı Max. Protein uzaklık yöntemi ve model olarak Jones-Taylor-Thornton (JTT+G) parametresi kullanılmıştır. Yapılan bu analiz sonucu, aminoasit düzeyinde genetik uzaklık değerleri incelendiğinde %0,00000'dan %0,75741'ya uzanan bir ölçekte geniş bir varyasyon gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.54 ve Şekil 4.55).

Species 1	Species 2	Dist	Std. E
PDV-RdRp-NC173-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-KH95-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-NC173-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK14-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-KH95-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK14-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-KH107-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK13-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-NC173-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK8-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-KH95-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK8-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-IK14-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK8-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-NC173-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK6-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-KH95-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK6-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-IK14-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK6-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-IK8-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK6-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-NC173-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK3-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-KH95-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK3-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-IK14-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK3-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-IK8-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK3-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-IK6-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-IK3-Sweet Cherry-TURKEY	0,00000	0,00000
PDV-RdRp-BK234-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-BK233-Sweet Cherry-TURKEY	0,00371	0,00388
PDV-RdRp-NC173-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-KH107-Sweet Cherry-TURKEY	0,00371	0,00388
PDV-RdRp-KH107-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-KH95-Sweet Cherry-TURKEY	0,00371	0,00388

Şekil 4.50. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu PDV-RdRp kısmi gen bölgesi nükleotid dizisi yakın olan değerler

PDV-RdRp-MS296-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,62596	0,15587
PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-KMA158-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-MK6-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-NC182-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-NC173-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-KH95-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-KH56-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-KH51-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-IK14-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-IK8-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-IK6-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-IK3-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,65286	0,16358
PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-MK10-Sweet Cherry-TURKEY	0,66671	0,16875
PDV-RdRp-BK236-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,66995	0,16659
PDV-RdRp-AK14-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,67403	0,17453
PDV-RdRp-NC167-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,67595	0,16813
PDV-RdRp-IK11-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,67724	0,16743
PDV-RdRp-BK233-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,68096	0,16949
PDV-RdRp-KE43-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,68395	0,16991
PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-KMA162-Sweet Cherry-TURKEY	0,68643	0,17119
PDV-RdRp-KH107-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,69326	0,17296
PDV-RdRp-IK13-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,69326	0,17296
PDV-RdRp-IK4-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,69326	0,17296
PDV-RdRp-KH93-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,71070	0,17460
PDV-RdRp-BK306-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,71290	0,17547
PDV-RdRp-BK305-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,72276	0,17932
PDV-RdRp-BK234-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,72276	0,17932
PDV-RdRp-AK17-Sweet Cherry-TURKEY	PDV-RdRp-OK16-Sweet Cherry-TURKEY	0,75741	0,19423

Şekil 4.51. MEGA 11 Protein uzaklık analizi sonucu RdRp kısmi gen bölgesi aminoasit dizisi uzak olan değerler

Filogenetik analizler sonucu, PDV'nin genetik çeşitliliğine bakıldığında izolatların dağılımında iller bazında kendi aralarında bir homojenliğin olduğu görülmüştür. Aynı gruba giren izolatlar aynı illerden olduğu gibi farklı illerden de olmaktadır. Bundan dolayı, kiraz izolatlarının tek bir coğrafik orjine bağlı olmadıklarını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da, bu bulgulara paralellik göstermekle birlikte en çok pozitif sonuç aldığımız ve çoğalttığımız PDV-MP primer çiftleri ile tanımlanan örneklerdir. Bu yüzden tanı primeri olarak PDV-MP primer çifti kullanılmıştır. Ayrıca yapılan bu çalışmada elde edilen veriler Predajna ve ark. (2017)'nin çalışması ile uyumluluk göstermiştir. PDV-CP primer çifti ile yapılan çalışmalarda ise PDV-RdRp primer çifti ile çalışılan izolatlardan daha çok pozitif sonuç alınmıştır. PDV, sert çekirdekli meyveleri (*Prunus spp.*) enfekte eden en yaygın virüslerden biri olmasına rağmen, şimdiye kadar moleküler çeşitlilik çalışmalarının çoğu Türkiye'de yapılan çalışmalarda olduğu gibi kılıf protein (CP) genine odaklanılmıştır. İzolatlar coğrafi olarak sınırlı bir bölgeden gelse de, analizler izolatlar arasında yüksek derecede nükleotid sekansı çeşitliliği göstermiştir. Orijin ve coğrafi kökene dayalı net bir filogenetik gruplama gözlemlenememiştir. PDV genomunun, aynı segmenti (RNA3) üzerinde olup, farklı konumlarda bulunan PDV-MP ve PDV-CP primer çiftleri ile teşhis edilen izolatlar ile yapılan analiz sonuçlarına göre bazıları birbirinden farklı sonuçlar vermiştir. Örneğin, IK8 numaralı izolat PDV-MP primer çifti analiz sonucu pozitif iken, PDV-CP primer çifti ile analiz sonucu negatif bulunmuştur. Bu yüzden eskisi ile uyumlu yeni bir kokteyl primer dizaynı tasarlanarak kullanılması önerilmektedir.

Ayrıca, bu çalışma kapsamında, dizilenen izolatlar ile gen bankasında kayıtlı dünya izolatlarının, nükleotid ve aminoasit düzeyinde yapılan karşılaştırmalı filogenetik analizler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaçlar arasında belirgin bir fark tespit edilmemiş olup izolatlar beklenen şekilde kümelenme göstermiştir. SDT programı kullanılarak da oluşturulan renklendirilmiş benzerlik matrisi incelendiğinde dizilenen ve seçilen izolatlar arasındaki benzerlik oranının genellikle yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kiraz, ülkemizin en önemli ihraç ürünlerinden biri olduğu gibi dünyanın diğer ülkeleri arasında da üretimde ilk sırada olduğumuz bir meyvedir. Kirazda görülen viral hastalıklar şüphesiz verimde ve kalitede kayıplara yol açmaya devam etmektedir. Bu viral hastalıkların meydana getirdiği bütün bu ekonomik kayıpların yanında, gıda güvenliği açısından da küresel ticaretin yani fidan ve meyve ithalat-ihracatı ile yer değiştirmesinden ayrıca iklim değişikliğinden dolayı üretimi tehdit etmektedir. Bu viral hastalık etmenlerinin en önemlilerinden biri olan PDV, 2016 yılında ülkemizin de üyesi olduğu Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO)'nun A2 karantina listesinde yer almaktadır.

“Türkiye’de Önemli Kiraz Üretim Alanlarında Prune Dwarf Virüs (PDV)’nin Yaygınlığı ve Genetik Çeşitliliğinin Araştırılması” isimli bu tez çalışması 2019-2022 yılları arasında toplanan örneklerden ve elde edilen analiz sonuçları verilerinden oluşan sonuçları içermiştir. Tez çalışması kapsamında belirlenen iller ve bu illere bağlı ilçeler, ülkemizin kiraz üretiminin yoğun olarak yapılması ile ön plana çıkmasının yanı sıra, sahip olduğu fidan üretimi ve ihracat potansiyeli ile ülkemizin son derece önemli olan bölgelerinde yapılmış bir çalışmadır.

Bu tez çalışmasında, kirazlarda PDV’nin varlığını ve yaygınlığını araştırmak için yoğun olarak kiraz yetiştiriciliğinin yapıldığı Konya, İzmir, Bursa, Manisa, Niğde, Kahramanmaraş, Antalya, Adana ve Osmaniye illeri ile ilçelerinden semptomlu ve semptomsuz yapraklı sürgünler alınarak sorvey yapılmıştır. Daha sonra, bu tez çalışmasının serolojik ve moleküler çalışmaları, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarında yapılmıştır. Serolojik ve moleküler çalışmalar yapılarak tespit edilen PDV’nin, ülkemiz ve dünyanın farklı ülkelerinin referans izolatları ile ayrıca kendi içlerinde de filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu tez çalışması kapsamında, Manisa ve Konya bölgelerinde kirazların yanı sıra diğer tüm *Prunus* cinsi sert çekirdekli meyve türlerinde de PDV virüsünün her üç kısmi gen bölgesinin saptanması ile filogenetik analiz ve dizileme çalışmaları ülkemizde ilk kez yapılmıştır. Ayrıca, ülkemizde PDV-MP kısmi gen bölgesi ile saptanması ile filogenetik analiz ve dizileme çalışmaları kirazlar dahil *Prunus* cinsi tüm sert çekirdeklielerde badem hariç ilk kez rapor edilmiştir. PDV-RdRp

kısmi gen bölgesinin de, tüm Türkiye’de kirazlar dahil tüm *Prunus* cinsi sert çekirdekli meyve türlerinde ilk kez çalışılmış ve rapor edilmiştir. Farklı coğrafi bölgelerden elde edilen dizilerin izolatlar arasında farklılık olduğu belirlenmiş olup, çalışmaların sonuçlarında konukçu ve coğrafi farklılıklar açısından önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir. Elde edilen veriler, PDV'nin genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu göstermiştir.

PDV ile enfekteli ağaçların semptomlarının benzerlerinin diğer bazı kiraz ağaçlarının yaprak ve meyvelerinde gözlemlendiği halde DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde pozitif sonuç saptanamamıştır. İlavirüsler, bitkide düzensiz olarak dağılabildiğinden (Dal Zotto ve ark., 1999) veya başka bir etmenin varlığı söz konusu olduğundan semptomlu olduğu halde bazı numunelerden negatif sonuç alınmış olabilir. Bu durumun aksine pozitif sonuçlar alınmış olan semptomsuz örnekler de bulunmaktadır.

Kiraz ağaçlarının serolojik ve moleküler test çalışmaları sonucu, DAS-ELISA (%5,3) ve RT-PCR (PDV-MP %11,01, PDV-CP % 9,3, PDV-RdRp % 8,26) ile orta düzeyde bir enfeksiyon oranı saptanmıştır. Polenle bulaşan bir virüs olan PDV, incelenen meyve bahçelerindeki enfeksiyon oranı olarak beklenen düzeyde sonuçlar vermiştir. Yapılan bu çalışmada üç farklı kısmi gen bölgesine bakıldığında PDV-MP gen bölgesinin filogeniyi tespit etmekte daha uygun bir gen bölgesi olduğu görülmektedir. Ayrıca, PDV-CP ile oluşturulan filogenetik ağaçları da incelenmiş ve elde edilen sonuçların Kalinowska ve ark. (2014), Koziel ve ark. (2015), Rubio ve ark. (2017) ve Çelik (2020)’in çalışmaları ile oldukça benzer sonuçlar alınmıştır. Sonuç olarak, elde edilen bulguların da çalışmamız sonuçları ile yüksek oranda benzediği görülmüştür.

RNA ekstraksiyonunda kullanılan Morante-Carriel ve ark. (2014)’nın metoduna göre, elde edilen RNA’lar RT-PCR testlemelerinde kullanılmıştır ve bu yöntem ile sistem düzgün bir şekilde çalışılmıştır. Bu metoda göre yapılan çalışma, insan ve çevre sağlığı açısından zararlı olan uygulamalar olmamakla birlikte PCR için elverişli RNA ekstraktı sağlamıştır.

PDV’nin RT-PCR testlerinde, RNA3 segmentinin MP bölgesinden 756 bp uzunluğunda kısmi gen bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan PDV/MP-F (PD3-331F) ve PDV/MP-R (PD3-1086R) tanı primerleri kullanılmıştır. PDV-MP, PDV-CP ve PDV-

RdRp primer çiftleri ile yapılan RT-PCR testleri sonrasında agaroz jellerde, su (steril d₂H₂O) kontrollerde hiçbir zaman spesifik bant seviyesinde herhangi bir bant gözlemlenmemiştir. PDV'nin tanı primeri olarak kullandığımız PDV-MP kısmi gen bölgesini çoğaltan primer çifti ile yapılan RT-PCR analizlerinde testlenen 472 örnekten 52'sinde beklenen 756 bp düzeyinde bant elde edilmiştir.

PDV'nin tespiti amacıyla, sistemin kurulması için uygulanan primer konsantrasyonları (10 pmol/μl) kullanılarak yapılan, RT-PCR analizi çalışmalarında hepsinde amplikasyon gözlemlenmiştir. RT-PCR testi sonuçları, 11,5 μl yarım doz hacimde hazırlanan mix konsantrasyon ile yeterince güzel bantlar elde edilmiştir. En iyi bantlar, 1,5 doz mix yani 36 pmol/μl konsantrasyonlarında elde edilmiştir. PCR çalışmalarında kullanılan MgCl₂ ve Taq polimeraz enziminin aktivitesini attırmaktadır. Yapılan optimizasyon çalışmalarında, uygun konsantrasyonu tespit etmek için 1, 1,5 ve 2 μl kullanılmıştır. Farklı kısmi gen bölgelerinin RT-PCR analizi için farklı miktarda MgCl₂ kullanılmıştır. Sırasıyla, PDV-CP için 2 μl (25 mM) MgCl₂, PDV-MP ve PDV-RdRp için 1,5 μl (25 mM) MgCl₂ konsantrasyonda sonuçlar oldukça güzel alınmıştır.

Yapılan moleküler çalışma metodu olan RT-PCR sonucunda elde edilen pozitif örneklerden, sekans analizine göndermek için çoğaltılan örnek sayısı PDV-MP spesifik primer çifti ile yapılan örneklerde diğer kısmi gen bölgelerine göre daha fazla sayıda olmuştur. PDV-RdRp spesifik primer çifti ile sert çekirdeklielerde Türkiyede ilk kez çalışılmasına rağmen kolaylıkla saptanmış olup, çoğaltma işlemi de yapılmıştır. Oransal olarak bakıldığında, tanılama sonucu sırasıyla PDV-MP spesifik primer çiftinde %11,01, sırasıyla PDV-CP spesifik primer çiftinde %9,32 ve sonra PDV-RdRp spesifik primer çiftinde ise %8,26 olarak saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara bakıldığında, en çok pozitif sonuç aldığımız izolatlar PDV-MP primer çiftleri ile tanılananlardır. Bu yüzden tanı primeri olarak kullanılmıştır. PDV-CP primer çifti ile yapılan çalışmalarda ise PDV-RdRp primer çifti ile çalışılan izolatlardan daha çok pozitif sonuç alınmıştır. PDV, sert çekirdekli meyveleri (*Prunus spp.*) enfekte eden en yaygın virüslerden biri olmasına rağmen, şimdiye kadar moleküler çeşitlilik çalışmalarının çoğu Türkiye'de yapılan çalışmalarda olduğu gibi kılıf protein (CP) genine odaklanılmıştır. İzolatlar coğrafi olarak sınırlı bir bölgeden gelse de, analizler izolatlar arasında yüksek derecede nükleotid sekansı çeşitliliği göstermiştir. Orjin ve coğrafi kökene dayalı net bir

filogenetik gruplama gözlemlenememiştir. PDV genomunun, aynı segmenti (RNA3) üzerinde bulunan farklı konumlardaki PDV-MP ve PDV-CP primer çiftleri ile teşhis edilen izolatlar ile yapılan analiz sonuçlarına göre bazıları birbirinden farklı sonuçlar vermiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada elde edilen veriler Predajna ve ark. (2017)'nın çalışması ile uyumluluk göstermiştir.

Kirazlarda PDV'nin yaygınlığının ve genetik çeşitliliğinin araştırılması için yapılan bu çalışmada, RT-PCR testi amacıyla seçilen primer çiftlerinin (MP, CP ve RdRp) PDV'nin kiraz ağaçlarında yapılacak rutin testlerde kullanılmaya elverişli primerler olduğu saptanmıştır. Ayrıca, kullanılan bu her üç primer çiftlerinin de yerli izolatları da teşhis ettiği, bu çalışmayla ortaya konmuştur. Ancak, farklı kısmi gen bölgelerine ait primer çiftleriyle testlenen izolatların bir kısmı pozitif sonuç verirken, diğer kısmi gen bölgesi primer çiftleri ile testlenen izolatlar ise negatif sonuç verebiliyor. Böylece, bu bulguların kiraz ağaçlarındaki karantina ve sanitasyon çalışmalarında kullanılmaya devam edilmesi önerilmesine rağmen daha kesin ve sağlıklı sonuçlar için yeni kokteyl primer dizaynı yapılmalıdır.

Filogenetik analizler sonucu, PDV'nin genetik çeşitliliğine bakıldığında izolatların dağılımında iller ve ilçeler dahilinde kendi aralarında bir homojenliğin olduğu görülmüştür. Aynı gruba giren izolatlar aynı illerden olduğu gibi farklı illerden de olmaktadır. Bu sonuçlar, ülkemizdeki kiraz izolatlarının tek bir coğrafik orjine bağlı olmadıklarını ortaya koymuştur. PDV-MP kısmi gen bölgesi tanı primeri ile Türkiye'de ilk kez kirazlarda PDV çalışıldığından ülke içinde farklı izolatlar ile kıyaslanamamıştır. Ayrıca, PDV- RdRp kısmi gen bölgesi ile de Türkiye'de yapılmış ilk çalışma olduğundan farklı ülke içinde PDV-MP kısmi gen bölgesi gibi ancak farklı ülkelerle ve kendi aralarında kıyaslanmıştır. Hem MP hem de CP nükleotid dizileriyle oluşturulmuş olan ağaçlarda izolatların ve referans PDV kiraz varyantlarının her iki kısmi genleri, iki filogrup oluşumu göstermiştir.

PDV izolatlarının filogenetik analizleri sonucu, 732 bp'lik 244 aa uzunluktaki hareket proteinine (MP), 587 bp'lik 195 aa uzunluktaki CP ve 271 bp'lik 90 aa uzunluktaki RdRp'a karşılık gelen nükleotid dizileri elde edilmiştir.

Dünyanın diğer ülkeleri ve Türkiye gen baz dizileri, “www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi” adresinde diğer nükleotid ve aminoasit dizileri ile kıyaslanmıştır. Kirazlardan elde edilen PDV izolatlarının, Türkiye'nin ve dünyanın

farklı coğrafi orijinlerinin izolatlarıyla benzerlik durumlarının araştırıldığı PDV-CP ve PDV-RdRp geninin diğer ülkelerinki ile yüksek oranda benzer olduğu görülmüştür.

Kiraz izolatları ile oluşturulan filogenetik ağaçlarında, nükleotid ve amino asit seviyesinin sırasıyla iki ve üç filogenetik gruba ayrıldığı bildirmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen PDV izolatlarının PDV-MP, PDV-CP ve PDV-RdRp kısmi gen dizilerine göre çizilen filogenetik ağaçlarda iki genomik bölgede iki filogrup oluşumu gözlemlenmiş buna göre çalışılan tüm izolatlar iki kümeye ayrılmıştır. Çalışma sonucunda, Türkiye PDV kiraz izolatlarının MP, CP ve RdRp kısmi gen bölgelerine ait nükleotid ve aminoasit dizileri elde edilmiştir. Bu tez çalışması ile Türkiye’de kirazlarda ilk kez Konya ve Manisa’da PDV-CP, tüm ülkede PDV-MP ve PDV-RdRp kısmi gen bölgelerine ait nükleotid ve aminoasit diziler elde edilerek gen bankası kaydı oluşturulmuştur. Filogenetik gruplama ile biyolojik özellikler ve coğrafi köken arasında bir ilişki gözlenmemiştir.

Filogenetik analizler sonucu, PDV’nin genetik çeşitliliğine bakıldığında izolatların dağılımında iller bazında kendi aralarında bir homojenliğin olduğu görülmüştür. Aynı gruba giren izolatlar aynı illerden olduğu gibi farklı illerden de olmaktadır. Bundan dolayı, kiraz izolatlarının tek bir coğrafik orjine bağlı olmadıklarını ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar sonucu, farklı konukçu farklı coğrafik bölgelerden gelen farklı konukçulardaki PDV’nin farklı izolatlarının RNA-3 ve RNA-2’deki nükleotid diziliminin açığa çıkarılmasıyla karşılaştırılmıştır. Bundan dolayı, nükleotid ve veya aminoasit farklılıklarının ortaya çıkmasında orjinal konukçu veya coğrafik köken arasında bir ilişkinin olmadığı ortaya konmuştur (Scott ve ark., 1998) .

Ayrıca, bu çalışma kapsamında, dizilenen izolatlar ile gen bankasında kayıtlı dünya izolatlarının, nükleotid ve aminoasit düzeyinde yapılan karşılaştırmalı filogenetik analizler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaçlar arasında belirgin bir fark tespit edilmemiş olup, izolatlar beklenen şekilde kümelenme göstermiştir. SDT programı kullanılarak da oluşturulan renklendirilmiş benzerlik matrisi incelendiğinde dizilenen ve seçilen izolatlar arasındaki benzerlik oranının genellikle yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Fidanlıklarda ve profesyonel ticari üretim yapılan bahçelerde PDV enfeksiyonunu önlemek ve kontrol altına almak için, serolojik ve/veya RT-PCR gibi moleküler yöntemler zorunlu yöntemler olarak uygulanmaları gerekmektedir. Sonuç olarak, bu tez

çalışmasında bildirilen sonuçlar göstermektedir ki uzun süredir çalışılan ve diğer virüslere göre daha iyi bilinen bir virüs olan PDV'nin, virüsün genetik çeşitliliği değişkenliğin bir parçası olduğu ve evrimsel tarihi hala bilinmediğinden ve anlaşılamadığından dolayı mevcut moleküler teşhisler ile tanılama yöntemlerinde hala bazı sınırlamalar gösterebilir.

Bu çalışma kapsamında, arazi çalışmaları esnasında kiraz üretiminin yoğun yapıldığı illerdeki Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı il ve ilçe personelleri, üretici kooperatifleri ve bireysel kiraz üreticileri ile de yapılan yüzyüze görüşmelerde pandeminin de kiraz üretimine çok fazla etkisinin olmadığı, hastalık ve zararlılarla mücadele de etkinlik olduğu söylenmiştir. Tarafımızdan da PDV yaygınlık oranı artmasın diye gerek kültürel mücadele yöntemleri konusunda gerekse arazide semptom tanılama konularında bilgiler verilmiş olup, tarımsal üretimin öneminde virüslerin önemi vurgulanmıştır. Bu tez çalışması ile Türkiye'de PDV'nin yayılmasına yol açabileceği ihtimali göz ardı edilmemesi için, elde edilen veriler ile PDV'nin yayılmasında daha etkili önlemlerin alınması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu yüzden eradikasyon çalışmalarına önem verilmesi, belirli aralıklarla üretim yapılan bahçelerin ve fidanlıkların düzenli olarak hastalığa karşı testlenmeleri önerilmektedir. Bu testlemelerin, yasal düzenlemelerle zorunlu hale getirilmesinin önemli olduğu görülmüştür. Ayrıca enfekteli örneklerin potansiyel bulaştırma alanları da hesaplanarak bu veriler ışığında daha geniş alanlarda eradikasyona gidilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması, Türkiye'de kirazlarda ilk kez Konya ve Manisa'da PDV-CP, tüm ülkede PDV-MP ve PDV-RdRp kısmi gen bölgelerine ait nükleotid ve aminoasit diziler elde edilerek gen bankası kaydı oluşturulduğundan ülkemiz ve dünyanın diğer ülke izolatları için referans gen veri bankası niteliğindedir.

Bu tez çalışması kapsamında, sonuç olarak elde edilen verilerin ışığında yapılacak bazı öneriler, ülkemizde kiraz üretiminin yerini korumasına, gelişmesine ve ihracatın daha da artmasına şüphesiz önemli katkılar sunacaktır.

KAYNAKLAR

- Amari, K., Burgos, L., Pallás, V., Sánchez-Pina, M. A., 2009. Vertical transmission of Prunus necrotic ringspot virus: Hitch-hiking from gametes to seedling. **Journal of General Virology**, 90:1767-1774. <https://doi.org/10.1099/vir.0.009647-0>
- Anonim, 2021. www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Bitki_Sagligi/Survey/survey_talimatlar_klavuz_el_kitabi.pdf
- Anonymous, 2020. Food and Agricultural Organization (FAO). Bitkisel Ürün İstatistikleri. (www.faostat.fao.org) (Erişim tarihi: 24.03.2022).
- Anonim, 2021. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Bitkisel Üretim Verileri. (www.tuik.gov.tr) (Erişim tarihi: 24.03.2022)
- Anonymous, 2022. EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/PDV000> (Erişim tarihi: 24.03.2022)
- Anonymous, 2022. EU Stone Fruit Annual Report.
- Anonymous, 2022. FAO Corporate Statistical Database.
- Anonim, 2022. TÜİK, EUROSTAT, FAO, Tarım ve Orman Bakanlığı ve bağlı müdürlük verileri.
- Anonymous, 2022. EPPO Global Database (<https://gd.eppo.int/taxon/PDV000>) (Erişim tarihi: 25.03.2022).
- Azeri, T., 1994. Detection of virus diseases of stone fruits in Aegean region of Turkey. Proceedings of 9th Congress of Mediterranean Phytopathological Union. p. 511-513. Kuşadası, Aydın.
- Bachman, E.J., Scott, S.W., Xin, G.E., Vance, V.B., 1994. The complete nucleotide sequence of prune dwarf ilarvirus RNA3: Implication for coat protein activation of genome replication in ilarviruses. **Virology**, 201(1), 127-131.
- Barba, M., Riccioni, L., 1993. Improvement of Diagnostic Methods to Detect Plum Pox Virus in Apricot Plants. **Agriculture**, 139- 141.
- Baumgartnerova, H., 1996. First findings of plum pox virus in walnut trees (*Juglans regia* L.). **Acta Virologica**, 40(1), 59-60.
- Brunt, H.A., Crabtree, K., Dallawitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., 1996. Viruses of plants. **CAB International**, Wallingford.
- Bonfield, J.K., Smith, K., Staden, R., 1995. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Research**, 23: 4992-4999.
- Bonilla, F.R., Cieniewicz, E., 2022. Distribution and Diversity of Prunus Necrotic Ringspot Virus, Prune Dwarf Virus, and Peach Latent Mosaic Viroid in Wild *Prunus* spp. In South Carolina and Georgia. **PhytoFrontiers**, 2:363-370.
- Boulila, M., 2009. Molecular characterization of an almond isolate of Prune dwarf virus in Tunisia. **Phytopathologia Mediterranea**, Vol. 48, No. 3, p. 411-421.
- Boulila, M., 2010. Putative Recombination Events and Evolutionary History of Five Economically Important Viruses of Fruit Trees Based on Coat Protein-Encoding Gene Sequence Analysis. **Biochemical Genetics**, Vol. 48, p.357-375
- Candresse, T., Lannneau, T., Revers, F., Grasseau, N., Macquaire, G., German, S., Malinowsky, T., Dunez, J., 1995, An Immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of apple chlorotic leafspot virus. **Acta Horticulturae**, 386: 136-147.
- Card, S. D., Pearson, M. N., Clover, G., 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. **Australasian Plant Pathology**, 36:455-461. <https://doi.org/10.1071/AP07050>

- Casper, R., 1977. Testung von *Prunus aviura*-Samen auf prune dwarf mit dem ELISA-Verfahren. **Phytopathology**, Z. 90:91-94.
- Choueiri, E., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., El Zammar, S., Jreijiri, F., 2003. Viruses of stone fruit trees in Lebanon. In : Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. **Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches, Bari : CIHEAM**, n. 45, p. 25-27
- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, 34:475-48.
- Clark, M.F., 1981. Immunosorbent assay plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**, 19: 83-106.
- Cooper, D., R., Sears, Lockhart G., Jones, B., 1986. Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of wheat plants derived from embryo callus culture. **Theoretical and applied genetics**, 71:784-790.
- Çağlayan Yıldızgördü, K., Hurigil, H., 1996. Virus Diseases of Peach Trees in Hatay Province. **The Journal of Turkish Phytopathology**, 25 (1-2), 65-69.
- Çağlayan, K., Ulubaş, Ç., 2003. Recent advances on Stone fruit viruses in Turkey. **Options Mediterraneennes Series B: Studies and Research**, Number 45: 33-35.
- Çağlayan, K., Ulubaş, Serce, C., Gazel, M., Jelkmann, W. , 2006. Detection of four apple viruses by ELISA and RT-PCR assays in Turkey. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. 30:241–246
- Çağlayan, K., Gazel, M., Ulubaş, Ç., 2008. Phytosanitary Status Of Cherry Trees In The East Mediterranean Region Of Turkey. V. International Cherry Symposium. Acta Horticulture, 795, 919-924.
- Çağlayan, K., Ulubaş, Ç., Gazel, M., Kaya, K., Cengiz, F.C., 2011. Sert Çekirdekli Meyve Bahçelerinde Plum Pox'un Epidemiyolojisine Yönelik Ön Bulgular. Türkiye 4. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, KSÜ, FP 106, 496s, Kahramanmaraş.
- Çelik, A., 2020. Bursa, Bilecik ve Bolu illerinde Şeftali Üretim Alanlarında Görrülen Bazı Viral Hastalıkların Serolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü, Doktora tezi, 149 s. Ankara
- Çelik, A., Ertunç, F., 2020. Bursa ve Bilecik İlleri Şeftali Yetiştiriciliği Yapılan Alanlarda Prune dwarf virus (PDV) Yaygınlığı ve Genetik Çeşitliliği. **Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Dergisi**. Volume 6, Issue 1, 66-74.
- Çevik, B., Yardımcı, N., Cülah-Kılıç, H., 2011. Detection of viruses infecting stone fruits in Western Mediterranean region of Turkey. **The Plant Pathology Journal**, 27(1), 44-52.
- Dal Zotto, A., Nome, S. F., Di Rienzo, J. A., Docampo, D. M. 1999. Fluctuations of Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. **Plant Disease**. 83:1055-1057.
- Das, C.R., Milbrath, J.A., and Swenson, K.G., 1961, Seed and pollen transmission of Prunus ringspot virus in Buttercup squash, **Phytopathology**. 51:64 (Abstr.).
- Davidson, T. R., Rundans, V., 1972. Incidence of necrotic ringspot and prune dwarf viruses in wild Prunus species. **Canadian Journal of Plant Science**, 52:907-913. <https://doi.org/10.4141/cjps72-157>.

- Digiario, M., Bici, I., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., 1994. A survey on virus and virus diseases of sweet and sour cherry in Albania. **Phytopathologia Mediterranea**, 33:162-16a.
- Dominguez, S., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J., Cano, A., Pallas, V., Garcia-Bruntun, J., 1998. Studies on the incidence of Ilarviruses and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) in apricot trees in the Murcia region (Spain) using serological and molecular hybridization methods. **Acta Horticulturae**, 472, 203–210.
- Dunez, J., 1986. Preliminary observations on virus and virus like diseases of stone fruit trees in the Mediterranean and Near East Countries. **FAO Plant Protection Bulletin**, 34:43-48.
- Dunez, J., 1988. Situation of virus and virus-like diseases of stone fruits in the Mediterranean and Near east region. In: Fruit crop sanitation in the Mediterranean and Near East region: status and requirements. **UNDP/FAO Publication**, pp. 226-275.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A., 2005. **Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press. books.google.com
- Fidan, Ü., Özdemir, S., 2000. Kiraz ağaçlarında görülen virüslerin DAS-ELISA ile belirlenmesi. Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Bornova/İzmir. Sonuç Raporu Proje Kod No: BS/97/06/09/113.
- Fonseca, F., Neto, J. D., Martins, V., Nolasco, G. 2005. Genomic variability of Prune Dwarf Virus as affected by agricultural practice. **Archives of Virology**, 150(8), 1607-1619.
- Fulton, R.W., 1983. Ilavirus group. C.M.I/A.A.B. Descr. **Plant Viruses**, 274.
- Fulton, R. W., 1985. Prune dwarf virus. In: ICTVdB- The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management, Columbia University, New York.
- Gatt, M., Mercieca, V., Farrugia, V., 1998. **Sanitary status of Stone fruits in Malta**. Pages 59-60 in; Options Mediterraneennes, Ser. B, no.19. Stone Fruit Viruses and Certification in the Mediteranean Countries: Problems and Prospects. CIHEAM, Bari, Italy.
- Gavriel, I., 1998. **Sanitary status of Stone fruit industry in the Mediterranean countries; Cyprus**. Pages 43-44 in; Options Mediterraneennes, Ser. B, no.19. Stone Fruit Viruses and Certification in the Mediterranean Countries: Problems and Prospects. CIHEAM, Bari, Italy.
- Gazel, M. H., Çağlayan, K., 1998. Hatay yöresi Prunus türlerindeki virus hastalıklarının ELISA ve biyolojik yöntemlerle tanılanması. **Türkiye 8. Fitopatoloji Kongresi**. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara, 322-325.
- Gentkow, J., Rebenstorf, K., von Bargen, S., Büttner, C., 2005. Biological and molecular characteristics of Cherry Leaf Roll Virus (CLRV) isolates from different host plants. Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe – **Introduction and Spread of Invasive Species**, 227-228.
- George, J.A., Davidson, T.R., 1964. Further evidence of pollen transmission of necrotic ring spot and sour cherry yellows viruses in sour cherry. **Can. J. Plant Sci.**, Downloaded from cdnsciencepub.com by 195.174.109.27 on 04/01/23
- Gilmer, R. M., 1965. Additional evidence of tree to tree transmission of sour cherry yellows virus by pollen. **Phytopathology**, 55:482-483. Google Scholar
- Predajňa, L., Sihelská, N., Benediková, D., Šoltys, K., Candresse, T., & Glasa, M. (2017). Molecular characterization of *Prune dwarf virus* cherry isolates from

- Slovakia shows their substantial variability and reveals recombination events in PDV RNA3. **European Journal of Plant Pathology**, 147(4), 877–885. doi:10.1007/s10658-016-1055-y
- Gökçe, A. Y., Turak, S., Albayrak, S., Akbağ, R., 1998. Doğu Anadolu bölgesinde meyve ağaçlarında sorun olan fungal etmenlerin tespiti. **Bitki Koruma Bülteni**, 2011, 51(1): 33-44.
- Greber, R. S., 1992. Thrips-facilitated transmission of prune dwarf and Prunus necrotic ringspot viruses from cherry pollen to cucumber. **Plant Disease**, 76:1039. <https://doi.org/10.1094/PD-76-1039> Crossref, Google Scholar
- Gundogan, P., Gazel, M. and Caglayan, K. 2022. Detection and the Prevalence of Prune Dwarf Virus (PDV) in Important Cherry Plantations of the Eastern Mediterranean Region by DAS-ELISA and RT-PCR Analyzes . **International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research**, 6 (2), pp. 90-102.
- Gümüş, M., Paylan, I. C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioglu, H. M., Erkan, S., 2007. Occurrence and Distribution of Stone Fruit Viruses and Viroids In Commercial Plantings Of Prunus Species In Western Anatolia, Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 89, 265-268.
- Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W., 2011. Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits. **APS Press**, 429, St. Paul, MN, USA.
- Helguera, P.R., Docampo, D.M., Nome, S.F., Ducasse, D.A., 2002. Enhanced Detection of Prune Dwarf Virus in Peach Leaves by Immunocapture- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction with Nested Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR Nested PCR). **Journal of Phytopathology**, 150, 94-96. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- Herrera, M.G., 1991. Incidencia de los virus Prunus Necrotic Ringspot Virus y Prune Dwarf Virus, en frutales de carozo en Chile. **Simiente**, 60: 124.
- Halk, E.L., Fulton R.W., 1978. Stabilization and particle morphology of prune dwarf virus. **Virology**, Volume 91, Issue 2, December 1978, Pages 434-443
- Hurigil Gazel, M., 1997. Hatay Bölgesi Prunus Türlerinde Gözlenen Virüs Hastalıklarının Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ve Biyolojik Yöntemlerle Tanılanması. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 30s, Antakya.
- Isogai, M., Aoyagi, J., Nakagawa, M., Kubodera, Y., Satoh, K., Katoh, T., Inamori, M., Yamashita, K., Yoshikawa, N., 2004. Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, 70.288-291. [org/10.1007/s10327-004-0129-4](https://doi.org/10.1007/s10327-004-0129-4)
- Jarrar, S., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., 2001. Viruses of Stone fruits in Paletsine. **Acta Horticulture**. 550: 245-248.
- Jawhar, J., Di Terlizzi, B., Khoury, W., Savino, V., 1996. Preliminary account of the phytosanitary status of stone-fruit trees in Lebanon. **EPPO Bulletin**, 26: 161-166.
- Jarošová, J., Kundu, J. K., 2010. Detection of Prune dwarf virus by one-step RT-PCR and its quantitation by real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, 164(1), 139-144.
- Jordović, M., 1955. Kržljavost šljive — virozna bolest u našoj zemlji. **Zaštita bilja** 30, 61— 62.
- Jordović, M., 1958. O nekim malo poznatim virozama voćaka u našoj zemlji. **Zaštita bilja** 47148, 109— 111.

- Kajati, I., 1976. **Metody ossledovanija ekomomičeskowo značeniya virusnykh zabolevanij plodovich kultur.** (Methods of invastigation on the economic importance of the virus diseases of fruit trees). In Proceedings of the Konferencija Stran-Tslenov SZEV po Zaščite i Karantenu Rastenij, Budapest, Hungary, 16–19 October; pp. 119–120.
- Kalinowska, E., Mroczkowska, K., Paduch-Cichal, E., Chodorska, M., 2014. Genetic variability among coat protein of Prune dwarf virus variants from different countries and different Prunus species. **European Journal of Plant Pathology**, 4, 863–868.
- Kamenova, I. L., Borisova, A. Z., Popov, A., 2019. Incidence and genetic diversity of prune dwarf virus in sweet and sour cherry in Bulgaria. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, Vol.33, NO. 1, 980-987.
- Kamenova, I.L., Borisova A., Popov A., 2020. Occurrence of Ilarviruses in sweet and sour cherry in Bulgaria. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 26(3):590–597
- Kamenova, I. L., Borisova, A. Z., 2022. Biological and molecular properties of Prune dwarf virus cherry isolates from Bulgaria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Vol. 129, p. 301–311
- Kamenova, I., Borisova, A., Krumov, S., 2022. Phylogeny of Prunus necrotic ringspot virus cherry variants based on RNA 3 coding region. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 28 (No 4) 2022, 606–615
- Karabacak, M., 2012. Trakya bölgesinde badem (*Prunus dulcis*) ağaçlarında görülen virüs hastalıklarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi, **Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 55, Tekirdağ.
- Koç, G., Fidan, H., Baloğlu, S., Endes, A., 2011. Pozantı İlçesindeki Kiraz ve Vişnelerde Bazı Sert Çekirdekli Meyve Virüslerinin Surveyi. **IV. Bitki Koruma Kongresi**, , 28 - 30 Haziran. Kahramanmaraş, ss.1
- Karabacak, M., İlbaşı, H., 2013. Description and Detection of Almond Virus Diseases in The Trakya Region of Turkey. **Türkiye Fitopatoloji Derneği Dergisi**, 1-2-3, (2011), 33-40.
- Karaca, İ., Bora, T., Özçağırın, R., 1972. Kemalpaşa Bölgesinde kiraz ağaçlarının kuruma sebepleri üzerine araştırmalar. **Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu, Tarım Ormancılık Araştırma Grubu Yayınları**, Sayı 13.
- Kozieł, E., Otulak, K., Garbaczewska, G., 2015. Phylogenetic analysis of PDV movement protein compared to Bromoviridae members as justification of possible intercellular movement. **Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica**, 57(2), 106-114.
- Kozieł, E., Bujarski, J. J., Otulak, K., 2017. Molecular biology of Prune Dwarf Virus—A lesser known member of the Bromoviridae but a vital component in the dynamic virus–host cell interaction network. **International journal of molecular sciences**, 18(12), 2733.
- Kozieł, E., Otulak-Kozieł, K., Bujarski, J. J., 2018. Ultrastructural Analysis of Prune Dwarf Virus Intercellular Transport and Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, August 29;19 (9):2570. doi: 10.3390/ijms19092570.
- Kozieł, E., Otulak-Kozieł, K., Bujarski, J. J., 2020. Modifications in Tissue and Cell Ultrastructure as Elements of Immunity-Like Reaction in *Chenopodium quinoa*

- against Prune Dwarf Virus (PDV). **Cells**, 9(1), 148; <https://doi.org/10.3390/cells9010148>, www.mdpi.com
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16:111-120.
- Kinoti, W., Constable, F., Nancarrow, N., Plummer, K., Rodoni, B., 2018. The incidence and genetic diversity of Apple mosaic virus (ApMV) and Prune dwarf virus (PDV) in *Prunus* species in Australia. **Viruses**, 10 (3), 136.
- Kurçman, S., 1977. Afyon ilinde vişne ve kiraz ağaçlarında görülen virüs hastalıklar üzerinde araştırmalar. **Bitki Koruma Bülteni**, 17(2-4), 113-149.
- Lee, S., Shin, Y.G., 2014. Development and practical use of RT-PCR for seed-transmitted Prune dwarf virus in quarantine. **The Plant Pathology Journal**, 30, 178–182.
- MacKenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S., Green, M., 1997. Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **The American Phytopathological Society, Plant Diseases**. Vol. 81, No. 2.
- Maliogka, V. I., Charou, A., Efthimiou, K., Katsiani, A. T., Chatzivassiliou, E. K., Katis, N. I., 2010. Identification of Ilarviruses in almond and cherry fruit trees using nested PCR assay. In: 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kuhn-Archive, 427: 281- 283.
- Mandic, B., Matic, S., Rwahnih, M.A.L., Jelkman, W., Myrta, A., 2007. Viruses of Sweet and Sour Cherry in Serbia. **Journal of Plant Pathology**, 89 (1), 103-108.
- Massart, S., Brostaux, Y., Barbarossa, L., César, V., Cieslinska, M., Dutrecq, O., Fonseca, F., Gulliem, R., Lavina, A., Olmos, A., Syeter, S., Wetzel, T., Kummert, J., Jijakli, M., 2008. Inter-laboratory evaluation of a duplex RT-PCR method using crude extracts for the simultaneous detection of Prune dwarf virus and *Prunus* necrotic ringspot virus. **European Journal of Plant Pathology**, 122(4), 539-547.
- Matic, S., Al Rwahnih, M., Myrta, A., Durie, G., 2008. Viruses of stone fruits in Bosnia and Herzegovina. **Acta Horticultural**, 781:71-74. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.781.8>
- Maxim, A., Papp, J., 2000. Modificari biochimice produse de virusurile ILAR (prune dwarf si *Prunus* necrotic ring spot) in fructele de cires [Biochemical changes caused by ILAR viruses (prune dwarf and *Prunus* necrotic ring spot) in sweet cherry fruits] **Simpozionul Stiintific Annal Cluj-Napoca**, 196-200.
- Mekuria, G., Ramesh, S.A., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., Sedgley, M., 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus* necrotic ringspot virus and Prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). **Journal of Virological Methods**, 114: 65-69.
- Milusheva, S., Borisova, A., 2005. The incidence of *Prunus* necrotic ringspot and *Prune dwarf* viruses in *Prunus* species in South Bulgaria. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 19:42–45. [Taylor & Francis Online], [Google Scholar]
- Mink, G. I., 1993. Pollen and seed transmitted viruses and viroids. **Annual review of phytopathology**, 31:375-402. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.002111> Crossref, Google Scholar

- Milne, J. R., Walter, G. H., 2003. The coincidence of thrips and dispersed pollen in PNRSV-infected stone fruit orchards – A precondition for thrips-mediated transmission via infected pollen. **Annals of Applied Biology**, 142:291-298. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2003.tb00253.x> Crossref, Google Scholar
- Morante-Cariel, J., Selles-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., JoséMartínez-Esteso, M., Luque, I., Bru-Martínez, R., 2014. RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. **Analytical Biochemistry**, Volume 452, Pages 46-53.
- Muhire, B. M., Varsani, A. ve Martin, D. P., 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PLoS ONE**, 9(9), e108277.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Digiaro, M. And Savino, V., 1996. Viruses of Stone Fruits in Albania. **EPPO Bulletin**, 26:141-146.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., Martelli, G.P., 2003. Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. *Virus and Virus-like Diseases of Stone Fruits, with Particular Reference to the Mediterranean Region*, 15–23.
- Myrta, A., Savino, V., 2005. Virus and virus-like diseases of cherry in the Mediterranean region. **V International Cherry Symposium**, 6 June, Book of Abstracts, Vol 2, 891-896, Bursa, Turkey.
- Myrta, A., Savino, V., 2008. Virus And Virus-Like Diseases Of Cherry In The Mediterranean Region. **Acta Horticulturae V. International Cherry Symposium**, 795, 891-896.
- Nemeth, M., 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. **Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands**, 47 p.
- Nolasco, G., Neves, M. A., Paria, E. A., 1991. Distribuição no Algarve de vírus do grupo Ilarvirus em amendoeira e suas consequências na produção-la aproximação . **Rev Cienc Agrar**, 15:33-37.
- Nyland, G., Gilmer, R.M., Moore, J.D., 1976. Prunus Ringspot Group, In: *Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America*. **U.S. Department of Agriculture Handbook**, pp 104-132 .
- Öz, F., 1998. Kiraz ve Vişne, Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı (TAV) Yayınları. Yayın No: 16, Yalova, Özbek, S., 1978, **Özel Meyvecilik, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, Yayın No: 128, Adana.
- Öztekin, V., 2006. KSÜ Sekamer Koleksiyon Parselindeki Badem Ağaçlarında Virüs Hastalıklarının Serolojik Teşhisleri ve Kontrol. **Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi, 43s, Kahramanmaraş.
- Öztürk, Y., 2012. Isparta kiraz üretim alanlarına görülen önemli virüslerin serolojik ve moleküler yöntemlerle teşhisi ve kılıf protein gen dizilimlerinin belirlenmesi. **Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi, 130s, Isparta.
- Öztürk, Y., Çevik, B., 2015. Genetic diversity in the coat protein genes of prune dwarf virus isolates from sweet cherry growing in turkey. **The Plant Pathology Journal**, 31(1), 41-49.
- Paduch-Cichal, E., 2000: Wielostronna charakterystyka izolatów wirusa nekrotycznej pierścieniowej plamistości wiśni i wirusa karłowatości śliwy. **Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa**.

- Paduch-Cichał, E., Sala-Rejczak, K., Mroczkowska, K., Boscia, D., Potere, O. 2011a. Serological characterization of Prune dwarf virus isolates. **Journal of Plant Protection Research**, 51(4), 389-392.
- Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, M., Amari, K., Sanchez-Pina, M., Myrta, A., Sanchez-Navarro, J., 2012. Ilarviruses of *Prunus* spp.: a continued concern for fruit trees. **Phytopathology**, 102(12), 1108-1120.
- Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, M. C., Sanchez-Navarro, J. A., Scott, S. W., 2013. The molecular biology of ilarviruses. Pages 139-181 in: **Advances in Virus Research. Academic Press, Burlington, MA.** Google Scholar
- Parakh, D. R., Shamloul, A. M., Hadidi, A., Waterworth, H. E., Scott, S. W., Howell, H. E., and Mink, G. I., 1995. Detection of prune dwarf ilarvirus from infected stone fruits using reverse transcription-polymerase chain reaction. **Acta Horticulturae**, 386:421-430. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.386.58> Crossref, Google Scholar
- Paylan, İ. C., 2006. İzmir İli Kiraz Üretim Alanlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. **Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi**, 73s, İzmir.
- Predajňa, L. Sihelská, N. Benediková, D. Šoltys, K. Candresse, T. Glasa, M., 2017. Molecular characterization of *Prune dwarf virus* cherry isolates from Slovakia shows their substantial variability and reveals recombination events in PDV RNA3. **European Journal of Plant Pathology**, 147, 877–885. [Google Scholar] [CrossRef]
- Rampitsch, C., Eastwell, K.C., Hall, J., 1995. Setting confidence limits for the detection of prune dwarf virus in *Prunus avium* with a monoclonal antibody-based triple antibody-sandwich ELISA. **Annals of Applied Biology**, 126, 485–491.
- Rampitsch, C., Eastwell, K. C., 1997. The complete sequence of prune dwarf ilarvirus RNA 1. **Archives of Virology**, 142:1911–1918.
- Rankovic, M., 1976. The most frequent viruses among various plum cultivars in Yugoslavia. **Mitt. Biol. Bundesanst. Land.- Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.**, 170:51–55.
- Rott, M.E, Jelkmann, W., 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, 107: 411-420.
- Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Pallás, V., Dicenta, F., Sánchez-Navarro, J. A. 2017. Molecular characterization of ilarvirus *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) and *Prune dwarf virus* (PDV) in Spanish autochthonous almond cultivars. VII **International Symposium on Almonds and Pistachios**, 5-9 November, Book of Abstracts, 353-356, Adelaide, Australia.
- Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Rowhani, A., Grant, A., Uyemoto, K., 2005. Detection of Cherry virus A, cherry necrotic rusty mottle virus and Little cherry virus 1 in California orchards. **Journal of Plant Pathology**, 87(3), 173–177. [Google Scholar] [CrossRef]
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining Method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4:406–425.
- Sajid, Q. U. A., 2018. Niğde ilinde kiraz virüs hastalıklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı, 88s, Niğde.

- Sánchez, R.P., Corts, R.M., Benavides, P.G., 2015. Main viruses in sweet cherry plantations of Central-Western Spain. **Scientia Agricola (Piracicaba, Braz)**. 72(1):83–86. [Crossref], [Web of Science], [Google Scholar]
- Saponari, M., Bottalico, G., Savino, V., 1999. In vitro propagation of *Prunus mahaleb* and its sanitation from Prune dwarf virus. **Advances in Horticultural Science**, 13:56–60
- Scott, S.W., Zimmerman, M.T., Xin, G., Mackenzie, D.J., 1998. The coat proteins and putative movement proteins of isolates of Prunus necrotic ringspot virus from different host species and geographic origins are extensively conserved. **European Journal of Plant Pathology**, 104, 155–161.
- Scott, S.W., Zimmerman, M.T., Yilmaz, S., Zehr, E. I., 2001. The interaction between prunus necrotic ringspot virus and prune dwarf virus in peach stunt disease. **Acta Horticulturae**, 550:229–236.
- Sertkaya, G., Çağlayan, K., Ulubaş, Ç., 2004. Detection of some viruses of stone fruits in mother plant blocks in Eastern Mediterranean Region of Turkey. **Acta Horti** 657: 127-132.
- Silva, C., Tereso, S., Nolasco, G., Oliveira, M. M., 2003. Cellular location of Prune dwarf virus in almond sections by in situ reverse transcription-polymerase chain reaction. **Phytopathology**. 93:278-285.
- Sipahioğlu, H.M., Demir, S., Polat, B., Akköprü, A., Usta, M., 2004. Van ve Civarında Sert Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Tespit Edilen Viral ve Fungal Hastalıklar. **Y.Y.Ü. Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi**, 14(2), 133-139.
- Sipahioğlu, H.M., Usta, M., Ocak, M., 2007. Virüsten Ari Sert Çekirdekli Meyve Fidanı Üretimi. **TUBİTAK Proje No:TOVAG 1050641**.
- Soltani, N., Hayati, J., Babaei, G., Qomi, M. E., 2013. Serological and molecular detection of Prune dwarf virus infecting stone fruits of Charmahal-va-Bakhtiari province, a central region of Iran. **International Journal of Plant Biology**, 4(1), 14-17.
- Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., Lelliott, R.A., Archer, S.A., 1988. European handbook of plant diseases. **Oxford: Blackwell Scientific Publications**. 583 p.
- Spiegel, S., Scott, S. W., Bowman-Vance, V., Tam, Y., Galiakparov, N. N., Rosner, A., 1996. Improved detection of prunus necrotic ringspot virus by polymerase chain reaction. **European Journal Planth Pathology**, 102: 681-685.
- Spiegel, S., Rosner, A., Tam, Y., Zilkah, S., Faingersh, E., Rotbaum, A. Krizbai, L. 1998. Detection Of Prune Dwarf Virus In Sweet Cherry In Israel. **Acta Horticulturae**, (Ishs) 472:249-256.
- Suchá, J., Svobodová, L., 2010. Incidence of Prune dwarf virus and Prunus necrotic ring spot virus in orchards of sweet and sour cherry in the Czech Republic. **Horticultural Science**, 37(3), 118-120.
- Sutic, D.D., Ford, R.E., Tomic, M.T., 1999. Virus Diseases of Sweet Cherry (*Prunus avium*). Handbook of plant virus diseases. CRC Press., London, NewYork, Washington D.C., Pages 374-386.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, Volume 38, Issue 7, July 2021, Pages 3022–3027, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Thomas, H. E., Hildebrand, E. M., 1936. A virus disease of prune. **Phytopathology**, 26:1145-1148.

- Torrance, L., 1981. Use of Forced Buds to Extend the Period of Serological Testing in Surveys for Fruit Tree Viruses. **Plant Pathology**, 30, 213-216.
- Torrance, L., Dolby, C.A., 1984. Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three ilarviruses in fruit trees. **Annals of Applied Biology**, 104, 267-276.
- Ulubaş, Ç., 2003. Sert çekirdekli meyve ağaçlarında enfeksiyon yapan İlarvirüslerin RT-PCR ile tanısı ve karakterizasyonu. **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Doktora tezi, 95s, Ankara.
- Ulubaş, Ç., 2005. Viral diseases diagnosed by DAS-ELISA and RT-PCR of sour and sweet cherry trees from different provinces of Turkey. V. **International Cherry Symposium** 795, 909-912.
- Ulubaş Serçe., Ç., Ertunç, F., Öztürk, A., 2009. Identification and Genomic Variability of Prune Dwarf Virus Variants Infecting Stone Fruit Trees in Turkey. **Journal of Phytopathology**, 157(5), 298-305.
- Ulubaş Serçe, Ç., Ertunç, F., Öztürk, A., 2009a. Identification and genomic variability of Prune dwarf virus variants infecting stone fruit trees in Turkey. **Journal of Phytopathology**, 157(5), 298-305.
- Uzunogulları, N., Akçay, M., 2012. Bilecik ve Bursa illerinde kiraz bahçelerinde enfeksiyona neden olan erik cücelik virüsünün (Prune Dwarf İlarvirüs, PDV) araştırılması. **Plant Protection Bulletin**, 52(4), 367 -374.
- Uyemoto, J. K., Scott, S. W., 1992. Important diseases of Prunus caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. **Plant Disease**, 76(1), 5-11.
- Uyemoto, J. K., Bulluck, L. R., Pethybridge, S., McCorkell, B., and Asai, W. K. 2003. Horizontal spread of ilarviruses in young trees of several peach cultivars. **Plant Disease**, 87:75-77. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.75> Link, Google Scholar
- Vaskova, D., Petrzik, K., Karesova, R., 2000. Variability and molecular typing of the woody-tree infecting PNRSV. **Archives Virology**, 145, 699-709.
- Waterworth, H.E., Fulton, R.W., 1964. Variation among isolates of necrotic ringspot and prune dwarf viruses isolated from sour cherry. **Phytopathology**, 54:1155-1160.
- Yegül, M., 2017. Doğu Akdeniz Bölgesinde Badem ve Ceviz Ağaçlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Saptanması, Karakterizasyonu ve Bazı Çeşit Davranışlarının Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 197 s.
- Youssef, S.A., Shalaby, A.A., Mazyad, H.M., Hadidi, A., 2002. Detection and identification of Prune Dwarf Virus and Plum Pox Virus by standard and multiplex rt-pcr probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA). **Journal of Plant Pathology**, 84(2), 113-119.
- Zeramini, H., Di Terlizzi, B., Savino, V., 1996. Phytosanitary status of almond and apricot in Tunisia. **EPPO Bulletin**. 26: 155-160.
- Zindović, J., Lanzoni, C., Autonell, C. R., Ratti, C., 2013. First Report of Prune Dwarf virus and Prunus Necrotic Ringspot Virus on peach in Montenegro. **Plant Disease**, 97(9), 1259.
- Zong, X. J., Liu, Q. Z., Wang, W. W., Wei, H. R., Wang, J. W. 2013. Detection of Prunus Necrotic Ringspot virus and Prune Dwarf Virus in sweet cherry (*Prunus avium*) and Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*) in Shandong Province, China. **VII International Cherry Symposium**, 23-27 June, Book of Abstracts, 469-474, Plasencia, Spain.

EKLER

EK1. ELISA Testi İçin Kullanılan Tampon Çözeltiler ve İçerikleri (1000 ml)

Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing buffer) PBS-Tween (pH 7.4; for 1000 ml)

Distile su içine ;

NaCl	8.00 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KCl	0.20 g
Tween 20	0.50 g

Kaplama Tampon Çözeltisi-1(Coating buffer) (pH 9.6; for 1000 ml)

Distile su içine ;

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.20 g

Kaplama Tampon Çözeltisi-1(Conjugate buffer) (pH 7.4; for 1000 ml)

Distile su içine (HCl ile ayarlanan pH);

TRIS	2.40 g
NaCl	8.00 g
PVP K25 (MW 24000)	20.00 g
Tween 20	0.50 g
BSA (bovine serum albumin)	2.00 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0.20 g
KCl	0.20 g
NaN ₃	0.20 g

Substrat Tampon Çözelti (Substrate buffer) (pH 9.8; for 1000 ml)

Distile su içine (HCl ile ayarlanan pH);

Diethanolamine	97.00 ml
NaN ₃	0.20 g

Saflaştırma Tampon Çözeltisi (Extraction buffer) «Genel» (pH 7.4; for 1000 ml)

Distile su içine (HCl ile ayarlanan pH);

TRIS	2.40 g
NaCl	8.00 g
PVP K25 (MW 24000)	20.00 g
Tween 20	0.50 g
KCl	0.20 g
NaN ₃	0.20 g

EK2. RNA Ekstraksiyonu için kullanılan tampon çözeltilerin içerikleri

RNA İzolasyon Tampon çözeltisi (Morante-Carriel ve ark., 2014)

Yıkama tampon çözeltisi (100 ml)

0,1 M Tris- HCl (pH 7.5)	1,2 g
0,35 M Sorbitol	6,3 g
% 10 PEG	10 g
% 2 Mercaptoethanol	2 µl

İzolasyon tampon çözeltisi (100 ml)

0,3 M Tris- HCl (pH 7.5)	3,6 g
25 mM EDTA	0,7 g
2 M NaCl	11,6 g
% 2 CTAB	2 g
% 2 PVP	2 g
% 0,005 Spermidine	0,10 g

Saflaştırma Tampon çözeltisi (100 ml)

10 M LiCl	42,3 g
3 M Sodium Asetat	40,8 g
% 70' lik, %96' lık Soğuk Ethanol kullanılmıştır.	

EK3. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ (Maniatis ve ark., 1982)

TAEX50 (100 ml)

0.5 M EDTA pH:8	10 ml
0.6 Glacial acetic acide	5.71 ml
Trizma base	24,2 g

Çözelti 100 ml d₂H₂O'ya tamamlanıp otoklavlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

PCR ürününün yükleme ortamı (15 ml 6X stok için)

Bromophenol blue	15 ml
Glycerol	18 g
TAEX50	6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

Etidyum Bromid Solüsyonu (1mg/ml) (200 ml) :

0.5 X TAE 200 ml

Ethidium Bromide (Sigma E-50) (Son konsantrasyon 1mg/ml) 200 µl

Karanlık ortamda ışık almayacak şekilde koyu bir kap içerisinde oda sıcaklığında saklanır ve belirli aralıklarla tazelenir.

%1 Agaroz Jel Elektroferezi

1 gr Agaroz, 100 ml 1XTAE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritilmiş ve yaklaşık 40°C sıcaklığa geldikten sonra içerisine 5 µl nükleik asit boyama solüsyonu (RedSafe™-iNtRON) eklenmiş ve tarakları yerleştirilmiş jel tepsisine dökülerek agarozun katılaşması için 30 dak bekletilmiştir. Ardından 0,5XTAE ortamı içeren elektroferez tankına yerleştirilmiştir.

Tezden üretilmiş Yayınlar

Uluslararası Tarım Araştırmalarında Yenilikçi Yaklaşımlar Dergisi
International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research 2022, Vol. 6 (2), 90-102
<https://doi.org/10.29329/ijjaar.2022.451.3>
Copyright © 2022. This is an open access article under the CC BY-NC-ND



Detection and the Prevalence of Prune Dwarf Virus (PDV) in Important Cherry Plantations of the Eastern Mediterranean Region by DAS-ELISA and RT-PCR Analyzes

Pelin Gündoğan^a, Mona Gazel^a & Kadriye Çağlayan^a

^a Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural, Hatay Mustafa Kemal University, Antakya-Hatay, Turkey

Abstract

In this study, the prevalence of PDV, which infects cherry (*Prunus avium* L.) trees and is among the important viral pathogens in Adana, Kahramanmaraş and Osmaniye provinces where cherry is extensively produced in the Eastern Mediterranean region of Turkey, was investigated. A total of 173 cherry leaf samples with and without symptoms collected from Adana, Kahramanmaraş and Osmaniye provinces were tested by DAS-ELISA and RT-PCR methods. PDV was not detected in all samples tested by the DAS-ELISA method. As a result of the tests performed with RT-PCR, 874 bp long nucleotide sequences belonging to the coat protein gene region of the 15 samples were obtained and found positive. After the sequences were obtained, they were compared with the sequences from Turkey and the sequences of PDV reference isolates registered in GenBank. As a result of BLASTn analysis, it was determined that the Turkish PDV cherry isolates showed similarity between 89.58-99.32% at the nucleotide level with the PDV reference sequence. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the obtained isolates was performed and their relationship with PDV cherry isolates in the world and Turkey was determined.

Keywords: *Prunus avium* L., cherry, DAS-ELISA, RT-PCR, PDV, Sequence analysis.

Received: 03 June 2022

* Accepted: 20 June 2022

* DOI: <https://doi.org/10.29329/ijjaar.2022.451.3>

✉

* **Corresponding author:** Pelin Gündoğan, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural, Hatay Mustafa Kemal University, Antakya-Hatay, Turkey. Email: gundoganpelin@yahoo.com