



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**MARDİN İLİ ZEYTİN ALANLARINDA BAZI VİRÜSLERİN MOLEKÜLER  
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI**

**OSMAN ÇİFTÇİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Antakya/HATAY**

**NİSAN-2012**



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**MARDİN İLİ ZEYTİN ALANLARINDA BAZI VİRÜSLERİN  
MOLEKÜLER TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI**

**OSMAN ÇİFTÇİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Antakya/HATAY**

**NİSAN-2012**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                               | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET.....                                                                                                                     | I     |
| ABSTRACT.....                                                                                                                 | IV    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                                                                                           | VI    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                                                                                        | IX    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                                          | X     |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                                                 | 1     |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....                                                                                                     | 9     |
| 2.1. Etmeni Saptanamamış Hastalıklar.....                                                                                     | 9     |
| 2.2. Virüsten kaynaklanan şekil bozuklukları ve etiyolojisi bilinmeyen<br>hastalık etmenlerinin neden olduğu hastalıklar..... | 11    |
| 2.3.Zeytin ağaçlarında tespit edilen virüsler.....                                                                            | 13    |
| 2.3.1. Zeytin önadı ile adlandırılan virüsler.....                                                                            | 15    |
| 2.3.1.1.Olive latent virus 1 (OLV-1) .....                                                                                    | 15    |
| 2.3.1.2.Olive latent virus 2 (OLV-2) .....                                                                                    | 16    |
| 2.3.1.3.Olive latent-3 virus (OLV-3).....                                                                                     | 16    |
| 2.3.1.4.Olive latent ringspot virus (OLRSV) .....                                                                             | 17    |
| 2.3.1.5.Olive vein yellowing associated virus (OVYaV) .....                                                                   | 18    |
| 2.3.1.6.Olive yellow mottling and decline associated virus<br>(OYMDaV) .....                                                  | 18    |
| 2.3.1.7.Olive leaf yellowing associated virus (OLYaV) .....                                                                   | 18    |
| 2.3.1.8.Olive semi latent virus (OSLV) .....                                                                                  | 19    |
| 2.3.1.9.Olive mild mozaik mosaic virus (OMMV) .....                                                                           | 20    |
| 2.3.2. Diğer virüsler: .....                                                                                                  | 20    |
| 2.3.2.1.Strawberry latent ringspot virus (SLRSV) .....                                                                        | 20    |
| 2.3.2.2.Cherry leaf roll virus (CLRV) .....                                                                                   | 21    |
| 2.3.2.3.Arabis mosaic virus (ArMV) .....                                                                                      | 22    |
| 2.3.2.4.Cucumber mosaic virus (CMV) .....                                                                                     | 23    |
| 2.3.2.5.Tobacco mosaic virus (TMV) .....                                                                                      | 23    |
| 2.3.2.6.Tobacco necrosis virus (TNV) .....                                                                                    | 23    |

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.Zeytin Ağaçlarındaki Fitoplazmalar: .....                                             | 24 |
| 2.5.Zeytin Ağaçlarındaki Fitoplazma ve Virüslerin Epidemiyolojisi ve Taşınması.....       | 24 |
| 2.6. Zeytin Ağaçlarındaki Virüs ve Fitoplazmaların Tespiti.....                           | 25 |
| 2.7.Zeytin Ağaçlarındaki Virüs ve Fitoplazmaların Kontrolü .....                          | 26 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                                                | 27 |
| 3.1. Materyal.....                                                                        | 27 |
| 3.1.1 Bitki Materyali/ Survey Çalışmaları.....                                            | 27 |
| 3.1.2. Test edilen virus etmenleri .....                                                  | 27 |
| 3.2. Yöntem.....                                                                          | 28 |
| 3.2.1. Survey Çalışmaları ve Bitki Materyalinin Temini.....                               | 28 |
| 3.2.2. Serolojik Yöntemler (DAS-ELISA) .....                                              | 28 |
| 3.2.3. Moleküler Çalışmalar .....                                                         | 29 |
| 3.2.3.1. Çift kollu RNA (dsRNA) izolasyonu ve elektroforez işlemi.....                    | 29 |
| 3.2.3.2. Toplam RNA İzolasyonu .....                                                      | 32 |
| 3.2.3.3. ds-RNA ile yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....                        | 34 |
| 3.2.3.4. Toplam RNA ile Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ..... | 34 |
| 3.2.3.5. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi Agaroz Jel Elektroforezi .....                | 38 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....                                                   | 39 |
| 4.1. Arazi çalışmaları ve gözlenen belirtiler.....                                        | 39 |
| 4.2. Serolojik Testler (DAS-ELISA) .....                                                  | 41 |
| 4.3. Çift kollu RNA (dsRNA) analizleri.....                                               | 41 |
| 4.4. Çift kollu RNA (dsRNA) örnekleriyle PCR analizleri.....                              | 42 |
| 4.4. Toplam RNA örnekleriyle PCR analizleri.....                                          | 47 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                 | 55 |
| KAYNAKLAR.....                                                                            | 57 |
| TEŞEKKÜR.....                                                                             | 63 |

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b> | <b>64</b> |
| <b>EKLER.....</b>    | <b>65</b> |
| <b>Ek 1.....</b>     | <b>65</b> |
| <b>Ek 2.....</b>     | <b>67</b> |
| <b>Ek 3.....</b>     | <b>70</b> |

## ÖZET

**MARDİN İLİ ZEYTİN ALANLARINDA BAZI VİRÜSLERİN VARLIĞININ  
MOLEKÜLER TEKNİKLERLE SAPTANMASI**

Güneydoğu Anadolu bölgesinde yer alan Mardin il ve ilçelerindeki zeytin ağaçlarından toplam 170 sürgün örneği alınmış ve alınan örnekler *Olive latent-1 virus* (OLV-1, Zeytin latent-1 virüs), *Olive latent-2 virus* (OLV-2, Zeytin latent-2 virüsü), *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Kiraz yaprak kıvrılma virüsü), *Arabis mosaic virus* (ArMV, Arabis mozayik 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 mozayik virüsü)'üne karşı ELISA, Çift kollu RNA (dsRNA) analizi, dsRNA'dan PCR analizleri ve Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile test edilmiştir. 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 sağlıklı bulunurken, zeytin ağaçlarını enfekte ettiği bilinen diğer virüs hastalıkları açısından da test edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

2012, 80 Sayfa

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

**ABSTRACT****DETERMINATION OF PRESENCE OF SOME VIRUSES IN OLIVE ORCHARDS USING MOLECULAR TECHNIQUES IN MARDIN PROVINCE**

Totally 170 samples were collected from Mardin and its counties which were located in Souteastern Anatolia and they were tested against *Olive latent-1 virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) by ELISA, dsRNA, PCR analyses by using dsRNA products and RT-PCR. According to results of ELISA and RT-PCR 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, Virus

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                 |                                               |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|
| ABD                             | Amerika Birleşik Devletleri                   |
| AFLP                            | Amplified fragment length polymorphism        |
| ArMV                            | <i>Arabis mosaic virus</i>                    |
| bp                              | Baz çifti (base pair)                         |
| cDNA                            | Komplementer DNA (complementer DNA)           |
| CLRV                            | <i>Cherry leaf roll virus</i>                 |
| cm                              | Santi metre                                   |
| CMV                             | <i>Cucumber mosaic virus</i>                  |
| CP                              | Örtü proteini (Coat protein)                  |
| cv                              | Cultivar                                      |
| Da                              | Dalton                                        |
| DAS-ELISA                       | Double antibody sandwich-ELISA                |
| d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | Çift destile su                               |
| dNTP                            | 2'-deoxynucleotide 5'-triphosphate            |
| ds-RNA                          | Çift kollu RNA (Double-stranded RNA)          |
| ELISA                           | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay             |
| EtBr                            | Etidyum bromid                                |
| EPPO                            | European Plant Protection Organisation        |
| FAO                             | Food and Agriculture Organization             |
| gr                              | Gram                                          |
| IEM                             | Immuno electron microscopy                    |
| kb                              | Kilobaz                                       |
| kDa                             | Kilo dalton                                   |
| lt                              | Litre                                         |
| M                               | Molar                                         |
| MgCl <sub>2</sub>               | Magnezyum klorit                              |
| ml                              | Mililitre                                     |
| mM                              | Milimolar                                     |
| M-MuLV                          | Moloney Murine Leukemia Virus                 |
| MP                              | Hareket proteini (Movement protein)           |
| NCBI                            | National Center for Biotechnology Information |
| ng                              | Nano gram                                     |
| nm                              | Nano metre                                    |
| nt                              | Nükleotid                                     |
| OLRSV                           | <i>Olive latent ringspot virus</i>            |
| OLV-1                           | <i>Olive latent-1 virus</i>                   |
| OLV-2                           | <i>Olive latent-2 virus</i>                   |
| OLV-3                           | <i>Olive latent-3 virus</i>                   |
| OLY                             | Zeytin yaprak sarılığı                        |
| OLYaV                           | <i>Olive leaf yellowing-associated virus</i>  |
| OMMV                            | <i>Olive mild mosaic virus</i>                |
| OYMD                            | <i>Olive yellow mottling disease</i>          |
| ORFs                            | Open reading frames                           |
| OSLV                            | <i>Olive semilatif virus</i>                  |
| OVYaV                           | <i>Olive vein yellowing-associated virus</i>  |

|        |                                                                     |
|--------|---------------------------------------------------------------------|
| OYMDaV | <i>Olive yellow mottling and decline associated virus</i>           |
| PAGE   | Poliakrilamid jel elektroforez (Polyacrylamide gel electrophoresis) |
| PAUP   | Phylogenetic Analysis Using Parsimony                               |
| PCR    | Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)             |
| PVX    | <i>Potato virus-X</i>                                               |
| RNA    | Ribonükleik asit                                                    |
| RNase  | Rnase inhibitörü                                                    |
| rpm    | Rotation perminutes                                                 |
| RT     | Revers transkripsiyon                                               |
| SDS    | Sodium dodecyl sulphate                                             |
| SLRSV  | <i>Strawberry latent ringspot virus</i>                             |
| ssRNA  | Single strand Ribonükleik asit                                      |
| SSCP   | Single strand conformation polymorphisim                            |
| TAE    | Tris asetat EDTA                                                    |
| TAGEM  | Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü                |
| TMV    | <i>Tobacco mosaic virus</i>                                         |
| TNV    | <i>Tobacco necrosis virüs</i>                                       |
| TNV-A  | <i>Tobacco necrosis virus-A</i>                                     |
| TNV-D  | <i>Tobacco necrosis virus-D</i>                                     |
| U      | Ünite                                                               |
| UV     | Ultraviole                                                          |
| V      | Volt                                                                |
| µl     | Mikro litre                                                         |
| β      | Beta                                                                |

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

|                                                                                                                                                  | <b>Sayfa</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Çizelge 2.1. Zeytin ağaçlarında enfeksiyon yaptığı belirlenen virüs etmenlerinin sınıflandırılması, konukçuları ve tespit edildiği ülkeler ..... | <b>14</b>    |
| Çizelge 3.1. PCR reaksiyon karışımının içerikleri ve konsantrasyonları .....                                                                     | <b>37</b>    |
| Çizelge 3.2. Zeytin ağaçlarında enfeksiyon yapan virüslerin PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri .....          | <b>38</b>    |
| Çizelge 4.1. Mardin ilinden toplanan zeytin örneği ve ilçelere göre örnek miktarları .....                                                       | <b>42</b>    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.1. 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 .....                                                                                                                                                                                                     | 3     |
| Şekil 1.2. Zeytin üretiminin yapıldığı alanın ülkelere göre dağılımı .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 3     |
| Şekil 1.3. Zeytin üretiminin ülkelere göre dağılımı.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 4     |
| Şekil 3.1. RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Germany) ile bitki dokularından toplam RNA ekstraksiyonunun şematik anlatımı. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 34    |
| Şekil 3.2. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)’nın şematik ifadesi.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 36    |
| Şekil 4.1. Mardin ili Derik ilçesindeki eski bahçelerin bulunduğu vadiden genel görünüm. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 39    |
| Şekil 4.2. Mardin ilinde A) Yaşlı ağaç B) Genç ağaç ve C) Dara antik kent bölgesindeki yaklaşık 10-30 yıllık zeytin ağaçları.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 40    |
| Şekil 4.3. Zeytin ağaçlarında virüs enfeksiyonları ile ilişkili olabilecek, en çok görülen semptomlar A) yaprak burulması, B) yaprak kenarlarının dışa doğru kaşık gibi kıvrılması, C, D, E) yapraklarda deformasyonlar, E, F) yapraklarda klorotik halkalı lekeler.....                                                                                                                                                                       | 41    |
| Şekil 4.4. Zeytin dallarının kortikal dokularında gerçekleştirilen dsRNA analizinde elde edilen elektroforetik oluşumlar.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 44    |
| Şekil 4.5. Zeytin dallarının kortikal dokularında gerçekleştirilen dsRNA analizinde elde edilen elektroforetik oluşumlar. 176 nolu örnek negatif kontrol. M Lambda DNA EcoRI/HindIII DNA ladder (MBI Fermentas, Almanya). ....                                                                                                                                                                                                                 | 45    |
| Şekil 4.6. dsRNA örnekleriyle gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya) .....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 46    |
| Şekil 4.7. dsRNA örnekleriyle gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya).....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 47    |
| Şekil 4.8. dsRNA örnekleriyle gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya) .....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 48    |
| Şekil 4.9. Araştırılan virüslerle enfekteli zeytin dokuları ile RT-PCR sistem kurma çalışmaları. M Markır (MBI Fermentas (GmbH, Almanya) 100 bp DNA ladder, 1 CMV pozitif kontrol (280 bp), 2 CLRV pozitif kontrol (416 bp), 3 SLRSV pozitif kontrol (293 bp), 4 ArMV pozitif kontrol (302 bp), 5 OLV-1 pozitif kontrol (299 bp), 6 OLV-2 pozitif kontrol (206 bp), 7 OLRV pozitif örnekler (356 bp) ve W su kontrolünü ifade etmektedir. .... | 49    |
| Şekil 4.10. Toplam RNA’dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya).....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 50    |
| Şekil 4.11. Toplam RNA’dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |       |

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix<br>(MBI Fermentas, Almanya).....                                                                             | 51 |
| Şekil 4.12. Toplam RNA'dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları.<br>+K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix<br>(MBI Fermentas, Almanya)..... | 52 |
| Şekil 4.13. Toplam RNA'dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları.<br>+K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix<br>(MBI Fermentas, Almanya)..... | 53 |

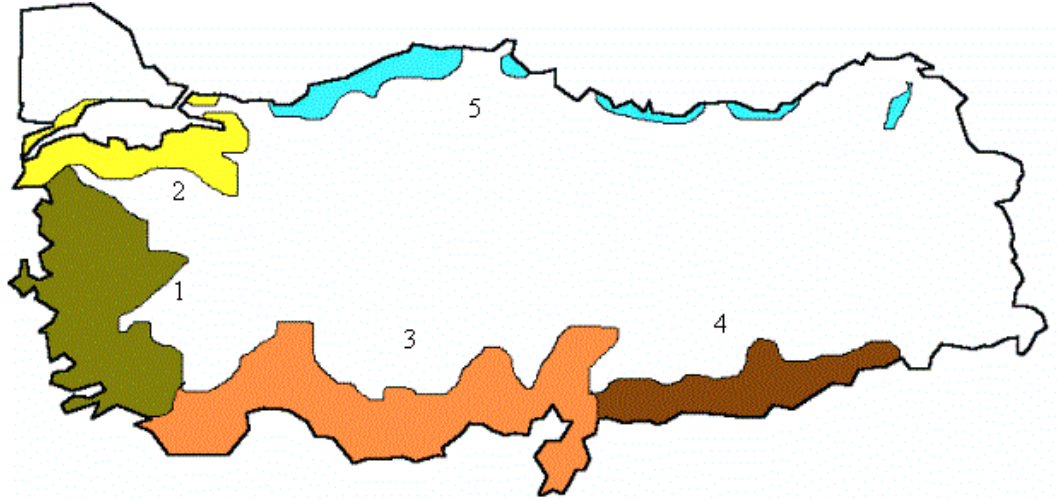
## 1.GİRİŞ

Zeytin geçmişten günümüze birçok kültürde, birçok efsanede ve tek tanrılı üç büyük dinin kutsal kitaplarında yer alıyor olması nedeniyle diğer meyveler arasında özel bir yere koymuştur. Zeytin Nuh Tufanı efsanesinde vurgulanmış daha sonraları Yunan mitolojisinde tanrılar tarafından insanlara verilen bir hediye olarak nitelendirilmiştir. Eski Mısır, Roma ve Yunan medeniyetlerinde zeytinyağına bazı ot ve çiçekler karıştırılıp ilaç ve kozmetik yapımında kullanılmış ve olimpiyat oyunlarının herhangi bir dalında bir yarışmayı kazanan atlet zeytin yapraklarından yapılmış bir taç ile onurlandırılmıştır. Tarihte zeytin dalı barışı, medeniyeti ve bereketi temsil etmiştir. Akdeniz insanının uzun ve sağlıklı yaşamasını 300-400 yıl ömür sürebilen ve bazı kaynaklarda 1000, hatta 3000 yaşında “Hayat ağacı” ya da “Ölmez ağaç” olarak adlandırılan zeytin ağaçlarından elde edilen ürünleri tüketmelerine bağlamışlardır.

*Oleacea* familyasının bir üyesi olan zeytin (*Olea europaea* L.) yüzyıllarca önemini yitirmemiş ve 21. yüzyılın bitkisi olarak düşünülen zeytin bitkisinin anavatanı olarak iki farklı görüş ortaya atılmıştır. En yaygın ve kabul gören görüş; Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ni de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya’da yer alan Mardin, Hatay, Suriye, Filistin ve Kıbrıs adasını içerisine alan bölge kabul edilmektedir. Dünya’ya da Anadolu’dan Akdeniz ülkelerine ve Dünya’nın değişik yerlerine yayılmıştır. Diğer görüş ise; Mısır, Kuzey Afrika’nın Atlas Dağları kesiminden yayıldığıdır. Ancak, orijini ne olursa olsun Kutsal zeytin ağacı; Akdeniz uygarlığının sembolüdür. Tüm dünyada yaklaşık 900 milyon ağaçtan % 98’ i Akdeniz çanağında yer almaktadır. Bir Akdeniz ülkesi olan ülkemizin nerdeyse tüm kıyı bölgelerinde ve bazı mikro klima özelliği gösteren alanlarında zeytine rastlanmaktadır (Şekil 1.1).

Zeytin türlerine bağlı olarak meyve ağırlığının % 20-30’ u yağdan ibarettir. Nisan-mayıs ayları arasında yeşilimsi-beyaz renkli çiçekler açar, kışın yapraklarını dökmeyen bir meyvedir. Gövdeleri çok dallı bir ağaççık olan zeytinin meyvesi önceleri yeşil, daha sonra mor ve siyah renge dönüşürler. Killi, kireçli ve su geçirebilen topraklarda iyi yetişir. Engebeli ve yamaç, fakat ılık rüzgarlı yerleri sever. Zeytin ağacı, yaprağından çekirdeğine

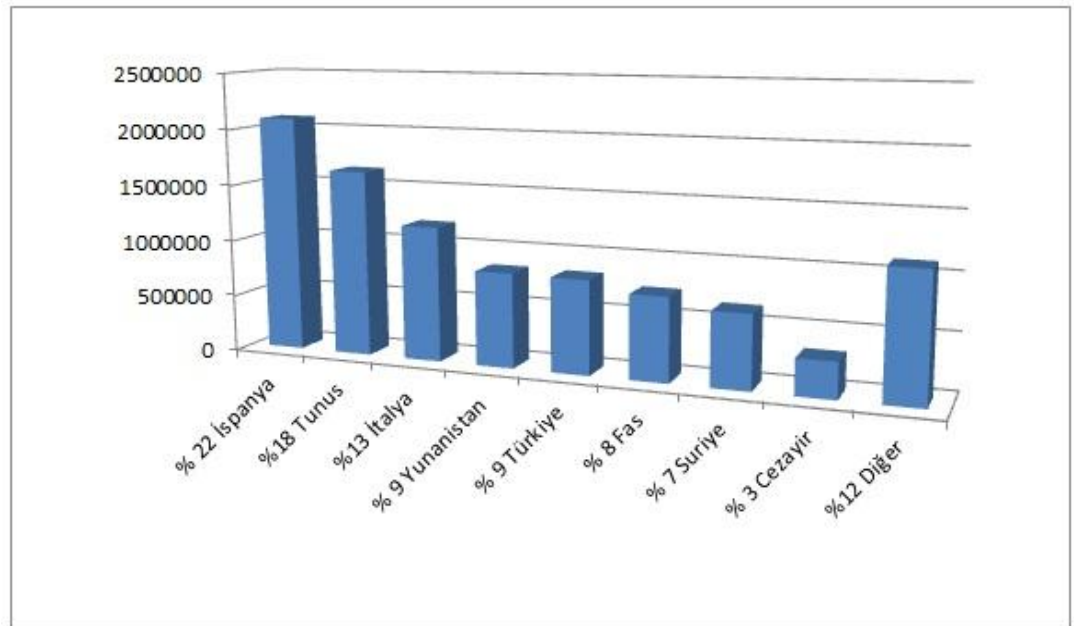
çok değerlidir. Zeytin ağacı; yerine göre süs, yerine göre yiyecek, yerine göre yakacak olurken, günümüzde giderek artan bir şekilde, hastalıklara karşı ilaç ve kozmetikte, temel madde olarak kullanılmaktadır. Zeytinin sağlığa faydaları ise; yapısı su, protein, yağ, selüloz, fosfor, kükürt, kalsiyum, klor, demir, bakır, manganez ve vitaminlerden meydana gelir. A, D, E ve K vitamini içeriği ile vücutta antioksidan etkisi gösterir, hücrelerin yenilenmesini hızlandırır. Zeytinyağı yaşlanmayı genel olarak geciktirdiği gibi, yaşlanmanın doku, organ ve beyin fonksiyonları üzerindeki etkisini de yavaşlatır. Yüksek oranda doymamış yağ içerdiğinden, kötü huylu kolesterol seviyesini düşürürken, iyi huylu kolesterol seviyesine etki etmez ve kalp hastalıklarının oluşmasını önler. Kemiklerin güçlenmesine katkıda bulunur. En kolay hazmedilen yağ olduğundan, tam anlamıyla mide dostudur. Yemeklerden önce içildiğinde mide çeperini kaplayıp, gastrit ve ülser gibi hastalıklara yakalanma riskini önler. Zeytinyağı, katı ve sıvı tüm yağlar arasında en kolay hazmedilen yağdır. Yeni doğmuş bebeklerin beyin gelişimi için gerekli olan linoleik asit oranı zeytinyağında yüksek seviyede olduğundan, bebek bekleyen ve emzikli annelerin beslenmesi için en uygun yağdır.



**Şekil 1.1.** 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.)

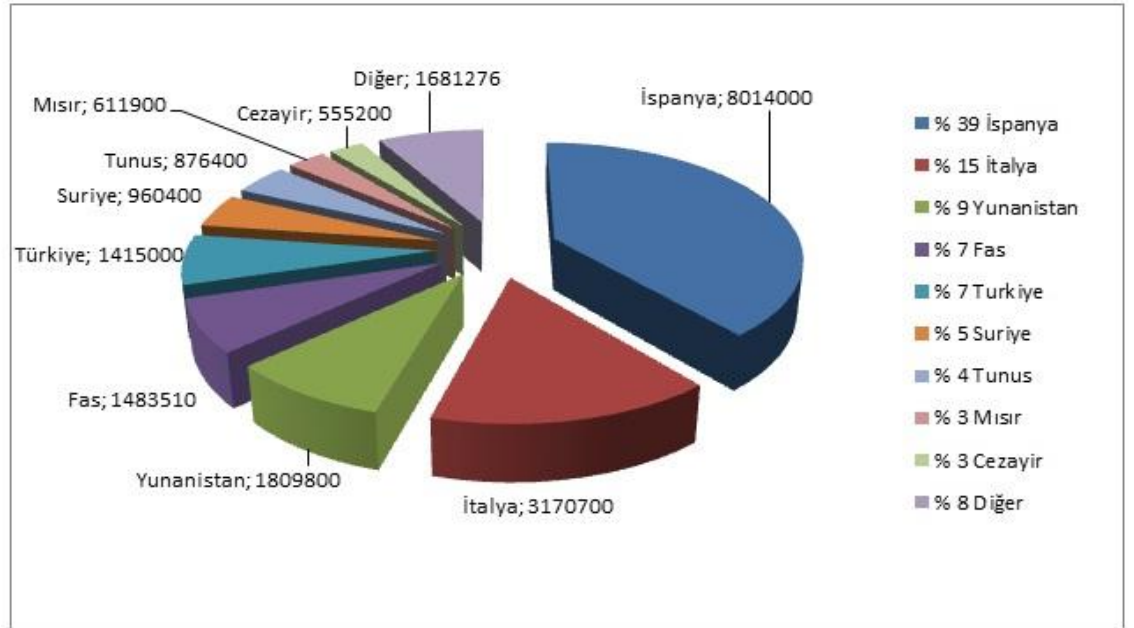
Zeytincilikte İspanya ve İtalya ülkeleri başta gelmektedir. Yunanistan, Fas, Türkiye, Suriye; Tunus, Mısır, Portekiz ve Cezayir diğer önemli zeytin üreticisi ülkelerdir. Türkiye; dünya zeytin yetiştiricilik alanı ve zeytin üretiminde 5. sıradadır. Dünyada zeytinin yetiştirildiği toplam alan 9.398,623 ha olup sırasıyla İspanya, Tunus, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Fas ve Suriye takip etmektedir (Şekil 1.2.). Dünya zeytin üretim miktarı ise 20.578,186 ton olup üretimde İspanya, İtalya, Yunanistan, Fas, Türkiye, Suriye ve Tunus olarak sıralanmaktadır (Şekil 1.3.) (Anonymous, 2010).

Ülkemizde zeytincilik ağırlıklı olarak Ege, Marmara, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve az da olsa Karadeniz bölgelerinde yapılmaktadır. Türkiye zeytin varlığı 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 1.2.** Zeytin üretiminin yapıldığı alanın ülkelere göre dağılımı (Anonymous, 2010).

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 yıllardır 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).



**Şekil 1.3.** Zeytin üretiminin ülkelere göre dağılımı (Anonymous, 2010)

Dünyada ve Türkiye’de yapılan çalışmalar neticesinde zeytinde birçok hastalık ve zararlı tespit edilmiştir. Türkiye’de zeytinde yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen veriler dikkate alındığında ülkemiz için ana zararlı ve hastalık olarak Zeytin sineği [*Bactrocera oleae* (Gmel.)] ve Zeytin halkalı leke hastalığı [*Spilocaea oleagina* (Cast) Hughes] olduğu görülmektedir. Bunun yanında, zeytindeki diğer zararlılar zeytin güvesi (*Prays oleae* Bern.), zeytin karakoşnili (*Saissetia oleae* Olivier ), zeytin kabuklu biti (*Parlatoria oleae* (Colvée), zeytin pamuklubiti (*Euphyllura olivina* Costa.), zeytin çiçek sap sokanları (*Calocoris trivialis* Costa. ve *C.annulus* Costa.), zeytin kırlangıç böcekleri

(*Agalmatium, flavescens* Oliv. ve *A.bilobum* Fieb.), zeytin kurdu (*Coenorrhinus cribripennis* Desb.), zeytin pamuklu koşnili (*Filippia oleae*), zeytin fidan tırtılı (*Palpita unionalis*), zeytin kızıl kurdu (*Lasioptera berlesiana*) ve zeytin yara koşnili (*Pollinia pollini* Costa)'dır. Zeytinde önemli hastalıklar ise zeytin dal kanseri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*) *Armillaria* kök çürüklüğü hastalığı [*Armillaria mellea* (Vall.) Quel], zeytin solgunluğu (*Verticillium dahliae* Kleb), ve Rosellinia kök çürüklüğü hastalığı (*Rosellinia necatrix* Prill.)'dır. Zeytin bahçelerinde hastalık ve zararlılar dışında bitki su ve besinlerine ortak olan yabancı otlar, bazı durumlarda hastalık ve zararlılara konukçuluk yapmaları yönünden önemlidirler. Zeytin bahçelerinde sık olarak görülen yabancı otlar yabani yulaf (*Avena* spp.), tarla bromu (*Bromus* spp.), hakiki papatya (*Matricaria chamomilla*), kanyaş (*Sorgum halepense*), böğürtlen (*Rubus* spp.) (odunsu bitki), hait (*Vitesagnus castus*)'tir. Hastalık zararlı ve yabancı otlar dışında zeytin ağaçlarında bitki besin elementi noksanlıkları virüs simptomları ile karıştırıldığı için önem arz etmektedir. En önemli bitki besin elementi noksanlıkları ise azot noksanlığı, fosfor noksanlığı, potasyum noksanlığı, kalsiyum noksanlığı, magnezyum noksanlığı, çinko noksanlığı ve bor noksanlıklarıdır.

Zeytinde yukarıda bahsedilen hastalık, zararlı, yabancı ot ve bitki besin elementleri dışında, dünyada konukçusu zeytin olduğu bilinen fitoplazmalar; yıldız çiçeği sarılığı (aster yellows grup; *Candidatus Phytoplasma asteris*), karaağaç sarılığı (elm yellows grup; *Candidatus Phytoplasma ulmi*) ve X hastalığı (X disease)' dir. Şu ana kadar zeytinde spiroplazmalardan palamutlaşma (stubborn; *Spiroplasma citri*) hastalığı tespit edilmiştir. Zeytinde saptanan virüsler ise; *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, Çilek latent halkalı leke virüsü), *Arabis mosaic virus* (ArMV, Arabis mozayik virüs), *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Kiraz yaprak kıvrılma virüsü), *Cucumber mosaic virus* (CMV, Hıyar mozayik virüsü), *Tobacco mosaic virus* (TMV, Tütün mozayik virüsü) olup konukçu dizisi geniş olan virüs etmenleridir. Zeytin ön adı ile başlayan ve konukçusu genellikle zeytin olan virüs hastalıkları 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 semilatif 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 virüs)'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 artıracak gibi ağaçların ekonomik ömürlerini uzatacaktır. Zeytinde enfeksiyon yapan virüslerin bir bitkiden diğerine nasıl geçtiği konusunda bazı araştırmalar var ise de henüz istenen düzeyde değildir. Bu çalışmalar virüsün doğadaki dağılımı ve yayılımını anlamamız bakımından önem arz etmektedir. Zeytin virüslerinin bir kısmı sadece sınırlı sayıda ağaçta bildirilmişken bir kısmı da geniş alanlarda bildirilmiştir. Zeytinde enfeksiyon yapan virüslerden OLV-1 zeytin dışında Türkiye ve Japonya'da önce turunçgillerden sonra da lalelerde tespit edilmiştir (Martelli ve ark., 1996; Kanematsu ve ark., 2001). Bunun dışındaki zeytin (olive) ön adıyla anılan virüsler hakkında (OLRSV, OLV-2, OLYaV, 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 belirtileri 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 yapılan böcek taşıma denemelerinde başarı sağlanamamıştır.

Zeytin virüslerinin görsel teşhisinde sadece SLRSV bazı belirtiler verirken diğerleri genellikle belirtisizdir (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 metodlarından 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 denenen 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 üç 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). Bu çalışmaların dışında 2008 yılında Doğu Akdeniz Bölgesinde zeytin örnekleri RT-PCR yöntemi analiz edilmiş ve OLV 1 virüsü saptanmıştır (Yalçın, 2008).

Güneydoğu Anadolu bölgesinin zeytin yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Mardin ili zeytin alanlarında yapılan sürveyler neticesinde toplanan zeytin örneklerinde SLRSV, CLRV, ArMV, CMV, OLV-1, OLV-2 ve OLRV’ lerinin varlığı araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada toplanan örnekler serolojik yöntemlerden ELISA yöntemi, çift kollu (ds-double strand) RNA analizi, ds-RNA’nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) analizleri ve toplam RNA’nın Revers Transkripsiyon (RT)-PCR ile analiz edilmiş ve elde edilen

veriler ÷lkemizdeki zeytin vir÷s hastalıklarının durumu konusunda yapılan çalışmalara katkı sağlamıştır.

## 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zeytin ağaçları virüs ve fitoplazmalar gibi sistemik hastalık oluşturabilen patojenlerle ve etiyolojisi bilinmeyen hastalık ajanları ile enfekte olabilmektedir. Zeytin ağaçlarında etmenin viral olması muhtemel hastalıkların ilk kaydı 1938'lere yapılmıştır (Pasente 1938). Akdeniz mutfağının vazgeçilmezi olan zeytinyağının kaynağı olması nedeniyle ekonomik öneme sahip olan zeytin ağacında birçok virüs ve fitoplazma hastalıkları rapor edilmiştir.

Zeytin ağaçlarının bir patojen ile enfeksiyon durumunda aşağıdaki olasılıklar söz konusu olabilir: 1- Hastalık etmeni saptanamamış olan hasta görünümlü bitkiler 2- Farklı virüslerin izole edildiği simptomsuz bitkiler, 3- Virüs veya fitoplazma ile enfekteli olup sararma ve meyve deformasyonları gibi vejetatif bozukluklar gösteren bitkiler.

Zeytin bitkisinde ilk viral enfeksiyonun deneysel kanıtı 1976' da kaydedilmiştir. İtalya'nın Tuskani bölgesinden simptom göstermeyen bir ağaçtan alınan polen taneleri yapılan bu deneyde kullanılmıştır (Paccini ve Cresti, 1977; Savino ve ark. 1979). Bu örnekten elde edilen virüs partikülleri SLRSV olarak tanımlanmıştır (Marte ve ark., 1986). 1980' lerden sonra zeytin ağaçlarından birçok farklı virüs izole edilmiştir.

İtalya'nın merkezi ve kuzeyindeki zeytin bahçelerinden 1996'da "Sarılık" ve "Cadı süpürgesi" fitoplazmalarının neden olduğu belirtiler meyve ağaçlarında bildirilmiştir. Yaprak orta damarı dokusunda lokalize olan fitoplazmalar ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Poggi Pollini ve ark 1996; Del Serrone ve ark.,1996).

### 2.1. Etmeni Saptanamamış Hastalıklar

Hastalık belirtileri: Bu güne kadar zeytin ağaçlarında birçok hastalık belirtisi belirlenmiştir.

1- Arjantin’ deki zeytin endüstrisini etkileyen bazı hastalıkların neden olduğu simptomlar arasında bitki yaprağının rozetleşmesi, yaprak üzerinde şerit şeklinde çizgiler, halka şeklinde benekler ve mozaik simptomlar gözlemlenmiştir. *Ligustrum sinensis* ile yapılan mekanik inokulasyonlarda rozetleşme ve klorotik halkalı simptomlar ortaya çıkmıştır (Nicolini ve Travessi, 1950).

2- Akdeniz ülkelerinde ve İtalya’ daki zeytin ağaçlarında rapor edilen en yaygın simptom yaprak deformasyonlarıdır. Enfekteli bitkilerden sağlam bitkilere inokulasyon denemeleri yapılmış ve başarı sağlanmamıştır (Cifferi ve ark., 1953; Fogliani, 1953). Ancak tipik simptomlar *L. luciduma* yapılan denemelerde filizler üzerinde yaprak deformasyonları görülmüştür. Bu yaprak deformasyonlarının muhtemelen bir virüsten kaynaklandığı ancak bitkilere tekrar bulaştırmaların yapılamadığını ifade etmişlerdir (Corte ve ark. 1961).

3- Orak yaprak simptomsu zeytin ağaçlarında en çok rastlanan simptomlardandır. *Olea europaea*’ya yapılan aşılamalarda bir bitkiden diğerine geçtiği kanıtlanmıştır. Bununla beraber bu simptomlara neden olan ajan halen belirlenememiştir (Materlli, 1999). Orak yaprak ilk defa Kaliforniya’da belirlenmiş (Tomas 1958), daha sonra Şili, Portekiz, İsrail ve Yunanistan’da (Waterworth ve Monroe, 1975; Barbara, 1993; Kyriakkopoulou, 1996) rapor edilmiştir. Kyriakopoulou (1996)’da hastalıklı yaprak ile verim arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını bildirmiştir. Herrera ve Madriago (1999)’ da Şili’deki zeytin ağaçlarında orak yaprak simptomları gösteren bitkilerde ds-RNA belirlemişlerdir. Aynı küçük RNA Peru’daki zeytin ağaçlarında da belirlenmiştir.

4- Bulaşıcı sarılık gösteren hastalık ilk olarak İtalya’ nın merkezindeki Umbria’da belirlenmiştir. Bu bulaşıcı sarılık hastalık ağaçlarda üründe azalma ve yaprakların kısmen sarıya dönmesi şeklinde kendini göstermiştir. Bu hastalık yabani zeytin türlerine (*O. europeae*, var. *oleaster*) aşılama yoluyla başarılı bir şekilde taşınmıştır. Etmenin etiyolojisi ile ilgili bir bilgi henüz mevcut değildir.

5- Spherosis hastalığı ilk olarak İsrail’de belirlenmiş ve genellikle ‘Manzanillo’ çeşidinde rapor edilmiştir. Bu hastalığın yaygın simptomları cüceleşme, düşük verim, gövde ve dallar üzerinde küçük çıkıntılara neden olur. Spherosis hastalığı ‘Nabali’ çeşidinde simptomlarda azalma gözlemlenmiştir. Aşılama ve doğal olarak yayılan bir

hastalık olmasına rağmen epidemiyolojisi ve etiyolojisi bilinmemektedir (Lavee ve Tanne, 1984).

6- Kabuk çatlaması Ürdün’ de yerel bir çeşit olan ‘Navalli B’ üzerinde belirlenmiştir. Hastalıktan etkilenen bitkilerde bodurlaşma, çiçekte azalma ve yaprakların sarıya dönmesi şeklindedir. Ağaçların gövde kabukları anormal şekilde kalın, mantarimsi ve çatlak şeklindedir. Bu mantarlaşma ve çatlama bütün gövde ve ana dalları sarabilir. Taşıyıcı ajan halen belirlenmemiş ve aşı yoluyla taşıma denemeleri halen başarılı bir şekilde sonuçlanmamıştır (Martelli ve ark., 1995).

7- Zeytin ağaçlarındaki farklı bozukluklar 1980’lerden sonra rapor edilmeye başlanmış sadece Spherosis’te aşı yoluyla taşımada başarı sağlanmıştır. Ancak diğerinin aşı ile taşıma çalışmaları henüz yapılmamıştır. Bu hastalıklar meyvelerde tümsekleşme, benekleşme ve gövdede çatlaklar oluşturur. Yunanistan’daki meyvelerdeki şekil bozuklukları meyve yüzeyinde benekleşme ve olgunlaşmada gecikmeler olduğu rapor edilmiştir (Martelli ve ark., 2002a). Bu belirtiler henüz aşı ile taşınmamış ancak bu belirtiler SLRSV ile ilişkilendirilmiştir.

Yunanistan’daki zeytin meyvelerinde değişimler meyve yüzeyinde kahverengi lezyonlar, beyazımsı düz şişkinlikler, olgunlaşmada problemler ve meyve çürümeleri olarak rapor edilmiştir (Martelli, 1999). Bu bozukluklar virüs belirtilerine benzerlikler gösterir fakat yapılan aşılama denemelerinde aşı ile henüz taşındıkları belirlenmemiştir (Kyriakopoulou, 1996) ancak bu belirtiler SLRSV ile ilişkilendirilmiştir.

## **2.2. Virüsten kaynaklanan şekil bozuklukları ve etiyolojisi bilinmeyen hastalık etmenlerinin neden olduğu hastalıklar**

Zeytin hastalıkları meyve, yaprak sararma kompleksi ile damar bantlaşması ve damar açılması ile ilişkilendirilmiştir (Martelli, 1999).

1- Meyvelerde şekil bozukluğu İtalya (Marte ve ark. 1986), Portekiz, (Henriques ve ark., 1992), ve Türkiye’de (Tarla ve Çağlayan, 1998) bildirilmiştir. Arazide yapılan

simptomolojik gözlemler sonucunda bu hastalık SLRSV olarak kabul edilmiştir. Ascolana tenera' ya yapılan aşılama sonucunda simptomolojik olarak SLRSV teşhis edilmiştir (Martelli 1999). SLRSV ile bulaşık ağaçlarda deforme meyveler İspanya (Bertolini ve ark., 1998) dışında belirtiler daha önce de gözlenmiştir (Savino ve ark. 1979; Marte ve ark., 1986; Henriques ve ark., 1992; Çağlayan ve ark., 2004). Meyve deformasyonları görülen ağaçlarda çoğunlukla yapraklarda kıvrılma, salkım benzeri oluşumlar ve verim kayıpları ile ilişkilendirilmiştir (Faggioli ve ark., 2002; Çağlayan ve ark., 2004).

2- Yaprak sarılık kompleksi üç farklı hastalığa karşılık gelmektedir. Bu hastalıklar Zeytin yaprak damarı sarılığı (OVY) (Faggioli ve Barba, 1995) Zeytin yaprak sarılığı (OLY) ve Zeytin sarı benek hastalığı (OYMD)' dir (Savino ve ark. 1996). Kompleksin tipik belirtileri zayıf meyve oluşumları, yaprağın tamamen açık sarı renklenmesi, beneklenme, nekroz, yoğun yaprak dökümü ve geriye doğru ölümdür (Martelli, 1999).

3- Damar bantlaşması ve damar açılması ilk olarak İtalya'da Toskana'da kaydedilmiştir. Damar bantlaşma belirtileri yaprakta ana damar boyunca klorotikten sarıya doğru renk açılmaları, verim düşüklüğü, şiddetli yaprak dökümü/azalmasıdır. Bu hastalık belirtilerini gösteren ağaçlardan aynı zamanda *Tobacco necrosis virus* (TNV) izole edilmiştir. Ancak hastalığın gerçek sebebi olduğuna dair kesin bir kanıt bulunmamıştır (Triolo ve ark. 1996). Damar açılması damarların oldukça az klorotik renk açılmalarıyla karakterize edilmektedir. Hastalıklı bitkilerden 28 nm boyutlarında izometrik partiküller izole edilmiş olup *Olive semi latent virus* (OSLV) olarak adlandırılmıştır. Bu virüs hastalığının etiyolojisi ile ilişkisi ile ilgili ileri derecede bilgilere ulaşılamamıştır (Materazzi ve ark., 1996; Martelli, 1999).

4- Vejetatif bozukluklar çalı gibi gelişim, cadısüpürgesi, kloroz, yaprakların sararması ve deformasyonu, çiçek dökümü, anormal sürgün gelişimi ve sürgünlerde 1990 yılında İtalya'nın merkezi ve kuzeyinde bildirilmiştir. Bu bitkilerde Aster yellows (16S-IB), Elm yellows (16S-VA) ve Stolbur (16S-XIIA) gruplarına ait fitoplazmalar belirlenmiştir (Pasquini ve ark., 2000). İran (Ahangaran ve ark., 2006) ve İspanya'daki (Font ve ark., 1998) zeytin ağaçlarında fitoplazmaların hastalıkları belirtilerine benzer belirtilerin olduğu bildirilmiştir.

### 2.3.Zeytin ağaçlarında tespit edilen virüsler:

#### **Zeytin Ağaçlarında Tespit Edilen Virüslerin Coğrafik Dağılımı ve Taksonomik Durumu:**

Zeytin ağaçlarında şu ana kadar 8 cinse ait 14 virüs türü etmeni tanımlanmıştır (Martelli ve ark. 1999; Felix ve Clara, 2002) (Çizelge 2.1.). Bunlara ilave olarak tanılaması kısmi olarak yapılan iki virüs türü (geçici olarak closterovirüs olarak sınıflandırılmıştır) zeytin doku ekstraktlarında tanımlanmıştır (Martelli ve ark., 2002b). Tanımı yapılmış virüsler şunlardır; Nepovirus olarak; *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV) ve *Olive latent ringspot virus* (OLRSV), Sadwavirus olarak *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), Cucumovirus olarak *Cucumber mosaic virus* (CMV), Tobamovirus olarak *Tobacco mosaic virus* (TMV), Necrovirus olarak *Olive latent virus 1* (OLV-1), *Olive mild mosaic virus* (OMMV), ve *Tobacco necrosis virus* (TNV), Oleavirus cinsine ait *Olive latent virus 2* (OLV-2), Potexvirus olarak *Olive vein yellowing associated virus* (OVYaV), Clostreovirus olarak *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV), Tymovirüs olarak *Olive latent virus 3* (OLV-3) ve ikisi de tanımlanmamış cinse ait virüsler olan *Olive yellow mottling and decline associated virus* (OYMDaV) ve *Olive semi latent virus* (OSLV), tür. Bazı virüsler iyi tanımlanmış olup çok sayıda ürünü enfekte ederler, diğerleri ise sadece zeytinlerde saptanmıştır. Kesin tanısı yapılan virüsler iki ana gruba ayrılabilirler: 1. Zeytin önadı ile adlandırılan virüsler 2. Diğer virüsler.

**Çizelge 2.1.** Zeytin ağaçlarında enfeksiyon yaptığı belirlenen virüs etmenlerinin sınıflandırılması, konukçuları ve tespit edildiği ülkeler

| <b>Zeytin Ön Adıyla Başlayan Virüsler</b>                          |                        |                      |                                                                                                               |                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>ve Kısaltmaları</b>                                             | <b>Familyası</b>       | <b>Cinsi</b>         | <b>Konukçuları</b>                                                                                            | <b>Tespit Edildiği Ülkeler</b>                                              |
| <i>Olive latent virus 1 (OLV-1)</i>                                | <i>Tombusviridae</i>   | <i>Necrovirus</i>    | Zeytin, Lale, Turunçgil                                                                                       | İtalya, Ürdün, Portekiz, Mısır, ABD, Lübnan, Suriye, Türkiye                |
| <i>Olive latent virus 2 (OLV-2)</i>                                | <i>Bromoviridae</i>    | <i>Oleavirus</i>     | Zeytin, Gene otu                                                                                              | İtalya, Suriye, Hırvatistan                                                 |
| <i>Olive latent virus 3 (OLV-3)</i>                                | <i>Tymoviride</i>      | <i>Tymovirus</i>     | Zeytin                                                                                                        | İtalya, Portekiz, Lübnan, Suriye, Türkiye, Malta, Tunus, Yunanistan         |
| <i>Olive leaf yellowing associated virus (OLYaV)</i>               | <i>Closteroviridae</i> | <i>Closterovirus</i> | Zeytin                                                                                                        | İtalya, Suriye, Mısır, ABD, Lübnan, Hırvatistan                             |
| <i>Olive vein yellowing associated virus (OVYaV)</i>               | -                      | <i>Potexvirus</i>    | Zeytin                                                                                                        | İtalya                                                                      |
| <i>Olive latent ringspot virus (OLRSV)</i>                         | <i>Secoviridae</i>     | <i>Nepovirus</i>     | Zeytin                                                                                                        | İtalya, Suriye                                                              |
| <i>Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV)</i> | -                      | Tanımlanmamış        | Zeytin                                                                                                        | İtalya                                                                      |
| <i>Olive semi latent virus (OSLV)</i>                              | -                      | Tanımlanmamış        | Zeytin                                                                                                        | İtalya                                                                      |
| <i>Olive mild mosaic virus (OMMV)</i>                              | -                      | <i>Necrovirus</i>    | Zeytin                                                                                                        | Portekiz                                                                    |
| <b>Diğer Virüsler ve Kısaltmaları</b>                              | <b>Familyası</b>       | <b>Cinsi</b>         | <b>Konukçuları</b>                                                                                            | <b>Tespit Edildiği Ülkeler</b>                                              |
| <i>Arabis mosaic virus (ArMV)</i>                                  | <i>Secoviridae</i>     | <i>Nepovirus</i>     | Zeytin, çilek vb., şerbetçiotu, asma, şeker pancarı, <i>Sambucus nigra</i> , kereviz, glayol, at turpu, marul | İtalya, Mısır, ABD, Türkiye, Suriye, Lübnan                                 |
| <i>Cherry leaf roll virus (CLRV)</i>                               | <i>Secoviridae</i>     | <i>Nepovirus</i>     | Zeytin, Karaağaç, ceviz, kiraz, ravent                                                                        | İtalya, Portekiz, İspanya, Mısır, ABD, Türkiye, Lübnan, Suriye,             |
| <i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>                                 | <i>Bromoviridae</i>    | <i>Cucumovirus</i>   | Zeytin, Hıyar ve diğerleri                                                                                    | İtalya, Mısır, ABD, Türkiye, Suriye, Lübnan,                                |
| <i>Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)</i>                    | <i>Secoviridae</i>     | <i>Sadwavirus</i>    | Zeytin, Çilek vb., asma, kiraz, erik, şeftali, , <i>Sambucus nigra</i>                                        | İtalya, Portekiz, İspanya, Mısır, ABD, Türkiye, Lübnan, Suriye, Hırvatistan |
| <i>Tobacco mosaic virus (TMV)</i>                                  | -                      | <i>Tobamovirus</i>   | Zeytin, Tütün ve diğerleri                                                                                    | İtalya                                                                      |
| <i>Tobacco necrosis virus (TNV)</i>                                | <i>Tombusviridae</i>   | <i>Necrovirus</i>    | Zeytin, Tütün, lale, fasulye, hıyar, patates, armut, elma, turunçgil, asma,                                   | Portekiz                                                                    |

### 2.3.1. Zeytin önadı ile adlandırılan virüsler

Zeytin ağaçlarının spesifik virüsleri olarak adlandırılabilir. Bu virüslerden lale ve turunçgilleri enfekte eden OLV-1 ve hint otu ve yabani fasulyede tespit edilen OLV-2 bu adlandırmanın dışında kalır. Bu virüsler dışında kalan ve zeytin önadı ile adlandırılan virüslerin şimdiye kadar diğer konukçuları rapor edilmemiştir.

#### 2.3.1.1. *Olive latent virus 1 (OLV-1)*

*Tombusviridea* familyasına ait olan bu virüs *Necrovirus* cinsinin bir üyesidir. İtalya (Gallitelli and Savino, 1985), Ürdün (Martelli ve ark., 1995), Portekiz (Felix ve Clara, 1998), Mısır, ABD (Saponari ve Savino, 2003), Lübnan (Fadel ve ark., 2005), Suriye (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Türkiye’de (Serce ve ark 2007) kayıt altına alınmıştır. Birkaç izolatu Türkiye’de turunçgil ağaçları gibi oldukça farklı hastalık konukçularının yanısıra zayıf kalmış zeytin ağaçlarında ve symptom göstermeyen ağaçlarda tanılanmıştır (Martelli ve ark., 1996), ayrıca Japonya’da da lalede saptanmıştır (Kanematsu ve ark., 2001). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda OLV-1 virüsünün 30 nm çapında izometrik bir partiküle sahip olduğu belirlenmiştir (3.619 nükleotid ssRNA genomunun pozitif sensidir). Bu genomik RNA 5’-3’ doğrultusunda 23, 82, 8, 6 ve 30 kDa olan polipeptidini kodlayan 5’ ucu açık okuyuma (ORFs) bölgesine sahiptir. ORF1 (23 kDa protein) ve ORF2 (82 kDa protein) her ikisi de virüsün çoğalmasında gereklidirler. ORF3 (8 kDa protein) ve ORF4 (6 kDa protein) uzun mesafelere yayılmadan ORF5 (30 kDa protein) kaplama protein olarak değerlendirilir. ORF4 hücreden hücreye ORF5 ise uzun mesafelerde bitkileri enfekte etmekle görevlidir (Pantaleo ve ark.,1999). Zeytinde tohumla bulaşan ve doku naklederek geçen bu virüs %82 oranında rapor edilmiştir.

#### 2.3.1.2. *Olive latent virus 2 (OLV-2)*

*Bromoviridea* familyasının *Oleavirus* cinsinin monotipik bir üyesidir. OLV-2 güney İtalya'da Apulia da simptomsuz zeytin ağaçlarından mekanik inokulasyon yolu ile izole edilmiştir (Savino ve ark., 1984). Daha sonra Suriye'de (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Hırvatistan'da (Bjelis ve ark., 2007) tarafından tanımlanmıştır. OLV-2'nin konukçu spektrumu sadece zeytin ağaçları ile sınırlı değildir. Castor beans (*Ricinus communis* L.) bitkisinde damarlarda açık sarı renkte ağımsı görünüm ve yapraklarda beneklenmeler olarak Yunanistan'da tanımlanmıştır (Grieco ve ark., 2002). OLV-2 küresel şeklinde olan *Alfalfa mosaic virus* (AMV)'üne benzer, küreselden çubuksuya değişen partiküllere sahiptir, ssRNA genomu poliadenilli değildir, pozitif anlamlı ve üç parçalıdır (Grieco ve Martelli, 1997). Virionlar dört büyük parçalı RNA molekülüne sahiptirler. RNA1 (3126 nt) ve RNA2 (2734 nt) tek gen taşıyan molekülüdür ve replikasyondan sorumlu proteinleri kodlarlar. RNA3 (2438 nt) iki gen taşıyan bir moleküldür ve 36.5 kDa hareket ağırlığındaki hareket proteini (MP) ile 20 kDa ağırlığındaki viral protein kılıfı (CP)'ni kodlar. RNA3'le RNA4 (2078 nt) birliktedir ve fonksiyonu belirlenmemiştir. Bir subgenomik RNA (1042 nt) enfekteli bitkilerde oluşturulmakta fakat kılıf ile çevrelenmemiştir (Grieco ve ark., 1995;1996; Martelli ve Grieco, 1997).

### 2.3.1.3. *Olive latent-3 virus* (OLV-3)

RT-PCR ve dot-blot hibridizasyon yöntemleri ile *Tymoviridae* familyasına bağlı yeni keşfedilen zeytin virüsü OLV-3'ün tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. OLV-3'ün coğrafik dağılışını belirlemek için 8 farklı Akdeniz ülkesinden 224 zeytin örneği toplanmış ve yukarıda bahsedilen iki yönteme göre testlenmiştir. RT-PCR yöntemine göre OLV-3 virüsü sorvey yapılan bütün ülkelerde (ortalama bulaşık oranı %30.4, %17 ile Portekiz %56 Türkiye) belirlenmiştir. 68 örneğin 12'sinde RT-PCR'da OLV-3 bulunurken dot-blot hibridizasyon yönteminde RNA konsantrasyonunun düşük olmasından dolayı belirlemede başarısız olmuştur.

Heterojen özelliğe sahip 11 farklı bölgeden alınan bulaşık örneklerin 68'ine RdRp bölgesine bağlı SSCP analizi yapılmıştır. Yapılan RdRP'nin nükleotid dizilimlerinin bilgisayar analizinde izolatlar arasında %5 ile %17 arasında değişim olduğu görülmüştür. Yapılan sekans analizinde, üç farklı grubun içerisinde coğrafik orijin açısından bir fark bulunmamıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda Akdeniz havzasında en yaygın zeytin virüsünün OLV-3 olduğu görülmüştür (Al Abdullah ve ark., 2009).

#### **2.3.1.4.Olive latent ringspot virus (OLRSV)**

*Secoviridae* familyasında yer alan *Nepovirus* cinsine ait bir virüstür. Bu virüs ilk olarak İtalya'nın merkezi olan Lazio'da symptom göstermeyen zeytin ağaçlarından izole edilmiştir (Savino ve ark., 1983) ve daha sonra Suriye'de rapor edilmiştir (Al Abdullah ve ark., 2005). OLRSV zeytin ağacında gizli (latent) olarak bulunur yapılan çalışmalarda indikatör bitkilerde teşhise uygun olan bu virüse hassas olan *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da lezyonlar ve *G. globosa*'da ise yapraklarda şekil bozuklukları ve kırmızı renkli lokal lezyonlar gösterir. Bu virüs mekanik olarak ve aşı yolu ile taşınmaktadır. OLRSV 28 nm uzunluğunda olan izometrik parçalara sahiptir. İki bölümlü ssRNA genomuna ( $1.4 \times 10^6$  (RNA2) ve  $2.65 \times 10^6$  (RNA1)) sahiptir. OLRSV'nin RNA2'sinin baz dizisi tamamen belirlenmiştir (Alkowni ve ark., 2001). RNA2 3969 nt uzunluğundadır ve poliprotein N-terminal bölgesinde olduğu varsayılan MP'ler ve C-terminal'de yerleşmiş CP sistron'a sahip olan tek ORF içerir.

#### **2.3.1.5.Olive vein yellowing associated virus (OVYaV)**

İlk olarak Roma yakınlarındaki çeşidi bilinmeyen bir zeytin ağacından izole edilmiştir (Faggioli ve Barba, 1995). Ribaldi tarafından bildirilen bulaşıcı sarılığa benzer damar sararması, verimde azalma gibi belirtiler gösterir (Ribaldi, 1959). 520 nm uzunluğunda ve 12 nm uzunluğundaki boyutlarda uzun veya kıvrımlı partiküllere sahip

olan potexvirus cinsinin üyesi olarak sınıflandırıldığı bildirilmiştir. Antiserum 1:1024 homolog titresi vermiştir ve IEM testlerinde sırasıyla 1/10 ve 1/256 sulandırma yapılan PVX ve papaya mozaik virüs ile serolojik ilişki sergilemiştir.

#### **2.3.1.6. *Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV)***

İtalya'da Nostrana'da kaydedilmiştir (Savino ve ark 1996). OYMDaV kıvrımlı iplik şeklinde 800 nm boyutunda particilerle sahiptir. Yapılan inokulasyonlarda sınırlı sayıda bitkide OYMD hastalığına benzer semptomlar göstermiştir. Elektroforetik analizlerde tüm örneklerde kompleks ds-RNA şekillerinin varlığı gözlenmiştir.

#### **2.3.1.7. *Olive leaf yellowing associated virus (OLYaV)***

Filogenetik analizlerin belirlenebilmesi için birçok bilgiye ihtiyaç duyulduğundan dolayı *Closteroviridae* familyasına atanmış bir virüstür. İlk olarak bu hastalık İtalya'da tanınması yapılmıştır (Savino ve ark., 1996) ve İtalya'nın yerel zeytin çeşitlerinden olan 'Biancolilla'da ağaçlarındaki yapraklarındaki açık sarıya dönen renk açılmaları ile özdeşleştirilmiştir. Bu çeşide yapılan aşılamalarda Zeytin yaprak sarılığı (OLY) hastalık semptomları elde edilmiştir. Fakat otsu bitkilere yapılan mekanik inokulasyonlarda başarı sağlanamamıştır. Virionların gözlenmesi çalışmalarında başarılı sağlanamasa da zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs olarak adlandırılmıştır. OLY ile enfekteli bitkilerden yapılan ds-RNA analizlerinde bol miktarda kompleks ds-RNA'ları içerdiği görülmüştür (Savino ve ark., 1996). (Yapılan ds-RNA analizlerinde *Closterovirüs* cinsinin bazı türlerine ait benzer bant profillerini içerdiğini göstermiştir (Sabanadzovic ve ark., 1999). *Closterovirüs* familyası üyelerinin HSP70 genine ait RT-PCR testlerinde dejenere primerler kullanıldığında 600 nükleotid uzunluğunda DNA bantları elde edilmiştir (Sabanadzovic ve ark., 1999). Bu elde edilen DNA parçasının baz dizi analizinde 611 nükleotidden oluşan 203 aminoaside sahip bir proteini kodladığı

belirlenmiştir. Bu proteinin yapılan filogenetik analizlerinde ise *Closterovirus* ve *Crinivirüs*'ün HSP70 polipeptidine olan benzerliğin %30 olduğu tespit edilmiştir. OLYaV zeytin virüsleri arasında en yaygın virüs olarak tespit edilmiştir (Faggioli ve ark., 2005), Güney İtalya'daki zeytin plantasyonlarının %60'ından fazlasını enfekte ettiği ve yüksek düzeylerde Mısır, ABD (Saponari ve ark., 2003), Lübnan (Fadel ve ark., 2005), Suriye (Al Abdullah ve ark., 2005), ve Hırvatistan (Bjelis ve ark., 2007)'dan bildirilmiştir. Yüksek bulaşıklığın muhtemelen zeytin psilas *Euphyllura olivina* (Costa) ve *Pseudococcus* cinsine bağlı tür tanımı yapılmamış böceklerden kaynaklandığını bildirmiştir (Sabanazdovic ve ark., 1999).

#### **2.3.1.8.Olive semi latent virus (OSLV)**

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bu virüsün cinsi belirlenememiştir. Enfekteli dokularda yapılan çalışmalarda 28 nm çapında olan izometrik partiküllere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Materazzi ve ark., 1996). Bu virüsün simptomları yaprak damarlarındaki hafif renk değişimleridir. Bu virus ile yapılan mekanik taşıma denemelerinde başarılı bir şekilde taşınmıştır. Fakat virüsün etiyolojik ilişkisi hakkında yeterli bilgi mevcut değildir (Martelli, 1999).

#### **2.3.1.9.Olive mild mozaik mosaic virus (OMMV)**

TNV ile benzer özellikler gösteren bu virüs partikülü ilk olarak mekanik taşıma yoluyla yapılan taşımalarından sonra TNV'nin teşhisinde de kullanılan geniş spektrumlu ELISA antiserumu ile yapılan testlemeler de pozitif sonuç vermiş ilk olarak zeytinde kaydedilmiş ve TNV ile benzer özellikler göstermektedir (Felix ve Clara 2002). Bir izolat ile fazla çalışılmıştır, izolatın CP geni sekanslanmış ve aminoasit secansları %82.2' lik yüksek benzerlik oranıyla TNV-D ile benzerlik göstermiş ve bu durum onun bir TNV-D türü olarak da tanımlanmasına neden olmuştur (Cardoso ve ark., 2004).

Bununla birlikte bu izolatın RdRp ile yapılan genomik karakterizasyonunda *Tobacco necrosis A* (TNV-A) ile % 90.7, OLV-1 ile %91.2, TNV-D ile %33.6 ve TNV-DH ile %34.5'lik benzerlik göstererek etmenin necrovirüs cinsine ait yeni bir virüs olduğu ve olive mild mozaik virüs olarak adlandırıldığını bildirmiştir (Cardoso ve ark., 2005).

### 2.3.2. Diğer virüsler:

#### 2.3.2.1. *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)

*Secoviridae* familyası *Sadwavirus* cinsindendir. Geniş bir yayılma alanı ve geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Çilek ve ahududunda latent bir şekilde bulunur fakat bazı çeşitlerde beneklenme ve bodurlaşma şeklinde gelişme geriliği olarak kendini göstermektedir. Diğer konukçu bitkiler; frenküzümü, kırmızı frenküzümü, kiraz, üzüm, şeftali, zeytin ve siyah mürver (*Sambucus nigra*)'dir. SLRSV genellikle Avrupa'da bulunur diğer kıtalarda yayılımı azdır. Avrupa ülkeleri dışında İsrail, Kanada, ABD, Avusturalya ve Yeni Zelanda'da rapor edilmiştir. Zeytin ağaçlarında SLRSV ilk kez 1979 yılında merkez İtalya'daki cv Corregiolo' da izole edilmiştir (Savino ve ark., 1979). Merkez İtalya'nın Ascoli Viceno yakılarında 1980 yıllarında sofralık bir zeytin çeşidinde şiddetli bazı belirtiler tespit edilmiş bu belirtileri gösteren ağaçların yaprak, kök ve çiçeklerinden tekrarlı bir şekilde izolasyonlar gerçekleştirilmiş ve otsu indikatör bitkilere taşıma denemeleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Marte ve ark., 1986). SLRSV 30 nm çapında izometrik partiküllere ve iki tek kollu RNA (ds-RNA)'dan oluşan bir genoma sahiptir. Birçok konukçusunda tohumla ve vektör nematod (*Xiphinema diversicaudatum*) ve aşı yolu ile taşınmaktadır (Cooper, 1986). İtalya'da Zeytindeki bazı belirtiler SLRSV ile ilişkilendirilmiştir (Ferreti ve ark., 2002). İtalya'daki zeytin çeşidinden 'Raggiola' ve 'Frantoio' morfolojik bakımından farklılık gösterse de genetik analizlerde (amplified fragment length polymorphism; AFLP) bu iki çeşidin yüksek oranda benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Raggiola çeşidindeki meyveleri ve yapraklarının şekilleri SLRSV belirtilerine benzer

simptomlar verdiği için bu çeşit SLRSV açısından RT-PCR ile testlenmiş ve sonuçta pozitif bulunmuştur. Bu kayıtlar ileri sürmüştür ki SLRSV, Raggiola ve Frantoio çeşitleri arasında agronomik ve morfolojik farklılıklara neden olmuştur (Ferreti ve ark., 2002). SLRSV Portekiz’de (Henriques ve ark., 1992), İspanya’da (Bertolini ve ark., 1998), Mısır ve ABD’de (Saponari ve Savino, 2003), Türkiye’de (Çağlayan ve ark., 2004), Lübnan’da (Fadel et al., 2005) Suriye’de (Al Abdullah et al., 2005) ve Hırvatistan’da (Bjelis ve ark., 2007) arazi örneklerine yapılan DAS-ELISA analizleri ile pozitif sonuç alınırken İtalya’da testlenen tüm örnekler bu virüs açısından negatif bulunmuştur.

#### **2.3.2.2. Cherry leaf roll virus (CLRV)**

*Secoviridae* familyasının *Nepovirus* cinsinin bir üyesidir. Zarfsız olan bu virüs (nonenveloped), çok yüzlüdür (icosahedral). Bu virüs 28 nm çapında partiküllere sahiptir genetik materyal iki parçalı doğrusal pozitif anlamlı ssRNA’ya sahiptir ve RNA2’nin 3’ ucunda 1,5 kb uzunluğunda kodlanmayan bölge mevcuttur (Gentkow ve ark., 2005). CLRV ilk olarak *Ulmus americana* (American karaağacı), *Prunus avium* (kiraz) ve *Juglans regia* (ceviz)’de rapor edilmiştir ve daha sonra genellikle dişbudak ve huş ağacında, kirazda, mürver ve cevizde dallarında yaprak gelişiminin yavaşlaması, yaprakta klorotik çizgililer ve dalların ya da tüm ağacın geriye doğru ölümü şeklinde belirtilmiştir (Hamacher ve Giersiepen, 1989; Hamacher ve Quadt, 1991; Rebenstorf ve ark., 2006), fakat CLRV zeytin ağaçlarında latent olarak bulunmaktadır (Savino ve Galitelli, 1981). Son yıllarda yapılan çalışmalarda CLRV’nin tohumla taşındığı ispatlanmış ve tohum kaynaklı enfeksiyonlar %41 olarak rapor edilmiştir (Saponari ve ark., 2002). Dünyada yapılan çalışmalarda CLRV’nin geniş alanlarda İtalya, Portekiz ve İspanya (Martelli ve ark., 1999); Türkiye (Çağlayan ve ark., 2004); Mısır ve ABD (Saponari ve Savino, 2003), Suriye (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Lübnan (Fadel ve ark., 2005)’dan rapor edilmiştir.

### 2.3.2.3. *Arabis mosaic virus* (ArMV)

*Secoviridae* familyasına *Nepovirus* cinsine mensuptur. Çok geniş konukçu dizini sahiptir ve vektör nematodlar (*Xiphinema diversicaudatum*) ile taşınan bu virüs polihedral viral partiküllere sahiptir. Bu virüsün bir çok konukçusu mevcut olup başlıca önemli konukçuları çilek, şerbetçiotu, asma (*Vitis spp.*), ahududu (*Rubus idaeus*), *Rheum spp.*, siyah mürver, şeker pancarı, kereviz, glayol, atturpu ve maruludur. Bu virüsün meydana getirdiği en yaygın belirtiler yapraklarda beneklenme ve lekelenmeler, bodurlaşma ve deformasyonlardır. Bu virüsün belirtileri konukçu bitkideki yoğunluğuna bağlıdır virüs izolatına, bitki çeşidine ve mevsime göre değişiklikler göstermektedir. Bu virüs zeytinde gibi bir çok bitkideki enfeksiyonu latenttir ve bitkiler hiçbir belirti göstermezler (Martelli ve ark., 2002a). Virüs aynı zamanda İtalya (Savino ve ark., 1979), Mısır ve ABD (Saponari ve Savino, 2003); Türkiye (Çağlayan ve ark., 2004), Suriye (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Lübnan (Fadel ve ark., 2005)'da zeytinlerde de rapor edilmiştir.

### 2.3.2.4. *Cucumber mosaic virus* (CMV)

*Bromoviridae* familyasının *Cucumovirus* cinsine bağlı bir türdür. İlk kez belirsiz bir zeytin ağacından Savino ve Galitelli (1983) tarafından izole edilmiştir. Rei ve ark. (1983) bu etmeni bulaşık zeytin ağacından SLRSV ile birlikte olarak izole etmişlerdir. Zeytin ağaçlarında CMV etmeni İspanya' da (Bertolloni ve ark., 1998), Türkiye' de (Çağlayan ve ark. 2004), Suriye' de (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Hırvatistan' da (Bjelis ve ark., 2007) tespit edilmiştir.

### 2.3.2.5. *Tobacco mosaic virus* (TMV)

*Tobamovirus* cinsine ait bir türdür. Damar bantlaşması, damarlar boyunca renk açılması, şiddetli yaprak dökülmesi ve geriye doğru ölüm belirtileri gösteren hastalıklı zeytin ağacından izole edilmiştir (Triolo ve ark., 1996). TMV' nin bu belirtilerin gerçek nedeni olduğuna dair gerçek bir kanıt yoktur.

### 2.3.2.6. *Tobacco necrosis virus* (TNV)

OMMV paragrafına göre TNV-D' nin zeytin ağaçlarından izole edilen virüslerden olduğuna dair kesin bir kanıt yoktur, her ne kadar son veriler bu türlerin zeytin ağaçlarında var olduğunu işaret etse de (son olarak Cardoso ve ark gen bankasına zeytin ağaçlarından izole edilen TNV-D' nin tüm genomunu kayıt etmişlerdir, izolat numarası FJ666328).

## 2.4. Zeytin Ağaçlarındaki Fitoplazmalar:

Fitoplazmalar *Mollicutes* sınıfı içerisinde yer alırlar. Fitoplazmaların sınıflandırılması 16S rRNA gen dizilimi ve RFLP analizleri ile mümkündür. Bu temelde zeytin ağaçlarındaki fitoplazmalar 16S-IB, 16S-VA ve 16S-XII (stolbur grubu) olarak sınıflandırılmıştır (Pasquini ve ark., 2000). İtalya'da 1995 yılında yapılan ilk fitoplazma kaydından sonra zeytin yaprak bozukluğu belirtileri ve fitoplazmalar arasında ki ilişkiyi destekleyen bazı çalışmalar yayınlanmıştır (Font ve ark. 1998; Pasquini ve ark., 2000; Ahangaran ve ark. 2006).

### **2.5.Zeytin Ağaçlarındaki Fitoplazma ve Virüslerin Epidemiyolojisi ve Taşınması:**

Çoğu zeytin ağacı virüslerinin epidemiyolojisi hala bilinmemektedir. Her ne kadar bazıları toprak kökenli olsa bile (SLRSV, ArMV ve TNV) diğerleri OLV- 2 ve OLRV aşılama ve mekanik inokulasyon yardımıyla, CMV yaprak bitleri vasıtasıyla, CLRV ve OLV-1 (Saponari ve ark., 2002a) tohum ve mekanik olarak taşınabilmektedir. Bunun yanı sıra arazi koşullar altında virüs taşıma mekanizması hakkında çok sınırlı bilgi mevcuttur. OLYaV ile enfekteli bir zeytin ağacı ile beslenen psilid ve unlubitler bildirilmiştir (Sabanadzovic ve ark., 1999) ancak ilk nakil girişimleri olumsuz olduğu için virüsün vektörü olarak bu böcekleri kabul etmek için çok erkendir.

Bu virüslerin tamamının enfekteli zeytin ağaçlarına vejetatif üretim materyali ile yayıldığı düşünülmektedir. Son zamanlarda zeytinlerin çoğaltılabilmesi üzerine SLRSV ve OLYaV nin olası etkileri rapor edilmiştir. Özellikle OLYaV ile enfekteli Carolea çeşidi ve SLRSV ile enfekteli Frantoio Raggiola çeşidinin köklenme ve aşılama performansları araştırılmıştır. Deneysel çalışmalar her iki virüsün de aşılama ve kök kaynaşma üzerine bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Aşılama başarısındaki kaydadeğer başarısızlık muhtemelen enfekteli bitkilerin su ihtiyaçlarını karşılayamamasından dolayı sadece sıcaklık stresi boyunca gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar zeytin virüslerinin bazılarının nasıl yayıldığını anlamamıza yardım etmektedir. Doğal koşullar altında çok ayrıntılı epidemiyolojik çalışmalar olmadan bu virüslerin yayılması ve bu yayılmanın tam olarak anlaşılabilmesi imkansızdır.

Zeytin fitoplazmalarının yayılması ve epidemiyolojisi ile ilgili yeterli bilgi yoktur. Gerçekte her ne kadar bu alandaki gözlemler taşıyıcı böcek vektörlerinin varlığı hipotezine sahipse de bitki simptomolojisi ve fitoplazmalarda zayıf bir yayılmanın altını çizse de fitoplazmaların yayılmasında böceklerin rolü ile ilgili henüz herhangi bir kanıt bildirilmemiştir. (Del Serrone ve ark., 1996).

### **2.6.Zeytin Ağaçlarındaki Virüs ve Fitoplazmaların Tespiti:**

Zeytinde enfeksiyon yapan nepovirüslerin (SLRSV ve ArMV) ve CLRV, CMV ve OLRV gibi diğer virüslerin tanısında otsu indikatör bitkilerine taşıma denemeleri ve

poliklonal antiserumlar kullanılmasına rağmen (Savino ve ark., 1979) zeytin ağaçlarındaki diğer virüslerin tanınmasında bu yöntemler olumlu sonuç vermemektedir .

Sörveyler boyunca virüsle bulaşık zeytin ağaçlarının teşhisi ve tanınmasındaki zorluk, serolojik testlerin güvenirsizliği, biyolojik indeksleme denemeleri için gerekli odunsu bitkilerin olmayışı ve hastalık simptomlarının eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Bütün bu faktörler zeytin ağaçları dokusundaki oksidantların ve tanenlerin bulunuşundan dolayı ELISA’da ve indeksleme denemelerinde zorluk çıkarmaktadır (Martelli., 1999; Bertoloni ve ark., 2001b). Bununla birlikte SLRSV’nin tanısında ELISA’nın kullanılması ile ilgili bazı kayıtlar bulunmaktadır (Henriques ve ark., 1992; Çağlayan ve ark., 2004).

Son yıllarda virüslerin belirlenmesi için moleküler teşhis tekniklerinin uygulanması (ds-RNA, moleküler hibridizasyon ve RT-PCR) geleneksel belirleme yöntemlerinden daha fazla ön plana çıkmaktadır. Bu kapsamda farklı moleküler yöntemler (RT-PCR, nested RT-PCR ve multiplex one step RT-PCR) geliştirilmiştir (Grieco ve ark., 2000; Bertolini ve ark., 2001a,2003; Panteleo ve ark., 2001; Faggiolli ve ark.,2002,2005). Bu tekniklerin güvenilirliği farklı coğrafik bölgelerde yapılan sörveyler ile zeytin virüslerinin dağılışı üzerindeki araştırmaların sayısını artırmıştır (Bertolini ve ark., 2001a,2001b; Faggiolli ve ark.,2002,2005; Saponari ve ark., 2002b; Albanese ve ark., 2003; Al Abdullah ve ark., 2005; Fadel ve ark., 2005; Bjelis ve ark., 2007).

## **2.7.Zeytin Ağaçlarındaki Virüs ve Fitoplazmaların Kontrolü**

Zeytin ağaçları için çeşitli sertifikasyon programları İtalya, Portekiz ve İspanya’da başlamıştır. Sağlıklı seçim ve bitki koruma önlemleri hem uluslararası hem iç piyasa için virüs testi yapılmış bitki materyali üretmek ve virüslerin yayılmasını önlemede tek stratejidir. Zeytin ağaçlarındaki latent virüs enfeksiyonlarının yaygın olmasından dolayı gözle yapılan kontroller güvenilir değildir ve arazi gözlemleri hassas ve güvenilir labaratuvar testleri ile desteklenmelidir.

Vejatif çoğaltma materyalleri ile hızla yayılabilen virüslerin eliminasyonu için kullanılan ısıtma, meristem uç kültür, mikro aşılama gibi yöntemler zeytinlerde de kullanılmaktadır. Bu konuda bazı başarılı sonuçlar İtalya'dan rapor edilmiştir (Bottalico ve ark. 2002). Isı uygulaması ve meristem uç kültürü ile CLRV zeytin ağaçlarından başarılı bir şekilde elemine edilmiştir.

Fitoplazma hastalıklarından korunmak için en iyi strateji, dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi ve tanımlanmasıdır. Fitoplazma hastalık belirtileri, belirli bazı sınıf antibiyotiklerin uygulanması ile geciktirilip veya durdurmasına rağmen bu yaklaşım genellikle pratik değildir. Bir sikadellid olan *Hyalestes spp*'nin açık alanda zeytin fitoplazma hastalığını taşıdığı şüphelidir. Vektör böceklerin kontrolü için en etkili araç fiziksel yöntemler ile onları engellemektir (ya perdeleme kullanılması ya da bitki yüzeyinde bazı kaplama minerallerin kullanılması). Yeni metotlar da muhtemelen genetik modifikasyonlar çerçevesinde zorunlu olacaktır ki, bu da fitoplazmaların bitki içerisinde çoğalmasını engelleyecek ya da popülasyonunu azaltacak yönde olacaktır (Weintraub, 2007)

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki Materyali / Survey Çalışmaları

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. Tanı testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere CLRV, OLRV, SLRSV, OLV-1 ve OLV-2 ve negatif kontrol için zeytin sürgünleri Dr. Francesca Faggioli'den (Roma, Italya) ve Dr. Angelantonio Minafra'dan (Bari, Italya) temin edilmiştir. SLRSV, ArMV, CLRV ve CMV pozitif kontrol örnekleri ayrıca ELISA kitlerinden temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Test edilen virus etmenleri

Toplanan bitki materyalleri 7 farklı virüse karşı test edilmiştir. Bunlar:

- *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, Çilek latent halkalı leke virüsü),
- *Arabis mosaic virus* (ArMV, Arabis mozayik virüs),
- *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Kiraz yaprak kıvrılma virüsü),
- *Cucumber mosaic virus* (CMV, Hıyar mozayik virüsü),
- *Olive latent ringspot virus* (OLRV, 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)'dür.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Survey 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 sürveyler sonucunda, virüs simptomu gösteren ağaçlardan ve virüslerin latent olarak taşındıkları göz önüne alınarak simptomsuz ağaçlardan da tesadüfî 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 yapılncaya 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 alınmış ve derhal sıvı azot yardımıyla ezilmiştir. Toz haline getirilen bitki materyalinin erimesine izin vermeden, çift kollu RNA (dsRNA) ve toplam nükleik asit izolasyonu yapılncaya kadar -80°C' de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2.2. Serolojik Yöntemler (DAS-ELISA)

Sörvey çalışmaları sonucunda ilkbaharda zeytin bitkilerinden alınan sürgünlerdeki virüslerin araştırılmasında önce serolojik testler yapılmıştır. Zeytin örnekleri SLRSV, ArMV, CLRV ve CMV virüsleri için DAS-ELISA'ya tabi tutulmuştur. Antiserumlar kit halinde alınmış (LOEWE, Almanya) firmanın önerdiği yöntemle göre testler gerçekleştirilmiştir. Buna göre, kaplama tamponu (Ek 1) ile IgG 1:200 oranında sulandırılarak ELISA plakalarının kuyucuklarına her kuyucukta 100 µl olacak şekilde yüklenmiş ve 4 saat 37C°'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda yıkama tamponu (Ek 1) ile ELISA plakaları üç kez yıkandıktan sonra zeytinlerin sürgünlerinin

floem kazıntılarından 1:10 oranında (1 gr örnek: 10 ml tampon) hazırlanan örnekler kuyucuklara 100 µl, iki tekerrürlü olarak yüklenmiştir. Tüm gece +4C°'de tutulan plakalar yıkama tamponu ile 5 kez yıkandıktan sonra 1:200 oranında konjugat tamponu (Ek 1) ile hazırlanmış antibadi-alkalin fosfat-konjugattan 100 µl eklenerek kaplanmıştır. Plakalar 4 saat 37C°'de inkübasyona bırakılmış ve üç kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra substrat olan 1 mg/ml oranında hazırlanmış paranitrofenil fosfat substratı eklenmiştir (Ek 1). 1-2 saat inkübasyon sonrasında oluşan renk değişimleri ELISA okuyucusunda okunmuştur.

Sonuçlar E Max Precision Microplate Reader cihazı kullanılarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Örneklerde sağlıklı kontrolün 2 katı olan absorbans değerleri enfekteli olarak değerlendirilmiştir (Clark ve Adams, 1977).

### **3.2.3. Moleküler Çalışmalar**

#### **3.2.3.1. Çift kollu RNA (dsRNA) izolasyonu ve elektroforez işlemi**

Çift kollu RNA (dsRNA) izolasyonu Walia ve ark (2009)'a göre yapılmıştır. Çift kollu RNA (dsRNA) izolasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Zeytin ağacının değişik sürgünlerinden kazınan 15 gr örnek sıvı azot yardımıyla ezilmiş ve 300 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Tüplere 45 ml 2xSTE, 17,5 ml %10 SDS, 1 ml bentonit ve 1 ml β-mercapto ethanol eklenmiştir (Ek 2).
- 5 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda 250 devir/dakika karıştırılmıştır.
- 17,5 ml 2xSTE ile doyurulmuş fenol eklenmiştir.
- Üzerine 17,5 ml kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenmiştir.
- 45 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda 250 devir/dakika karıştırılmıştır.
- 20 dakika oda sıcaklığında 8.500 rpm'de santrifüj edilmiştir.

- Üsteki sıvı pipetlenerek 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 çalkalayıcıda 200 devir/dakika karıştırılmıştır.
- 15 dakika oda sıcaklığında 8.500 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Üstteki sıvı dökülerek uzaklaştırılmış ancak çökelti yerinden oynayacak olursa üstteki sıvıyı pipetlenerek boşaltılmıştır.
- Selüloz santrifüj tüpünde tamponu ile yeniden süspanse edilmiştir (yıkama tamponu: %17 ethanol-1xSTE 50-100 ml). Tüp yavaşça çalkalanmıştır.
- 10 dakika oda sıcaklığında 8.500 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Üstteki sıvı pipetlenerek iyice boşaltılmıştır. Selüloz yeniden 50-100 ml %17 ethanol-1xSTE ile sulandırılmıştır.
- 10 dakika oda sıcaklığında 8.500 rpm’de santrifüj edilmiştir (Selüloz hala yeşil ise üçüncü yıkama yapılır, ancak bu aşamada selüloz çökeltisi kaybolabilir ).
- Selüloz yeniden 50-100 ml %17 ethanol-1xSTE ile süspanse edilmiştir. Miracloth diski ile kapatılmış şırıngaya selüloz karışımı dökülmüştür.
- Selüloz kolonu aynı yıkama tamponu ile 5-6 kez yıkanmış (60-400 ml ile selülozun koyu rengi gidene kadar). Selülozun ideal rengi kremdir.
- 1 ml 1xSTE kolona eklenmiş ve sonra 5 ml 4 kez 1xSTE kolona dökülmüştür. Son damla düştükten sonra piston ile hafifçe bastırılmış, kolonun altından ~20 ml ds-RNA solüsyonu 50 ml’lik falkon tüplere toplanmıştır ve 10’ar ml’lik iki ayrı falkon tüpe bölünmüştür.
- 25 ml soğuk saf alkol (2,5 hacim ethanol) ve 1 ml NaOAc’tan (0,1 hacim) eklenmiştir (Ek 2).
- -20 °C’de tüm gece bekletilmiştir.
- 35 dakika +4°C’de 9000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Üstteki sıvı çökelti oynatılmadan yavaşça dökülerek uzaklaştırılmıştır (çökelti yerinden oynayacak olursa 5 dakika daha santrifüj edilmiştir).
- Çökelti yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında veya 37°C ‘de kurutulmuştur.
- Çökelti 1 ml soğuk (+4°C) TE buffer ile süspanse edilmiş ve kısa bir vortex yapılmıştır (Ek 2).
- 4 dakika 4°C’de 6000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

- Üstte toplanan dsRNA içeren sıvı her tüpe 400-420 µl olacak şekilde eppendorf tüplere aktarılmıştır.
- Tüplere 1 ml soğuk (-20°C) saf alkol (2,5 hacim) ve 40 µl NaOAc (0,1 hacim) eklenmiştir.
- -20 °C’de tüm gece veya -70 °C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 20 dakika +4°C’de 15000 rpm’de santrifüj edilmiş ve tüpün üst kısmında toplanan sıvı dökülerek uzaklaştırılmıştır.
- %70 ‘lik soğuk (-20°C) ethanolden 500 µl eklenmiş ve 4 dakika 4 °C’de 14000 rpmde santrifüj edilmiştir.
- Tüplerin üst kısmında toplanan sıvı dökülmüş ve tüpler peçeteye ters çevrilmiştir.
- 14000 rpm’de kısa bir santrifüj yapılmış ve dipte toplanan sıvı pipetlenerek uzaklaştırılmıştır.
- Oda koşullarında veya 37°C’de 15-20 dakika dsRNA çökeltisi kurutulmuştur.
- Her tüpe 8 µl TE tamponu eklenmiş ve ds-RNA çökeltisi eritilmiştir (Ek 2).
- Eppendorf tüp içinde toplanan dsRNA solüsyonu, jel elektroforez işlemi yapılınca kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

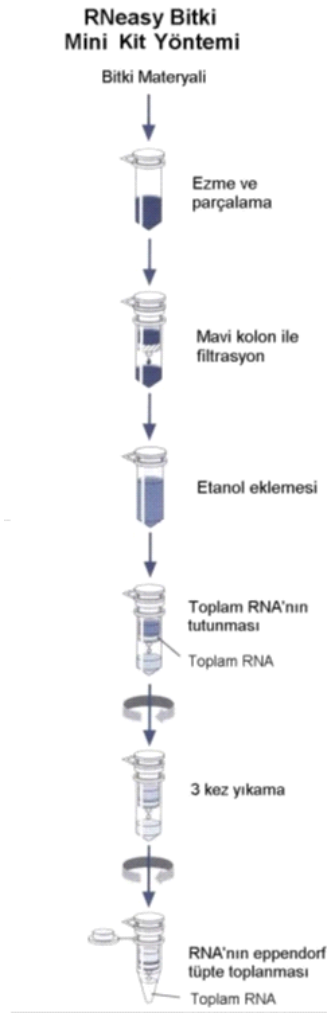
ds-RNA izolasyonu sonucu elde edilen ürünlerin görsel hale getirilmesi amacıyla, reaksiyondan sonra ürünlerle %1,2 agaroz jelde elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez 1xTAE (Ek 3) ortamında yapılmış, aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 3 µl yükleme ortamı (Ek 3) ile birlikte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

### 3.2.3.2. 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 (Şekil 3.1). Ekstraksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Zeytin ağacının değişik sürgünlerinden kazınan 1 gr örnek sıvı azot yardımıyla ezilmiş ve bundan 0,1 gr alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır.
- Tüplere 450 µl RLT tampon çözeltisi eklenmiş ve girdap karıştırıcıda karıştırılmıştır. NOT: Kullanımdan hemen önce RLT tampona  $\beta$ -mercaptoethanol eklenir.
- Karışım mor renkli kolonlara aktarılmış ve 15.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Bitki artıklarının toplandığı kolon atılmış ve alt kısımda toplama tüpünde biriken 400 µl sıvı faz alınarak yeni 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış, üzerine 200 µl %96'lık ethanol eklenmiştir.
- Karışım pembe kolonlara aktarılmış ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Kolonun alt kısmında toplama tüpünde biriken sıvı dökülerek uzaklaştırılmış ve kolon tekrar aynı toplama tüpü içine yerleştirilmiştir.
- Kolona 700 µl RW1 tamponu eklenmiş ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Kolonun alt kısmındaki toplama tüpünde toplanan sıvı dökülmüş ve kolon yine aynı tüp üzerine yerleştirilmiştir.
- Kolona 500 µl RPE tamponu eklenmiş ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Önceki iki aşama aynen bir kez daha tekrar edilmiştir.
- Kolon yeni bir toplama tüpü içine alınmıştır ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kolon içerisindeki tüm sıvının uzaklaşması sağlanmıştır.

- Toplama tüpü atılmış ve kolon RNA'nın toplanacağı yeni 1,5 ml'lik ependorf tüp içine yerleştirilmiştir.
- Kolona 50 µl RNase içermeyen su eklenmiştir ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon atılmış ve ependorf içinde toplanan 50 µl RNA solüsyonu, testler yapılınca kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.1.** RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Germany) ile bitki dokularından toplam RNA ekstraksiyonunun şematik anlatımı.

### 3.2.3.3. ds-RNA ile yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

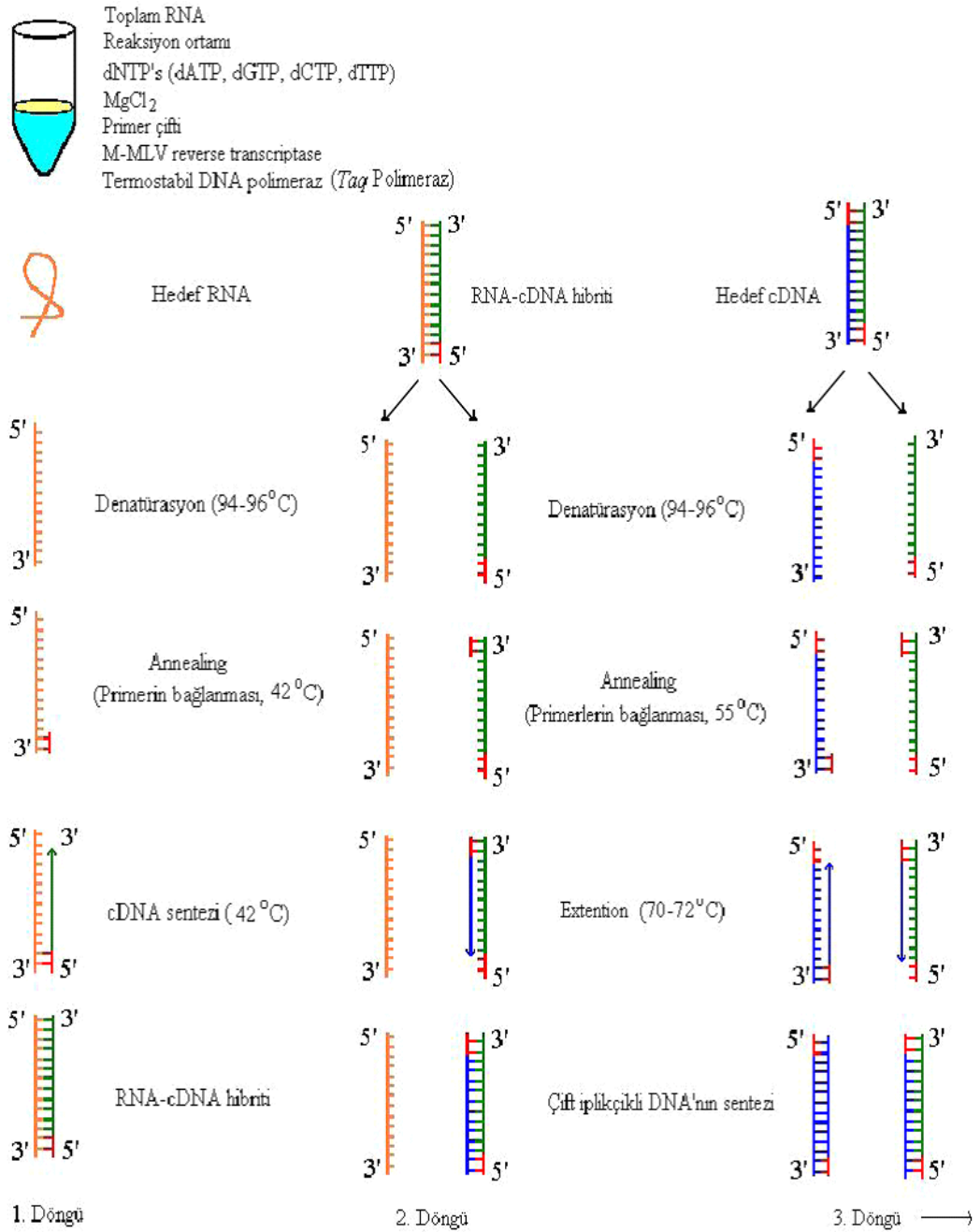
PCR analizleri için dsRNA örneklerinden önce komplementer DNA (cDNA) sentezi sağlanmıştır. cDNA sentezi gerçekleştirmek için her bir örnek için 4 µl ds-RNA veya RNA, 1 µl random hegzamer primer (0,2 µg/µl) konulmuş ve RNase'dan arı su ile 12,5 µl'ye tamamlanmıştır. 94 °C'de 5 dakika inkubasyon uygulandıktan sonra tüpler buz içerisine 1-2 dk bırakılmış ve üzerine ters transkripsiyon karışımı (1X reaksiyon tamponu, 10 unite Ribolock Ribonuclease inhibitor, 1 mM dNTP mix, 200 unite M-MuLV reverse transcriptase) eklenerek toplam 20 µl hacime ulaşılmıştır. Kısa süreli santrifüj uygulandıktan sonra 25 °C'de 10 dakika, 42 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 10 dakika inkubasyon uygulanarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

PCR işlemi Faggioli ve ark (2005)'na göre bir adımda değil cDNA'dan PCR işlemi uygulanarak yapılmıştır. Her bir reaksiyon karışımı toplam 25 µl'den oluşmuştur (Çizelge 3.1). Tek bir reaksiyon karışımında 2 µl cDNA, 0,6 mM virüs spesifik primer çifti (Çizelge 3.2), 0,6 mM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X reaksiyon ortamı ve 0,625 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, GmbH, Germany) ile hazırlanmıştır. 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.

### 3.2.3.4. Toplam RNA ile Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR; Reverse Transcription –Polymerase Chain Reaction)

RT ve PCR tek, kesintisiz bir yöntemle (Şekil 3.2) Faggioli ve ark. (2002)'na göre yapılmıştır. Her bir reaksiyon karışımı toplam 25 µl'den oluşmuştur (Çizelge 3.1). Tek bir reaksiyon karışımında cDNA yerine 1-2 µl RNA (1-2 µg), 0,6 mM virüs spesifik primer çifti (Çizelge 3.2), 0,6 mM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X reaksiyon ortamı, 0,625 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, GmbH, Germany) ve revers transkripsiyon için 20 U RNase inhibitörü (MBI Fermentas, GmbH, Germany) ve 20 U M-MuLV revers transkriptaz enzimi (MBI Fermentas, GmbH, Germany) ile

hazırlanmıştır. 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.



**Şekil 3.2.** Revers Trankripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)'nın şematik ifadesi

**Çizelge 3.1.** PCR reaksiyon karışımının içerikleri ve konsantrasyonları

| <b>İçerik</b>                          | <b>Ambalaj konsantrasyonu</b> | <b>1Xreaksiyon (25 µl)</b> | <b>Son konsantrasyon</b> |
|----------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Steril d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | -                             | 16 µl                      | -                        |
| PCR buffer                             | 10X                           | 2,5 µl                     | 1X                       |
| MgCl <sub>2</sub>                      | 25 mM                         | 1,5 µl                     | 1,5 mM                   |
| dNTP's                                 | 10 mM                         | 1,0 µl                     | 0,6 mM                   |
| Primerler (Forward/reverse)            | 20 µM                         | 1+1 µl                     | 0,8 µM                   |
| Taq polymerase                         | 5 U/ µl                       | 0.125 µl                   | 0,625 U                  |
| cDNA                                   | -                             | 2 µl                       | -                        |

**3.2.3.5. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Agaro Jel Elektroforezi**

PCR ürünlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla, reaksiyondan sonra ürünler %1-1,5 agaroz jelde elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez 1xTAE (Ek 3).ortamında yapılmış, aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 2 µl yükleme ortamı (6X; 15 ml için 75 mg bromophenol blue, 75 mg xylene cyanol, 18 g gliserol, 6 ml 50xTAE) (Ek 3) ile birlikte 10 µl yüklenen PCR ürünleri, 110 V'da 40 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. İşlem bittikten sonra jel 1 mg/ml etidyum bromid (EtBr) (Ek 3). içeren 1XTAE ortamında 5-10 dakika bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra UV transillüminatörde sonuçlar gözlenerek jel görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Zeytin ağaçlarında enfeksiyon yapan virüslerin PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri (Faggioli ve ark., 2005)

| Virüs                | Amplikon<br>uzunluğu (bp) | Primer dizilimi (5'-3')                                            |
|----------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| OLV1-HA<br>OLV1-CA   | 299                       | ACA CAG AAA TCA TAA GTG CC<br>CCA TAG CAC CAT CAT ACC              |
| SLRSV-5D<br>SLRSV-3D | 293                       | CCC TTG GTT ACT TTT ACC TCC TCA TTG TCC<br>AGG CTC AAG AAA ACA CAC |
| ArMV-5A<br>ArMV-3A   | 302                       | TAC TAT AAG AAA CCG CTC CC<br>CAT CAA AAC TCA TAA CCC AC           |
| CLRV-5<br>CLRV-3     | 416                       | TGG CGA CCG TGT AAC GGC A<br>GTC GGA AAG ATT ACG TAA AAG G         |
| CMV-CPN5<br>CMV-CPN3 | 280                       | ACT CTT AAC CAC CCA ACC TT<br>AAC ATA GCA GAG ATG GCG G            |
| OLRSV-R1<br>OLRSV-R2 | 356                       | GAT TGC CAA GGA ATA TGC TG<br>CTC CCA ACA AAT GAT TGC TG           |
| OLV2-H<br>OLV2-C     | 206                       | GAA GGT GGC TCG CCT AGA G<br>GCC AGG AGT TTG AGC TTT G             |

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Arazi çalışmaları ve gözlenen belirtiler

Mardin ilinin 3 ilçesinden zeytin örnekleri toplanmıştır (Çizelge 4.1). Sörveyler sırasında toplam 35 bahçe ziyaret edilmiş ve 170 adet zeytin örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerin %80'i genç ağaçlar (2-10 yıllık), %20'si yaşlı ağaçlardan (10 ve üstü) oluşmuştur (Şekil 4.1, 4.2).



**Şekil 4.1.** Mardin ili Derik ilçesindeki eski bahçelerin bulunduğu vadiden genel görünüm.

Yapılan sörveylerde zeytin ağaçlarının büyük bölümünde herhangi bir belirtiler görülmezken en çok karşılaşılan belirtiler yapraklarda deformasyonlar, yaprak kenarlarının dışa doğru kaşık gibi kıvrılması, yaprak burulması ve klorotik halkalı lekeler şeklinde olmuştur (Şekil 4.3). Virüs enfeksiyonları tespit edilen zeytin ağaçlarında genellikle herhangi bir belirtiler gözlenmediği, bu enfeksiyonların latent olarak bulunduğu bildirilmiştir (Martelli, 1999; Faggioli ve ark., 2005; Loconsole ve ark., 2010). Ancak, SLRSV çilek ve diğer konukçularında genellikle latent olarak

bulunsa da, zeytin yapraklarında şiddetli daralma ve kıvrılmalara, meyvelerde deformasyona ve verim azalmasına neden olduğu gözlenmiştir (Faggioli ve ark., 2002; Çağlayan ve ark., 2006).



**Şekil 4.2.** Mardin ilinde A) Yaşlı ağaç B) Genç ağaç ve C) Dara antik kent bölgesindeki yaklaşık 10-30 yıllık zeytin ağaçları



**Şekil 4.3.** Zeytin ağaçlarında virüs enfeksiyonları ile ilişkili olabilecek, en yaygın belirtiler A) yaprak burulması, B) yaprak kenarlarının dışa doğru kaşık gibi kıvrılması, C, D, E) yapraklarda deformasyonlar, E, F) yapraklarda klorotik halkalı lekeler

**Çizelge 4.1.** Mardin ilinden toplanan zeytin örneği ve ilçelere göre örnek miktarları

| <b>İl-ilçeler</b> | <b>Bahçe sayısı</b> | <b>Test edilen örnek sayısı</b> |
|-------------------|---------------------|---------------------------------|
| -Mardin Merkez    | 5                   | 25                              |
| -Kızıltepe        | 13                  | 49                              |
| -Derik            | 17                  | 91                              |
| <b>Toplam</b>     | <b>35</b>           | <b>170</b>                      |

#### 4.2. Serolojik Testler (DAS-ELISA)

Toplam 170 adet zeytin örnekleği 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 absorbands değerlerinin iki katı elde edilmemiştir. Bu sonuca göre testlenen zeytin örnekleri DAS-ELISA yöntemine göre testlenen virüsler açısından negatif olarak değerlendirilmiştir.

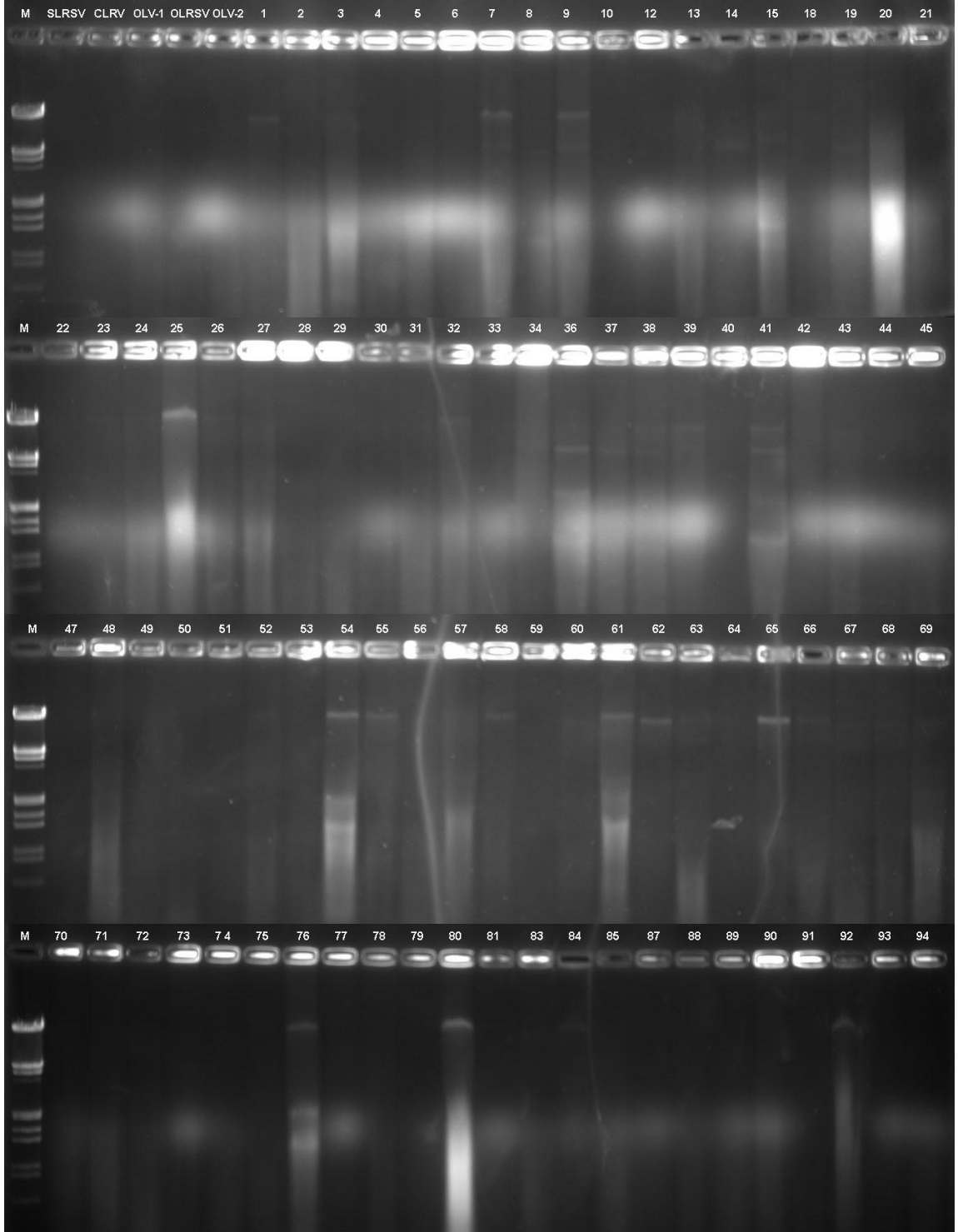
#### 4.3. Çift kollu RNA (dsRNA) analizleri

Zeytin örneklerinin kortikal dokularından elde edilen dsRNA'ların elektroforetik analizleri sonucunda 170 örnekten 41 adedinde dsRNA profilleri görülmüştür (Şekil 4.4, 4.5). Elde edilen dsRNA bandlarının çoğunluğu zayıf görünümlü 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. Sabanadzovic ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)'da 15.000 bp seviyesinde dsRNA profilleri tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

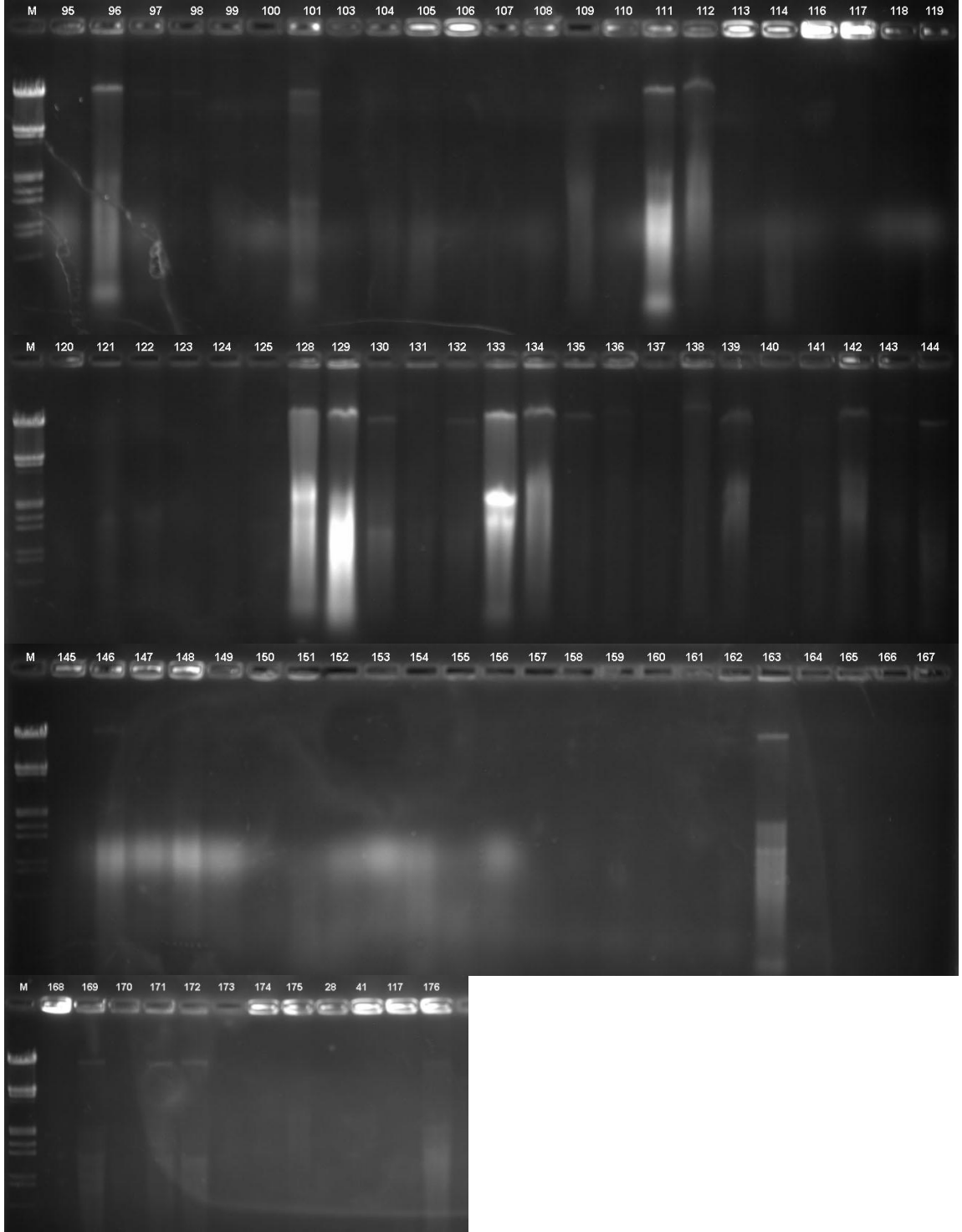
Araştırılan örneklerde tespit edilen 15.000 bp seviyesindeki band bu virüsle ilişkili olabilir. Ancak, bu çalışma kapsamında bu virüs örneklerde araştırılmamıştır. Bunun dışında zeytin ağaçlarında enfeksiyon yaptığı bilinmeyen virüsler olabileceği de göz önünde bulundurulursa elde edilen dsRNA profillerinin bu virüslerle de ilişkili olabileceği düşünülebilir. Nitekim son yıllarda, zeytinlerde *Tymoviridae* familyasından *Olive latent virus-3* (OLV-3) tanımlanmıştır (Al Abdullah ve ark., 2009).

#### 4.4. Çift kollu RNA (dsRNA) örnekleriyle PCR analizleri

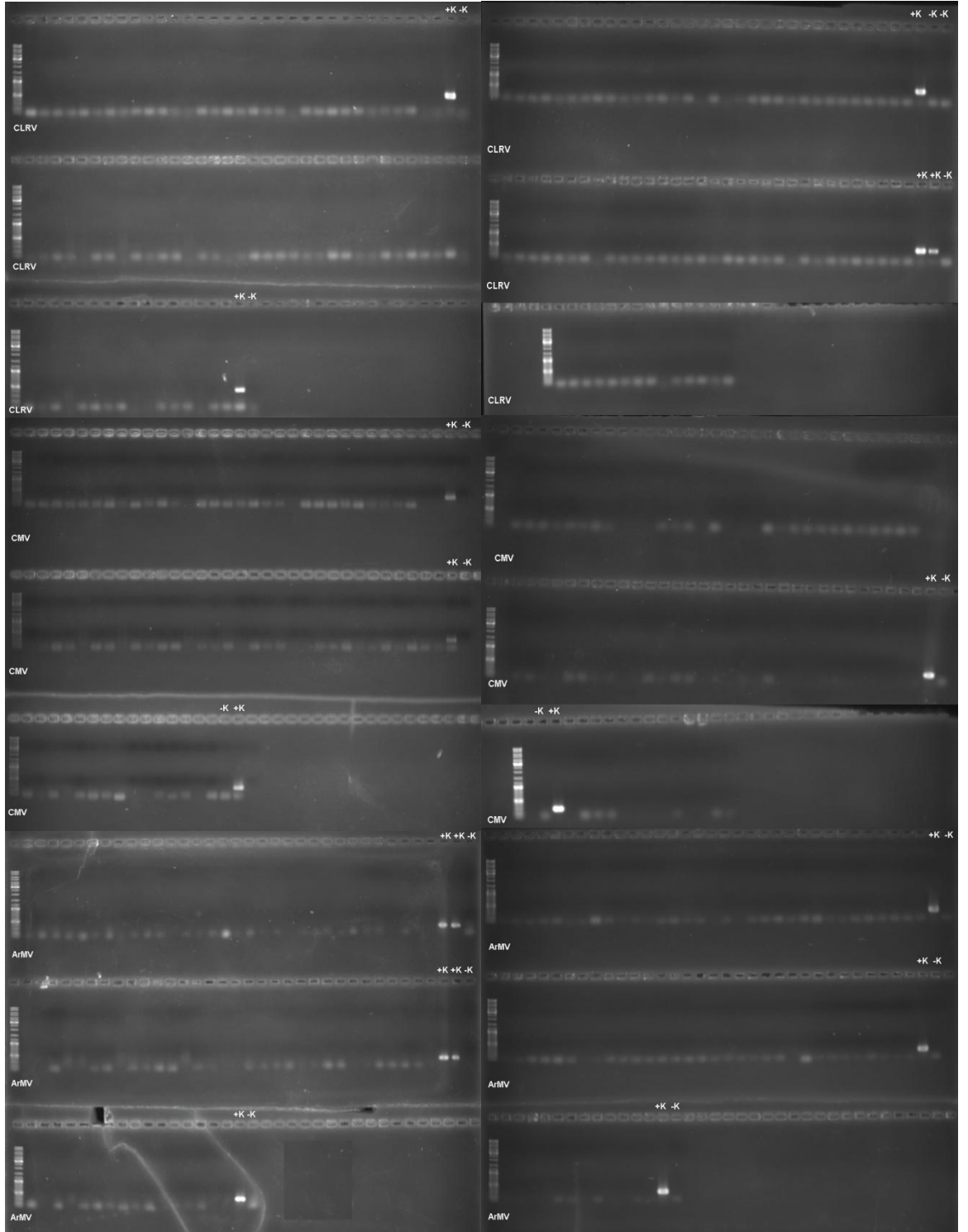
dsRNA analizinde 41 örnekte belirlenen profillerin hangi virüse ait olduğunu belirlemek amacıyla tüm dsRNA örnekleri araştırılan virüsler açısından PCR işlemine tabi tutulmuştur. dsRNA'dan cDNA'ların sentezlenmesiyle gerçekleştirilen PCR işlemlerinde test edilen 7 virüse karşı örneklerde reaksiyon veren olmamış, hepsinin bu virüsler açısından negatif olduğu tespit edilmiştir. Tüm testlerde pozitif kontrollerde beklenen seviyelerde fragment elde edilirken kontrolde de elde edilmemiştir (Şekil 4.6, 4.7, 4.8). zeytin ağaçlarında bu çalışma kapsamında araştırılan virüs hastalıklarının dışında *Olive vein yellowing-associated virus* (OVYaV), *Olive yellow mottling and decline associated virus* (OYMDaV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Olive semilatif virus* (OSLV), *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) ve *Tobacco necrosis virus-D* (TNV-D= *Olive mild mosaic virus*; OMMV) gibi virüs enfeksiyonları da bildirilmiştir (Poggi Pollini et al, 1996; 2002). dsRNA profillerinde gözlenen bantların bu virüs etmenleriyle ilişkili olabileceği düşünülebilir.



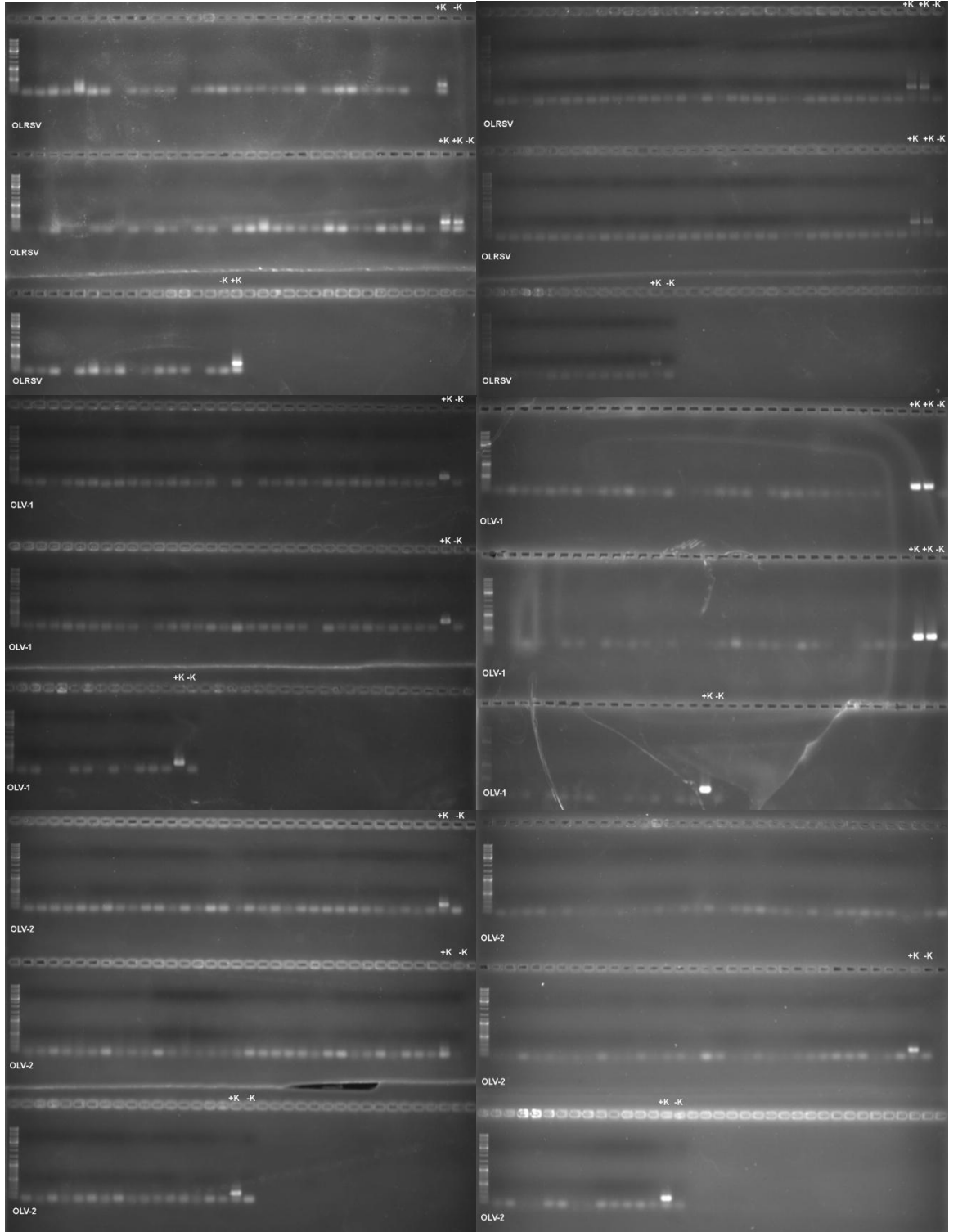
**Şekil 4.4.** Zeytin dallarının kortikal dokularının kullanıldığı dsRNA analizi sonucu elde edilen elektroforetik oluşumlar. 176 nolu örnek negatif kontrol. M Lambda DNA EcoRI/HindIII DNA ladder (MBI Fermentas, Almanya)



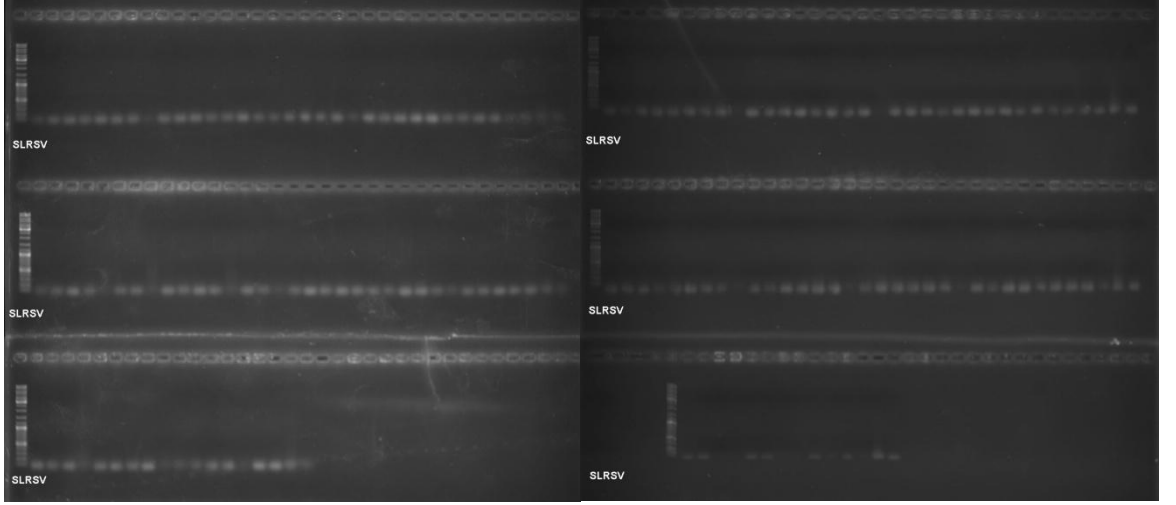
**Şekil 4.5.** Zeytin dallarının kortikal dokularının kullanıldığı dsRNA analizi sonucu elde edilen elektroforetik oluşumlar. 176 nolu örnek negatif kontrol. M Lambda DNA EcoRI/HindIII DNA ladder (MBI Fermentas, Almanya).



**Şekil 4.6.** dsRNA örnekleriyle gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya)



**Şekil 4.7.** dsRNA örnekleriyle gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya)



**Şekil 4.8.** dsRNA örnekleriyle gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya)

#### 4.4. Toplam RNA örnekleriyle PCR analizleri

Zeytin virüslerinin bitki dokusunda konsantrasyonlarının çok düşük olduğu ve ağaç bünyesinde düzensiz dağılım gösterdiği (Bertolini ve ark, 1998; 2001a; 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.

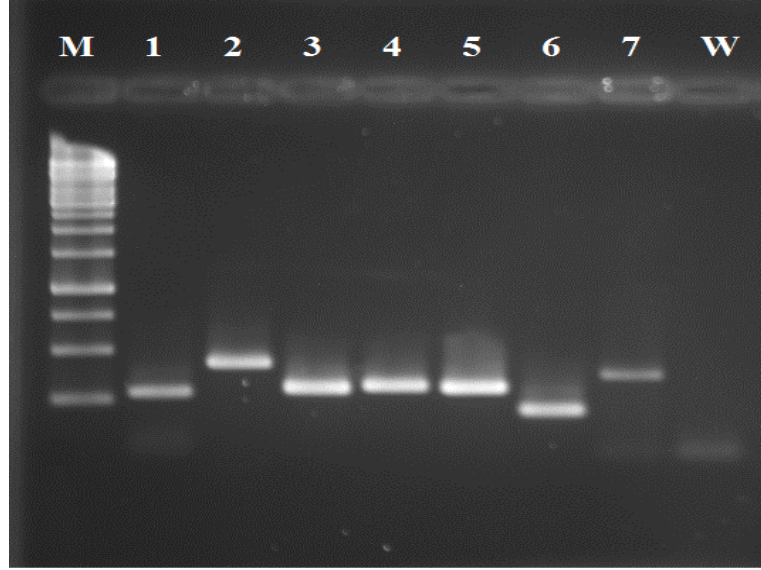
Zeytin virüslerinin testinde kullanılan Qiagen ekstraksiyon kiti en iyi sonuç veren ve pratik bir yöntem olarak önerilmiştir (Faggioli ve ark., 2005). Bu kitin kullanılmadığı durumlarda silika yönteminin (Rott ve Jelkmann, 2001) de iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Al Abdullah ve ark., 2009; Loconsole ve ark., 2010). Araştırmacılar diğer yöntemlerle ekstraksiyonların virüs testinde sorun yarattığını ve yanlış negatif sonuçlar verdiğini ifade etmiştir.

Mardin ili zeytin alanlarından toplanan örnekler ile RT-PCR çalışmalarına başlamadan önce, pozitif olduğu bilinen zeytin örnekleri kullanılarak laboratuarda sistem kurma çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla pozitif zeytin sürgünleri ve ELISA kiti liyofilize pozitif örneklerinden Qiagen ekstraksiyon kiti kullanılarak toplam RNA

ekstraksiyonu yapıldı. Pozitif örnekler ile yapılan RT-PCR analizleri sonucunda; CMV (280 bp), CLRV (416 bp), SLRSV (293 bp), ArMV (302 bp), OLV-1 (299 bp), OLV-2 (206 bp) ve OLRSV için (356 bp), beklenen spesifik DNA bant uzunlukları görülmüştür (Şekil 4.9).

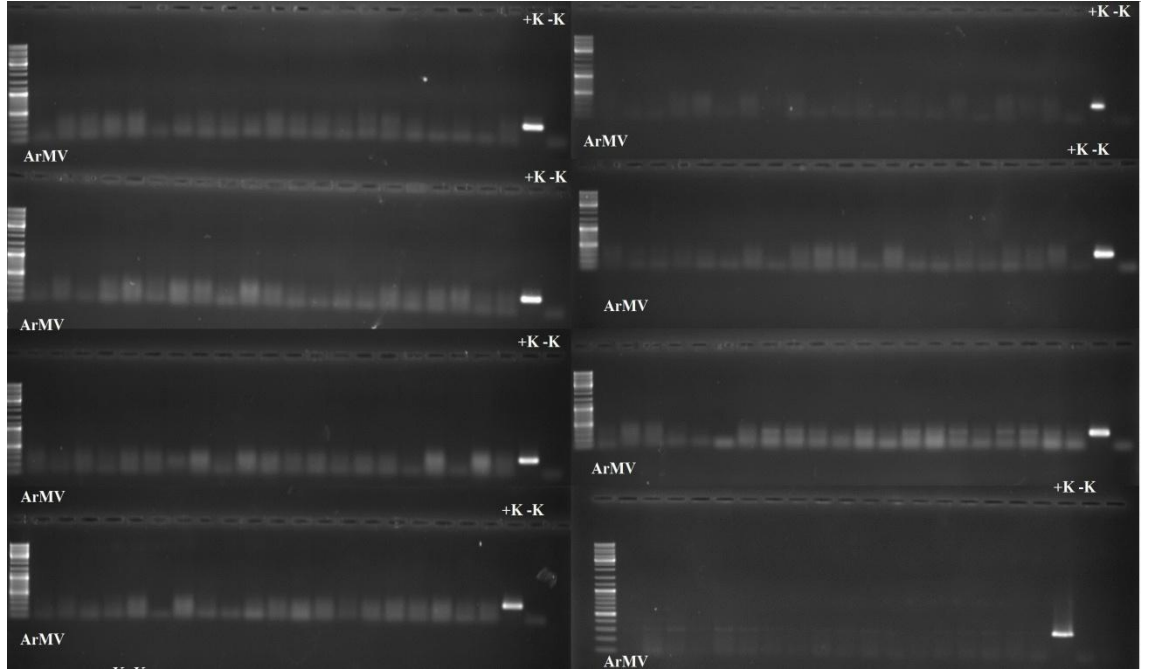
Daha önce yapılan çalışmalarda RNA ekstraksiyonlarından doğrudan RT-PCR ve 1/10 sulandırılarak yapılan RT-PCR çalışmaları arasında fark görülmemiştir (Yalçın, 2008). Bu nedenle yapılan RT-PCR çalışmalarında RNA sulandırılmadan tek aşamalı PCR şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Toplam RNA'dan gerçekleştirilen PCR işlemlerinde test edilen 7 virüse karşı örneklerde reaksiyon veren olmamış, hepsinin bu virüsler açısından negatif olduğu bu yöntemle de tespit edilmiştir (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13.). Tüm testlerde pozitif kontrollerde beklenen seviyelerde fragment elde edilirken su kontrolden elde edilmemiştir

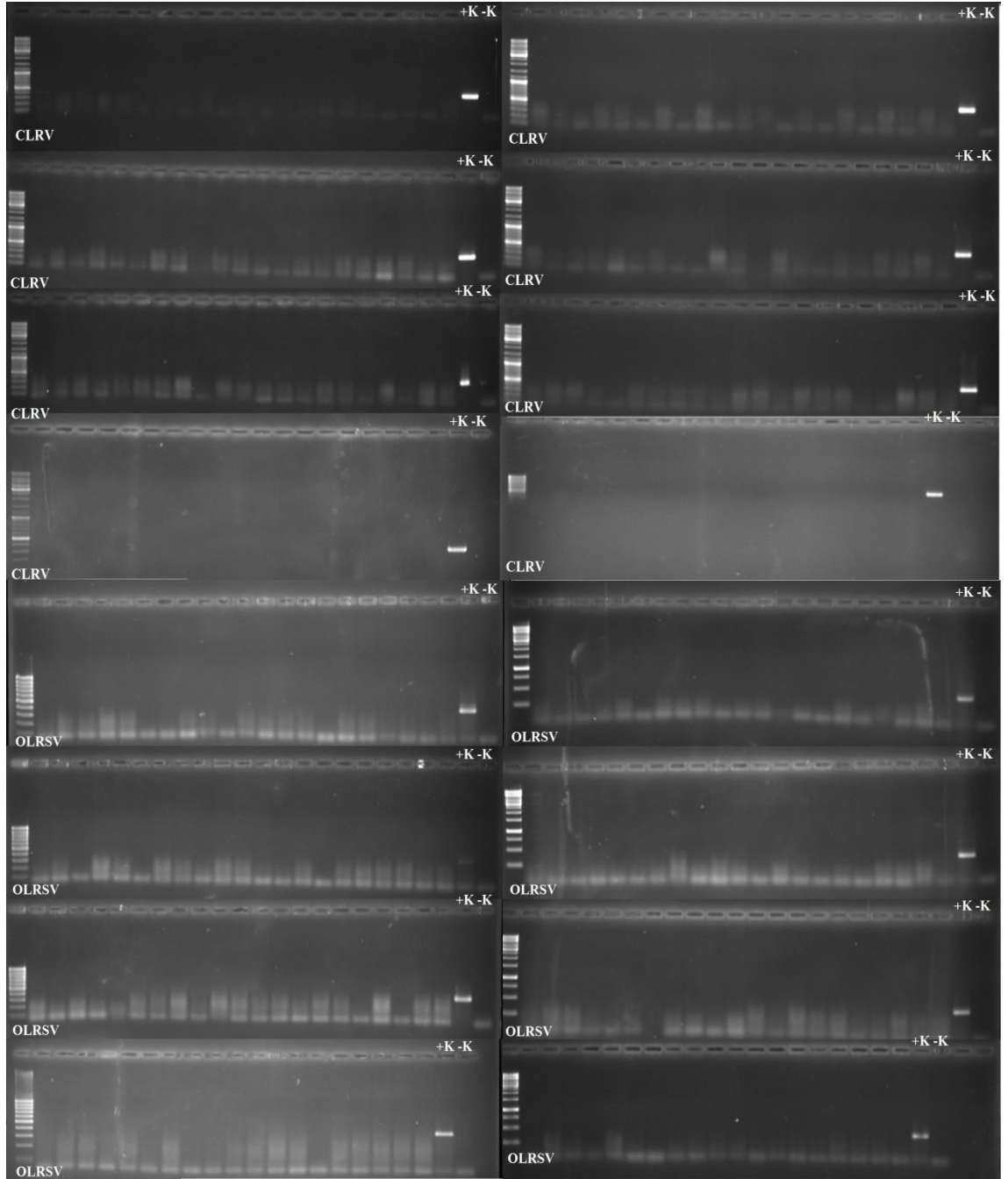


**Şekil 4.9.** Araştırılan virüslerle enfekteli zeytin dokuları ile RT-PCR sistem kurma çalışmaları. M: Markır (MBI Fermentas (GmbH, Almanya) 100 bp DNA ladder, 1: CMV pozitif kontrol (280 bp), 2: CLRV pozitif kontrol (416 bp), 3: SLRSV pozitif kontrol (293 bp), 4: ArMV pozitif kontrol (302 bp), 5: OLV-1 pozitif kontrol (299 bp), 6: OLV-2 pozitif kontrol (206 bp), 7: OLRSV pozitif örnekler (356 bp), W: su kontrol

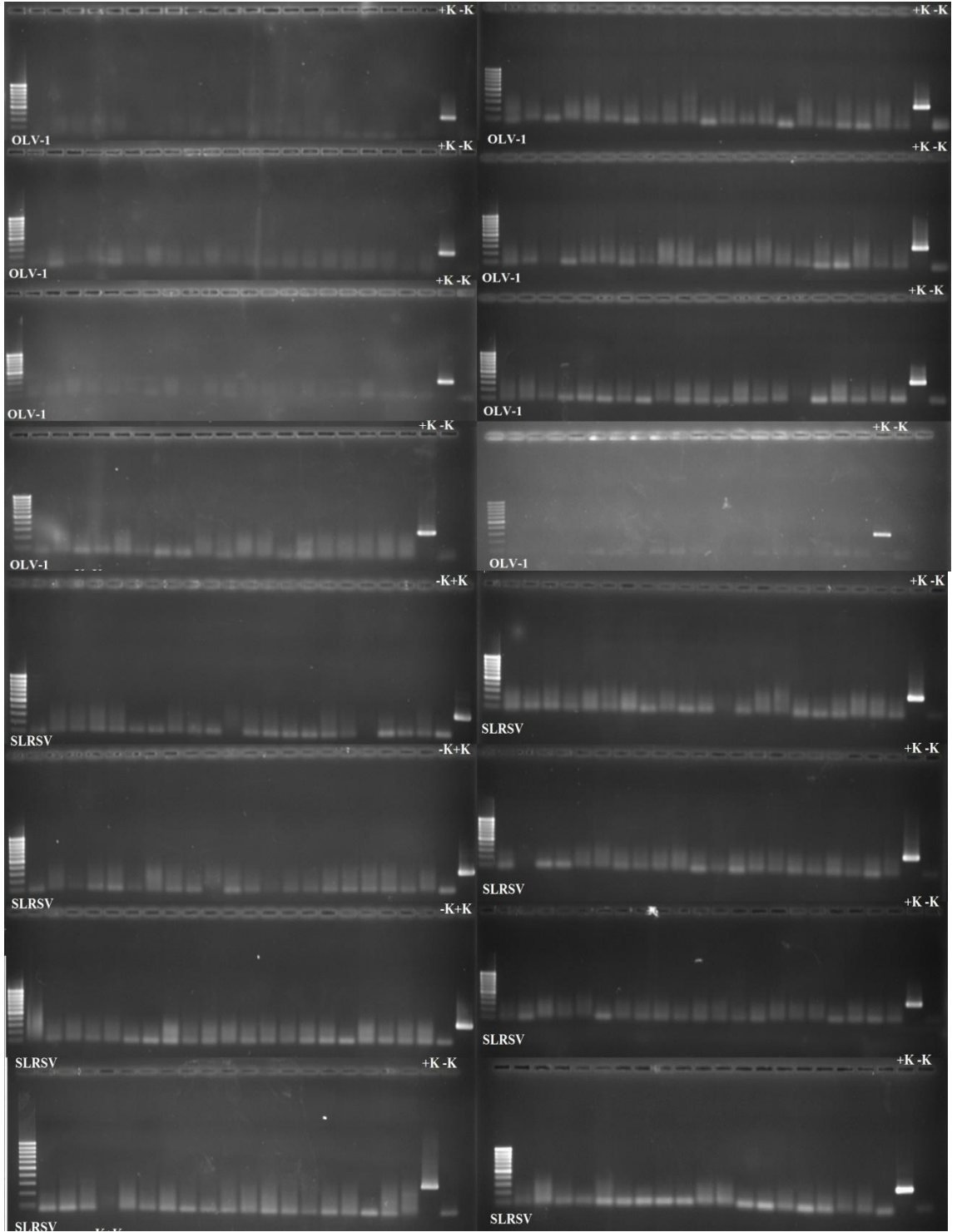
Dünyada yapılan çalışmalar sonucunda zeytinde ilk CMV enfeksiyonları İtalya'dan (Savino ve Galitelli, 1983) daha sonra Portekiz (Rei ve ark., 1993) ve İspanya'dan (Bertolini ve ark., 2001a) bildirilmiştir. Yapılan ilk çalışmalarda CMV zeytin ağaçlarında sınırlı yayılma gösterirken, son yıllarda daha geniş alanlardan; %22.7 oranında Suriye'de (Al Abdullah ve ark., 2005), %37,7 oranında California'da (Al Rwahnih ve ark., 2011), %25.7 oranında Tunus'ta (El Aïr ve ark., 2011) ve %24.7 oranı ile Mısır'dan (Youssef ve ark., 2010) bildirilmiştir. Ülkemizde ELISA testi ile Ege bölgesinde yapılan eski bir çalışmada; zeytinde CMV enfeksiyonu yaprakta %24, çiçekte ise %21.9 olarak bildirilmiştir (Fidan ve Ertem, 1995). Çok geniş bir konukçu dizisine sahip olan bu virüs 60'tan fazla afıt türü (*Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora* ve *Myzus persicae* vb.) ile non-persistent taşınabilmektedir. Bu virüs vejetatif üretim materyalleri olan aşı, aşı gözü, aşı kalemi, tohum v.b yollar ile taşınabildiği bildirmiştir.



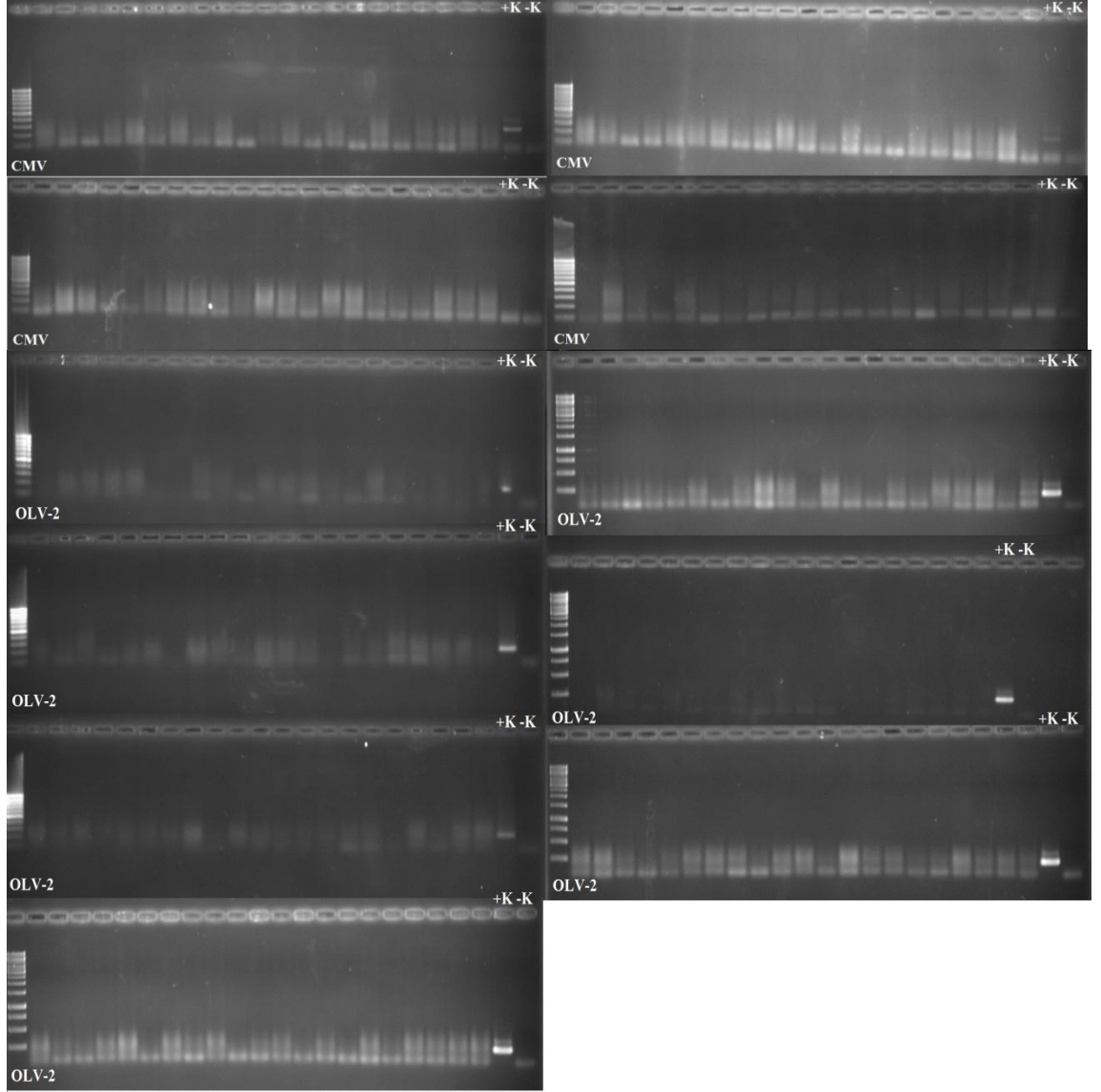
**Şekil 4.10.** Toplam RNA'dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya).



**Şekil 4.11.** Toplam RNA'dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya).



**Şekil 4.12.** Toplam RNA'dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya).



**Şekil 4.13.** Toplam RNA'dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin sonuçları. +K pozitif kontrol, -K negatif kontrol, DNA ladder DNA ladder mix (MBI Fermentas, Almanya)

OLV-1 ilk olarak Güney İtalya'nın Apulia kentinde sptomsuz bir zeytin ağacından mekanik inokulasyonla izole edilmiştir (Galitelli ve Savino, 1985). Diğer OLV-1 enfeksiyonu 1998 yılında Felix ve Clara tarafından Portekiz'de zeytin meyvelerinden elde edilen ekstraktlarla inokule edilen semptomlu *Nicotiana bentamiana* bitkilerinden kaydedilmiştir (Felix ve ark., 2005). 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 Aır

ve ark., 2011) ve %5.7 oranında Mısır'dan (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 (Yalçın, 2008).

OLV-2 ilk olarak italya'da tespit edilmiş ve herhangi bir yayılma tespit edilmemişti (Savino ve ark., 1984) ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda sonucunda %2 oranında Suriye'de (Al Abdullah ve ark., 2005), Hırvatistan'da (Bjelis ve ark., 2007) %6.9 oranı ile Tunus'ta (El Aır ve ark., 2011) ve %2.7 oranı ile Mısır'dan (Youssef ve ark.,2010) bildirilmiştir. *Bromoviridae* familyasının *Oleavirus* cinsinin monotipik bir türü olan OLV-2 son yıllarda yapılan çalışmalar ile akdeniz havzasında yayılımı artmıştır. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada OLV-2'nin zeytinden farklı bir konukçu olan gene otunda bildirilmiştir (Grieco ve ark., 2002). Ülkemizde ise Doğu Akdeniz bölgesinde bu virüs araştırılmış ancak tespit edilmemiştir (Yalçın, 2008), ülkemizde bu çalışmanın 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 Aır ve ark., 2011) ve %6.7 oranında Mısır'dan (Youssef ve ark.,2010) bildirilmiştir. Yapılan son çalışmalar ile bu virüsün daha geniş alanlara yayıldığı görülmektedir.

Türkiye'de DAS-ELISA yöntemi ile yapılan bir çalışmada zeytinde CLRV enfeksiyonu %23 oranında (Çağlayan ve ark., 2004) bildirilmiştir. 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 Aır ve ark., 2011), %4.7 oranında Mısır'da (Youssef ve ark.,2010) ve Hırvatistan'dan 25 semptomlu örneğin 6'sında (Luigi ve ark.2011) bildirilmiştir. CLRV zeytinlerde semptom 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; DAS-ELISA testi ile %7.1 oranında Türkiye'de (Çağlayan ve ark., 2004), RT-PCR ile 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. ArMV'nin geniş bir konukçu dizisi sahip olmasına rağmen yapılan çalışmalarda oldukça düşük seviyede kaldığı görülmektedir. ArMV'nin zeytin ağaçlarında çok az rastlanma sebebi; bu virüsün diğer konukçularının zeytin bahçelerinde bulunmadığından dolayı bu virüs az yayılım gösterdiği kanısına varılmıştır. Bu virüs zeytin ağaçlarına enfekteli üretim materyali vasıtası ile bulaştığı düşünülmektedir.

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 DAS-ELISA ile Türkiye'de (Çağlayan ve ark., 2004) 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 sorvey 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 Aır ve ark., 2011) ve %2.3 oranında Mısır'dan (Youssef ve ark.,2010) SLRSV enfeksiyonları tespit edilmiştir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

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. Viral hastalıklarla enfekteli bitkilerden sağlam üretim materyali elde etmek oldukça zordur. Ancak farklı yöntemler kullanarak (örneğin; ısı terapisi, meristem ucu kültürü, mikro aşılama yöntemleri) virüsten arı üretim materyali üretmek imkansız değildir. İtalya’da yapılan bazı başarılı çalışmalarda CLRV ve OLYaV’nin ısı uygulaması ve sürgün ucu kültürü yöntemleri kullanılarak elemine edildiği bildirilmiştir (Bottalico ve ark., 2002). Zeytinde enfeksiyon yaptığı belirlenen virüslerin bazıları örneğin; SLRSV, ArMV ve TNV gibi virüsler toprak kökenlidir. TMV gibi bazı virüsler doğrudan veya CMV gibi vektör böcekler aracılığıyla veya vejetatif üretim materyalleri yoluyla, CLRV ve OLV-1 gibi bazı virüsler de tohumla taşınarak yayılırlar. Bu bilgiler dışında arazi koşullarında zeytin virüslerinin epidemiyolojisi ve zeytin ağaçlarındaki virüslerin ekonomik açıdan önemleri hakkında yapılan bir araştırma olmadığı için virüslerin bitkilerde meydana getirdiği verim ve kaliteye etkileri üzerinde herhangi bir bilgi mevcut değildir.

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, 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, OYVaV, OYMDaV, OSLV, OLYaV, OMMV, OLV-3 virüslerine karşı da test edilmesi gerekmektedir.

Mardin ilinde yetiştirilen zeytin ağaçlarında yürütülen bu çalışma ile bu bölgedeki zeytin ağaçlarının sağlık durumları hakkında ilk veriler elde edilmiştir. Bu çalışmanın daha geniş alanlarda, zeytinde enfeksiyon yaptığı bilinen tüm virüs etmenlerine karşı araştırılacağı projelerle devam ettirilmesi önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ahangaran, A., Khezri, S., Habibi, M. K., Alizadeh, A., and Mohammadi, G, M., 2006. The first report of detection of phytoplasma in olive trees in a botanic collection in Iran. Commun agric. **Appl. Boil.** 7:1133-1138
- Al Abdullah, A., T. El Beaino, M. Saponari, H. Hallak and M. Digiaro (2005). Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Syria. **EPPO Bulletin** 35 (2), 249–252.
- Al Abdullah A., Elbeaino T., Minafra A., Digiaro 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 Rwahnih M., Guo Y., Daubert S., Golino D. and Rowhanni A., (2011), Characterization Of Latent Viral İnfection Of Olive Trees İn The National Germplasm Repository İn California, **Journal Of Plant Pathology**, Vol 93 No 1
- Albance, G., Faggioli, F., ferretti, L., Sciarroni, R., La Rosa, R., and Barba, M. 2003. Sanitary status evaluation of live cultivars in Calabria and Sicily. **J. Plant Pathol.** 85:304
- Alkowni, R., Grieco, F.. and Martelli, G.P. 2001. Complete nucleotide sequence of RNA-2 of *Olive latent ringspot virus*. **Archives of Virology**, 46: 127-133.
- Anonymous. 2010. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Anonim, 2011. **Tarımsal yapı üretim, fiyat, değer**. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu.
- Anonim, 2012. Mardin İl Müdürlüğü Proje İstatistik Şubesi Verileri, 10S
- Barba M (1993) Viruses and virus-like diseases of olive. **Bullen OEPP/EPPO Bulletin** 23. 493-497.
- 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. 2001a. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. **Journal of Virological Methods**, 96: 33-41.
- Bertolini E., Cambra M., Peñalver R., Ferrer A., Garcia A., Del Rio M.C., Gorris M.T., Martínez M.C., Quesada J.M., García De Oteyza J., Duran-Vila N., Caballero J.L., López M.M., 2001b. Métodos serológicos y moleculares de diagnóstico de virus y bacterias de olivo. Evaluación de la sensibilidad varietal y la aplicación a programas decertificación. **MERCACEI Magazine** 30:1-6.
- Bertolini, E., Olmos, A., Lopez, M.M. and Cambra, M. 2003. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. **Phytopathology**, 93: 286-292.
- Bjelis. M., Loconsole, G., and Saponari, M., 2007. Presence of virruses in Croatian olive groves. **Pomologia Croatica** 13:16S-172.
- Bottalico, G., Rodio,M. E., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G. P. 2002. Preliminary Results of Sanitation Trials of Viruses-Infected Olive Tree. **Journal of Plant Pathology** 84: 171-200.

- 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., Ç. Ulubas Serçe and M. Gazel,. 2006. “**Olive Viruses**” **Characterization, Diagnosis & Management of Plant Viruses**. ed. G.P. Rao, S.M.P. Khurana ve S.L. Lenardon, Vol. 1, 305-339, Industrial Crops, Published by Studium Press LLC, Texas, USA,
- Cardoso, J.M.S., Felix, M.R., Oliveira, S. and Clara, M.I.E. 2004. A *Tobacco necrosis virus* D isolate from *Olea europaea* L.: viral characterization and coat protein sequence analysis. **Archives of Virology**, 149: 1129-1138.
- 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 europaea* L. **Archives of Virology**, 150: 815-823.
- Cifferi R, Baldini E. Rui. D. Scaramuzzi G, Fogliani G & Rostirolla G (1953) Foliar abnormalities of olive in Liguria and on the lake Garda. **Ann. Sper. Agrar.** 10:25-59
- 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.
- Cooper, J. 1986. **Strawberry latent ringspot virus**. CMI/AAB Description of Plant Viruses, N 126, 4 pp.
- Corte, A., Cifferi, R. and Rui, D. 1961. **Infections on privet and foliar abnormalities of olive**. Rivista di Pathologia Vegetaleç S. III 1: 251-260 (in Italian).
- Del Serrone P, Faggioli F. Arzone A., Tarquini, and Barba, (1996) .Lociated nuovo ospite naturale di fiyoplami. **L’Informematore agrario**, LII 13:71-72
- El Air M., Mahfoudi N., Digiaro M., Najjar A. and Elbeaino T., (2011) Detection of Olive-infecting Viruses in Tunisia. **J Phytopathol** 159:283–286
- Fadel, C., Digiaro, 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. and Barba, M. 1995. An elongated virus isolated from olive. **Acta Horticulture**, 386: 593-600.
- 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.
- 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.
- Felix, M.R. and Clara, M.I. 1998. Caracteristicas biologicas e bioquimicas da estirpe GI, do Necrovirus Olive Latent 1 isolado de *Olea europaea* L. **Actas da 2a Reuniano Bial da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia**, pp. 67.
- Felix, F. and Clara, M.I.E. 2002. Two *Necrovirus* isolates with properties of *Olive latent virus* 1 and of *Tobacco necrosis virus* from Olive in Portugal. **Acta Horticulture**, 586: 725-728.
- Felix, M.R., Cardoso, J.M.S., Oliverira, S. and Clara, M.I.E. 2005. Viral properties, primary structure and phylogenetic analysis of the coat protein of an *Olive latent virus* 1 isolate from *Olea europaea* L. **Virus Resaerch**, 108: 195-198.
- Ferreti, L., Faggioli, G., Pasquini, G., Sciarroni, R., Pannelli, G., Baldoni, L. and Barba, M. 2002. *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) cause of differentiation

- among Raggiola and Frantoio olive cultivars. **Journal of Plant Pathology**, 84: 171-200.
- 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.
- Fogliani G (1953) Studies on olive leptonecrosis. III. Attempts to reproduce the disease and further observations on the epidemics of 1951.1 **Ann. Sper. Agrar.** 7. 1241 - 1258
- Font I., Abad P, Dally E. L., Davis RE and Jorda C (1998) A new disease in Spanish olives. **Phytopathologia Mediterranea** 102, 21 1-212
- 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.
- Gentkow, J., Rebenstorf, S., von Bargen, S. and Büttner. 2005. Biological and molecular characteristics of cherry leaf roll virus (CLRV) isolates from different host plants. 4<sup>th</sup> Meeting of Dutch and German Plant Virologist, WICC, Wageningen, March 10,11. **Viruskrankheiten der Pflanzen**, Abstract
- Grieco, F., Martelli, G.P. and Savino, V. 1995. The nucleotide sequence of RNA3 and RNA4 of *Olive latent virus* 2. **Journal of General Virology**, 76: 929-937.
- Grieco, F., Dell'Orco, M. and Martelli, G.P. 1996. The nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 of *Olive latent virus* 2 and its relationships in the family *Bromoviridae*. **Journal of General Virology**, 77(10): 2637-2644.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2000. Molecular detection of olive viruses. **OEPP/EPPPO Bulletin**, 30: 469-473.
- Grieco, F., Parrella, G. and Vovlas, C. 2002. An isolate of *Olive latent virus* 2 infecting castor bean in Greece. **Journal of Plant Pathology**, 84(2): 129-131.
- Hamacher, J. and Giersiepen, R. 1989. Histologisch-cytologische Veränderungen in Kirschenblattrollvirus-infizierten und durch Luftschadstoffe gestreßten Betula-Arten. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes** 41: 124-130.
- Hamacher, J. and Quadt, A. (1991). Light- and electron microscopic studies of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) on European Ash (*Fraxinus excelsior* L.). **Journal of Phytopathology**, 131: 215-226.
- 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.
- Herrera, M.G., and Madariaga, V. M. 1999. Detection of viroid like-organism on olive plants (*Olea europaea* L.) with sickle leaf symptoms. **Agricultura Tecnica** (Santiago) 59:178-185
- 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.
- Kyriakopoulou PE (1996) Olive fruit hump and olive fruit pox: two new diseases of possible viral origin. **Phytopathologia Mediterranea** 35, 23 1-232.
- Lavee S & Tanne E (1984) Spherosis - a virus disease of the olive (*Olea europaea*). Symptoms, growth, tree development and production. **Olea** 12, 71-75.
- 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
- Marte, M., Gadani, E., 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. 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., Yilmaz, 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.
- Martelli, G.P. and Grieco, F. 1997. *Oleavirus*, a new genus in the family *Bromoviridae*. **Archives of Virology**, 142: 1933-1936.
- Martelli, G.P., Salerno, M., Savino, V. and Prota, U. 2002a An appraisal of diseases and pathogens of olive. **Acta Horticulture**, 586: 701-708.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J., Wisler, G.C. and Yoshikawa, N., (ICTV Study group on closteroviruses and allied viruses). 2002b. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**, 147: 2039-2044.
- Materazzi, A., Toni, S., Panatroni, A., Osti, M. and Triolo, E. 1996. **On the presence of a new isometric virus in *Olea europaea* L.** In: Atti convegno Annuale della Societa Italiana di Patologia Vegetale, pp. 57-59. **Universita di Pisa (IT)** (in Italian).
- Nicolini, J.C. and Traversi, B.A. 1950. **Observations of a new disease of olive in Argentina.** Informa de la Direction de Investigaciones Agricolas, Buenos Aires 3:1-6 (in Spanish).
- Pacini, E. and Ciresti, M. 1977. Viral particles in developing pollen grain of *Olea europaea*. **Planta**, 137: 1-4.
- Pantaleo, V., Grieco, F., Castellano, M.A. and Martelli, G.P. 1999. Synthesis of infectious transcripts of *Olive latent virus 1*: genes required for RNA replication and virus movement. **Archives of Virology**, 144: 1071-1079.
- Pantaleo, V., Saponari, M., and Galitelli, D. 2001. Development of a nested PCR protocol for detection of olive-infecting viruses in crude extracts. **Journal of Plant Pathology**, 83(2):143-146.
- Pasquini, G., marzachi, C., Poggi PolliniC., Faggioli, F., Ragozzino. A., Bissani, R., Vischi, A., Barba, M., Giunchedi. L., and boccardo, G. 2000. Molecular characterization of phytoplasmas affecting olive trees (*Olea eurapea* L.) in Italy. **J. plant pathol.** 82:213-219.
- Pesante (1938) On a disease of olive unknown up to now. **Bollettirio della Sraziorie di Patalogin Vegetale, Ronia** 18, 401 -428.
- 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 Boccardo, 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.
- Rebenstorf, K., candrese, T., dulueq, M.J., Bütnner, C., and Obermeier, C., 2006. Host species dependent population structure of a pollen-borne plant virüs, Cherry leaf roll virüs, **J. Virol.** 80:2453-2462.
- 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.
- Ribaldi M (1959) Preliminary observations on an infectious yellows of olive (*Olea europaea* var. *sativa*). **Notiziario sidle Mulottie delk Piante.** 47-48 (NS 26-27), 178-1 18.
- Rott M.A. and Jelkmann W. 2001,. Characterizasyon and detection of sevrall 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.
- Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2002a. Seed transmission in olive of two olive-infecting viruses. **Journal of Plant Pathology**, 84(3): 167-168.
- Saponari, M., R. Alkowni, F. Grieco, N. Driouech, M. Hassan, B. Di Terlizzi, M. Digiaro, V. Pantaleo, V. Savino, G.P. Martelli 2002b. Detection of olive-infecting viruses in the mediterranean basin. **Acta Horticulturae.** 586: 787-790.
- Saponari, M., and Savino, V. 2003. Virus and virus-like agents in olive. **Inf. Fitopatol.** 12:26-29
- Savino, V., Barba, M., Galitelli, G. and Martelli, G.P. 1979. Two nepoviruses isolated from olive in Italy. **Phytopatologia Mediterranea**, 18: 135-142.
- Savino, V. and Galitelli, D. 1981. *Cherry leaf roll virus* in olive. **Phytopatologia Mediterranea**, 22: 76-77.
- Savino, V. and Galitelli, D. 1983. Isolation of *Cucumber mosaic virus* from olive in Italy. **Phytopatologia Mediterranea**, 22: 76-77.
- 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).
- Savino, V., Sabanadzovic, S., Scarito, G., Laviola, C. and Martelli, G.P. 1996. Two olive yellows of possible viral origin in Sicily. **Informatore Fitopatologico**, 46(5): 55-59 (in Italian).
- 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. (Serologically detection of

- some virus diseases in olive grown in Hatay province) **VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Ankara**, pp.239-243.
- Thomas. 1958. Sick leaf of olive. **Plant Disease Reporter**, 42: 1100-1154.
- Triolo, E. , Materazzi, A. and Toni, S. 1996. An isolate of Tobacco mosaic tobamovirus from *Olea europaea*. **Advances in Horticultural Science**, 10: 39-45.
- 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.
- Waterworth HE and Monroe RL (1975) Graft transmission of olive sick leaf disorder. **Plant Disease Reporter** 59, 366-367.
- Weintraub, P.G. and Beanland, L. 2007. Insect vectors of phytoplasmas and their control- an update bull. **Insectol.**60:169-173
- Yalçın, S., 2008. Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki zeytin bahçelerindeki virüslerin yaygınlığının RT-PCR ile belirlenmesi ve karakterizasyonu. **MKÜ, 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 Graft Trasmissible Disease Of Fruit Crops., **Julius-kühn-archiv**, 427.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir özveri ve sabırla yol gösteren, değerli fikir ve katkılarını esirgemeyerek çalışmalarına ışık tutan danışman hocam sayın Doç. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında değerli görüş, katkı ve bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN ve Doç. Dr. Mona GAZEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana her konuda destek olan mesai arkadaşlarıma ve hayatımın her alanında bana büyük bir özveri ve sabırla destek olan eşim Hilal ÇİFTÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Batman'ın Sason ilçesinde doğdum. İlkokulu burada, orta öğrenimi Batman'da, liseyi ise Ankara Laborant Meslek Lisesinde tamamladım. 2001 yılında Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde laborant olarak çalışmaya başladım. 2004 yılında Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma İstasyonu'na tayin oldum. 2002 yılında girdiğim Dicle Üniversitesi Fen Edebiyet Fakùltesi Biyoloji bölümünden 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi 'nin açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazandım. 2011 yılında evlendim. Halen Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma İstasyon Müdürlüğünde Bitki Virolojisi konusunda çalışmaktayım.

## EKLER

### EK 1. ELISA TESTİNDE KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER

#### 1. Fosfat Tamponu Salin (Phosphate Buffered Saline-PBS) pH: 7.4

|                                                           |        |
|-----------------------------------------------------------|--------|
| NaCl                                                      | 8.0 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                           | 0.2 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O veya | 2.9 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O        | 2.3 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O        | 1.44 g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Susuz)                  | 1.15 g |
| KCl                                                       | 0.2 g  |
| NaN <sub>3</sub>                                          | 0.2 g  |

Yukarıda verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 0.1 NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 °C'de saklanmıştır. Bu tampon çözelti 5 veya 10 kat konsantre olarak stok çözelti şeklinde hazırlanıp saklanabilir ve gerekli olduğunda aynı oranda sulandırılıp kullanılabilir.

#### 2. Kaplama Tamponu (Coating Buffer) pH: 9.6

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 1.59 g |
| NaHCO <sub>3</sub>              | 2.93 g |
| NaN <sub>3</sub>                | 0.2 g  |

Yukarıda verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanmış ve 4 °C'de saklanmıştır. Ancak her kullanımda pH kontrol edilmiştir.

### **3. Yıkama Tamponu (Washing Buffer)**

1 litre PBS tamponuna 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

### **4. Örnek Tamponu (Sample Buffer)**

1 litre tampon çözeltisi içerisine 20 g (%2) Polyvinylpyrrolidone 40.000 (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır (1 ay içerisinde kullanılmak üzere 4 °C’de saklanabilir).

### **5. Enzim Konjugat Tamponu (Enzyme Conjugate Buffer)**

1 litre örnek tamponu içine 2 g (%2) Ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır (1 ay içerisinde kullanılmak üzere 4 °C’de saklanabilir).

### **6. Substrat Tamponu (Substrat Buffer) pH: 9.8**

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içerisine ilave edilir. Sonra 0.2 g  $\text{NaN}_3$  eklenir ve HCl ile pH 9.8’e ayarlanarak 1 litreye tamamlanır (karanlıkta 4 °C’de saklanabilir ancak kullanılmadan önce pH kontrol edilmelidir).

## EK 2 ds-RNA ANALİZLERİNDE KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER

### 1. % 0.1 DEPC (diethylpyrocarbonate) Uygulanmış Su Hazırlanışı 1000 ml

% 0.1 DEPC' li su için 1 lt suya 1 ml DEPC eklenir. İyice karıştırılır. Tüm gece bekletildiktilir. Otoklav edildikten sonra kullanılır.

### 2. 0.1M BENTONİTE Hazırlanışı (45 mg/ml konsantrasyonda) 100 ml

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1.36 gr |
| Bentonit                        | 4.50 gr |

Kimyasalları tartıktan sonra 100 ml ye tamamlanır. İçerisine % 0.1 DEPC eklenir (100 µl / 100ml için). Manyetik karıştırıcı ile tüm gece karıştırılır. Otoklav edilir.

### 3. TE Buffer Hazırlanışı 7.5 pH 100 ml

|            |           |
|------------|-----------|
| 10 mM Tris | 0.121 gr  |
| 1 mM EDTA  | 0.0372 gr |

% 0.1 DEPC uygulanmış su ile 100 ml tamamlanır. pH 7.5' e ayarlanır otoklav edildikten sonra kullanılır.

**10X STE Stok Solüsyonu Hazırlanışı pH 7.4 1000 ml**

|             |             |
|-------------|-------------|
| 1 M NaCl    | 58.8 gr/lit |
| 0.5 M Tris  | 60.5 gr/lit |
| 0.01 M EDTA | 3.72 gr/lit |

900 ml % 0.1 DEPC uygulanmış suda eritilir. pH 7.4' e HCl (saf) ile ayarlandıktan sonra 1000 ml' ye tamamlanır. Otoklav edildikten sonra kullanılır.

**4. 3 M NaOAc Hazırlanışı pH 5.5 100 ml**

40.81 gr NaoAc 80 ml % 0.1 DEPC uygulanmış suda eritilir. pH 5.5' e glacial asetik asid ile ayarlanır. 100 ml' ye tamamlanır. Otoklav edildikten sonra kullanılır.

**5. % 10 SDS Hazırlanışı 1000 ml**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Sodium dodecyl sulfate | 100 gr |
|------------------------|--------|

1 lt' Distile suda eritir ve kullanılır.

## 6. ds-RNA Analizleri İçin 2XSTE ile Doyurulmuş Fenol Hazırlama

- 0.1 Hydroxyquialine fenole eklenir. (1kg fenol için 1 gr)
- 1:1 oranında steril % 0.1 DEPC uygulanmış su ile koyu renkli şişede çalkalanır.
- 4 saat veya tüm gece beklet.
- Ertesi gün iki faz olmuş olur, üstteki sıvı fazı uzaklaştır ( yüzeyde 1 cm yüksekliğinde su kalabilir. Hepsini uzaklaştırmaya gerek yok).
- Uzaklaştıran sıvı miktarını belirle ve eşit hacimde 2XSTE fenole eklenir.
- Şiddetle karıştırılır ve 2 saat veya tüm gece beklet
- Üstteki sıvı fazı uzaklaştır (yüzeyde 1 cm yüksekliğinde su kalabilir. Hepsini uzaklaştırmaya gerek yok).
- Uzaklaştıran sıvı miktarını belirle ve eşit hacimde 2XSTE fenole eklenir.
- 2 saat veya tüm gece beklet. Üstteki sıvıyı uzaklaştır ve fenölü +4 °C’de muhafaza edilir.

### EK 3. PCR ANALİZLERİNDE KULLANILAN TAMPON ÇÖZELTİLER

#### 1. 50 X TAE 100 ml stok için

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Trizma base              | 24.2    |
| 0.5 M EDTA pH 8.0        | 10 ml   |
| 0.6 glacial acetic acide | 5.71 ml |

Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

#### 2. Yükleme Ortamı 15 ml 6X stok için

|                  |        |
|------------------|--------|
| Bromophenol blue | 150 mg |
| Glycerol         | 18 g   |
| 50X TAE          | 6 ml   |

-20°C’de saklanır.

#### 3. Ethidium Bromide Solüsyonu 1 mg/ml 200 ml stok için

|                  |                                    |
|------------------|------------------------------------|
| 1X TAE           | 200 ml                             |
| Ethidium Bromide | 200 µl (son konsantrasyon 1 mg/ml) |

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanır. 5-10 defayakadar aynı solüsyon kullanılabilir. Daha sonraki kullanımlar için tazelenmelidir.