

## Türkiye’de Mardin İli Zeytin Alanlarında Bazı Virüslerin Serolojik ve Moleküler Tekniklerle Araştırılması<sup>1</sup>

Osman ÇİFCİ<sup>2</sup> Çiğdem ULUBAŞ SERÇE<sup>3</sup>

### SUMMARY

#### Research on the Presence of Some Viruses in Olive Orchards Using Serological and Molecular Techniques in Mardin Province of Turkey

Surveys were performed in 2010 in order to investigate the presence of several virus diseases in olive trees grown in Mardin province and counties located in the Southeastern Anatolia. Totally 170 shoot samples were collected from trees showing virus symptoms and also collected randomly symptomless trees considering the possibility of virus presence latently. Olive plant samples were tested against *Olive latent-1 virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Olive latent-3 virus* (OLV-3). To identify viral agents, the serological (DAS-ELISA) tests using available polyclonal antisera (SLRSV, ArMV, CLRV and CMV) and molecular methods (dsRNA, RT-PCR) were applied to collected olive samples. According to results of DAS-ELISA and PCR analysis, all samples were found negative whereas dsRNA profiles were observed in 41 samples. All tested samples were found free of tested viruses but it was concluded that they have to be tested against other known viruses of olives.

**Key Words:** ELISA, dsRNA, RT-PCR, Olive viruses

### ÖZET

Güneydoğu Anadolu bölgesinde yer alan Mardin il ve ilçelerindeki zeytin ağaçlarındaki bazı virüs hastalıklarının durumunu araştırmak amacıyla 2010 yılında surveyler yapılmıştır. Virüs simptomsu gösteren ağaçlardan ve virüslerin latent olarak taşındıkları göz önüne alınarak simptomsuz ağaçlardan da tesadüfi olarak toplam 170 sürgün örneği toplanmıştır. Alınan örnekler *Olive latent-1 virus* (OLV-1, Zeytin latent-1 virüs), *Olive latent-2 virus*

<sup>1</sup> Bu çalışma T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM-BS-09/04-04/02-10 proje numarası ile desteklenmiştir.

<sup>2</sup> Diyarbakır Ziraat Mücadele Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Yenişehir, Diyarbakır

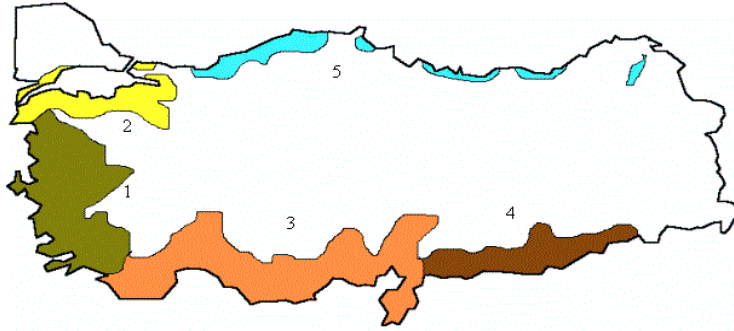
<sup>3</sup> Niğde Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Niğde  
Sorumlu Yazar (Corresponding author) e-mail: osman.ciftci@gthb.gov.tr  
Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received): 14.02.2014

(OLV-2, Zeytin latent-2 virüsü), *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Kiraz yaprak kıvrılma virüsü), *Arabis mosaic virus* (ArMV, Arabis mozaik virüs), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, Çilek latent halkalı leke virüsü), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV, Zeytin latent halkalı leke virüsü) ve *Cucumber mosaic virus* (CMV, Hıyar mozaik virüsü), *Olive latent-3 virus* (OLV-3, Zeytin latent-3 virüs)’üne karşı testlere tabi tutulmuştur. Toplanan zeytin örneklerine mevcut poliklonal antiserumlar kullanılarak (DAS-ELISA) serolojik testler (CLRV, ArMV, SLRSV ve CMV) ve moleküler metodlar (dsRNA, RT-PCR) uygulanarak virüsler test edilmiştir. DAS-ELISA ve PCR analizlerinde tüm örnekler negatif olarak tespit edilirken, dsRNA analizlerinde 41 örnekte, dsRNA profilleri tespit edilmiştir. Test edilen zeytin örnekleri araştırılan virüsler açısından temiz bulunurken, bu örneklerin zeytin ağaçlarını enfekte ettiği bilinen diğer virüsler açısından da test edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** ELISA, dsRNA, RT-PCR, Zeytin virüsleri

## GİRİŞ

*Oleacea* familyasının bir üyesi olan zeytin (*Olea europaea* L.) yüzyıllarca önemini yitirmemiştir. 21. yüzyılın bitkisi olarak düşünülen zeytin bitkisinin, tüm dünyada yaklaşık 900 milyon olan ağaçtan % 98’i Akdeniz havzasında yer almaktadır. Bir Akdeniz ülkesi olan ülkemizin neredeyse tüm kıyı bölgelerinde ve bazı mikro klima özelliği gösteren alanlarda zeytine rastlanmaktadır (Şekil 1). Türkiye; dünya zeytin yetiştiricilik alanı ve zeytin üretiminde 5. sırada olup 8.261,993 dekar alanda 111.397.831’i meyve veren, 45.757.988’i de meyve vermeyen olmak üzere toplam 157.155.819 adet zeytin ağacı bulunmaktadır. Türkiye toplam zeytin üretimi 1.415.000 ton olarak gerçekleşmiştir. Çalışmanın yapıldığı Mardin ilinde 19,235 dekar alanda 252.030’u meyve veren 1.201.200’i ise meyve vermeyen yaşta olan toplam 1.453.230 zeytin ağacından 5.742 ton ürün elde edilmektedir (Anonim, 2011).



Şekil 1. Türkiye’de zeytin yetiştiriciliği yapılan alanlar (1. Ege, 2. Marmara, 3. Akdeniz, 4. Güneydoğu Anadolu, 5. Karadeniz bölgeleri. (Numaralar bölgelerin ağaç sayısı ve üretim miktarlarına göre çoktan aza doğru verilmiştir)

Zengin bir çeşit potansiyeline sahip Türkiye’de, yağlık ve sofralık olarak değerlendirilmeye elverişli, değişik bölgelere ait 28 zeytin çeşidinin yaygın olarak

yetiştiriciliği yapılmaktadır. Mardin’de Halhalı (Derik), Ağlış, Belluti, Hursuki, Mavi ve Zoncuk, çeşitleri uzun yıllar yetiştirilen yerel çeşitlerdir. Bölgede zeytincilik her geçen gün önem kazanmakta ve yeni plantasyonlar oluşturulmaktadır. Bölgeye giren yabancı çeşitler ise; Kilis, Nizip, Gemlik ve Ayvalık çeşitleridir (Anonim, 2012).

Bu güne kadar zeytinde yapılan çalışmalar sonucunda saptanan virüsler; *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, Çilek latent halkalı leke virüsü), *Arabis mosaic virus* (ArMV, Arabis mozaik virüs), *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Kiraz yaprak kıvrılma virüsü), *Cucumber mosaic virus* (CMV, Hıyar mozaik virüsü), *Tobacco mosaic virus* (TMV, Tütün mozaik virüsü)’dür. Zeytin ön adı ile başlayan ve konukçusu genellikle zeytin olan viral etmenler ise *Olive latent ringspot virus* (OLRSV, Zeytin latent halkalı leke virüsü), *Olive latent-1 virus* (OLV-1, Zeytin latent-1 virüs), *Olive latent-2 virus* (OLV-2, Zeytin latent-2 virüs), *Olive latent-3 virus* (OLV-3, Zeytin latent-3 virüs), *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 ölümle ilişkili virüs), *Olive semilaten virus* (OSLV, Zeytin yarı latent virüs), *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV, Zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs) ve *Tobacco necrosis virus-D* (TNV-D, Tütün nekroz virüsü = *Olive mild mosaic virus*; OMMV, Zeytin ılımlı mozaik virüsü)’dir (Poggi Pollini et al, 1996; 2002).

Viral hastalıklarla mücadelede kimyasalların kullanılmayışı ve özellikle çok yıllık bitkilerde virüs enfeksiyonlarının uzun yıllar bitkilerde zarar yapma durumu nedeniyle virüs hastalıkları önem arz etmektedir. Viral hastalıklarla mücadelede dolaylı yollar (vektör mücadelesi, yabancı ot kontrolü v.b) kullanılmakta olup en etkili korunma yolu ise temiz ve sertifikalı fidanlar ile bahçelerin tesis edilmesidir. Viral hastalıklardan arı olarak yapılacak üretimler verim ve kaliteyi artıracığı gibi ağaçların ekonomik ömürlerini uzatacaktır. Zeytin virüslerinin bir kısmı sadece sınırlı sayıda ağaçta bildirilmişken bir kısmı da geniş alanlarda bildirilmiştir. Zeytinde enfeksiyon yapan virüslerden OLV-1 zeytin dışında Türkiye’de turunçgillerde, Japonya’da lalelerde ve son olarak da domatesde tespit edilmiştir (Martelli ve ark., 1996; Kanematsu ve ark., 2001; Hasiów-Jaroszewska ve ark., 2011). OLV-2 ise zeytin dışında gene otunda (castor bean) bulunmuştur (Grieco ve ark., 2002). Bunun dışındaki zeytin (olive) ön adıyla anılan virüsler hakkında (OLRSV, OVYaV, OSLV ve OLYaV) zeytin dışındaki bitkilerde şu ana kadar bir kayda rastlanmamıştır. SLRSV, ArMV, CMV, TMV, TNV ve CLRV çok geniş konukçu dizisine sahip ve yaygın olarak bulunan virüslerdir. Bu virüslerden zeytinde en belirgin semptomları SLRSV verirken verim kaybı ve kalite bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir. Zeytini enfekte eden virüslerin bazıları toprak kökenli olarak (SLRSV, ArMV, TNV), bazıları bitkileri doğrudan (TMV), tohumla (CLRV ve OLV-1), vektör böceklerden olan yaprak bitleri ile (CMV) veya sadece vejetatif üretim materyali ile bitkiler arasında yayılmaktadırlar (OLV-2 ve OLRV). OLYaV’nin vektörü olarak unlubit ve psillidler rapor edilmiş fakat böceklerle yapılan taşıma denemelerinde başarı sağlanamamıştır.

Zeytin virüslerinin görsel teşhisinde sadece SLRSV bazı simptom verirken diğerleri genellikle simptomsuzdur (latent) ancak bazı belirtiler virüs hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Zeytinde ArMV, CLRV ve OLYaV yaprak sararması, TMV ve OSLV damar açılması ile ilişkili bulunmuştur. Zeytin virüslerinin teşhisinde simptomolojinin yanıltıcı olması, biyolojik indeksleme yöntemi kullanımında uygun odunsu indikatör bitkilerinin olmayışı var olan otsu konukçulara yapılan mekanik taşımalarda her zaman aynı sonucu vermemesi ve düşük hassasiyette olması bu hastalıkların teşhisini zorlaştırmaktadır. Günümüzde bitki virüslerinin teşhisinde yaygın olarak kullanılan teşhis metotlarından olan ELISA da ise; Portekiz’de SLRSV ve CMV teşhisinde başarılı sonuçlar alınmış, İtalya’da ise TMV’nin teşhisinde başarılı olamamıştır. Zeytin virüslerinde antiserumu bulunan virüslerin teşhisinde DAS-ELISA istikrarlı sonuçlar vermemekte bu da bitki bünyesinde virüs konsantrasyonunun çok düşük olması veya bitkide bulunan toksik maddelerden dolayı yanlış pozitif sonuçlar verebilmekte ve hatalı sonuçlar alınmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle zeytin virüslerinin teşhisinde İtalya’da geliştirilen ve birçok ülkede denenilen moleküler yöntemlerden çift kollu (ds-double strand)-RNA ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemlerin kullanılması gerektiği bildirilmiştir. Zeytinde yapılan ds-RNA analizi sonucunda elde edilen bantların bitkide virüsün varlığının işareti olduğu ancak tek tek virüslerin teşhisi için kullanılmasının uygun olmadığı ve bu bantların yalnız virüs enfeksiyonları durumunda oluşabileceği ve zeytindeki çalışmalarda rutin olarak kullanılabileceği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Grieco ve ark., 2000; Faggioli ve ark., 2002; Fadel ve ark., 2005; Al Abdullah ve ark., 2005).

Ülkemizde zeytin virüsleri ile ilgili Ege ve Doğu Akdeniz bölgelerinde birbirinden farklı dört çalışma yapılmış ve SLRSV, CLRV, CMV ve ArMV virüsleri DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir (Fidan ve Ertem, 1995; Tarla ve Çağlayan, 1998; Çağlayan ve ark., 2004; Erilmez ve Erkan 2014). Bu çalışmaların dışında 2008 yılında Doğu Akdeniz Bölgesinde zeytin örnekleri RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiş, CMV ve OLV-1 virüsleri saptanmıştır. (Yalçın, 2008). Ege bölgesinde yapılan çalışmada ise ArMV, CMV, CLRV, SLRSV, OLV-1, OLV-2, OLV-3, OLRV ve OLYaV adlı virüslerin varlığı RT-PCR ile araştırılmıştır (Erilmez ve Erkan 2014).

Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde de zeytin yetiştiriciliği yoğun olarak yapılmasına rağmen şimdiye kadar bu bölgedeki zeytin ağaçlarının virüslerle enfeksiyon durumları araştırılmamıştır. Bu nedenle, bu bölgede zeytin yetiştiriciliğinin en yoğun yapıldığı Mardin ili zeytin alanlarında sörveyler düzenlenmiş ve toplanan zeytin örneklerinde SLRSV, CLRV, ArMV, CMV, OLV-1, OLV-2, OLV-3 ve OLRV’nin varlığı araştırılmış ve elde edilen veriler ülkemizde yetiştirilen zeytinlerdeki virüs hastalıklarının durumu konusunda yapılan çalışmalara katkı sağlamıştır.

## MATERYAL VE METOT

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde zeytin yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Mardin ili Merkez, Kızıltepe ve Derik ilçelerinde yer alan ticari ve ev zeytin bahçelerinden alınan sürgün örnekleri çalışmada bitki materyali olarak kullanılmıştır. Virüslerin teşhis çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere CLRV, OLRSV, SLRSV, OLV-1, OLV-2, OLV-3 ve negatif kontrol için zeytin sürgünleri Dr. Francesca Faggioli'den (Roma, İtalya) ve Dr. Angelantonio Minafra'dan (Bari, İtalya) temin edilmiştir. SLRSV, ArMV, CLRV ve CMV pozitif kontrol örnekleri ayrıca ELISA kitlerinden temin edilmiştir.

### Sörvey Çalışmaları ve Bitki Materyalinin Temini

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde zeytin yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Mardin ili Merkez, Kızıltepe ve Derik ilçelerinde ticari ve ev zeytin bahçeleri 2010 yılının Mart-Nisan aylarında ziyaret edilmiştir. Yapılan sörveyler sonucunda, virüs semptomuna benzerlik gösteren ağaçlardan ve virüslerin latent olarak taşındıkları göz önüne alınarak semptomsuz ağaçlardan da tesadüfi olarak bahçenin en az % 5 ini temsil edecek şekilde ağacın etrafından dolaşarak 2-3 yıllık, 20–25 cm uzunluğunda, 7–8 sürgün alınmıştır. Alınan sürgünler plastik torbalara etiketlenerek yerleştirilmiş ve buz içeren kutularda nükleik asit izolasyonu yapılmaya kadar saklanmak üzere laboratuvara taşınmıştır (Faggioli ve ark., 2005; Loconsole ve ark., 2010).

Araziden alınan ve bitki materyali olarak kullanılacak olan sürgünlerin kabuk kısımları kazınarak floem dokuları alınmış ve derhal sıvı azot yardımıyla ezilmiştir. Toz haline getirilen bitki materyalinin erimesine izin vermeden, dsRNA ve toplam nükleik asit izolasyonu yapılmaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

### Serolojik Yöntemler

Survey çalışmaları sonucunda ilkbaharda zeytin bitkilerinden alınan sürgünlerdeki virüslerin araştırılmasında önce serolojik testler yapılmıştır. Zeytin örnekleri SLRSV, ArMV, CLRV ve CMV virüsleri için DAS-ELISA (Double-antibody sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 'ya tabi tutulmuştur. Antiserumlar kit halinde alınmış (LOEWE, Almanya) firmanın önerdiği yöntemle göre testler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar E Max Precision Microplate Reader cihazı kullanılarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Testlerde kitte yer alan negatif örneğin iki katı absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Clark ve Adams, 1977).

### Moleküler Yöntemler

#### dsRNA izolasyonu ve elektroforez işlemi:

dsRNA izolasyonu Walia ve ark (2009)'a göre yapılmıştır. Bu amaçla 15 gr sıvı azot yardımıyla ezilmiş bitki örneği 300 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Tüplere 45 ml 2xSTE, 17,5 ml %10 SDS, 1 ml bentonit ve 1 ml β-mercapto etanol eklenmiştir. 5 dakika oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 17,5 ml 2xSTE

ile doyurulmuş fenol eklenmiştir. Üzerine 17,5 ml kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve 45 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra 20 dakika oda sıcaklığında 8.500 rpm’de santrifüj edilmiş ve üsteki sıvı steril mezürlere alınmış (~60ml), daha önceden hazırlanmış olan 1.5 ml CF11 selüloz (1 gr/10 gr doku ) ve 13,25 ml saf ethanol bulunan santrifüj tüpüne dökülmüş ve 2xSTE ile dengelenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında 8.500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı uzaklaştırılmış ve selüloz %17 ethanol-1xSTE tamponu ile yeniden süspanse edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında 8.500 rpm’de santrifüj edilmiş, üstteki sıvı pipetlenerek boşaltılmıştır. Selüloz yeniden %17 ethanol-1xSTE ile sulandırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında 8.500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra selüloz yeniden 50-100 ml %17 ethanol-1xSTE ile süspanse edilmiştir. Mira-cloth diski ile kapatılmış kolona selüloz karışımı dökülmüş ve selüloz kolonu aynı yıkama tamponu ile 5-6 kez yıkanmıştır. 1 ml 1xSTE kolona eklenmiş ve sonra 5 ml 4 kez 1xSTE kolona dökülmüştür. Kolonun altından ~20 ml ds-RNA solüsyonu 50 ml’lik falkon tüplere toplanmıştır. 25 ml soğuk saf alkol (2,5 hacim ethanol) ve 1 ml NaOAc’tan (0,1 hacim) eklenerek -20 °C’de tüm gece bekletilmiştir. 35 dakika +4°C’de 9000 rpm’de santrifüj edildikten sonra pellet alkol ile yıkanmış ve 8 µl TE tamponunda çözülerek -80°C’de saklanmıştır.

dsRNA izolasyonu sonucu elde edilen ürünlerin görsel hale getirilmesi amacıyla, reaksiyondan sonra ürünlerle %1,2 agaroz jelde elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez 1xTAE ortamında yapılmış, aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 3 µl yükleme ortamı ile birlikte 12 µl yüklenen ds-RNA ürünleri, 200 V’da 1 saat süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. İşlem bittikten sonra jel 1 mg/ml etidyum bromid içeren 1xTAE ortamında 5-10 dakika bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra UV transillüminatörde sonuçlar gözlenerek jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilmiştir.

#### **Toplam RNA İzolasyonu:**

Toplam RNA izolasyonu Faggioli ve ark. (2005)’na göre yapılmıştır. Bu amaçla, zeytin ağaçlarından toplam RNA izolasyonu RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Germany) ile firmanın önerdiği yöntemler doğrultusunda yapılmıştır

#### **cDNA elde edilmesi:**

PCR analizleri için dsRNA ve DNA örneklerinden önce komplementer DNA (cDNA) sentezi sağlanmıştır. cDNA sentezi kit yardımıyla yapılmış, alındığı firmanın.(MBI Fermentas, GmbH Germany) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

#### **Polymerase Chain Reaction (PCR):**

PCR işlemi cDNA ve virüse spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılmıştır. PCR işleminde kullanılan virüs spesifik primer çiftleri Çizelge 1’de verilmiştir. PCR reaksiyon karışımı hacmi toplam 25 µl’dir. Tek bir reaksiyon karışımında 2 µl cDNA, 0,6 µM virüs spesifik primer çifti, 0,6 µM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X reaksiyon ortamı ve 0,625 Unite Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, GmbH,

Germany) yer almıştır. Amplifikasyon için PCR cihazı 1 döngü 94 °C’de 3 dakika ve 35 döngü, 94 °C’de 30 saniye, 55 °C’de 45 saniye, 72 °C’de 45 saniye, son olarak 72 °C’de 7 dakika olarak programlanmıştır. OLV-3 virüsüne spesifik primer çiftleri için annealing sıcaklığı 58 olarak uygulanmıştır.

#### PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi:

PCR ürünlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla, reaksiyondan sonra ürünler %1-1,5 agaroz jelde elektroforez işlemi 1xTAE ortamında yapılmış, 1 mg/ml etidyum bromid (EtBr) ortamında bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra UV transillüminatörde sonuçlar gözlenerek jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilmiştir.

Çizelge 1. Zeytin ağaçlarında enfeksiyon yapan virüslerin PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizimleri (Faggioli ve ark., 2005)

Virüs	Amplikon uzunluğu (bp)	Primer dizilimi (5'-3')	Annealing Sıcaklığı (°C)
SLRSV-5D SLRSV-3D	293	CCCTTGGTTACTTTTACCTCCTCATT GTCC AGGCTCAAGAAAACACAC	55
ArMV-5A ArMV-3A	302	TACTATAAGAAACCGCTCCC CATCAAAACTCATAACCCAC	55
CLRV-5 CLRV-3	416	TGGCGACCGTGTAACGGCA GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	55
CMV-CPN5 CMV-CPN3	280	ACTCTTAACCACCCAACCTT AACATAGCAGAGATGGCGG	55
OLRSV-R1 OLRSV-R2	356	GATTGCCAAGGAATATGCTG CTCCCAACAAATGATTGCTG	55
OLV1-HA OLV1-CA	299	ACACAGAAATCATAAGTGCC CCATAGCACCATCATACC	55
OLV2-H OLV2-C	206	GAAGGTGGCTCGCCTAGAG GCCAGGAGTTTGAGCTTTG	55
OLV3F OLV3R	176	CCCGTTGAGCAAGTTGTCTTCC GCAGTGGCTGGAGAGCATGGAG	58

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Mardin ilinin 3 ilçesinde gerçekleştirilen sörveyler sırasında toplam 35 bahçe ziyaret edilmiş ve 170 adet zeytin örneği toplanmıştır (Çizelge 2). Toplanan örneklerin %80’i genç ağaçlar (2-10 yıllık), %20’si yaşlı ağaçlardan (10 ve üstü) oluşmuştur

Çizelge 2. 2010 yılı Mardin ilinde incelenen bahçe ve alınan örnek sayıları

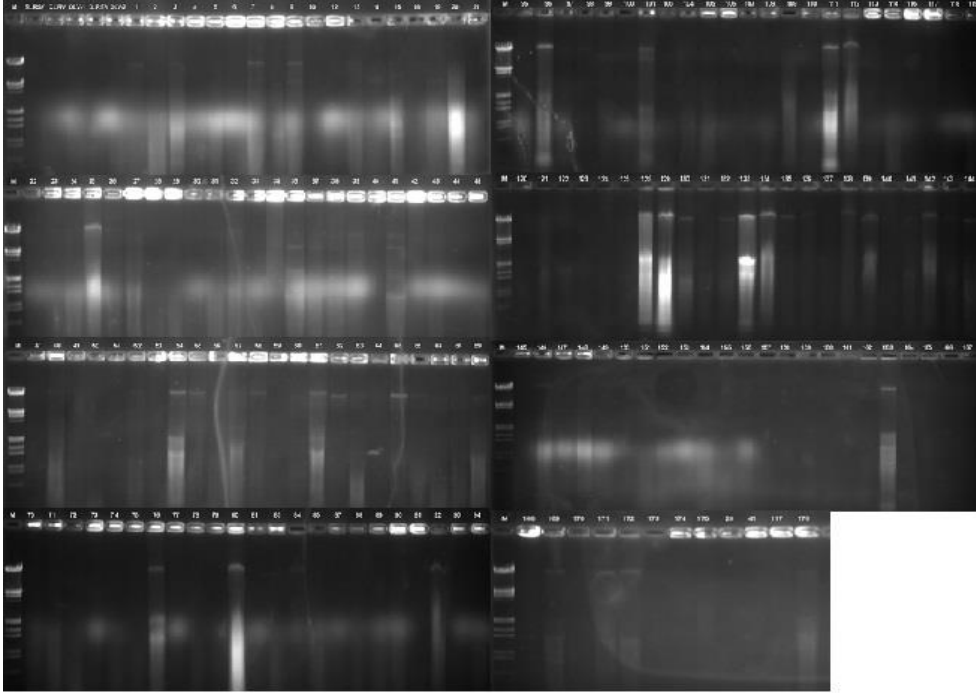
İlçeler	Bahçe sayısı	Test edilen örnek sayısı
-Merkez	5	25
-Kızıltepe	13	49
-Derik	17	96
Toplam	35	170

### Serolojik Testler (DAS-ELISA)

Toplam 170 adet zeytin örneği SLRSV, ArMV, CLRV ve CMV virüsleri için DAS-ELISA’ya tabi tutulmuştur. ELISA testlerinde tüm virüsler için pozitif kontrol örnekler reaksiyon verirken, test edilen örneklerin hepsinde negatif kontrol örnekte okunan absorbans değerlerinin iki katı elde edilmemiştir. Bu sonuca göre test edilen zeytin örnekleri DAS-ELISA yöntemine göre test edilen virüsler açısından negatif olarak değerlendirilmiştir.

### dsRNA analizleri

Zeytin örneklerinin floem dokularıyla elde edilen örneklerin elektroforetik analizleri sonucunda incelenen 170 örnekten 41 adedinde dsRNA profilleri görülmüştür (Şekil 2). Elde edilen dsRNA profillerinin çoğunluğu zayıf görünümü olmuştur. Bu profiller 10 gr bitki dokusundan elde edilmesine rağmen, dsRNA konsantrasyonunun bitkilerde oldukça düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Bu profiller içerisinde birden fazla dsRNA içeren olduğu gibi tek dsRNA içerenler de mevcuttur. Kullanılan Lambda DNA EcoRI/HindIII DNA markörünün 15.000-20.000 bp seviyesine yakın olan band en büyük fragment olup 37 örnekte bulunmuştur. Bu fragmentin dışında örneklerde 8 örnekte 5000 bp seviyesinde, 7 örnekte 2000 bp seviyesinde bandlar tespit edilmiştir.



**Şekil 2.** Zeytin dallarının kortikal dokularının kullanıldığı dsRNA analizi sonucu elde edilen elektroforetik oluşumlar. 176 nolu örnek negatif kontrol. M Lambda DNA EcoRI/HindIII DNA ladder (MBI Fermentas, Almanya).



Sabanadzovic ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)'da 15.000 bp seviyesinde dsRNA profilleri tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırılan örneklerde tespit edilen 15.000 bp seviyesindeki band bu virüsle ilişkili olabilir. Ancak, bu çalışma kapsamında adı geçen virüs pozitif kontrol bulunamaması nedeniyle örneklerde araştırılmamıştır.

#### **dsRNA örnekleriyle PCR analizleri:**

dsRNA analizinde 41 örnekte belirlenen profillerin çalışma kapsamında araştırılan virüs etmenleri ile olan ilişkisini belirlemek amacıyla tüm dsRNA örnekleri araştırılan virüsler açısından PCR işlemine tabi tutulmuştur. dsRNA'dan cDNA'ların sentezlenmesiyle gerçekleştirilen PCR işlemlerinde test edilen 7 virüse karşı örneklerde reaksiyon veren olmamış, hepsinin bu virüsler açısından negatif olduğu tespit edilmiştir. Tüm testlerde pozitif kontrollerde beklenen seviyelerde fragment elde edilirken örneklerde elde edilmemiştir. Zeytin ağaçlarında bu çalışma kapsamında araştırılan virüs hastalıklarının dışında OVYaV, OYMDaV, TMV, OSLV, OLYaV TNV-D=OMMV gibi virüs enfeksiyonları da bildirilmiştir (Poggi Pollini ve ark, 1996; 2002). dsRNA profillerinde gözlenen bantların bu virüs etmenleriyle veya henüz tespit edilmemiş virüs etmenleriyle ilişkili olabileceği düşünülebilir.

#### **Toplam RNA örnekleriyle PCR analizleri:**

Zeytin virüslerinin bitki dokusunda konsantrasyonlarının çok düşük olduğu ve ağaç bünyesinde düzensiz dağılım gösterdiği (Bertolini ve ark, 1998; 2001; Martelli, 1999) bildirilmiştir. Bu nedenle, RNA ekstraksiyonları yapılırken sekiz adet 1-2 yıllık zeytin sürgünlerinin gövdesindeki floem dokularından kazıma yöntemi ile 1 gr doku alınmış ve sıvı azotta ezilmiştir, içerisinden 0.1 gr'ı ekstraksiyonda kullanılmıştır. Zeytin virüslerinin testinde kullanılan Qiagen ekstraksiyon kiti en iyi sonuç veren ve pratik bir yöntem olarak önerilmiştir (Faggioli ve ark., 2005). Bu kitin kullanılmadığı durumlarda silika yönteminin (Rott ve Jelkmann, 2001) de iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Alabdullah ve ark., 2009; Loconsole ve ark., 2010). Araştırmacılar diğer yöntemlerle ekstraksiyonların virüs testinde sorun yarattığını ve yanlış negatif sonuçlar verdiğini ifade etmiştir.

Toplam RNA'dan gerçekleştirilen PCR işlemlerinde test edilen 8 virüse karşı örneklerde reaksiyon veren olmamış, hepsinin bu virüsler açısından negatif olduğu bu yöntemle de tespit edilmiştir. Tüm testlerde pozitif kontrollerde beklenen seviyelerde fragment elde edilirken su kontrolden elde edilmemiştir

Dünyada yapılan ilk çalışmalarda CMV'nin zeytin ağaçlarında sınırlı yayılması gözlenirken, son yıllarda daha geniş alanlardan; %22.7 oranında Suriye'de (Al Abdullah ve ark., 2005), %37,7 oranında Kaliforniya'da (Al Rwahnih ve ark., 2011), %25.7 oranında Tunus'ta (El Air ve ark., 2011) ve %24.7 oranı ile Mısır'da (Youssef ve ark.,2010) bildirilmiştir. Ülkemizde ELISA testi ile Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada; zeytinde CMV enfeksiyonu bir çalışmada %24, diğer bir

çalışmada ise % 9,6 olarak bildirilmiştir (Fidan ve Ertem, 1995; Erilmez ve Erkan 2014).

OLV-1 ilk olarak Güney İtalya’nın Apulia kentinde sptomsuz bir zeytin ağacından mekanik inokulasyonla izole edilmiştir (Galitelli ve Savino, 1985). Yıllarca virüs sadece Avrupa’nın Akdeniz bölgelerinde sınırlı kalmışken 1995 yılında Ürdün’de zayıf zeytin ağaçlarında tespit edilmiştir (Martelli ve ark., 1995). Daha sonra %34.3 oranında Tunus’ta (El Air ve ark., 2011) ve %5.7 oranında Mısır’da (Youssef ve ark.,2010) bildirilmiştir. Ülkemiz Doğu Akdeniz bölgesinde zeytinde yapılan bir çalışmada OLV-1 tespit edilmiş ve bu izolatların turunçgillerden elde edilen izolat ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe ve ark., 2007).

OLV-2 ilk olarak İtalya’da tespit edilmiş ve herhangi bir yayılma tespit edilmemiştir (Savino ve ark., 1984) ancak son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda %2 oranında Suriye’de (Al Abdullah ve ark., 2005), Hırvatistan’da (Bjelis ve ark., 2007) %6.9 oranı ile Tunus’ta (El Air ve ark., 2011) ve %2.7 oranı ile Mısır’da (Youssef ve ark.,2010) bildirilmiştir. Ülkemizde ise Doğu Akdeniz ve Ege bölgelerinde bu virüs araştırılmış ancak tespit edilmemiştir (Yalçın, 2008; Erilmez ve Erkan 2014), ülkemizde bu çalışmaların dışında bir kayıt bulunmamaktadır.

OLRSV ilk kez İtalya’da zeytinde tespit edilmiş (Savino ve ark., 1983) daha sonraları RT-PCR yönteminin geliştirilmesi ile yapılan analizler sonucunda %11.5 oranında Suriye’de (Al Abdullah ve ark., 2005), %16.6 oranında Tunus’ta (El Air ve ark., 2011) ve %6.7 oranında Mısır’dan (Youssef ve ark.,2010) bildirilmiştir. Yapılan son çalışmalar ile bu virüsün de daha geniş alanlara yayıldığı görülmektedir.

Türkiye’de DAS-ELISA yöntemi ile yapılan bir çalışmada zeytinde CLRV enfeksiyonu %23, PCR ile yapılan çalışmada %10,66 oranında bildirilmiştir (Çağlayan ve ark., 2004; Erilmez ve Erkan 2014). RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan bazı çalışmalar neticesinde %15 oranında Suriye’de (Al Abdullah, 2005), %2 oranında Lübnan’da (Fadel ve ark., 2005), %4.9 oranında İtalya’da (Faggioli ve ark., 2005), %13.1 oranında Tunus’ta (El Air ve ark., 2011), %4.7 oranında Mısır’da (Youssef ve ark.,2010) ve Hırvatistan’dan 25 simptomlu örneğin 6’sında (Luigi ve ark.2011) bildirilmiştir. CLRV zeytinlerde simptom vermezken zeytin ağaçlarında ekonomik kayba yol açtığına dair bir kayıt yoktur.

ArMV ilk olarak İtalya (Martelli, 1999) ve İspanya’da (Bertoloni ve ark., 2001a) zeytinde enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise; Türkiye’de DAS-ELISA testi ile %7.1 oranında (Çağlayan ve ark., 2004), RT-PCR ile %22,93 oranında (Erilmez ve Erkan 2014), Suriye’de %0.7 (Al Abdullah ve ark., 2005), %0.3 oranında Lübnan’da (Fadel ve ark., 2005) ve son olarak %0.7 oranında Mısır’daki (Youssef ve ark.,2010) zeytin ağaçlarında enfeksiyon yaptığı rapor edilmiştir.

Çok geniş bir konukçu dizisine ve hızlı yayılma alanı olan SLRSV ilk kez 1979 yılında İtalya'da tespit edilmiş ve daha sonraları RT-PCR ile Portekiz'de (Henriques ve ark., 1992; Rei ve ark., 1993), İspanya'da (Bertolini ve ark., 1998) ve Türkiye'de DAS-ELISA ile %33,2 (Çağlayan ve ark., 2004) ve PCR ile %9,6 (Erilmez ve Erkan 2014) oranında araziden alınan zeytin örneklerinde teşhis edilmiştir. İtalya'da (Martelli, 1999) SLRSV teşhis çalışmalarında DAS-ELISA ile başarı sağlamamış ve DAS-ELISA testi ile pozitif sonuçlar veren zeytin örnekleri dsRNA analizleri ve PCR esaslı metotlar ile test edildiğinde DAS-ELISA testinin hatalı pozitif sonuçlar verdiği ileri sürülmüştür (Bertolini ve ark., 1998). Son yıllarda gelişen moleküler teknikler (RT-PCR) kullanılarak yapılan sörvey çalışmalarında %5.7 oranında Suriye'de (Al Abdullah ve ark., 2005), %0.3 oranında Lübnan'da (Fadel ve ark., 2005), %7.4 oranında Tunus'ta (El Air ve ark., 2011) ve %2.3 oranında Mısır'dan (Youssef ve ark., 2010) SLRSV enfeksiyonları tespit edilmiştir.

Vejetatif olarak çoğaltılan diğer bitkiler gibi zeytinler de çoğaltma materyalinde bulunabilen pek çok patojenden (virüs, bakteri ve fungus) etkilenir ve bu yolla yeni bitkilere geçerek yayılabilir. Bu durum ağaçların ürün kalitesini ve verimi olumsuz yönde etkiler. Yeni bahçelerin temiz üretim materyali ile oluşturulması ileride alınacak ürünün kalitesi ve tesisin ekonomik ömrü bakımından çok önemlidir. Sağlıklı zeytin üretim materyali sağlama konusunda bazı Avrupa ülkelerinde (İtalya, İspanya ve Portekiz) virüs ve fitoplazmalar gibi tedavisi olmayan hastalık etmenlerinin yayılımını engellemek amacı ile çeşitli sertifikasyon çalışmalarına başlanmıştır.

Yurdumuzda her geçen gün zeytin yetiştiriciliği yapılan alanlar artmakta fakat zeytin üretimi yapılan alanlarda bu virüslerin varlığı, verim ve kaliteye etkileri hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle zeytin virüslerinin yetiştiricilik yapılan alanlarda enfeksiyon durumlarının belirlenmesi, fidanlıkların virüsler açısından taranması virüslerin yayılımında önem arz etmektedir.

Yapılan bu çalışmada Mardin ilinde yetiştirilen zeytin ağaçları SLRSV, CLRV, ArMV, CMV, OLRSV, OLV-1 ve OLV-2 virüsleri açısından serolojik ve moleküler yöntemlerle test edilmiş ve test edilen örneklerin bu virüsler açısından negatif olduğu dört ayrı test ve analiz yöntemi ile tespit edilmiştir. dsRNA yöntemi ile elde edilen dsRNA profillerinin hangi virüsler tarafından oluşturabileceğinin daha ileri çalışmalarla araştırılması gereklidir. Bu nedenle, mevcut örneklerin TMV, TNV, OLYaV, OYMDaV, OSLV, OLYaV, OMMV virüslerine karşı da test edilmesi gerekmektedir. Mardin ilinde yetiştirilen zeytin ağaçlarında yürütülen bu çalışma ile, bu bölgedeki zeytin ağaçlarında virüs hastalıklarının bulunma durumları hakkında ilk veriler elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Al Abdullah A., Elbeaino T., Minafra A., Digiario m., Martelli G.P., 2009., Detection And Variability Of Olive Latent Virüs 3 İn The Mediterreanean Region., Journal Of Plant Pathology , 91(3),521-525
- Al Abdullah, A., T. El Beaino, M. Saponari, H. Hallak and M. Digiario 2005. Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Syria. EPPO Bulletin 35 (2), 249–252.
- Al Rwahnih M., Guo Y., Daubert S., Golino D. and Rowhani A., 2011, Characterization Of Latent Viral Infection Of Olive Trees İn The National Germplasm Repository İn California, Journual Of Plant Pathology, Vol 93 No 1
- Anonim, 2011. Tarımsal yapı üretim, fiyat, değer. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu.
- Anonim, 2012. Mardin İl Müdürlüğü Proje İstatistik Şubesi Verileri, 10S
- 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. Virosis del olivo detectadas en Espana, Nuevos metodos de diagnostico. Phytoma, 102: 191-193.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martinez, M.C., Gorris, M.T. and Cambra M. 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. Journal of Virological Methods, 96: 33-41.
- Bjelis. M., Loconsole, G., and Saponari, M., 2007. Presence of virruses in Croatian olive groves. Pomologia Croatica 13:16S-172.
- Clark, M.F. and Adams, A.N., (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J.Gen.Virol.* 34: 475-483.
- 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.
- El Aır M., Mahfoudi N., Digiario M., Najjar A. and Elbeaino T., 2011 Detection of Olive-infecting Viruses in Tunisia. J Phytopathol 159:283–286
- Erilmez S ve Erkan S.,2014. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde zeytin ağaçlarındaki viral hastalık etmenlerinin tanılanması ve bulunma durumlarının belirlenmesi. bitki koruma bülteni 2014, 54(1):45-67 issn 0406-3597. 45-67
- Fadel, C., Digiario, M., Choueiri, E., El Beaino, T., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2005. On the presence and distribution of olive viruses in Lebanon. OEPP/EPPO Bulletin, 35: 33-36.
- Faggioli F., Ferreti, L., Albanese, G., Sciarroni, R., Pasquini, G., Lumia, V. and Barba, M., 2005. Distirubition of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. Journal of Plant Pathology, 87:45-51.
- Faggioli, F., Ferretti, L., Pasquini, G. and Barba, M. 2002. Detection of *Stravberry latent ring spot virus* in leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. Journal of Phytopathology, 150: 636-639.

- 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.
- Gallitelli, D. and Savino, V. 1985. *Olive latent virus 1*. A single-RNA spherical virus isolated from in Apulia (Southern Italy). *Annals of Applied Biology*, 106: 295-303.
- Grieco F, Parrella G, Vovlas C, 2002. An isolate of Olive latent virus 2 infecting castor bean in Greece. *Journal of Plant Pathology* 84, 129–31.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2000. Molecular detection of olive viruses. *OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 469-473.
- Hasiów-Jaroszewska B, Borodynko N, Pospieszny H. 2011. Molecular characterisation of the full-length genome of olive latent virus 1 isolated from tomato. *Journal of Applied Genetics*. 52(2):245-247.
- Henriques, N.I.C., Rei, F.T., Alit, F.A., Serena, J.F. and Poet, M.F., 1992. Virus diseases in *Olea europaea* cultivars: Immunodiagnosis of *Strawberry latent ringspot nepovirus*. *Phytopathologia Mediterranea*, 31 127-132.
- Kanematsu, S., Taga, Y. and Morikawa, T. 2001. Isolation of *Olive latent virus 1* from Tulip in Toyoma Prefecture. *Journal of General Plant Pathology*, 67: 333-334.
- Loconsole G., Saponari M., Faggioli F., Albanese G., Bouyahia H., Elbeaino T., Materazzi A., Nuzzaci M., Prota V., Romanazzi G., Trisciuzzi N. and Savino V., (2010), Inter-Laboratory Validation Of PCR-Based Protocol For Detection Of Olive Viruses., The Authors. *Journal compilation a 2010 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 40, 423–428
- Luigi, M., Godena, S., Dermic, E., Barba, M. and Faggioli, F., 2011, Detection of viruses in olive trees in Croatian Istria., *Phytopathol. Mediterr.* 50: 150-153.
- Martelli, G.P. 1999. Infectious diseases and certification of olive: an overview. *OEPP/EPPO Bulletin*, 29: 127-133.
- Martelli, G.P., Sabanadzovic, S., Savino, V., Abu-Zurayk, A.R. and Masannat, M. 1995., Virus-like diseases and viruses of olive in Jordan. *Phytopathologia Mediterranea*, 34: 133-136.
- Martelli, G.P., Yılmaz, M.A., Savino, V., Baloğlu, S., Grieco, F., Güldür, M.E., Greco, N. and Laforteza, R. 1996 Properties of citrus isolate of *Olive latent virus 1*, a new *Necrovirus*. *European Journal of Plant Pathology*, 102(6): 527-536.
- Poggi Pollini, C., Bissani, R., Giunchedi, L. And Vindimian, F. 1996. First report of a phytoplasma infection in olive trees. *Journal of Phytopathology*, 144, 109-111.
- Poggi Pollini, C., Bissani, R., Ragozzino, A., Pasquini, F., Barba, M., Marzachi, C. and Boccoardo, G. 2002. Detection and characterization of phytoplasmas in olive trees from Italy. *Proc. 4<sup>th</sup> International Symposium on Olive Growing. Acta Horticulturae* 586, ISHS 2002, (2), 781-783.
- Rei, F.T., Henriques, M.I.C., Leitao, F.A., Serrano, J.F. and Potes, M.F. 1993. Immunodiagnosis of *Cucumber mosaic cucumovirus* in different olive cultivars. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 23: 501-504.

- Rott M.A. and Jelkmann W. 2001,. Characterizasyon and detection of sevral filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning metod (DOP-PCR), and modificasyon of an RNA extraction protocol. *Europen journal of plant pathology* 107:411-420
- Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., La Notte, P., Savino, V., Scarito, G. and Martelli, G.P. 1999. Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, 81(1): 37-45.
- Savino V., Galitelli, D. and Barba, M. 1983. *Olive latent ringspot virus*, a newly recognized virus infecting olive in Italy. *Annals of Applied Biology*, 133(2): 243-249.
- Savino, V., Piazzola, T., Di Franco, A. and Martelli, G.P. 1984. *Olive latent virus 2*, a newly recognized virus with a differently shaped particle. In: *Proceeding of the 6<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, pp. 24-26. Cairo (Egypt).
- Ulubaş Serce, 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.
- Tarla, G., ve. Çağlayan K, 1998. Hatay Yöresinde Yetişen Zeytin Ağaçlarında Görülen Bazı Virüs Hastalıklarının Serolojik Olarak Saptanması. (Serologicaly detection of some virus diseases in olive grown in Hatay province) VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Ankara, pp.239-243.
- Walia, J. J., Salem, N. M., and Falk, B. W. 2009. Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. *Plant Dis.* 93:4-10.
- Yalçın, S., 2008. Doğu Akdeniz Bölgesi’ndeki zeytin bahçelerindeki virüslerin yaygınlığının RT-PCR ile belirlenmesi ve karakterizasyonu. M.K.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 50 s.
- Youssef S.A., Moawed S.M., el-sayed M. and Shalaby A.A.2010., Detection Of Olive Tree Viruses İn Egypt By One-Step Rt-Pcr, 21st İnternational Conference On Virüs And Other Greft Trasmissible Disease Of Fruit Crops., Julius-kühn-archiv, 427.