

The Comparison of Sensitivity of Various Methods in The Detection of Olive Tree Viruses

Serpil ERİLMEZ¹ Semih ERKAN²

¹Bornova Zirai Mücadele Araştırma İstasyonu, İzmir/ TÜRKİYE,

²Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, İzmir/ TÜRKİYE

Corresponding author email:serpiltok@hotmail.com

Accepted for publication 5 May 2016

ABSTRACT

To compare the sensitivity of different methods used to detect the agents of viral diseases in olive trees, totally 375 samples of leaves, fruits and flowers were collected from olive trees in Aydın, Balıkesir and İzmir provinces and for further studies, 27 samples were selected from 375 ones as a one representative sample from each of counties in these provinces. The existence of 9 viral agents in these samples was checked by RT-PCR while the detection of 4 viruses was done with DAS-ELISA. When the juice from the samples was inoculated to certain test plants, they did not produce any symptoms. It was found that all samples were infected with the any of viruses entitled *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leafroll virus* (CLRV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) and *Cucumis mosaic virus* (CMV) by RT-PCR while ArMV was present in only 5 samples in DAS-ELISA. Moreover, all samples in this study were free from *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) by RT-PCR. The results of RT-PCR showed that the samples from 3 trees having virus-like symptoms were infected with a virus and on the contrary, 24 samples from the trees which were determined to be infected with viruses did not demonstrated any virus symptoms. In conclusion, it was concluded that RT-PCR was the most sensitive method in the detection of the viruses in olive trees at this moment and has the potential usage on the applications of quarantine and certification programs in safety.

Keywords: Olive, virus, detection methods, RT-PCR, DAS-ELISA

ÖZET

Zeytin Ağaçlarındaki Virüs Hastalıklarının Tanılanmasında Kullanılan Değişik Yöntemlerin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması

Zeytin ağaçlarındaki viral hastalık etmenlerin tanılanmasında kullanılan farklı yöntemlerin duyarlılık durumlarının karşılaştırılması amacıyla, Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden zeytin ağaçlarından üzerinde yaprak, meyve ve çiçek bulunan 375 adet genç sürgün örneği toplanmıştır. Bu örneklerden adı geçen 3 ildeki her ilçeyi temsil edecek şekilde 27 örnek daha sonra yürütülecek çalışmalar için seçilmiştir. Bu örneklerde 9 virüsün bulunma durumu RT-PCR ve 4 virüsün varlığı ise DAS-ELISA yöntemleriyle araştırılmıştır. Seçilen örneklerden elde edilen ekstraktlar bazı test bitkilerine inokule edildiklerinde, bu bitkilerde herhangi bir belirtinin oluşmadığı görülmüştür. RT-PCR çalışmalarında, tüm örneklerin *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), *Cherry leafroll nepovirus* (CLRV), *Strawberry latent ringspot nepovirus* (SLRSV) ve *Cucumis mosaic cucumovirus* (CMV) adlı virüslerin birisi ile enfekteli oldukları belirlenmiş ve DAS-ELISA testlerinde ise yalnızca 5 örnekte ArMV enfeksiyonu olduğu bulunmuştur. Buna ilave olarak, tüm örneklerde *Olive latent-1 virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Olive latent-3 virus*

THE COMPARISON OF SENSITIVITY OF VARIOUS METHODS IN THE DETECTION OF OLIVE TREE VIRUSES

(OLV-3), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) ve *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) adlı virüslerin olmadığı RT-PCR ile saptanmıştır. Ayrıca; RT-PCR sonuçlarına göre, virüs benzeri belirtiler taşıyan 3 ağaçtan alınan örneklerin bir virüs ile enfekteli olduğu ve buna karşılık, virüs enfeksiyonu olduğu belirlenen 24 ağaca ait örneklerin ise herhangi bir virüs belirtisi taşımadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, zeytin ağaçlarındaki virüslerin tanınmasında en duyarlı yöntemin şu anda RT-PCR olduğu ve bu yöntemin karantina ve sertifikasyon uygulamalarında güvenli biçimde kullanım potansiyeline sahip olduğunu söylemek mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Zeytin, virüs, tanılama yöntemi, RT-PCR, DAS-ELISA

GİRİŞ

Dünyadaki üretiminin büyük bir kısmının Akdeniz havzasındaki ülkelerde yapıldığı zeytin, Türkiye ekonomisinde de önemli yeri olan bir meyve türüdür. Zeytin *Oleaceae* familyasında *Olea europae* L. türünün *Olea europae* 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, ekonomik olarak dünyanın her yerinde yetişmesi mümkün olmayan bir meyvedir. 30⁰–40⁰ enlemler arasında, %98'i Kuzey Yarımküre'de, dünyada 37 ülkede ekonomik anlamda zeytin üretimi yapılmaktadır. 9.8 milyon hektarlık dünya zeytin üretim alanının %95'i kuzeyde Akdeniz bölgesinde yer almaktadır. 2013 yılı istatistiklerine göre; yaklaşık 20.6 milyon ton olan dünya dane zeytin üretiminin % 98'lik kısmı Akdeniz Bölgesi'ne kıyaslı olan İspanya, Yunanistan, İtalya, Türkiye, Mısır, Cezayir, Suriye, Fas, ve Arjantin gibi önemli üretici ülkelerden elde edilmektedir. Türkiye bu ülkeler içerisinde gerek üretim ve gerekse zeytin alanı bakımından yıllara göre değişimle birlikte genellikle 4. sırada yer almaktadır (FAOSTAT, 2013).

Türkiye'de 1.676. 000 ton zeytin üretilmekte olup, üretimin % 45'i Ege, % 26'sı Marmara, % 27'si Akdeniz ve % 2'si Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yapılmaktadır (TÜİK, 2013).

Ülkemiz zeytin yetiştiriciliği gelişmiş olan ülkelerle karşılaştırıldığında, daha geleneksel bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Bu yapının bir uzantısı olarak, kültürel uygulamaların yeterince ve zamanında gerçekleştirilmemesi nedeniyle, ürün verimi ve kalitesinde azalmalar görülmekte, zeytinin genetik yapısında mevcut olan ve yıllara göre değişen ürün miktarı da (periyodisitenin), bu şartlardan olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu faktörler zeytinde verim, kalite ve karlılık artışını sınırlamaktadır.

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 bitkideki özellikle virüs hastalıklarının incelenmesini önemli hale getirmektedir. Virüs, viroid ve fitoplazma gibi etmenlerin yol açtığı hastalıklar ağaçların zayıflamasına, ölümüne, ürünün kalite ve miktarının düşmesine, aşı tutma ve köklenme oranında azalmalara neden olabilmektedir (Candresse *et al.*, 1995).

Zeytin ağaçları birçok virüs ve virüs benzeri etmeden etkilenmektedir. Dünyada bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda, 9 cinse ait 15 farklı virüsün zeytin ağaçlarının konukçusu olduğu saptanmıştır. Zeytinde tespit edilen 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* (OYVaV, 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 semilata 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 (Fidan ve Ertem, 1995; Tarla ve Çağlayan, 1998; Martelli, 1999; Çağlayan et al., 2004; Ulubaş Serçe et al., 2007; Ulubaş Serçe ve ark. 2009; Cardoso et al., 2005; Felix and Clara, 2006; Alabdullah et al., 2009; Çağlayan et al., 2011; Erilmez ve Erkan, 2014).

Arazide gözlenen semptomlar birçok bitki türünde virüs enfeksiyonu olabileceği konusunda ilk ipucunu vermektedir. Ancak, zeytin virüs hastalıkları için bunu söylemek pek mümkün değildir. Çünkü, zeytin virüsleri az sayıdaki çeşitte tipik belirtiler verirken (cv. Ascolana tenera), genellikle diğer çeşitlerde latent olarak bulunmaktadır. En önemli konulardan birisi ise zeytinde hastalık oluşturan virüslerin üretim materyali ile taşınabilmesidir. Zeytin yetiştiriciliğinde virüsten arı temiz üretim materyalinin kullanılması, bu taşınmadan dolayı çok önemlidir. Viral hastalıklardan temiz zeytin üretim materyalinin elde edilebilmesi öncelikle zeytinde görülen virüs hastalıklarının en uygun yöntem ile tanılanabilmesine bağlıdır.

Ağaçtaki virüs konsantrasyonunun çok düşük olması ve zeytindeki inhibitör maddelerin yoğunluğu sebebiyle, son yıllarda DAS-ELISA yönteminin zeytin virüslerinin rutin ve duyarlı teşhislerinde, uygun bir tespit olmadığı pek çok çalışmada belirtilmiş ve zeytin virüslerinin teşhis çalışmalarının moleküler tekniklerle doğrulanması gerektiği vurgulanmıştır (Triolo et al., 1996; EPP0, 2006).

Virüs hastalıklarından korunmada en önemli yol sağlıklı ve temiz üretim materyali kullanılmasıdır. Bitkilerde bulunan virüslerin belirlenmesi bu hastalıklara karşı alınabilecek önlemlerin temelini oluşturmaktadır. Bu düşünceden hareketle, bu çalışma ile zeytin ağaçlarında enfeksiyon oluşturan SLRSV, ArMV, CLRV, CMV, OLRSV, OLV-1, OLV-2 ve OLYaV, OLV-3 adlı virüslerin saptanabilmesi için semptomatoloji, test bitkilerine inokulasyon, DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerinden yararlanılmıştır. Ayrıca, sözü edilen yöntemlerin virüsleri saptamadaki başarı oranları değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

MATERYAL

Çalışmanın ana materyalini; Aydın, Balıkesir ve İzmir illeri zeytin üretim alanlarından alınan yaprak, meyve ve çiçek taşıyan genç zeytin sürgün örnekleri, test bitkileri (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn, *Chenopodium quinoa* Quin, *Datura stramonium* L., *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun, Xanthi, Maden), zeytin virüslerine ait ELISA tanı kitleri (Bioreba AG, Reinach, Switzerland), primerler ve moleküler test çalışmalarında kullanılan sarf malzemeler ve cihazları oluşturmuştur.

METOT

Örneklerin alınması

Yaprak-sürgün örneklerini almak için, illere göre zeytin vejetasyon dönemi ve çeşitler dikkate alınarak 2010 ve 2011 yıllarında Nisan sonu ile Haziran ayları arasında araziye çıkılmıştır. İzmir ilinden 136, Aydın ilinden 157 ve Balıkesir ilinden 82 olmak üzere toplam 375 örnek toplanmıştır. Tanılama yöntemlerinin duyarlılığını karşılaştırmak için, bu örneklerden her 3 ilde örnekleme yapılan ilçeleri temsil edecek şekilde bir adet olmak üzere 27 örnek seçilmiştir. Örnekleme esnasında öncelikle belirti gösteren ağaçlar seçilmiş (bodurlaşma, çalılışma, sürgünlerde boğum aralarının kısılması, dallarda yassılaşıma, deformasyonlar, yapraklarda nekrotik ve klorotik lekeler, orak şeklinde yaprak oluşumu, yaprak uçlarında çatallanma, yapraklarda yukarıya doğru kıvrılma, meyvelerde deformasyon gibi belirtiler) ve virüslerin latent olarak bulunabildikleri göz önüne alınarak semptomsuz ağaçlar da tesadüfi olarak belirlenmiştir (Bora ve Karaca., 1970). Her ağacın dört yanından yaprak örnekleri ve üzerinde yaprak, çiçek ya da meyve bulunan 20-25 cm boyundaki sürgünler kesilerek alınmıştır. Alınan sürgünler, etiketlenerek plastik torbalara yerleştirilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler analizleri yapıncaya kadar +4°C de,

THE COMPARISON OF SENSITIVITY OF VARIOUS METHODS IN
THE DETECTION OF OLIVE TREE VIRUSES

moleküler çalışmalarda kullanılacak materyal ise-80°C'de saklanmıştır. Gezilen ve örnek alınan zeytin bahçelerine ait bilgiler (yeri, mevkii) ile ağaçlarda gözlenen belirtiler kaydedilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

Biyolojik Testler

Mekanik inokulasyon çalışmalarında otsu test (indikatör) bitkilerinden, *Chenopodium amaranticolor* Coste&Reyn. (6 yapraklı devre), *C. quinoa* Quin. (6 yapraklı devre), *Datura stramonium* L. (2 yapraklı devre), *Gomphrena globosa* L. (4-8 yapraklı devre), *Nicotiana glutinosa* L. (4 yapraklı devre), *N. tabacum* L. cv. Samsun (4 yapraklı devre), *N. tabacum* L. Cv. Xanthi (4 yapraklı devre), *N. tabacum* L. cv. Maden (4 yapraklı devre) kullanılmıştır (Marte et al., 1986). Biyolojik testler için kullanılan test bitkileri iklim odasında yetiştirilmiştir. Yetiştirme ortamı olarak kullanılan harç toprak, gübre ve kum (1:1:1) 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). Test bitkileri uygun gelişme dönemlerine ulaştıkları zaman yaprak örneklerinden %0.1 sodyum sülfid içeren 0,01 M fosfat tamponu (pH=7.0) kullanılarak (1/5; g/v) hazırlanan ekstraktlar, test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule edilmiştir. İnokulumun içine enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırmak amacı ile celite ilave edilmiş ve cam spatül inokulasyon yardımıyla yapılmıştır. İnokulasyondan 1-2 dakika sonra test bitkilerinin yaprakları çeşme suyu ile yıkanmıştır. İnokulasyondan sonra, test bitkilerinde belirti oluşup oluşmadığı periyodik olarak gözlemlenmiş ve oluşan belirti tipleri değerlendirilerek, fotoğrafları çekilmiş ve kaydedilmiştir (Yorgancı, 1975; Savino and Gallitelli, 1981; Nogay, 1983; Matthews, 1991).

Serolojik test yöntemi (DAS-ELISA)

Viral etmenlerin belirlenmesi amacı ile zeytin ağaçlarından toplanan örneklere, DAS-ELISA testi uygulanmıştır. Toplam 27 adet zeytin örneği, Çizelge 1'de gösterilen viral etmenler açısından DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

Çizelge 1. Zeytin sürgün ve fidan örneklerinde serolojik ve moleküler yöntemler ile testlenen viral etmenler

Viral Etmenler	Akronim	Test Yöntemi	
		DAS-ELISA	RT-PCR
<i>Cherry leafroll nepovirus</i>	CLRV	+	+
<i>Arabis mosaic nepovirus</i>	ArMV	+	+
<i>Strawberry latent ringspot sadwavirus</i>	SLRSV	+	+
<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>	CMV	+	+
<i>Olive latent-1 necrovirus</i>	OLV-1	-	+
<i>Olive latent-2 oleavirus</i>	OLV-2	-	+
<i>Olive latent ringspot nepovirus</i>	OLRSV	-	+
<i>Olive leaf yellowing associated closterovirus</i>	OLYaV	-	+
<i>Olive latent-3 tymovirus</i>	OLV-3	-	+

+: DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemi ile testlenen etmenler -: DAS-ELISA yöntemi ile testlenemeyen etmenler

DAS-ELISA testlerinin uygulanması Clark ve Adams (1977) ve Erkan ve ark. (1995)'a göre yapılmıştır. Buna göre ELISA tabaklarının her bir çukuruna kaplama tamponunda 1:1000 oranında seyreltilmiş olan IgG'den 200 µl eklenerek 37°C'de 4 saat inkube edilmiştir. Ardından, ELISA tabakları yıkama tamponu ile yıkanarak 3 dakika beklenmiş ve bu işlem 4 kez tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu ile 1/10 (g/ml) oranında seyreltilerek hazırlanan sürgün+yaprak örnekleri, pozitif ve negatif kontrollerin her bir çukura 200 µl olacak miktarda eklenerek 4°C'de bir gece inkube edilmesinden sonra, yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra ise konjuge edilmiş IgG, konjugat tamponu içerisinde 1:1000 oranında seyreltilip her bir çukura 200 µl eklenerek 37 °C'de 4 saat inkube edilmiş, aynı şekilde yıkama yapılmış ve substrat çözeltisine 1mg/ml olacak şekilde substrat her bir çukura 200 µl konularak oda sıcaklığında inkube edilmiştir. Sonuçlar ELISA reader cihazı ile

405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir (Erkan ve ark., 1995). Kontrolün absorbans değerinin 2 katı ve daha üstünde olan örnekler enfekteli olarak değerlendirilmiştir.

Moleküler Test Yöntemi (RT-PCR)

DAS-ELISA testi sonucunda virüs(ler) ile enfekteli oldukları belirlenen örnekler ile virüs enfeksiyonu olmadığı tespit edilen örnekler, RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Bu örneklerden, 0.5 g yaprak, 0.5 g sürgünden kazıma yapılmış ve sıvı azotla muamele edilmiştir. Eppendorf tüpler içinde toz haline getirilen doku parçaları, RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuya konmuştur (Faggioli et al., 2005).

Her izolat için yaklaşık 0,2 g örnek (yaprak+sürgün kazıma) 10 ml % 1 mercapto-ethanol içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi varlığında steril örnek ezme poşetleri içinde homojenize edilmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70 °C 10 dakika inkube edildikten sonra, 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 300 µl alınarak, yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 µl ethanol, 300 µl 6M NaI, 50 µl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvı atılmış tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için, 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 6000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. 70°C'de 4 dakika ısıtıcıda inkube edilen tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 145µl alınarak, yeni tüplere aktarılmış ve TNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve PCR uygulamaları yapılmaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac et al., 2001).

TNA ekstraksiyonu yapılmış olan örnekler komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda kullanılarak cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre ilk olarak eppendorf tüplerin içerisine 0,1–5 µg total RNA, 1 µl oligo (dT) primer konulmuş ve DEPC su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. 65°C'de 5 dakika inkubasyonun ardından, tüpler buz üzerine bırakılmış ve içlerine sırasıyla 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl Ribolock Ribonuclease inhibitor, 2 µl 10mM dNTP mix eklenmiştir. Kısa süreli santrifüj (3-5 saniye) uygulandıktan sonra 25°C'de 5 dakika inkubasyona bırakılmış ve tüplerin içine 1 M-MLV 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.

PCR işlemi Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 50 µl hacimde yapılmıştır. Çizelge 2'de verilen spesifik primerler ile RT-PCR testleri gerçekleştirilmiştir. Steril PCR tüplerine 25 µl 2x PCR master mix, 1 µl primer1, 1 µl primer 2, 2 µl cDNA ve 21 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program kullanılmıştır (Candresse et al., 1995). Tüm işlemler boyunca kontaminasyon olasılığını önlemek için eldiven kullanılmıştır. Ayrıca, nükleik asit eklemekten sadece karışımın yer aldığı bir tüpte (kontrol), PCR programında çoğaltma işlemine alınmıştır. Son olarak, PCR cihazında çoğaltılan ürünler 100 V'da 60 dk süreyle elektroforeze tabi tutulmuş ve ethidium bromide ile boyanarak ETX-20.M marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kaydedilmiştir.

THE COMPARISON OF SENSITIVITY OF VARIOUS METHODS IN
THE DETECTION OF OLIVE TREE VIRUSES

Çizelge 2. RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve sıcaklık döngüleri

Hedef Virüs / Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	PCR Döngüleri
ArMV-5A	TACTATAAGAAACCGCTCCC	302 bp	1 X (95°C 3 dk.)
ArMV-3A	CATCAAAACTCATAACCCAC (Grieco et al., 2000)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
CMV-CPN5	ACTCTTAACCACCCAACCTT	280 bp	1 X (95°C 3 dk.)
CMV-CPN3	AACATAGCAGAGATGGCGG (Faggioli et al., 2005)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
SLRSV-5D	CCCTTGGTACTTTTACCTCCTCATTGTCC	293 bp	1 X (95°C 3 dk.)
SLRSV-3D	AGGCTCAAGAAAACACAC (Faggioli et al., 2005)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
CLRV-5	TGGCGACCGTGTAACGGCA	416 bp	1 X (95°C 3 dk.)
CLRV-3	GTCGAAAAGATTACGTAAGG (Faggioli et al., 2005)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLRSV-R1	GATTGCCAAGGAATATGCTG	356 bp	1 X (95°C 3 dk.)
OLRSV-R2	CTCCCAACAAATGATTGCTG (Faggioli et al., 2005)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLYaV-F	GGGACGGTTACGGTCGAGAGG	383 bp	1 X (95°C 3 dk.)
OLYaV-R	CGAAGAGAGCGGCTGAAGGCTC (Sabanadzovic et al., 1999)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV1-HA	ACACAGAAATCATAAGTGCC	299 bp	1 X (95°C 3 dk.)
OLV1-CA	CCATAGCACCATCATACC (Faggioli et al., 2005)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV2-H	GAAGGTGGCTCGCCTAGAG	206 bp	1 X (95°C 3 dk.)
OLV2-C	GCCAGGAGTTGAGCTTTG (Faggioli et al., 2005)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV3-F	CCCGTTGAGCAAGTTGTCTTCC	176 bp	1 X (94°C 2 dk.)
OLV3-R	GCAGTGGCTGGAGAGCATGGAG (Alabdullah et al., 2009)		35 X (94°C 30sn. / 58 °C 45sn. / 72°C 20 sn) 1 X (72°C 5dk.)

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, değişik örneklerle ait test sonuçları dikkate alınarak uygulanan 3 farklı virüs tanılama yöntemleri arasında karşılaştırma yapılmıştır. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden örnekleme yapılan ilçelerden temsili olarak birer örnek seçilmiş ve bu örnekler üzerinden virüs tanılama yöntemlerinin karşılaştırılması sonuçları ve başarı oranları Çizelge 3’de verilmiştir. Surveyler sırasında incelenen ağaçlarda ve alınan bitki örneklerinde, bazı viral enfeksiyonların olabileceği şüphesi gösteren yapraklarda şekil bozulmaları, orak yaprak oluşumu, yapraklarda renk değişimi, mozaik, meyvelerde şekil bozukluğu ile ağaçlarda zayıf sürgün oluşumu, çalılışma vb. belirtiler olduğu gözlenmiştir (Şekil 1,2 ve 3). 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. Simptomatolojik olarak herhangi bir belirti göstermeyen ve görünüşte sağlıklı olarak değerlendirilen zeytin örneklerinde de virüs enfeksiyonlarının olabileceği, yapılan laboratuvar analizleri sonucunda görülmüştür. Çizelge 3’de görüldüğü üzere analizi yapılan 27 örneğin 3’ünde belirti gözlenmiş ve viral etmen saptanmıştır. 24 örnekte ise hiçbir belirti gözlenmemekle birlikte, hepsinde virüs enfeksiyonu olduğu tespit edilmiştir. 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 birçoğunun hiç semptom göstermeyen ağaçlardan saptandığı belirtilmektedir. 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 belirti gösteren zayıf gelişmesi olan ağaçlarda saptanırken, aynı zamanda hiçbir simptom vermeyen ağaçlarda da belirlenmiştir. CLRV (Savino and Gallitelli, 1981) ve CMV (Savino and Gallitelli, 1983) görünüşte tamamen simptomsuz ağaçlardan saptanırken, TMV (cv. Leccino çeşidinde) damar bantlaşması ve çökme belirtisi gösteren ağaçlardan saptanmıştır (Triolo et al., 1996).



Şekil 1. Yapraklarda şekil bozulmaları ve orak yaprak oluşumu



Şekil 2. Yapraklarda mozaik ve sararma



Şekil 3. Meyvelerde şekil bozukluğu

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

THE COMPARISON OF SENSITIVITY OF VARIOUS METHODS IN
THE DETECTION OF OLIVE TREE VIRUSES

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 (Çizelge 3). 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, zeytin özsuyunda bulunan inhibitörlerin, virüsün enfekte etme özelliğini engellemesi şeklinde açıklanmaktadır (Alabdullah et al., 2005).

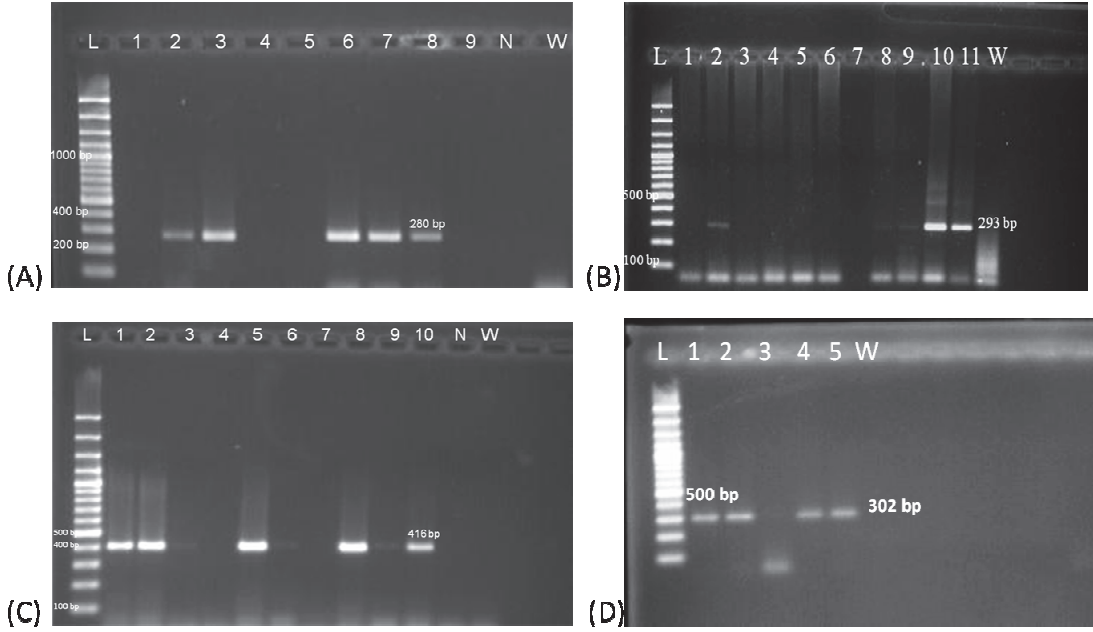
Çizelge 3. Virüs tanılama yöntemlerinin karşılaştırılmalı sonuçları

No	Örnek No.	RT-PCR	DAS-ELISA	Test Bitkilerine Inokulasyon	Simptomatoloji
1	Bozdoğan 9	+(CLRV)	-	-	-
2	Çine 10	+(SLRSV)	-	-	-
3	Merkez 29	+(CMV+CLRV)	-	-	X
4	Koçarlı 4	+(CMV)	-	-	-
5	Sultanhisar 15	+(ArMV)	+(ArMV)	-	-
6	Germencik 9	+(ArMV)	+(ArMV)	-	-
7	Söke 9	+(CMV)	-	-	-
8	Karpuzlu 3	+(SLRSV)	-	-	-
9	Karacasu 6	+(CMV)	-	-	-
10	Köşk 7	+(CMV)	-	-	-
11	Kuyucak 4	+(SLRSV)	-	-	-
12	Nazilli 3	+(CLRV)	-	-	-
13	Edremit 4	+(CLRV)	-	-	-
14	Burhaniye 5	+(SLRSV)	-	-	-
15	Ayvalık 3	+(CLRV)	-	-	X
16	Gömeç 5	+(CLRV)	-	-	-
17	Havran 1	+(ArMV)	-	-	-
18	Erdek 15	+(SLRSV)	-	-	-
19	Bayındır 5	+(CMV)	-	-	-
20	Kemalpaşa 1	+(ArMV)	-	-	-
21	Torbalı 15	+(ArMV)	+(ArMV)	-	-
22	Selçuk 6	+(CMV)	-	-	-
23	Bergama 15	+(SLRSV)	-	-	-
24	Tire 21	+(CLRV)	-	-	X
25	Ödemiş 9	+(ArMV)	-	-	-
24	Seferihisar 2	+(ArMV)	+(ArMV)	-	-
27	Karaburun 10	+(ArMV)	+(ArMV)	-	-
Viral Enfeksiyonları		27/27	5/27	0/27	3/27
Saptama Oranları		(% 100.00)	(% 18.51)	(% 0.00)	(% 11.11)

+: Viral enfeksiyon tespit edilen örnek X: Belirti gösteren örnek (Yapraklarda renk değişimleri)

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 yapılan DAS-ELISA testi sonucunda, 27 örneğin yalnızca 5'inde ArMV enfeksiyonu saptanmıştır. RT-PCR analizleri sonucunda ise, ArMV, CLRV, SLRSV ve CMV ile enfekteli olarak tespit edilmiştir ve yöntem tanılamada %100 oranında bir başarı sağlamıştır.(Çizelge 3; Şekil 4). Testlenen örneklerde OLV-1, OLV-2, OLV-3 enfeksiyonu tespit edilememiştir. Zeytin ağaçlarında SLRSV, CMV, CLRV ve ArMV gibi virüsler, Portekiz ve İtalya'da DAS-ELISA yöntemi ile başarılı bir şekilde saptanırken, İtalya'da bu

yöntemden başarılı sonuçlar alınmamıştır. Zeytin dokularından kısmen artırılmış ekstraktlarda TMV DAS-ELISA ile tespit edilmiş, ancak klasik DAS-ELISA tekniğinin zeytin virüslerinin rutin ve hassas teşhislerinde örnekteki virüs konsantrasyonu çok düşük olduğu için, uygun bir teknik olmadığını belirtmişlerdir (Triolo et al.,1996). Son olarak uygun antiserum (tanı kiti) sayısının az olması nedeniyle DAS-ELISA yönteminin zeytinde saptanan virüslerin çoğu için uygulanma durumu pek fazla olmamaktadır. Ayrıca, fenolik madde içeriği yüksek olan zeytin dokularının DAS-ELISA ile test edilmesinin güvenilir bulunmadığı belirtilerek, testlemelerde dsRNA ve PCR gibi moleküler yöntemlerin kullanılması gerekliliği ifade edilmektedir (Henriques et al., 1992; Rei et al., 1993; Félix et al., 2002; Bertolini et al., 1998 ; Martelli, 1999; Martelli et al., 1996; Grieco et al., 2000; Faggioli et al., 2005; Bertolini et al., 2001) .



Şekil 4. Zeytin örneklerine uygulanan bazı PCR testlerinin jel görüntüleme cihazında çekilmiş fotoğrafları (A) CMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (B) SLRSV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (C) CLRV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü (D) ArMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü

Sonuç olarak, çalışmanın yürütüldüğü üç ilde, Çizelge 3’de görülen ilçeleri temsil edecek şekilde her ilçeden birer örnek alınarak, toplam 27 örnekte kullanılan tanılama yöntemlerinin duyarlılığı ve güvenilirliği karşılaştırılmıştır. Değişik örneklerin deneme sonuçlarından baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda, tanılama yöntemleri arasında RT-PCR yöntemi, zeytin örneklerinin tanılanmasında duyarlılık ve güvenilirlik bakımından daha başarılı bulunmuştur. RT-PCR sonucunda enfekteli çıkan 27 adet örnekte DAS-ELISA testi sonucuna göre yalnızca % 18.51 oranında enfeksiyon olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerin test bitkilerine inokulasyonu sonucunda beklenen belirtiler elde edilmemiştir. Bu durum zeytinde bulunan virüslerin düşük konsantrasyonda bulunması nedeniyle yeterli miktarda partikülün test bitkisine ulaşamadığı, bitki içerisinde virüslerin düzensiz dağılımı ve zeytin öz suyunda bulunan inhibitörlerin, virüsün enfekte etme özelliğini engellemesi şeklinde açıklanmaktadır (Alabdullah et al., 2005).

Ele alınan 27 örneğin 3 tanesinde simptom belirlenmiş ve RT-PCR sonucunda virüs enfeksiyonu olduğu ortaya konmuştur. Viral enfeksiyon belirlenen 24 örnekte virüs benzeri belirtiyeye rastlanmamıştır. Birçok bitki türünde simptomlar virüs enfeksiyonlarının varlığı konusunda ilk kanıtı vermektedir. Yalnız zeytin için bunu söylemek pek mümkün değildir. Doğal enfeksiyonların çoğu simptomsuz (latent) olduğu ya da bu virüslerin belirli

THE COMPARISON OF SENSITIVITY OF VARIOUS METHODS IN
THE DETECTION OF OLIVE TREE VIRUSES

çeşitlerde simptom verirken başka çeşitlerde latent olarak bulunduğu belirtilmektedir (Martelli, 1999). Bu çalışma kapsamında alınan örneklerde bulunan virüslerle belirtiler arasında tam bir bağlantı kurulamamıştır. Alınan çoğu örnekte belirti olmamasına rağmen, diğer analizler sonunda çoğunda virüs saptanmıştır. zeytin virüslerinin teşhisinde güvenilir olmadığı belirtilerek, testlemelerde dsRNA ve PCR gibi moleküler yöntemlerin kullanılması gerekliliği, çeşitli araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir. Yapılan bu çalışma ile RT-PCR'in DAS-ELISA yönteminden daha güvenilir ve etkili olduğu bir kez daha belirlenmiştir. Bu sonuçlar, zeytin ağaçlarında viral etmenlerin saptanmasında, DAS-ELISA yönteminin yeterli olmadığını ve daha hassas bir yöntem olan RT-PCR kullanılması gerekliliğini bir kez daha ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın TAGEM-BS-06/04-04/02-09 no'lu projesi olarak yürütülmesinde verdikleri destek ve katkılar için T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne ve Bornova Zirai Mücadele Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Alabdullah, A., El Beaino, T., Saponari, M., Hallak, H. and Digiario, M., 2005. Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Syria. *EPPO 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. *Journal of Plant Pathology* 91 (3): 521-525.
- Bertolini, E., Fadda, Z., Garcia, F., Celada, B., Olmos, A., Gorris, M. T., Del Rio, C., Caballero, J., Duran-Vila, N. and Cambra, M., 1998. Virus diseases of olive detected in Spain. New diagnostic methods. *Phytoma España* 102: 191-193.
- Bertolini, E., Olmos, A., Gorris, M.T., Martinez, M.C. and Cambra, M., 2001, Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol. Methods* 96: 33-41.
- Bora, T. ve Karaca, İ., 1970, Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi, E.Ü. Zir. Fak. Yardımcı Ders Kitabı. No: 167. Bornova 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: 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/> (Erişim tarihi: 25 Ağustos 2012).
- Çağlayan, K., U. Fidan, G. Tarla, and M. Gazel, 2004. First report of olive viruses in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 86 (1): 89-90.
- 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.
- Candresse, T., Lanneau, 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.
- Cardoso, J.M.S., Felix, M.R., Clara, M.I.E and Oliveira, S., 2005. The complete genome sequence of a new necro virus isolated from *Olea europea* L. *Archives of Virology*. 150: 815-823.
- Çavuşoğlu, A., 1980, Ege Bölgesinin Belli Başlı Yerli ve Yabancı Zeytin Çeşitlerinin Pomolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Sonuç Raporu. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, İzmir.
- Clark, M.F. and Adams, A.N., 1977, Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- Erilmez, S. ve Erkan, S., 2014. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde zeytin ağaçlarındaki viral hastalık etmenlerinin tanınması ve bulunma durumlarının belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 54 (1): 45-67.

- Erkan, S., M. Gümüş, H. Türküsay ve İ. Duman, 1995. Sanayi Domatesi Çeşitlerine Ait Tohum Örneklerinde Tohum Kaynaklı Bazı Hastalık Etmenlerinin Bulunma Durumunun Saptanması Üzerinde Araştırmalar.
- 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. *Journal of Plant Pathology*, 87 (1): 49-55.
- Faostat, 2013. Food and Agriculture Organization Statistics Division. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Erişim Tarihi: 05 Nisan 2015).
- Felix, M.R.F., Clara, M.I.E., Leitao, F.A. and Fernandes Serrano, J.M., 2002, Virus incidence in four *Olea europaea* cultivars evaluated by mechanical inoculation and immunological assays. Proceedings of 4th International Symposium on Olive Growing. *Acta Horticulturae* 586 (2): 721-723.
- Felix, M.R. and Clara, M.I.E., 2006. Characterization of viruses occurring on *Olea europaea* L. In: Rao G.P., Valverde A., Dovas C.I. (eds). *Techniques in Diagnosis of Plant Viruses*, pp. 173-216. Studium Press, Houston, TX, USA.
- Fidan ve Ertem., 1995. Ege yöresindeki zeytin ağaçlarında virus hastalıklarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi üzerinde araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül 1995: 378-380, Adana.
- 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 RT-PCR using degenerated and inosine-containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 550: 37-44.
- 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.
- Henriques, M.I.C., Rei, F.T., Leitão, F.A., Serrano, J.F. and Potes, M.F., 1992, Virus diseases in *Olea europaea* L. cultivars. I. Immunodiagnosis of Strawberry latent ring spot nepovirus. *Phytopathologia Mediterranea* 31: 127-132. 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., Yılmaz, M.A., Savino, V., Baloğlu, S., Grieco, F., Güldür, M.E., Greco, N. and Laforteza, R., 1996, Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a new necrovirus. *Eur. J. Plant Path.* 102: 527-536.
- 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*, 3rd ed., Acad. Pres, New York, 897 pp.
- Nogay, A., 1983, Marmara Bölgesi *Cucurbitaceae* Familyası Kültür Bitkilerinde Görülen Virüs Hastalıklarının Tanılanması, Tohumla Geçiş Durumlarının ve Konukçu Dizilerinin Saptanması Üzerinde Araştırmalar. (Doktora tezi). Erenköy- İstanbul, 120 s.
- Rei, F.T., Henriques, M.I.C., Leitao, F.A., Serrano, L.F. and Potes, M.F., 1993. Immunodiagnosis of cucumber mosaic cucumovirus in different olive cultivars. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 23: 510-514.
- 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. *Pytopathologia Mediterranea*, 18: 135-142.
- Savino, V. and Gallitelli, D., 1981, Cherry leafroll virus in olive. *Phytopathologia Mediterranea* 20: 202-203.
- Savino, V. and Gallitelli, D. 1983, Isolation of *cucumber mosaic virus* from olive in Italy. *Pytopathologia Mediterranea* 22: 76-77.
- Tarla, G., ve. Çağlayan K., 1998. Hatay Yöresinde Yetişen Zeytin Ağaçlarında Görülen Bazı Virüs Hastalıklarının Serolojik Olarak Saptanması. (Serologically detection of some virus diseases in olive grown in Hatay province) VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Ankara, pp.239-243.

THE COMPARISON OF SENSITIVITY OF VARIOUS METHODS IN
THE DETECTION OF OLIVE TREE VIRUSES

- Triolo, E., Materazzi, A. and Toni, S., 1996, An isolate of Tobacco mosaic tobamovirus from *Olea europaea*. *Advances in Horticultural Science*, 10: 39-45.
- TÜİK, 2013. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim Tarihi: 01 Mart 2015)
- Ulubaş Serçe, Ç. U., Yalçın S., Gazel M, Çağlayan K. and Faggioli F., 2007. First Report of *Olive Latent Virus 1* from Olive Trees in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 89(3):73.
- Ulubaş Serçe, Ç., S. Yalçın, M. Gazel, K. Çağlayan. 2009. Doğu Akdeniz bölgesi'ndeki Zeytin Ağaçlarında *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)'ün Saptanması ve Karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Van, S. 175.
- Valverde, K.A., Nameth, S.T. and Jordan, R.L., 1990, Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. The American Phytopathological Society. *Plant Disease* 74: 255-258.
- Yorgancı, Ü., 1975, İzmir İlinde Domateslerdeki Virüs Hastalıkları, Yayılma ve Zarar Durumları, Elde Edilen İzolatlarla Biyolojik ve Serolojik Araştırmalar (Doçentlik Tezi). TOAG/127 No'lu Proje Nihai Raporu. Ege Üniv. Ziraat Fak. Bornova-İzmir. 102 s.