

## Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde zeytin ağaçlarındaki viral hastalık etmenlerinin tanınması ve bulunma durumlarının belirlenmesi<sup>1</sup>

Serpil ERİLMEZ<sup>2</sup> Semih ERKAN<sup>3</sup>

### SUMMARY

#### The identification of virus diseases in olive trees in Aydın, Balıkesir and İzmir provinces and the determination of their present status

The present study was carried out to determine the presence and prevalence of the viral agents in olive production areas of Aydın, Balıkesir and İzmir in 2009-2010. In 2009, totally 293 samples were collected from Aydın (157) and İzmir (136) provinces. In 2010, with collected 82 samples from Balıkesir, the total sample number in the research has reached to 375. To identify viral agents, the biological, serological and molecular methods were applied to collected olive samples. DAS-ELISA method was used to detect *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cucumis mosaic virus* (CMV), *Cherry leafroll virus* (CLRV) and *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV). Also, the existence of *Olive latent-1 virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Olive latent-3 virus* (OLV-3), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) and *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) in the samples was analysed by RT-PCR molecular method. The results of RT-PCR analyses showed that the incidence of virus infection was 55.73% in total 375 olive samples from Aydın, Balıkesir and İzmir in 2009 and 2010. According to individual provinces, it was 22.66% in Aydın, 11.46 in Balıkesir and 21.60% in İzmir. DAS-ELISA results revealed that infection rate of ArMV was 12.8% in total samples and only 1 sample was found to be infected with SLRSV while other tested viruses were not present. According to the data from RT-PCR tests, infection rates in all tested samples were 22.93%, 9.60%, 10.66% and 9.06% for ArMV, CMV, CLRV and SLRSV, respectively. Moreover, it was ascertained that 9 samples were infected by CMV + CLRV and 4 samples by ArMV + CLRV as mixed infections. Other viruses including OLV-1, OLV-2, OLV-3, OLRSV and OLYaV were not detected in all samples.

**Key words:** Olive, virus, DAS-ELISA, RT-PCR, biological indexing

<sup>1</sup> Bu çalışma E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda 27.12.2012 tarihinde kabul edilen "Aydın, Balıkesir ve İzmir İllerinde zeytin ağaçlarındaki viral hastalık etmenlerinin tanınması, bulunma durumlarının belirlenmesi ve bazı meyve kalite özellikleri üzerine olan etkilerinin araştırılması" adlı doktora tezinin bir bölümüdür.

<sup>2</sup> Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, İzmir.

<sup>3</sup> E.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, İzmir  
Sorumlu Yazar (Corresponding author) e-mail: serpilerilmez@gmail.com  
Yazının Yayın Kuruluna geliş tarihi (Received): 03.07.2013

## ÖZET

Bu çalışma 2009 ve 2010 yılları arasında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde yaygın olarak zeytin yetiştiriciliği yapılan üretim alanlarındaki virüs hastalıklarının belirlenmesi ve toplanan örneklerde virüslerin bulunma durumlarının ortaya konması amacıyla 2009 yılında Aydın (157) ve İzmir (136) illerinden 293 örnek, 2010 yılında ise Balıkesir ilinden 82 örnek olmak üzere toplam 375 örnek alınarak yürütülmüştür. Zeytin örneklerindeki viral etmenlerin tanınması biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılmıştır. *Arabid mosaic virus* (ArMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cherry leafroll virus* (CLRV) ve *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) adlı etmenlere ait tanı kitleri kullanılarak, örnekler DAS-ELISA yöntemine göre testlenmiştir. Bu virüslere ek olarak, örneklerde *Olive latent-1 virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Olive latent-3 virus* (OLV-3), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) ve *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) adlı virüslerin varlığı RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. RT-PCR sonuçları, 2009 ve 2010 yıllarında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanarak testlenen toplam 375 bitki örneğinde %55.73 oranında viral enfeksiyon bulunduğunu ve bu oranın Aydın ilinde %22.66, Balıkesir ilinde %11.46 ve İzmir ilinde ise %21.60 düzeyinde olduğunu ortaya koymuştur. DAS-ELISA sonuçlarına göre; örneklerin %12.80'inde ArMV ve sadece 1 örnekte ise SLRSV enfeksiyonunun var olduğu ve test edilen diğer virüslerin ise bulunmadığı saptanmıştır. RT-PCR testi sonucunda, örneklerin %22.93'ünde ArMV, %9.60'ında CMV, %10.66'sında CLRV ve %9.06'sında SLRSV enfeksiyonlarının var olduğu görülmüştür. Buna ek olarak, 9 örnekte CMV+ CLRV, 4 örnekte ise ArMV+CLRV karışık enfeksiyon şeklinde tespit edilirken, tüm örneklerde OLV-1, OLV-2, OLV-3, OLRSV ve OLYaV'nin bulunmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Zeytin, virüs, DAS-ELISA, RT-PCR, biyolojik indeksleme

## GİRİŞ

Dünya üzerindeki üretiminin büyük bir kısmı Akdeniz havzasındaki ülkelerde gerçekleştirilen zeytin, Türkiye ekonomisinde de önemli yeri olan bir meyve türüdür. Zeytin *Oleaceae* familyasında *Olea europaeae* L. türünün *Olea europaeae* subsp. *sativa* alt türü içinde yer almaktadır. Ülkemizde halen yetiştirilmekte olan 100'ün üzerinde zeytin çeşidi vardır. Bu anlamda, zeytinciliğimiz gerek yabancı formları, gerekse de kültür çeşitleri bakımından çok büyük bir zenginliğe sahiptir (Çavuşoğlu 1980).

Zeytin ve zeytinyağının insan beslenmesindeki değeri, ekonomik önemi ve mutfak kültüründeki geçmişi, 8.000 yıl gibi çok eski tarihlere dayanmaktadır (Öztürk 2008). Son yıllarda “Akdeniz beslenme tarzı” veya “Akdeniz diyeti” kavramı, sağlıklı beslenme ve kalp hastalıkları yönünden özellikle ele alınan bir beslenme şeklidir. Akdeniz beslenme tarzında, bol miktarda tüketilen zeytinyağının insan sağlığına olumlu etkileri çok fazladır (Demirci ve Bölükbaşı 2003).

30<sup>0</sup>-40<sup>0</sup> enlemleri arasında, %98'i kuzey yarım kürede olmak üzere dünyada 37 ülkede ekonomik anlamda zeytin üretimi yapılmaktadır. 9.4 milyon hektar dünya zeytin üretim alanının %95'i kuzeyde Akdeniz bölgesinde yer almaktadır. 2010 yılı

istatistiklerine göre yaklaşık 20,6 milyon ton olan dünya dane zeytin üretiminin %98'i Akdeniz'e kıyısı olan İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Suriye, Fas, Portekiz, Fransa ve Cezayir gibi önemli üretici ülkelerden elde edilmektedir. Bu ülkeler üretim oranlarına göre sıralandığında, üretimin %38'i İspanya, %15'i İtalya, %9'u Yunanistan, %7'si Türkiye, %5'i Suriye ve %4'ü Tunus tarafından yapıldığı görülmektedir (Anonymous 2010). Türkiye bu ülkeler içerisinde gerek üretim ve gerekse zeytin alanı bakımından yıllara göre değişmekle birlikte genellikle 5. sırada yer almaktadır.

2010 yılı istatistiklerine göre, Türkiye'de 1.076.601 ton zeytin üretilmekte ve üretimin %46.45'i Ege Bölgesi'nde, %26.42'si Marmara Bölgesi'nde, %24.23'ü Akdeniz Bölgesi'nde, %2.67'si Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ve %0.23'ü ise diğer bölgelerde gerçekleştirilmektedir.

Aydın, İzmir ve Balıkesir illeri arasında 2010 yılı verilerine göre (Anonim 2010) en fazla ağaç sayısı 23.616.070 ile Aydın ilinde yer alırken bunu 18.346.660 ile İzmir ili takip etmektedir. Ağaç sayısı olarak 11.353.617 ile Balıkesir ili son sırada yer alırken, üretime bakıldığında ise diğer iki il İzmir ilinden sonraki sırada yer almaktadır (Çizelge 1).

Türkiye ekonomisinde önemli bir yere sahip olan zeytinin ürün verimine, kalitesine ve ömrünün uzunluğuna etki eden önemli faktörlerden birisi de hastalıklar ve zararlılardır. Ülkemizde birçok yerli zeytin çeşitlerinin çok eski çağlardan beri yetiştirilmesi ve ülkemizin bu bitki için gen kaynağı merkezi konumunda olması bu bitkiyedeki özellikle virüs hastalıklarının incelenmesini önemli kılmaktadır. Virüs, viroid ve fitoplazma gibi etmenlerin yol açtığı hastalıklar ağaçların zayıflamasına ve ölümüne, ürünün kalite ve miktarının düşmesine, aşı tutma ve köklenme oranında azalmaya neden olabilmektedir (Candresse et al. 1995).

Çizelge 1. Aydın, İzmir, Balıkesir illerinde zeytin ağaç sayısı ve üretim miktarları

İl	Ağaç Sayısı (Adet)			Toplam Zeytin Üretimi (ton)
	Meyve Veren	Meyve Vermeyen	Toplam	
Aydın	21 077 358	2 538 712	23 616 070	122 455
İzmir	14 966 950	3 379 710	18 346 660	183 125
Balıkesir	10 706 622	646 995	11 353 617	130 549
Toplam	46 750 930	6 565 417	53 316 347	436 129

Zeytin ağaçları birçok virüs ve virüs benzeri etmeden etkilenmektedir. Dünyada bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda, zeytin ağaçlarının 9 cinse ait 15 farklı virüsün konukçusu olduğu saptanmıştır. Zeytinde saptanan virüsler arasında; *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, çilek latent halkalı leke virüsü), *Arabis mosaic virus* (ArMV, arabis mozaik virüsü), *Cherry leaf roll virus* (CLRV, kiraz yaprak kıvrılma virüsü), *Cucumber mosaic virus* (CMV, hıyar mozaik virüsü), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV, zeytin latent halka leke virüsü), *Olive latent-1 virus* (OLV-1, zeytin latent-1 virüsü), *Olive latent-2 virus* (OLV-2, zeytin latent-2 virüsü), *Olive vein yellowing-associated virus* (OVYaV, zeytin damar sararması ile

ilişkili virüs), *Olive yellow mottling and decline associated virus* (OYMDaV, zeytin sarı beneklenme ve geriye doğru ölümle ilişkili virüs), *Tobacco mosaic virus* (TMV, tütün mozaik virüsü), *Olive semilatif virus* (OSLV, zeytin yarı latent virüsü), *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV, zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs), *Tobacco necrosis virus-D* (TNV-D, tütün nekroz virüsü), *Olive mild mosaic virus* (OMMV, zeytin ılımlı mozaik virüsü) ve *Olive latent-3 virus* (OLV-3, zeytin latent-3 virüsü) bulunmaktadır (Martelli 1999, Cardoso et al. 2005, Felix and Clara 2006, Alabdullah et al. 2009, Çağlayan et al. 2011)

Zeytin ağaçlarındaki virüslerin saptanması amacıyla Türkiye’de çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Ege Bölgesi’nde Balıkesir, Çanakkale, İzmir ve Manisa illerindeki zeytin ağaçlarında ArMV, CLRV, SLRSV ve CMV enfeksiyonlarının olduğu DAS-ELISA ile saptanmıştır (Fidan ve Ertem 1995). Hatay ilinde yürütülen çalışmada (Tarla ve Çağlayan 1998), bu yöredeki zeytin ağaçlarının %47.7 oranında SLRV, %46.1 oranında CLRV ve %32.2 oranında ise ArMV ile enfekteli olduğu DAS-ELISA yöntemi ile saptanmış ve ağaçlarda OLRV, OLV-1 ile OLV-2 enfeksiyonlarına ise rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışma sonuçları, daha sonra Türkiye’de zeytin ağaçlarında saptanan virüsler olarak dünya literatürüne ilk kayıt olarak aktarılmıştır (Çağlayan et al. 2004). Balıkesir, Bursa ve Aydın illerinde yürütülen bir araştırmada (Belir ve Açıköz 2005), toplanan zeytin bitki örneklerinde DAS-ELISA yöntemi ile CMV, CLRV, ArMV ve SLRSV adlı virüslerin ve bunların karışık enfeksiyonlarının var olduğu belirlenmiştir. Hatay ilinde yapılan çalışmada, daha önce turuncgillerden izole edilen OLV-1’nün Türkiye’de zeytin ağaçlarında da bulunduğu RT-PCR yöntemi ile ilk kez tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe et al. 2007). Doğu Akdeniz Bölgesi illerinde (Hatay, Adana, Kahramanmaraş ve Osmaniye) resmi ve özel fidanlıklardan ve ticari bahçelerden alınan 414 örnekte 2’sinde OLV-1 enfeksiyonu olduğu saptanmış ve OLV-2 ise bulunamamıştır (Yalçın ve ark. 2007). Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yürütülen diğer bir araştırmada (Ulubaş Serçe ve ark. 2009), Hatay, Adana, Osmaniye, Kahramanmaraş ve İçel illerinden 552 zeytin ağacından örnekler alınmış ve RT-PCR yöntemi ile 141 ağacın SLRSV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir.

Bu makalede İzmir, Aydın ve Balıkesir illerindeki zeytin ağaçlarında enfeksiyon oluşturan ve sertifikasyon programlarında testlenmesi öngörülen SLRSV, ArMV, CLRV, CMV, OLRV, OLV-1, OLV-2, OLYaV ve OLV-3 adlı virüslerin biyolojik ve serolojik yöntemlere ek olarak, daha duyarlı ve güvenilir olan RT-PCR yöntemi ile tespit edilmesi ve virüslerin bulunma oranlarının belirlenmesine yönelik olarak yürütülen çalışmalardan elde edilen bulgulardan söz edilmektedir.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmanın materyalini; Aydın, Balıkesir ve İzmir illeri zeytin üretim alanları ile bu illerdeki fidanlıklardan alınan yaprak-sürgün ve meyve örnekleri, test bitkileri (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., *Chenopodium quinoa* Quin., *Datura*

*stramonium* L., *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. cvs. Samsun, Xanthi, Maden), zeytin virüslerine ait DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tanı kitleri, primerler ve moleküler analiz kimyasal maddeleri ve cihazları oluşturmuştur.

### Survey Çalışmaları

Survey alanını belirlemek için Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinin Tarım İl Müdürlüklerinden zeytin üretim alanlarını ve miktarını belirten listeler ve veriler temin edilmiştir. Örnek sayısı, işgücü, zaman, mali durum ve örneklerin değerlendirilmesi göz önüne alındığında, zeytin ağacı sayısının en fazla olduğu ilçelerden örnekler alınmış ve örnek alınacak ilçeler belirlenirken, ağaç sayısının 700000 üstünde olması dikkate alınmıştır. Bu ilçelerden ağaç sayısının en fazla olduğu 3 köy/mevki seçilmiş, buralardan ise alt sınırı 500 ağaç olan, 4 bahçeden örnekler toplanmıştır.

Yaprak-sürgün örneklerini almak için, illere göre zeytin ağacının vejetasyon dönemi ve çeşitler dikkate alınarak Nisan sonu Haziran ayları arasında araziye çıkılmıştır. 2009 yılında İzmir ilinden 136 örnek, Aydın ilinden 157 örnek alınmış, 2010 yılında Balıkesir ilinden 82 örnek toplanmıştır. Adı geçen illerden toplam olarak 375 örnek alınmıştır (Çizelge 2).

Örnekleme esnasında öncelikle belirti gösteren ağaçlar seçilmiş (bodurlaşma, çalılışma, sürgünlerde boğum aralarının kısalması, dallarda yassılaşma, deformasyonlar, yapraklarda nekrotik ve klorotik lekeler, orak şeklinde yaprak oluşumu, yaprak uçlarında çatallanma, yapraklarda yukarıya doğru kıvrılma, meyvelerde deformasyon gibi belirtiler) ve virüslerin ağaçlarda latent olarak bulunma durumları göz önüne alınarak simptomsuz ağaçlar da tesadüfi olarak belirlenmiştir (Bora ve Karaca. 1970). Her ağacın dört yanından yaprak örnekleri ve üzerinde yaprak, çiçek ya da meyve bulunan 20-25cm boyundaki sürgünler kesilerek alınmıştır. Alınan yaprak ve sürgün örnekleri plastik torbalara etiketlenerek yerleştirilmiş, laboratuvara getirilerek analizleri yapılmaya kadar +4°C'de buzdolabında, moleküler çalışmalarda kullanılacak materyal ise -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Gezilen ve örnek alınan zeytin bahçelerinin yeri ve mevki belirlenmiş, ağaçlarda nasıl belirtiler gözlemlendiği kaydedilmiş ve gerekli durumlarda ağaçların ya da belirtili organların fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. Ayrıca, boya ile örnek alınan ağaçlarda numaralandırma yapılmış ve GPS ile gerekli koordinatlar alınmıştır.

Çizelge 2. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde ilçe bazında toplanan örnek sayısı

	<b>İlçeler</b>	<b>Tarih</b>	<b>Toplanan Örnek Sayısı</b>
<b>Aydın</b>	Karacasu	13/05/09	12
	Kuyucak	13/05/09	12
	Nazilli	13/05/09	13
	Sultanhisar	14/05/09	12
	Köşk	14/05/09	14
	Bozdoğan	14/05/09	14
	Koçarlı	15/05/09	13
	Karpuzlu	15/05/09	12
	Çine	15/05/09	15
	Söke	18/05/09	13
	Germencik	18/05/09	13
	Merkez	18/05/09	14
	<b>Toplam</b>		<b>157</b>
	<b>Balıkesir</b>	Gömeç	27/04/10
Ayvalık		28/04/10	14
Burhaniye		03/05/10	15
Edremit		12/05/10	14
Havran		12/05/10	12
Erdek		13/05/10	14
<b>Toplam</b>			<b>82</b>
<b>İzmir</b>	Kemalpaşa	17/04/09	12
	Bayındır	20/04/09	13
	Tire	20/04/09	22
	Seferihisar	21/04/09	12
	Selçuk	21/04/09	12
	Bergama	22/04/09	17
	Torbali	27/04/09	16
	Ödemiş	27/04/09	14
	Karaburun	30/04/09	18
	Kemalpaşa	17/04/09	12
	<b>Toplam</b>		<b>136</b>
	<b>Genel Toplam</b>		<b>375</b>

### Serolojik Çalışmalar

Survey çalışmaları sonucu toplanan örnekler, Clark and Adams (1977), Clark (1981) ve Erkan ve ark. (1992)'na göre bazı modifikasyonlar uygulanarak DAS-ELISA ile test edilmiş ve sağlıklı kontrolün 2 katı veya daha fazla düzeyde absorbans değerine sahip olan örnekler enfekteli olarak dikkate alınmıştır. Toplam 375 zeytin örneğine, Çizelge 3'de gösterilen viral etmenler için DAS-ELISA testleri uygulanmıştır.

Çizelge 3. Zeytin ağaç ve fidanlarından alınan sürgün örneklerinde serolojik ve moleküler yöntemler ile testlenen viral etmenler

Viral Etmenler	Test Yöntemi	
	Serolojik	Moleküler
CLRV	+	+
ArMV	+	+
SLRSV	+	+
CMV	+	+
OLV-1	-	+
OLV-2	-	+
OLV-3	-	+
OLRSV	-	+
OLYaV	-	+

### Biyolojik çalışmalar

Biyolojik çalışmalarda testlemeler için kullanılan indikatör bitkiler iklim odasında yetiştirilmiştir. Yetiştirme ortamı olarak kullanılan harç 1:1:1 toprak, gübre ve kum karışımından oluşmuştur. Test bitkilerinin tohumları küvetlere ekilmiş ve tohum ekimi yapılan test bitkileri 4000-6000 lüks ışık şiddeti, 16 saat/gün aydınlanma periyodu ve 20-24°C sıcaklığa sahip olan iklim odası koşullarında yetiştirilmiştir (Nogay 1983 Matthews 1991). Bitkiler belirli aralıklarla insektisit ve fungusitlerle ilaçlanarak oluşabilecek muhtemel hastalıklara ve zararlılara karşı önlem alınmıştır. Daha sonra uygun gelişme dönemlerinde fideler küçük boy (10cm çaplı) saksılara şaşırtılmıştır. Test bitkileri uygun gelişme dönemlerine ulaştıkları zaman 1g zeytin yaprak örneklerinden %0.1 sodyum sülfid içeren 0.01 M fosfat tamponu (pH=7.0) + %2.5 Nicotin kullanılarak (1/5; g/ml) hazırlanan ekstraktlar, belirlenmiş test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak inokule edilmiştir. İnokulumun içine enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırmak amacı ile, celite ilave edilmiştir ve cam spatül aracılığı ile test bitkilerine inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyondan 1-2 dakika sonra test bitkilerinin yaprakları çeşme suyu ile yıkanmıştır. Bu bitkilerde belirti oluşup oluşmadığı, inokulasyon sonrasında gözlemlenmiş ve oluşan belirti tipleri değerlendirilerek, fotoğrafları çekilmiş ve kaydedilmiştir (Yorgancı 1975, Savino and Gallitelli 1981, Matthews 1991).

### Moleküler çalışmalar

#### Toplam RNA İzolasyonu

RNA ekstraksiyonunda kullanılan tüm malzemeler, yapısına uygun olarak ekstrakte edilmiştir. Her izolat için yaklaşık 0.2g örnek (yaprak+sürgün kazıma) 10ml %1 mercapto-ethanol içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi varlığında steril örnek poşetleri içinde homojenize edilmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70°C 10 dakika inkube edildikten sonra, 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 300µl alınarak, yeni tüplere

aktarılmıştır. Tüplere 150µl etanol, 300µl 6M NaI, 50µl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvı atılarak tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için, 500µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiş ve sonra tüpler 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150µl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. 70°C'de 4 dakika ısıtıcıda inkube edilen tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmındaki sıvıdan 145µl alınarak, yeni tüplere aktarılmış ve RNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve PCR uygulamaları yapılmaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac et al. 2001).

#### Komplementer DNA (cDNA) sentezi

RNA ekstraksiyonu yapılmış olan örnekler komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri kullanılmış ve firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre ilk olarak eppendorf tüplerin içerisine 0,1-5 µg total RNA, 1µl oligo (dT) primer konulmuş ve DEPC su ile 12µl'ye tamamlanmıştır. 65°C'de 5 dakika inkubasyon uygulandıktan sonra, tüpler buz üzerine konulmuş ve içerisine sırasıyla 4µl 5X reaction buffer, 1µl Ribolock Ribonuclease inhibitor, 2µl 10mM dNTP mix eklenmiştir. Kısa süreli santrifüj (3-5 saniye) uygulandıktan sonra 25°C'de 5 dakika inkubasyon uygulanmıştır ve tüplerin içine 1 M-MuLV reverse transcriptase eklenerek, toplam 20 µl hacme ulaşılmıştır. Karışım daha sonra 42°C'de 60 dakika ve 70°C'de 5 dakika inkubasyon uygulanarak, cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

#### RT-PCR yöntemi

PCR işlemi Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 50 µl hacimde yapılmıştır. Çizelge 4'de verilen spesifik primerler ile RT-PCR testleri gerçekleştirilmiştir. Steril PCR tüplerine 25µl 2x PCR master mix, 1µl primer1, 1 µl primer 2, 2µl cDNA ve 21 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanmıştır (Candresse et al., 1995). Tüm işlemler boyunca eldiven kullanılmış ve herhangi bir kontaminasyon olasılığını belirlemek için de nükleik asit eklemekten sadece karışımın yer aldığı bir tüpte (kontrol), PCR programında çoğaltma işlemine alınmıştır.

#### Agaroz jel elektroforez yöntemi

Agaroz jel 100ml 1X TAE tamponu içine 1.5g agaroz konulup, mikrodalga fırında 3.5 dakika tutularak hazırlanmıştır. Agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez koşumunda kullanılan 1X TAE tamponu, stok 50 X TAE tamponunun seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Stok TAE 50X tamponu; 40mM Tris-acetate (pH 8), 57.1 ml Glacial Acetic Acid, 100ml 0.5 M EDTA (pH 8)'den oluşmaktadır. Bu karışım 1000 ml'ye tamamlanarak stok solüsyon oluşturulmuştur.



Çizelge 4. RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve sıcaklık döngüleri

Hedef Virüs / Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	PCR Döngüleri
ArMV-5A ArMV-3A	TACTATAAGAAACCGCTCCC CATCAAAACTCATAACCCAC (Grieco et al., 2000)	302 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
ArMV-F ArMV-R	TTGGCCAGATATAGCGTAAAAAT CAGCGGATTGGGAGTTTCGT (MacKenzie et al., 1997)	519 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 50 °C 45sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 5dk.)
CMV-CPN5 CMV-CPN3	ACTCTTAACCAACCAACCTT AACATAGCAGAGATGGCGG (Faggioli et al., 2005)	280 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
CMV-F CMV-R	GCCGTAAGCTGGATGGACAA TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG (Youssef et al., 2010)	499 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 50 °C 45sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 5dk.)
SLRSV-5D SLRSV-3D	CCCTTGGTTACTTTTACCTCCTCATTGTCC AGGCTCAAGAAAACACAC (Faggioli et al., 2005)	293 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
CLRV-5 CLRV-3	TGGCGACCGTGAACGGCA GTCGGAAGATTACGTAAGG (Faggioli et al., 2005)	416 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLRSV-R1 OLRSV-R2	GATTGCCAAGGAATATGCTG CTCCAACAAATGATTGCTG (Faggioli et al., 2005)	356 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLYaV-H OLYaV-C	ACTACTTTCGCGCAGAGACG CCCAAAGACCATTGACTGTGAC (Faggioli et al., 2005)	346 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLYaV-F OLYaV-R	GGGACGGTTACGGTCGAGAGG CGAAGAGAGCGGCTGAAGGCTC (Sabanadzovic et al., 1999)	383 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV1-HA OLV1-CA	ACACAGAAATCATAAGTGCC CCATAGCACCATCATAAC (Faggioli et al., 2005)	299 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV2-H OLV2-C	GAAGGTGGCTCGCCTAGAG GCCAGGAGTTTGAGCTTTG (Faggioli et al., 2005)	206 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV3-F OLV3-R	CCCGTTGAGCAAGTTGTCTTCC GCAGTGGCTGGAGAGCATGGAG (Alabdullah et al., 2009)	176 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 58 °C 45sn. / 72°C 20 sn) 1 X (72°C 5dk.)

Stok çözültiden 20ml alınarak, distile H<sub>2</sub>O ile 1000ml'ye tamamlanmış ve 1X TAE konsantrasyon hazırlanmıştır. Elektrophorez koşumu, 100 V'da, yatay düzende 60 dakika süreyle ve 1X TAE çözültisi içerisinde uygulanmıştır. Jel yükleme yapılmadan önce, örneklere (10µl örneğe) 2µl yükleme tamponu eklenmiştir.

Jel görüntüleme cihazında PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan jel, ETX-20.M marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir.

## SONUÇLAR

### Arazi gözlemleri

2009 yılında Aydın ve İzmir illerinde, 2010 yılında Balıkesir ilinde yapılan surveyler sonucunda, zeytin bahçelerinde virüs belirtisi görülen ve belirti görülmeyen ağaçlardan örneklemeler yapılmıştır. Örnekleme yapılırken, ağaçlar önce simptomatolojik açıdan incelenmiş ve görülen belirtilerin viral etmenlerden kaynaklanabileceğinin yanı sıra diğer patojenler ya da etkenler tarafından oluşturulabileceği de göz önünde tutulmuştur. Ayrıca, hiç belirti göstermeyen ve sağlıklı bir görünüme sahip olan ağaçlarda da virüs enfeksiyonu olabildiği, daha sonra yapılan testler sonucunda gözlemlenmiştir. Surveyler sırasında incelenen ağaçlarda ve alınan bitki örneklerinde, bazı viral enfeksiyonların olabileceği şüphesini yaratan, yapraklarda şekil bozulmaları, orak yaprak oluşumu, yapraklarda renk değişimi ve mozaik, meyvelerde şekil bozukluğu ve ağaçlarda ise zayıf sürgün oluşumu, çalılışma vb. belirtiler olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 1).

### Biyolojik Testlerin Sonuçları

Yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR çalışmalarının bulgularına göre, virüs(ler) ile enfekteli oldukları belirlenen zeytin örnekleri grup olarak sınıflandırılmış ve her grubu temsil edecek sayıda örnekler seçilerek bu zeytin örnekleri ile biyolojik testler yürütülmüştür. Zeytin virüslerinin birçoğunun teşhisinde otsu test bitkilerine mekanik inokulasyon duyarlılığı pek fazla olmamasına rağmen halen kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, DAS-ELISA ve RT-PCR çalışmalarında bazı virüslerle (ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV) enfekteli olan örnekler gruplandırılarak, bunlardan seçilen örneklerden 6 farklı test bitkisine (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum cv. xanthi* ve *N. glutinosa*) mekanik olarak inokule edilmiştir. Ancak, yapılan inokulasyonlar sonucunda test bitkilerinde herhangi bir belirtinin meydana gelmediği görülmüştür.

### Serolojik Testlerin Sonuçları

Zeytin virüslerinin saptanması amacıyla Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan örnekler DAS-ELISA yöntemi ile ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV adlı etmenlere ait tanı kitleri kullanılarak testlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 5’de gösterilmiştir. Buna göre, 2009 yılında Aydın ilinden 157 ve İzmir ilinden 136 olmak üzere toplam 293 adet örnek toplanmış, 2010 yılında ise Balıkesir ilinden 82 adet örnek alınarak, toplam 375 örnek serolojik yöntemle (DAS-ELISA) test edilmiştir.



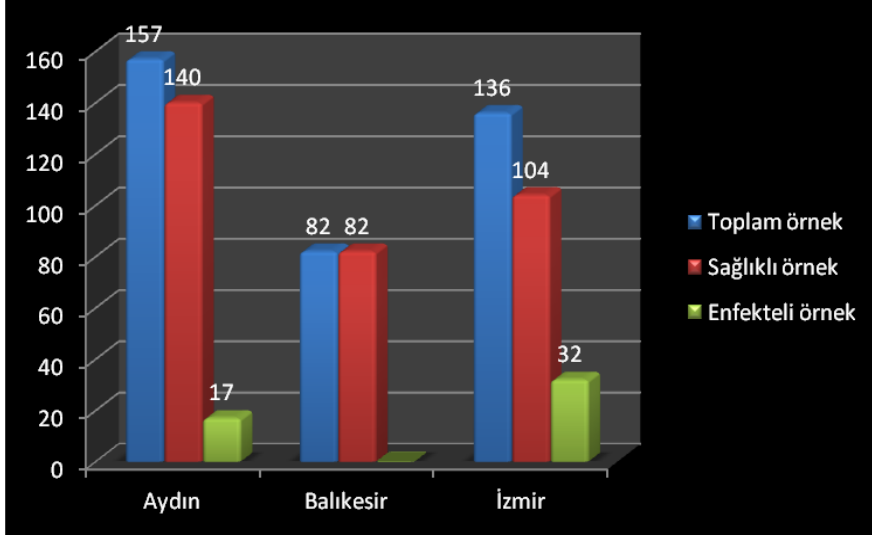
Şekil 1. Survey çalışmaları sırasında zeytin ağaçlarında görülen bazı belirtiler. a) Yapraklarda şekil bozulmaları ve orak yaprak oluşumu. b) Yapraklarda renk değişikliği. c) Yapraklarda mozaik d) Meyvelerde şekil bozukluğu.

Çizelge 5. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan bitki örneklerinde DAS-ELISA yöntemine göre virüslerin bulunma durumu

İl	İlçeler	Alınan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Adı			
			ArMV	CMV	CLRV	SLRSV
Aydın	Karacasu	12/2	2	--	--	--
	Kuyucak	12/0	--	--	--	--
	Nazilli	13/0	--	--	--	--
	Sultanhisar	12/3	3	--	--	--
	Köşk	14/0	--	--	--	--
	Bozdoğan	14/3	2	--	--	1
	Koçarlı	13/0	--	--	--	--
	Karpuzlu	12/1	1	--	--	--
	Çine	15/1	1	--	--	--
	Söke	13/2	2	--	--	--
	Germencik	13/1	1	--	--	--
	Merkez	14/4	4	--	--	--
<b>Toplam</b>	<b>157/17</b>	<b>16</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>1</b>	
Balıkesir	Gömeç	13/0	--	--	--	--
	Ayvalık	14/0	--	--	--	--
	Burhaniye	15/0	--	--	--	--
	Edremit	14/0	--	--	--	--
	Havran	12/0	--	--	--	--
	Erdek	14/0	--	--	--	--
	<b>Toplam</b>	<b>82/0</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>--</b>
İzmir	Kemalpaşa	12/3	3	--	--	--
	Bayındır	13/2	2	--	--	--
	Tire	22/7	7	--	--	--
	Seferihisar	12/3	3	--	--	--
	Selçuk	12/3	3	--	--	--
	Bergama	17/4	4	--	--	--
	Torbalı	16/3	3	--	--	--
	Ödemiş	14/2	2	--	--	--
	Karaburun	18/5	5	--	--	--
	<b>Toplam</b>	<b>136/32</b>	<b>32</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>--</b>
<b>Genel Toplam</b>	<b>375/49</b>	<b>48</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	

Çizelge 5’de görüldüğü üzere, Aydın ilinden 157 örnek toplanmış ve örneklerin %10.82’sinde virüs enfeksiyonunun bulunduğu belirlenmiştir. Bu örneklerin %10.19’unda ArMV olduğu saptanırken, sadece %0.63’ünde SLRSV olduğu tespit edilmiştir. 2010 yılında Balıkesir ilinden toplanan 82 adet zeytin örneği ile ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV adlı etmenlerin varlığı yönünden yapılan testlerde, bu ilden toplanan örneklerde virüs enfeksiyonu olmadığı belirlenmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda 2009 yılında İzmir ilinde toplanan 136 örneğin %23.52’sinde ArMV enfeksiyonu olduğu saptanmıştır.

Genel bir değerlendirme yapıldığında; 2009 ve 2010 yıllarında adı geçen üç ilden toplanan 375 adet zeytin bitkisi örneğinden %12.8'inin ArMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiş ve 1 örnekte ise SLRSV'nün bulunduğu saptanmıştır. DAS-ELISA testleri sonucunda Aydın ilinde ArMV ve SLRSV, İzmir ilinde sadece ArMV adlı virüslerin bulunduğu, Balıkesir ilinde toplanan örneklerde ise testlenen dört virüsün enfeksiyonunun olmadığı belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. DAS-ELISA yöntemine göre Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde toplam örnek, virüs ile enfekteli ve sağlıklı örnek miktarı.

### Moleküler Testlerin Sonuçları

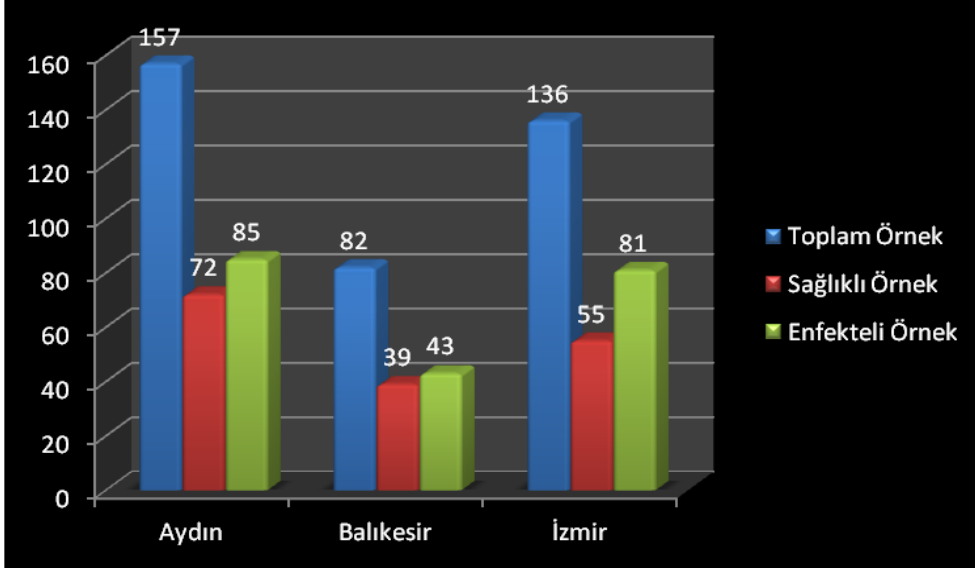
Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan 375 örnek 9 virüse ait spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemine göre testlenmiştir. Testlenen örneklerin iller bazında moleküler test sonuçları Çizelge 6'da gösterilmiştir.

Çizelge 6'da görüldüğü üzere, Aydın ilinden toplanan örneklerle yapılan RT-PCR testi sonuçlarına göre örneklerde %54.14 oranında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda, ArMV (%21.01) en yaygın viral etmen olarak saptanırken, bunu sırasıyla CMV (%11.46), CLRV (%9.55) ve SLRSV (%8.28) izlemiştir. 6 örnekte ise CMV ve CLRV'nün birlikte bulunduğu belirlenmiştir. Balıkesir ilinden alınan örneklerde %52.43 oranında virüs enfeksiyonu olduğu görülmektedir. Yapılan analizler sonucunda alınan örneklerde ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV enfeksiyonlarının bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca, bu ildeki örneklerde ArMV ve CLRV'nün %4.87 oranında karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu belirlenmiştir. En yaygın virüs olarak CLRV (%24.39) saptanmış olup bunu sırasıyla SLRSV (%12.19), CMV (%7.31) ve ArMV (%3.65) izlemiştir. İzmir ilinden alınan örneklerde RT-PCR yöntemi ile yapılan analiz sonuçlarına göre, %59.05 oranında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 6. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin RT-PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İl	İlçeler	Alınan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Adı											
			ArMV	CMV	CLRV	SLRSV	CMV+CLRV	ArMV+C LRV	OLV-1	OLV-2	OLRSV	OLYaV	OLV-3	
Aydın	Karacasu	12/9	5	2	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Kuyucak	12/6	1	1	--	2	2	--	--	--	--	--	--	--
	Nazilli	13/6	--	2	3	--	1	--	--	--	--	--	--	--
	Sultanhisar	12/8	4	2	1	1	--	--	--	--	--	--	--	--
	Köşk	14/4	2	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Bozdoğan	14/12	5	3	2	2	--	--	--	--	--	--	--	--
	Koçarlı	13/6	--	2	1	3	--	--	--	--	--	--	--	--
	Karpuzlu	12/8	4	--	2	1	1	--	--	--	--	--	--	--
	Çine	15/4	1	--	2	1	--	--	--	--	--	--	--	--
	Söke	13/6	3	2	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Germencik	13/4	2	--	1	1	--	--	--	--	--	--	--	--
	Merkez	14/12	6	2	--	2	2	--	--	--	--	--	--	--
	<b>Toplam</b>	<b>157/85</b>	<b>33</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	--	--	--	--	--	--	--
Balıkesir	Gömeç	13/5	--	--	3	--	--	2	--	--	--	--	--	--
	Ayvalık	14/8	--	1	5	2	--	--	--	--	--	--	--	--
	Burhaniye	15/7	1	1	2	3	--	--	--	--	--	--	--	--
	Edremit	14/8	--	1	4	2	--	1	--	--	--	--	--	--
	Havran	12/6	2	2	1	1	--	--	--	--	--	--	--	--
	Erdek	14/9	--	1	5	2	--	1	--	--	--	--	--	--
	<b>Toplam</b>	<b>82/43</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	--	<b>4</b>	--	--	--	--	--	--
İzmir	Kemalpaşa	12/6	3	2	--	--	1	--	--	--	--	--	--	--
	Bayındır	13/9	5	3	--	1	--	--	--	--	--	--	--	--
	Tire	22/16	11	2	1	2	--	--	--	--	--	--	--	--
	Seferihisar	12/7	5	--	--	2	--	--	--	--	--	--	--	--
	Selçuk	12/8	5	2	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Bergama	17/9	4	1	1	2	1	--	--	--	--	--	--	--
	Torbalı	16/8	5	1	--	1	1	--	--	--	--	--	--	--
	Ödemiş	14/6	5	--	--	1	--	--	--	--	--	--	--	--
	Karaburun	18/12	7	1	2	2	--	--	--	--	--	--	--	--
	<b>Toplam</b>	<b>136/81</b>	<b>50</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	--	--	--	--	--	--	--
<b>Genel Toplam</b>	<b>375/209</b>	<b>86</b>	<b>36</b>	<b>40</b>	<b>34</b>	<b>9</b>	<b>4</b>							

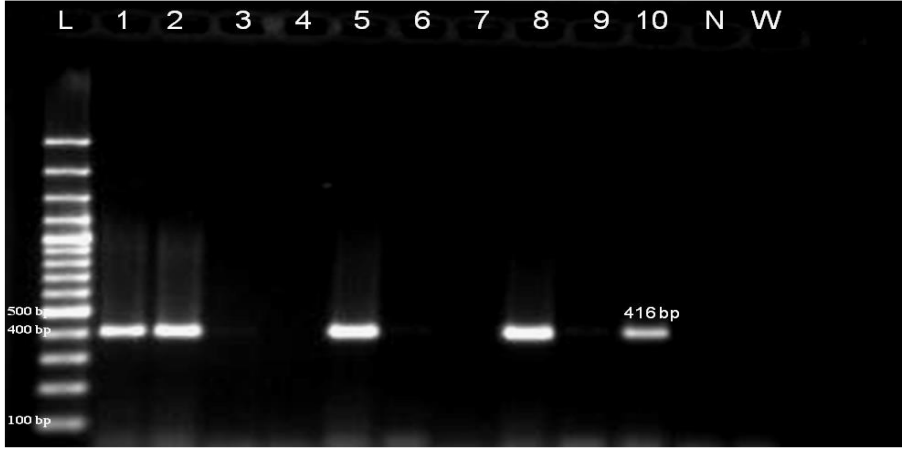
Örneklerde ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV adlı virüslerin bulunduğu tespit edilmiştir. İzmir ilinde zeytin ağaçlarında ArMV (%36.76) en yaygın viral etmen olarak belirlenirken, bunu sırasıyla CMV (%8.82), SLRSV (%8.08) ve CLRV (%3.67) izlemiştir. Ayrıca toplanan örneklerde CMV ve CLRV'nün %2.21 oranında karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu üç ilden alınan örneklerde OLV-1, OLV-2, OLRSV, OLYaV ve OLV-3 enfeksiyonu olmadığı belirlenmiştir.



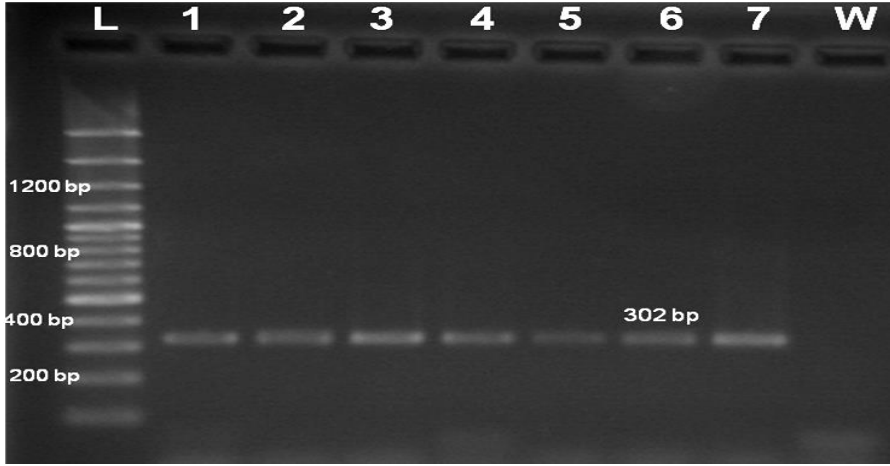
Şekil 3. RT-PCR yöntemine göre Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde toplam örnek, virüs ile enfekteli ve sağlıklı örnek miktarı.

Moleküler testlerin sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde; 2009 ve 2010 yıllarında adı geçen üç ilden toplanan 375 adet zeytin bitkisi örneğinde RT-PCR analizleri sonucunda %55.73 oranında virüs enfeksiyonu olduğu görülmektedir. Viral etmenler açısından bakılacak olursa örneklerde %22.93 oranında ArMV, %9.60 oranında CMV, %10.66 oranında CLRV ve %9.06 oranında SLRSV enfeksiyonu bulunduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, %2.4 oranında CMV ile CLRV'nün ve %1.06 oranında ArMV ile CLRV'nün birlikte karışık enfeksiyonlar oluşturduğu belirlenmiştir. Toplanan 375 örnekte RT-PCR testleri sonucunda OLV-1, OLV-2, OLRSV, OLYaV ve OLV-3 adlı virüslerin olmadığı saptanmıştır (Şekil 3).

RT-PCR çalışmalarında, virüslere özgü primer çiftleri kullanılarak CLRV, ArMV, SLRSV ve CMV adlı virüslere ait DNA bantları elde edilmiştir. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden zeytin bahçelerinden alınan örneklerle yapılan moleküler çalışmalar sonucunda, CLRV için 416 bp, ArMV için 302 bp, SLRSV için 293 ve CMV için 280 bp uzunluğunda spesifik DNA bantları tespit edilmiş olup, buna karşın OLV-1, OLV-2, OLV-3, OLYaV ve OLRSV adlı virüslerin spesifik primerleri ile yapılan RT-PCR çalışmalarında ilgili etmenlere yönelik DNA bantlarının oluşumu ise gözlenmemiştir (Şekil 4,5,6,7).

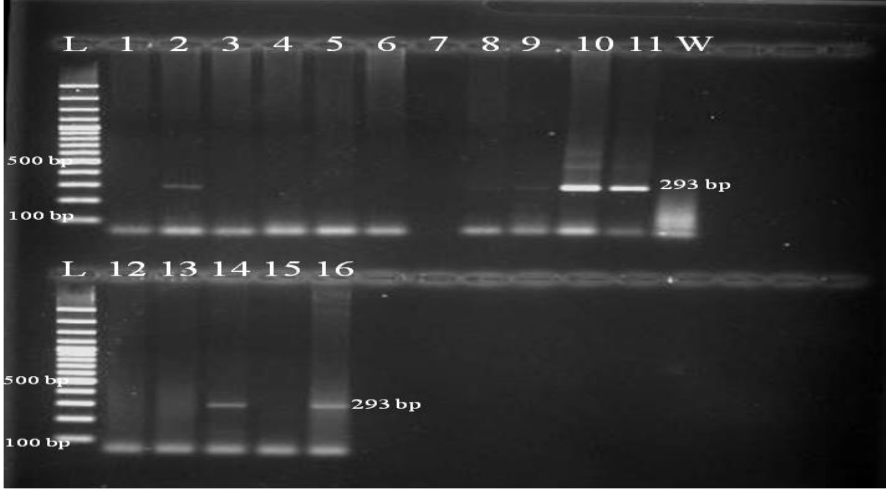


Şekil 4. CLRV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1,2,5,8,10: CLRV ile enfekteli pozitif örnekler N: Negatif kontrol; W: su kontrol

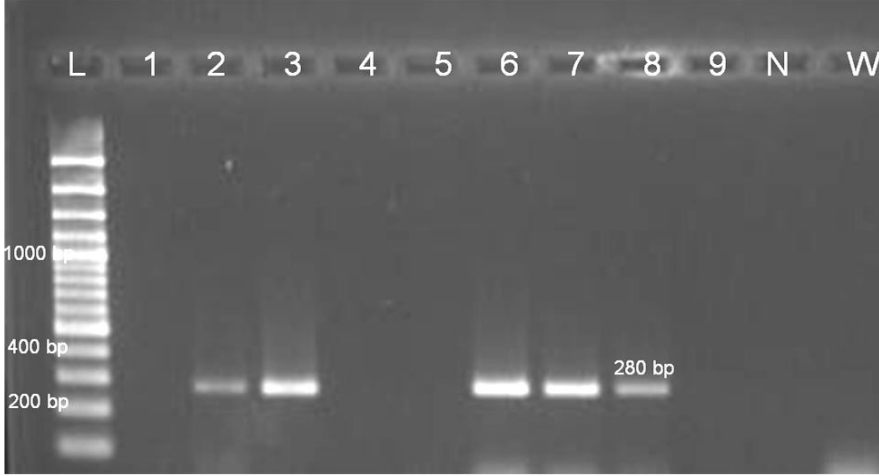


Şekil 5. ArMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1,2,3,4,5,6,7:ArMV ile enfekteli pozitif örnekler; W: su kontrol





Şekil 6. SLRSV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 2,9,10,11,14,16: SLRSV ile enfekteli pozitif örnekler; W: su kontrol



Şekil 7. CMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 2,3,6,7,8: CMV ile enfekteli pozitif örnekler N: Negatif kontrol; W: su kontrol

## TARTIŞMA VE KANI

Yürütülen bu çalışma ile, zeytin yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde zeytin ağaçlarındaki viral etmenlerin semptomatolojik, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile tanılanması ve bu etmenlerin bulunma durumlarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Araştırma için toplanan örneklerin semptomatolojik açıdan incelenmesi sonucunda,

bazı viral enfeksiyonların olabileceği izlenimi uyandıran yapraklarda şekil bozulmaları, orak yaprak oluşumu, renk değişimi ve mozaik, meyvelerde şekil bozukluğu ve ağaçlarda zayıf sürgün oluşumu, çalılışma vb. belirtilerin bulunduğu dikkati çekmiştir (Şekil 1). Zeytinde saptanan virüslerden SLRSV'nün küçük, armut şekilli buruşuk meyve oluşumuna, çekirdeklerde şekil bozukluklarına (tümsekli meyve) neden olup, yapraklarda daralma ve bükülmeye, boğum aralarında kısılmaya, sürgünlerde çalimsı büyümeye ve üründe azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Marte et al. 1986). Ayrıca, yaprak sararması kompleksi olarak adlandırılan hastalık “damar sararması” (Faggioli and Barba 1995), “yaprak sararması” ve “yaprak beneklenmesi ve geriye doğru ölüm” (Savino et al. 1996) olarak adlandırılan 3 farklı hastalık tarafından oluşturulmaktadır. Bu hastalık kompleksini karakterize eden özellikler zayıf meyve oluşumu, yaprakların parlak sarı renkte oluşudur. Yaprak beneklenmesi ve geriye doğru ölüm olduğunda ise, yaprakların nekrozlaşması ve yaygın yaprak dökülmesi sonucunda geriye doğru ölüm görülür. OVYaV damar sararması, OYMDaV ise yaprak beneklemesi ve geriye doğru ölüm gösteren bitkilerde tespit edilmiştir. Bu belirtileri gösteren zeytin örnekleri ile yapılan biyolojik, serolojik ve moleküler testlerin ardından; anormalliklerin viral etmenlerden kaynaklı olabileceği gibi, diğer patojenler ya da etkenler tarafından da oluşturulabileceği sonucuna varılmıştır. SLRSV bazı çeşitlerde (*Ascolana tenera*) çok belirgin semptom verirken, aynı virüs belirtisiz ağaçlardan alınan örneklerde de saptanmıştır (Savino et al. 1979; Marte et al. 1986). ArMV orak yaprak şeklindeki semptom gösteren zayıf gelişmesi olan ağaçlarda saptanırken, aynı zamanda hiçbir semptom vermeyen ağaçlarda da belirlenmiştir. CLRV (Savino and Gallitelli 1981) ile CMV (Savino and Gallitelli 1983) görünüşte tamamen semptomsuz olan ağaçlarda ve TMV ise Leccino çeşidinde damar bantlaşması ve çökme belirtisi gösteren ağaçlarda bulunmuştur (Triolo et al. 1996). Semptomatolojik olarak herhangi bir semptom göstermeyen ve görünüşte sağlıklı olarak değerlendirilen zeytin örneklerinde de virüs enfeksiyonlarının olabileceği, yapılan laboratuvar analizleri sonucunda görülmüştür. Nitekim, bu sonuçlar ele alındığında saptanan virüsler ile zeytin ağaçlarında bulunan belirtiler karşılaştırıldığında, aralarında tam bir ilişki kurulamamıştır. Ayrıca, bu çalışma ile bölgemizde zaman zaman zeytin meyvelerinde şikayet konusu olan şekil bozukluğu belirtilerinin tek başına virüslerden kaynaklanmadığı da belirlenmiş olmaktadır. Dünyada yapılan çalışmalar incelendiğinde de, zeytin virüslerinin çoğunun hiç semptom göstermeyen ağaçlarda saptandığı belirtilmektedir (Savino et al. 1979 ve 1983, Savino and Gallitelli 1981 ve 1983, Martelli and Gallitelli 1985 Marte et al. 1986, Merciega et al. 1996, Triolo et al. 1996).

Zeytin virüslerinin teşhisinde test bitkilerine mekanik inokulasyon çalışmaları Savino and Gallitelli (1981) tarafından kullanılmıştır. Bir kısım test bitkisinde (*C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *N. glutinosa* ve *N. tabacum*) oluşan belirtiler mozaik, nekrozlar ve halka lekelerdir (Savino and Gallitelli 1981, Merciega et al. 1996). Zeytinde saptanan virüslerin yapay olarak test bitkilerine inokule edilmesi durumunda çoğunlukla test bitkilerinde semptom çıkmadığı görülmüştür. ArMV,

SLRSV, CMV ve CLRV gibi virüslerin zeytin dışındaki bitkilerden test bitkisine kolaylıkla taşınabildiği, ancak zeytinden bu virüsleri izole etmenin daha zor olduğu belirtilmektedir (Brunt et al. 1996). Karşılaşılan bu zorluklar ise; zeytin özsuyunda virüs partiküllerinin düşük konsantrasyonda olması, bitki içerisinde virüslerin düzensiz dağılımı ve zeytin özsuyunda bulunan inhibitörlerin virüsün enfekte etme özelliğini engellemesi şeklinde açıklanmaktadır (Alabdullah et al. 2005).

Bitki virüslerinin tanılanmasında genellikle birden fazla yöntemden yararlanmak gerekmektedir. Birden çok yöntemi kullanarak tanılama yapmak daha doğru sonuçlara ulaşmak için gereklidir (Valverde et al. 1990). Bu araştırma kapsamında toplam 375 ağaçtan alınan örneklerde DAS-ELISA testi sonucuna göre %12.8'inin ArMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda 1 örnekte ise SLRSV'nün bulunduğu belirlenmiştir. Aydın ilinde toplam 157 adet örnekte %10.82 oranında ve İzmir ilinde toplam 136 adet örnekte %23.52 oranında virüs enfeksiyonu olduğu ortaya konmuştur. DAS-ELISA testi sonucunda Aydın ilinde ArMV ve SLRSV, İzmir ilinde sadece ArMV adlı virüslerin bulunduğu, Balıkesir ilinde ise hiçbir etmenin olmadığı saptanmıştır. DAS-ELISA testi sonucunda örneklerin hiçbirisinde CMV ve CLRV enfeksiyonu olmadığı belirlenmiştir. Buna karşın ülkemizde Ege Bölgesi'nde Balıkesir, Çanakkale, İzmir ve Manisa illerindeki zeytin ağaçlarında DAS-ELISA testi sonucunda ArMV, CLRV, SLRSV ve CMV enfeksiyonlarının olduğu saptanmıştır (Fidan ve Ertem, 1995). Benzer çalışma Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Hatay ilinde yapılmıştır. Araştırma yöresinde toplam 180 ağaçtan örnek alınmış 86 adedinde (%47.77) SLRSV, 83 adedinde (%46.11) CLRV ve 58 adedinde (%32.22) ArMV tespit edilmiştir. Aynı bahçelerden alınan 76 örnekte OLV-1, OLV-2 ve OLRV tespit edilmemiştir (Tarla ve Çağlayan 1998). Başka bir çalışma ise Balıkesir, Bursa ve Aydın illerinde yürütülmüş ve bu illerden toplanan örneklerde DAS-ELISA testi sonucunda CMV, CLRV, ArMV ve SLRSV virüsleri ve bunların karışık enfeksiyonları tespit edilmiştir (Belçer ve Açıkgöz 2005).

Zeytin virüslerinin tespit edilmesinde en yaygın kullanılan teşhis metotlarından biri RT-PCR yöntemidir. RT-PCR ile DNA'nın belirli bölümlerinin DNA polimeraz enzimi ve sentetik oligonükleotitler yardımı ile çok sayıda kopyası oluşturulmaktadır (Kreuzer and Massey 1996). Zeytin virüslerinin tespit edilmesinde, DAS-ELISA yönteminin duyarlılığının düşük olması nedeniyle Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan 375 örnek 9 virüse ait spesifik primerler kullanılarak, RT-PCR yöntemine göre testlenmiştir. RT-PCR çalışmalarında virüslere özgü primer çiftleri kullanılarak CLRV, ArMV, SLRSV ve CMV adlı virüslere ait DNA bantları elde edilmiştir, buna karşın OLV-1, OLV-2, OLV-3, OLYaV ve OLRV'nün spesifik primerleri ile yapılan RT-PCR çalışmalarında, ilgili etmenlere yönelik DNA bantlarının oluşumu ise gözlenmemiştir. Benzer çalışma Doğu Akdeniz Bölgesi illerinden (Hatay, Adana, Kahramanmaraş, Osmaniye) kamu fidanlığı, özel fidanlıklar ve ticari bahçelerde yürütülmüştür. Bu bahçelerden alınan örneklerde RT-PCR yöntemi ile yapılan analizler sonucunda OLV-1 ve SLRSV saptanmıştır (Ulubaş Serçe et al. 2007;

2009, Yalçın ve ark. 2007).Çalışmamızda kullandığımız primer çiftleri çeşitli araştırmalarda RT-PCR testlerinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Grieco et al. 2000, Faggioli et al. 2005).

2009 ve 2010 yılları arasında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde yürütülen bu çalışma ile, zeytinlerde enfeksiyon yapan virüsler ve bu virüslerin bulunma durumları belirlenmiştir. Araştırma süresince biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile test edilen 375 bitki örneğinde DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemi ile yapılan analizler sonucunda %55.73 oranında viral enfeksiyonlar olduğu ortaya konmuştur. Ülkemiz için ekonomik yönden önemi olan zeytin ağaçlarından alın örneklerde, virüslerin tek başlarına mevcut olmalarının yanında, bazı örneklerde karışık enfeksiyonlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde zeytin virüs hastalıklarının saptanması üzerinde fazla çalışma olmadığından ve zeytin bitkisinin virüs hastalıklarının simptomsuz taşıyıcısı olduğundan, ülkemiz fidanlıklarının ve bu fidanlıkların tesisinde kullanılan anaçların virüs hastalıkları açısından incelenmesi, hastalıklarla enfekteli olanların tespiti ve mevcut virüs hastalıklarının tanımlanması ve böylece virüs hastalıklarıyla etkili bir şekilde mücadele yoluna gidilmesi gerekmektedir.

### KAYNAKLAR

- Alabdullah A., El Beaino T., Saponari M., Hallak H. and Digiario M., 2005. Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Syria. EPP0 Bulletin, 35 (2): 249-252.
- Alabdullah A., Elbeaino T., Minafra A., Digiario M. and Martelli G.P., 2009. Detection and variability of *olive latent virus 3* in the mediterranean region. J. Plant Pathol., 91 (3): 521–525.
- Anonim 2010. <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim Tarihi: 01 Temmuz 2012)
- Anonymous 2010. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Erişim Tarihi: 05 Nisan 2012)
- Belir Ö. ve Açıkgöz S., 2005. Ege ve Marmara Bölgelerindeki zeytin fidanlıkları ve ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının Elisa testi ile saptanması. ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2(1) : 79-84.
- Bora T. ve Karaca İ., 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniv. Ziraat Fak., Yardımcı Ders Kitabı, No: 167, 43 p.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. and Zurcher E.J., 1996. `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20 th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/> (Erişim tarihi: 25 Ağustos 2012)
- Candresse T., Lanneau T., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinowsky T. and Dunez J. 1995. An Immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of apple chlorotic leafspotvirus. Acta Hort., 386: 136-147.

- Cardoso J.M.S., Felix M.R., Clara M.I.E and Oliveira S. 2005. The complete genome sequence of a new necrovirus isolated from *Olea europea* L. Archives of Virology, 150: 815-823.
- Clark M.F. and Adams A.N., 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. J. Gen. Virology, 34, 475-483.
- Clark M.F. 1981. Immunosorbent Assays in Plant Pathology. Ann. Rev. Phytopathol., 19, 83-106.
- Çağlayan K., Faggioli F. and Barba M. 2011. Viruses, phytoplasmas and diseases of unknown etiology of olive viruses. In: Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits (Eds. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann). APS Press. p. 289-297.
- Çağlayan K., Fidan U., Tarla G., and Gazel M. 2004, First report of olive viruses in Turkey. J. Plant Pathol., 86 (1): 89-90.
- Çavuşoğlu A., 1980. Ege Bölgesinin Belli Başlı Yerli ve Yabancı Zeytin Çeşitlerinin Pomolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Sonuç Raporu. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, İzmir.
- Demirci M. ve Bölükbaşı B., 2003. Akdeniz Beslenme Tarzında Zeytinyağının Önemi. Türkiye 1. Zeytinyağı ve Sofralık Zeytin Sempozyumu Bildirileri, İzmir, s. 41-48.
- Erkan S., Özaktan H., Yorgancı Ü. ve Yoltaş T. 1992. Sanayi Domatesi Tohum Örneklerinde Domates Mozaik Virüsü ve Bakteriyel Solgunluk Etmenlerinin Bulunma Durumunun Saptanması Üzerinde Araştırmalar. Sanayi Domatesi Üretimini Geliştirme Projesi (SANDOM) Yayın No: 6, s. 45-50.
- Faggioli F. and Barba M. 1995. An elongated virus isolated from olive (*Olea europaea*). Acta Hortic., 386, p. 593-599.
- Faggioli F., Ferretti L., Albanese G., Sciarroni R., Pasquini G., Lumia V. and Barba M. 2005. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. J. Plant Pathol., 87 (1): 49-55.
- Felix M.R. and Clara M.I.E. 2006. Characterization of viruses occurring on *Olea europaea* L. In: Techniques in Diagnosis of Plant Viruses (Eds. Rao G.P., Valverde A., Dovas C.I.), pp. 173-216, Studium Press, Houston, TX, USA.
- Fidan Ü. ve Ertem G. 1995. Ege Bölgesi'ndeki zeytin ağaçlarında virüs hastalıklarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi üzerinde araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Adana, s. 555.
- Foissac X., Savalle-Dumas L., Gentit P., Dulucq M.J. and Candresse T. 2001. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo, and Foveaviruses by nested RTPCR using degenerated and inosine-containing primers (PDO RT-PCR). Acta Hortic., 550: 37-44.
- Gallitelli D. and Savino V., 1985. Olive latent virus 1. A single RNA spherical virus isolated from olive in Apulia (southern Italy). Ann. Appl. Biol., 106: 295-303.

- Grieco F., Saponari M., Alkowni R, Savino V. and Martelli G.P. 2000. Molecular detection of olive viruses. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 30: 469-473.
- Kreuzer H. and Massey A. 1996, Recombinant DNA and biotechnology, A guide for students. American Society for Microbiology. Washington D.C., 542.
- MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S. and Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease, 81: 222-226.
- Marte M., Gadani F., Savino V. and Rugini E. 1986. Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in central Italy. Plant Disease, 70: 171-172.
- Martelli G.P. and Gallitelli D. 1985. Virus diseases of olive. Italia Agricola 122: 150-156.
- Martelli G.P. 1999. Infectious diseases and certification of olive: An overview. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 29: 127-133.
- Matthews R.E.F. 1991. Plant Virology, 3<sup>rd</sup> ed., Acad. Pres, New York, 897 p.
- Merciega V., Boscia D. and Savino V. 1996. Comparison of five isolates of Olive latent virus 1. Pytopathol. Mediterr., 35: 1-8.
- Nogay A. 1983. Marmara bölgesi Cucurbitaceae familyası kültür bitkilerinde görülen virüs hastalıklarının tanılanması, tohumla geçiş durumlarının ve konukçu dizilerinin saptanması üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üni. Fen Bil. Ens., İzmir, 120 s.
- Öztürk F. 2008. Türkiye’de ve Dünyada Zeytincilik Sektörü. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, Bilgisayar Kayıtları “Basılmamış” (İzmir-2008).
- Sabanadzovic S., Abou G.N., Notte P., Savino V., Scarito G. and Martelli G.P. 1999. Partial molecular characterisation and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. J. Plant Pathol., 81: 37-45.
- Savino V., Barba M., Gallitelli D. and Martelli G.P. 1979. Two nepoviruses isolated from olive in Italy. Pytopathol. Mediterr., 18: 135-142.
- Savino V. and Gallitelli D. 1981. Cherry leafroll virus in olive. Pytopathol. Mediterr., 20: 202-203.
- Savino V. and Gallitelli D. 1983. Isolation of *cucumber mosaic virus* from olive in Italy. Pytopathol. Mediterr., 22: 76-77.
- Savino V., Gallitelli D. and Barba M. 1983. Olive latent ringspot virus, a newly recognized virus infecting olive in Italy. Ann. Appl. Biol., 103: 243-249.
- Savino V., Sabanadzovic S., Scarito G., Laviola C. and Martelli G.P. 1996. Two olive yellows of possible origin in Sicily. Informatore Fitopatologico, 46 (5): 55-59.
- Tarla G. ve Çağlayan K. 1998. Hatay yöresinde yetişen zeytin ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının serolojik olarak saptanması. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Ankara, s. 239-243.
- Triolo E., Materazzi A. and Toni S. 1996. An isolate of Tobacco mosaic tobamovirus from *Olea europaea*. Advances in Horticultural Science, 10: 39-45.

- Ulubaş Serçe Ç., Yalçın S., Gazel M., Çağlayan K. and Faggioli F. 2007. First report of *Olive latent virus-1* from olive trees in Turkey. *J. Plant Pathol.*, 89 (3):73.
- Ulubaş Serçe Ç., Yalçın S., Gazel M. ve Çağlayan K. 2009. Doğu Akdeniz Bölgesi zeytin ağaçlarında *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)'ün saptanması ve karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, s.174.
- Valverde K.A., Nameth S.T. and Jordan R.L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74: 255-258.
- Yalçın S., Ulubaş Serçe Ç., Çağlayan K. ve Gazel M. 2007. Doğu Akdeniz Bölgesi zeytin ağaçlarındaki virüslerin RT-PCR ile belirlenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, s. 307.
- Yorgancı Ü. 1975. İzmir ilinde domateslerdeki virüs hastalıkları yayılma ve zarar durumları, elde edilen izolatlarla biyolojik ve serolojik araştırmalar. E.Ü. Ziraat Fakültesi Fitopatoloji ve Ziraat Botanik Kürsüsü, Bornova, 102 s.
- Youssef S.A., Moawed S.M., El-Sayed M. and Shalaby A.A. 2010. Detection of olive tree viruses in Egypt by one-step RT-PCR. 21<sup>st</sup> International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 427 p.