

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**AYDIN, BALIKESİR VE İZMİR İLLERİNDE ZEYTİN
AĞAÇLARINDAKİ VİRAL HASTALIK
ETMENLERİNİN TANILANMASI, BULUNMA
DURUMLARININ BELİRLENMESİ VE BAZI MEYVE
KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Serpil ERİLMEZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Semih ERKAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.03.01

Sunuş Tarihi:

Bornova-İZMİR

2012

Serpil ERİLMEZ tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Aydın, Balıkesir ve İzmir İllerinde Zeytin Ağaçlarındaki Viral Hastalık Etmenlerinin Tanılanması, Bulunma Durumlarının Belirlenmesi ve Bazı Meyve Kalite Özellikleri Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27/12/2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Semih ERKAN
Raportör Üye : Doç. Dr. Mustafa GÜMÜŞ
Üye : Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN
Üye : Prof. Dr. Elmas ÖZEKER
Üye : Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

İmza

.....
.....
.....
.....
.....

ÖZET**AYDIN, BALIKESİR VE İZMİR İLLERİNDE ZEYTİN AĞAÇLARINDAKİ
VİRAL HASTALIK ETMENLERİNİN TANILANMASI, BULUNMA
DURUMLARININ BELİRLENMESİ VE BAZI MEYVE KALİTE
ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ERİLMEZ, Serpil

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Semih ERKAN

Aralık 2012, 79 sayfa

Bu çalışma 2009 ve 2012 yılları arasında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde yaygın olarak zeytin yetiştiriciliği yapılan üretim alanlarındaki virüs hastalıklarının belirlenmesi, toplanan örneklerde virüslerin bulunma durumlarının ortaya konması ve virüslerin bazı meyve kalite özellikleri üzerine olan etkisinin araştırılması amacıyla yürütülmüştür. 2009 yılında Aydın (157) ve İzmir (136) illerinden 293 örnek, 2010 yılında ise Balıkesir ilinden 82 örnek olmak üzere, toplam 375 örnek alınmıştır. Ayrıca, bu üç ildeki fidanlıklardan her ilden 40 adet olmak üzere, toplam 120 adet fidan örneği alınmıştır.

Zeytin örneklerindeki viral etmenlerin tanılanması biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılmıştır. *Arabidopsis mosaic nepovirus* (ArMV), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV), *Cherry leafroll nepovirus* (CLRV) ve *Strawberry latent ringspot nepovirus* (SLRSV) virüslerine ait tanı kitleri kullanılarak, örnekler DAS-ELISA yöntemine göre testlenmiştir. Bu virüslere ek olarak, örneklerde *Olive latent-1 virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Olive latent-3 virus* (OLV-3), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) ve *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) adlı virüslerin varlığı RT-PCR ile araştırılmıştır.

2009 ve 2010 yıllarında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanarak testlenen toplam 375 bitki örneğinde % 55.73 oranında viral enfeksiyon olduğu belirlenmiştir. Aydın ilinde % 22.66, Balıkesir ilinde % 11.46 ve İzmir ilinde % 21.60 oranında viral enfeksiyon tespit edilmiştir. Toplam 375 örnekte DAS-ELISA testi sonucunda % 13 oranında virüs enfeksiyonu belirlenirken, RT-PCR sonucuna göre örneklerde % 56 oranında viral enfeksiyonu olduğu görülmüştür. DAS-ELISA

sonuçlarına göre; örneklerin % 12,80'inde ArMV ve sadece 1 örnekte ise SLRSV enfeksiyonu bulunduğu saptanmıştır. RT-PCR testi sonucunda, örneklerin % 22,93'ünde ArMV, % 9,60'ında CMV, % 10,66'sında CLRV ve % 9,06'sında SLRSV enfeksiyonlarının var olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, 9 örnekte CMV+ CLRV, 4 örnekte ise ArMV+CLRV karışık enfeksiyon şeklinde tespit edilmiştir.

Bazı meyve kalite özellikleri üzerine virüs enfeksiyonunun etkilerini incelemek amacıyla, SLRSV ile enfekteli ve enfekteli olmayan zeytin ağaçlarının bulunduğu bahçede denemeler kurulmuş ve karşılaştırma yapılmıştır. Bu denemelerde ağaç başına meyve verimi, meyve ağırlığı ve meyve hacmi (meyve eni+ meyve boy) gibi özellikler karşılaştırılmıştır. Pomolojik analiz sonuçlarına göre, ağaç başına meyve verimi, meyve ağırlığı ve meyve hacmi açısından enfekteli olmayan ve enfekteli ağaçlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur. Belirtilen özelliklere ilişkin değerlerin virüs ile enfekteli olan ağaçlarda daha düşük olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Zeytin, virüs, DAS-ELISA, RT-PCR, verim ve kalite

ABSTRACT**THE INVESTIGATION ON THE DETECTION OF VIRUS DISEASES IN
OLIVE TREES IN AYDIN, BALIKESIR AND IZMIR PROVINCES,
DETERMINATION OF THEIR PRESENT STATUS AND EFFECTS ON
SOME FRUIT QUALITY CHARACTERISTICS**

ERİLMEZ, Serpil

Ph. D. Thesis in Plant Protection

Supervisor: Prof.Dr. Semih ERKAN

December, 2012, 79 pages

The present study was carried out to determine the presence and prevalence of the viral agents in olive production areas of Aydın, Balıkesir and Izmir provinces and examine their effects on some fruit quality characteristics in 2009-2012. In 2009, totally 293 samples were collected from Aydın (157) and Izmir (136) provinces. In 2010, with collected 82 samples from Balıkesir, the total sample number in the research has reached to 375. In addition, totally 120 samples were collected from the nurseries in the aforementioned provinces as 40 for each of them.

To identify viral agents, the biological, serological and molecular methods were applied to collected olive samples. DAS-ELISA method was used to detect *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), *Cucumis mosaic cucumovirus* (CMV), *Cherry leafroll nepovirus* (CLRV) and *Strawberry latent ringspot nepovirus* (SLRSV). Also, the existence of *Olive latent-1 virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Olive latent-3 virus* (OLV-3), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) and *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) in collected samples was researched by RT-PCR molecular method.

The results from conducted tests showed that the incidence of virus infection was 55.73 % in total 375 olive samples from Aydın, Balıkesir and Izmir between the years of 2009 and 2010. Infection rate was 22.66 % in Aydın, 11.46

in Balıkesir and 21.60 % in Izmir. The findings of DAS-ELISA and RT-PCR assays indicated that the infection rates in total 375 samples were 13 % and 56 %, respectively. DAS-ELISA results showed that infection rate of ArMV was 12.8 % and only 1 sample was found to be infected with SLRSV. According to the data from RT-PCR tests, infection rates in all tested samples were 22.93 %, 9.6 %, 10.66 % and 9.06 % for ArMV, CMV, CLRV and SLRSV, respectively. Moreover, it has been detected that 9 samples had infection of CMV + CLRV and 4 samples contained ArMV + CLRV as mixed infections.

In order to examine the viral infection effects on certain fruit quality characteristics, SLRSV infected and non-infected olive trees were analyzed and compared with a trial which was performed in olive plantations. The characteristics such as fruit yield per tree, fruit weight and volume (fruit width + fruit length) were considered in the trial. According to the results of pomological analysis, it was found to be statistically significant differences between non-infected and infected orchards from the stand point of fruit yield per tree, fruit weight and volume. It was determined that the values of mentioned fruit properties were lower in virus- infected trees in comparison to non-infected trees.

Key words: Olive, virus, DAS-ELISA, RT-PCR, yield and quality

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanması sırasında her türlü desteğini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Semih ERKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Araştırmamın başından sonuna kadar tez izleme komitesi üyeleri olarak devamlı desteğini ve yardımını gördüğüm Sn. Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN'a ve Sn. Prof. Dr. Elmas ÖZEKER'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışmayı TAGEM-BS-06/04-04/02-09 no'lu proje olarak destekleyen T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne, ayrıca çalışmalarım süresince Bornova Zirai Mücadele Araştırma İstasyonu olanaklarından yararlanma fırsatı veren kurum müdürü ve yöneticilerine teşekkür ederim.

Projenin survey amaçlı yapılan arazi çalışmalarında yardımcı olan Aydın, Balıkesir ve İzmir Tarım İl ve İlçe Müdürlüklerinde çalışan ilgili teknik personele teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, bu çalışmayı sonuçlandırmamda katkısı olan tüm mesai arkadaşlarıma da içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Zeytin virüsleri konusunda bilgi ve deneyimlerini devamlı benimle paylaşan ve ayrıca pozitif kontrollerin temin edilmesine yardımcı olan İtalya'dan Dr. Francesco FAGGIOLI (Centro di Ricerca per La Patologia Vegetale, Roma-Italy)'ye gönülden teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımın çeşitli aşamalarında yardımlarını benden esirgemeyen Sn. Zir. Yük. Müh. Dilek POYRAZ'a, Sn. Zir. Yük. Müh. Murat APAYDIN'a ve Sn. Zir. Müh. İlhan BOZKURT'a teşekkür ederim. Manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme de çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ.....	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1 Araştırmada Kullanılan Materyal	17
3.1.1 Bitkisel örnekler.....	17
3.1.2 Test bitkileri	17
3.1.3 Serolojik testlerde kullanılan materyal	18
3.1.4 PCR testlerinde kullanılan materyal	18
3.1.5 Meyve verim ve kalite analizlerinde kullanılan materyal.....	20
3.1.6 Çalışmada kullanılan diğer materyal	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Survey yöntemi.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2 Fidan örneklerinin alınması ve muhafazası	23
3.2.3 Biyolojik testler	24
3.2.4 Serolojik test yöntemi (DAS-ELISA).....	25
3.2.5 Moleküler yöntemler	22
3.2.6 Meyve kalite analizleri	31
4. BULGULAR.....	33
4.1 Bitki Örneklerinde Gözlenen Belirtiler	33
4.2 Biyolojik Testlerin Sonuçları.....	33
4.3 Serolojik Testlerin Sonuçları	35
4.4 Moleküler Testlerin Sonuçları	37
4.4.1 Zeytin bahçelerinden toplanan örneklerin sonuçları	37
4.4.2 Fidanlıklardan alınan örneklerin sonuçları	42
4.5 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması	49
4.6 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi	50
4.7 Meyve Verim ve Kalite Analizlerine Ait Bulgular.....	52
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR DİZİNİ	69
ÖZGEÇMİŞ	79
EKLER	
Ek 1 TNA ekstraksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Akdeniz havzasında zeytin üretim alanlarının dağılımı (IOOC, 2012)	2
1.2 Türkiye’de bölgelere göre zeytin üretim oranları (TÜİK, 2010)	4
3.1 Tül sera içerisinde bulunan fidanlardan görünüm.....	23
3.2 İklim odasında yetiştirilen test bitkilerine ait görünüm	24
3.3 Zeytin örneklerine uygulanan DAS-ELISA testine ait görünüm	26
3.4 Yaprak ve sürgün örneklerine sıvı azot uygulanması	27
3.5 RT- PCR ürünlerinin elektroforez aşamaları a) PCR ürünlerinin agar jele yüklenmesi b) Jele konulan ürünlerin 100 V’da koşumu c) Ethidium bromide uygulaması d) Jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmesi.....	29
3.6 RT-PCR yönteminin şematik olarak gösterilmesi.....	31
3.7 Meyve kalite analizleri ile ilgili çalışmaların çeşitli aşamalarına ait bir görünüm	32
4.1 Survey çalışmaları sırasında zeytin ağaçlarında görülen bazı belirtiler A) Yapraklarda şekil bozulmaları ve orak yaprak oluşumu B) Yapraklarda renk değişikliği C) Yapraklarda mozaik D) Meyvelerde şekil bozukluğu	34
4.2 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde toplam örnek, virüs ile enfekteli ve sağlıklı örnek miktarı	37
4.3 Aydın ilinde RT-PCR yöntemine göre testlenen örneklerde virüslerin bulunma durumları	39
4.4 Balıkesir ilinde RT-PCR yöntemine göre testlenen örneklerde virüslerin bulunma durumu	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 İzmir ilinde RT-PCR yöntemine göre testlenen örneklerde virüslerin bulunma durumu	41
4.6 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde toplam örnek, virüs ile enfekteli ve sağlıklı örnek miktarı	42
4.7 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerindeki fidanlıklardan alınan örneklerde virüslerin bulunma durumu	44
4.8 Zeytin örneklerinden elde edilen nükleik asitlerin (TNA) jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1-12: Total nükleik asit izolasyonu yapılmış örnekler	44
4.9 CLRV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1,2,5,8,10: CLRV ile enfekteli pozitif örnekler N: Negatif kontrol; W: su kontrol.....	45
4.10 ArMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1,2,3,4,5,6,7:ArMV ile enfekteli pozitif örnekler; W: su kontrol	45
4.11 SLRSV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 2,9,10,11,14,16: SLRSV ile enfekteli pozitif örnekler; W: su kontrol	46
4.12 SLRSV etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak belirlenen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü L: 100bp DNA ladder; 1-12: örnekler; +: Pozitif kontrol.....	46
4.13 CMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 2,3,6,7,8: CMV ile enfekteli pozitif örnekler N: Negatif kontrol; W: su kontrol	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14 OLYaV etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak belirlenen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1-5: örnekler; +: Pozitif kontrol.....	47
4.15 OLV-1 etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak belirlenen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1-12: örnekler	48
4.16 OLRSV etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak belirlenen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü	48
4.17 OLV-2 etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak belirlenen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü	49
4.18 Zeytin örneklerinde DAS-ELISA yöntemine göre saptanan virüsler ve bulunma durumu	52
4.19 Zeytin örneklerinde RT-PCR yöntemine göre saptanan virüsler ve bulunma durumu	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Dünya zeytin üretimi ve zeytin üretim alanlarının ülkelere göre sıralaması (FAO, 2010).....	3
1.2 Türkiye’de bölgelere göre zeytin ağaç sayısı, oranı ve üretim miktarı değerleri (TÜİK, 2010)	3
1.3 Aydın, İzmir, Balıkesir illerinde zeytin ağaç sayısı ve üretim miktarları (TÜİK, 2010).....	4
1.4 Zeytin ağaçlarında saptanan virüsler, ilk kayıt ve coğrafik dağılımları	6
3.1 Biyolojik testlerde kullanılan test bitkileri ve kullanıldıkları dönemler	17
3.2 RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve sıcaklık döngüleri.....	19
3.3 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde zeytin ağacı sayısına göre örnekleme yapılan ilçeler	21
3.4 İzmir, Aydın ve Balıkesir illerinde ilçe bazında toplanan örnek sayısı	22
3.5 İzmir, Aydın ve Balıkesir illerinde fidanlıklardan alınan örnek sayıları.....	23
3.6 Zeytin sürgün ve fidan örneklerinde serolojik ve moleküler yöntemler ile testlenen viral etmenler	27
4.1 2009 yılında Aydın ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin bulunma durumu	35
4.2 2010 yılında Balıkesir ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin bulunma durumu	36
4.3 2009 yılında İzmir ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin bulunma durumu	36

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge	Sayfa
4.4	2009 yılında Aydın ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin RT-PCR yöntemine göre bulunma durumu 38
4.5	2010 yılında Balıkesir ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin RT-PCR yöntemine göre bulunma durumu 39
4.6	2009 yılında İzmir il ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin RT-PCR yöntemine göre bulunma durumu 40
4.7	2011 yılında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde fidanlıklardan alınan örneklerde RT-PCR yöntemine göre virüslerin bulunma durumu 43
4.8	Virüs tanılama yöntemlerinin karşılaştırılmalı sonuçları 50
4.9	Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden alınan zeytin örneklerinde kullanılan tanılama yöntemlerine göre enfekteli ve sağlıklı örnek sayıları 51
4.10	Zeytin örneklerinde DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemine göre belirlenen viral etmenler ve bulunma durumları 51
4.11	Meyve ağırlıklarına ait varyans analiz tablosu..... 53
4.12	Meyve hacmine ait varyans analiz tablosu..... 53
4.13	Virüs saptanan ve virüs saptanmayan ağaçlarda meyvelerin ağırlık, hacim ve verim olarak istatistiki analizi..... 53

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
g	Gram
bp	Base pair
pmol	Pikomol
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
U	Unite
V	Volt
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
Abs	Absorbans
ArMV	<i>Arabis mosaic nepovirus</i>
cDNA	Komplementer deoksiribonükleikasit
CLRV	<i>Cherry leafroll nepovirus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich – ELISA
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilen Diamino Tetra Asetik Asit (disodium salt)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Etanol
FAO	Food and Agriculture Organisation
HSP70	Heat Shock Protein 70
IOOC	International Olive Oil Council

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
M-MuLV	Moloney-Murine Leukemia virus
NaI	Sodium iodide
OLRSV	<i>Olive latent ringspot nepovirus</i>
OLV-1	<i>Olive latent virus 1</i>
OLV-2	<i>Olive latent virus 2</i>
OLV-3	<i>Olive latent virus 3</i>
OLYaV	<i>Olive leaf yellowing associated closterovirus</i>
OMMV	<i>Olive mild mosaic necrovirus</i>
OSLV	<i>Olive semilatifent virus</i>
OVYaV	<i>Olive vein yellowing associated potexvirus</i>
OYMDaV	<i>Olive yellow mottling and decline associated virus</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonükleikasit
RNAse	Ribonükleaz enzim
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase ChainReaction
SLRSV	<i>Strawberry latent ringspot sadwavirus</i>
TAE	Tris Asetik Asit
TMV	<i>Tobacco mosaic tobamovirus</i>
TNV-D	<i>Tobacco necrosis necrovirus D</i>
TNA	Total Nükleik Asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

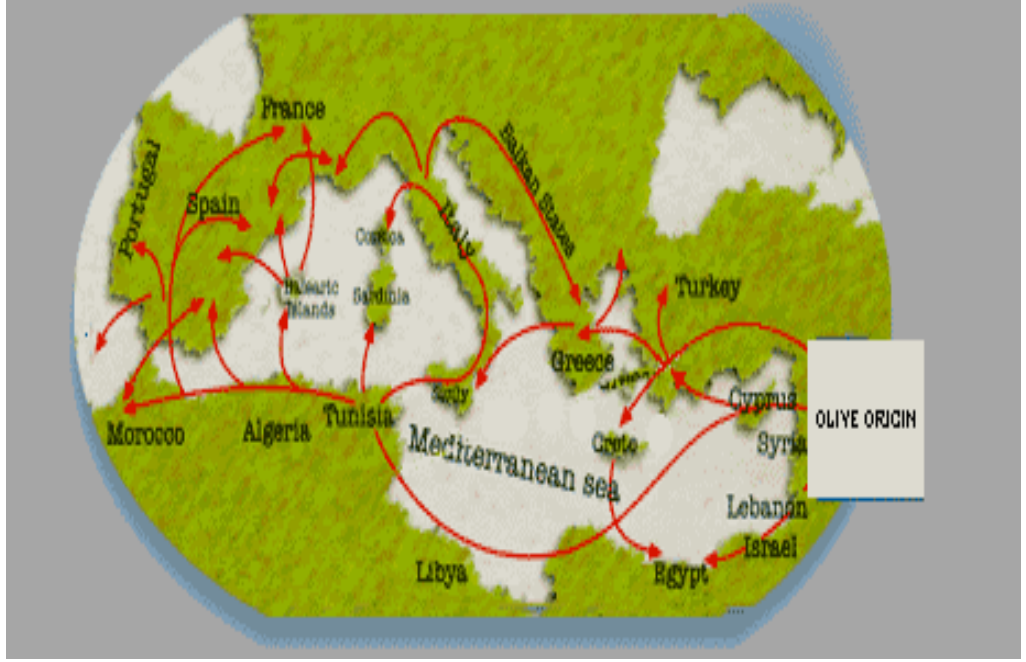
Dünya üzerindeki üretiminin büyük bir kısmı Akdeniz havzasındaki ülkelerde gerçekleştirilen zeytin, Türkiye ekonomisinde de önemli yeri olan bir meyve türüdür. Zeytin *Oleaceae* familyasında *Olea europaea* L. türünün *Olea europaea* subsp. *sativa* alt türü içinde yer almaktadır. Ülkemizde halen yetiştirilmekte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

Zeytin ve zeytinyağının insan beslenmesindeki değeri, ekonomik önemi ve mutfak kültüründeki geçmişi, 8.000 yıl gibi çok eski tarihlere dayanmaktadır (Öztürk, 2008). Son yıllarda “Akdeniz beslenme tarzı” veya “Akdeniz diyeti” kavramı, sağlıklı beslenme ve kalp hastalıkları yönünden özellikle ele alınan bir beslenme şeklidir. Bu beslenme tarzıyla, Yunanistan’ın bazı yörelerinde ve Güney İtalya gibi zeytin yetiştirilen bölgelerde görülen beslenme tarzı kastedilmektedir. Akdeniz beslenme tarzında, bol miktarda tüketilen zeytinyağının insan sağlığına olumlu etkileri çok fazladır (Demirci ve Bölükbaşı, 2003).

Derinlere uzayan kökleri sayesinde kalkerli, çakıllı, taşlı ve kurak topraklarda yetiştirilmeye elverişli olan zeytin ağacı için en verimli ortam yazları sıcak, kışları ise ılıman geçen iklimlerin bulunduğu alanlardır. Çünkü, zeytin ağacı ışığı, güneşi ve 15⁰C’nin üstündeki sıcaklıkları sever. Yıllık ortalama 220 mm düzeyindeki yağış, zeytin ağacının verimli bir şekilde büyümesi için yeterli olmaktadır. Zeytin ağacı genellikle rakımı düşük alanlarda yetişir. Ancak, denizden 1000 metre yükseklikte de zeytin tarımı yapılabilmektedir. Çalı görünümündeki zeytin ağacının yapraklarının üst yüzü koyu, alt yüzü ise gümüş rengindedir. Yapraklar mükemmel bir düzen içinde dalın iki tarafından karşılıklı olarak yer almaktadır. Ortalama 40-50 cm genişliğindeki gövde, çürümeye karşı çok dayanıklıdır. Ağaç yaşlanınca, yamrulardan gelişen yeni uçlar gövdeyi tazeler. Ortalama boyu 4-10 m olan zeytin ağacı, bir yıl bol, bir yıl az ürün verir. Çiçek verme mevsimi kuzey yarım kürede Nisan - Haziran ayları arasındadır. Yeşil zeytinler, Ağustos ayı sonundan Kasım ayı başına kadar olan süre içinde olgunlaşır (Bakırlıoğlu, 2006).

Tarımsal anlamda zeytinin ilk yetiştirilmeye başladığı yer, Suriye olarak kabul edilmektedir. Arkeolog ve paleo-botanikçilerin yapmış oldukları araştırmalar ve elde edilen bulgular, M.Ö. VI. yüzyılda Suriye’de tarımsal anlamda zeytin yetiştiriciliği yapıldığını göstermektedir. Bu konuda değişik

fikirler öne sürülse de, genel kabul gören düşünce ilk tarımsal zeytin üretiminin Suriye’de yapıldığı şeklindedir. Şekil 1.1’de görüldüğü gibi, Suriye sınırları içerisinde yetiştirilen zeytin, üç kol üzerinden dünyaya yayılmıştır. Irak ve İran üzerinden giden kol zamanla Pakistan ve Afganistan’a kadar uzanırken, ikinci kol Suriye ve Mısır üzerinden Akdeniz’e kıyısı olan ülkelere yayılmış ve en büyük üçüncü kol ise Batı Ege üzerinden Ege Adaları, Yunanistan, İtalya, Fransa üzerinden İspanya’ya ulaşarak, Avrupa üzerindeki ilerlemesini tamamlamıştır (IOOC, 2012).



Şekil 1.1 Akdeniz havzasında zeytin üretim alanlarının dağılımı (IOOC, 2012)

Zeytin, ekonomik olarak dünyanın her yerinde yetişmesi mümkün olmayan bir meyvedir. 30° – 40° enlemleri arasında, % 98’i kuzey yarım kürede olmak üzere dünyada 37 ülkede ekonomik anlamda zeytin üretimi yapılmaktadır. 9.4 milyon hektar dünya zeytin üretim alanının % 95’i kuzeyde Akdeniz bölgesinde yer almaktadır. 2010 yılı istatistiklerine göre yaklaşık 20,6 milyon ton olan dünya dane zeytin üretiminin % 98’i Akdeniz’e kıyısı olan İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Suriye, Fas, Portekiz, Fransa ve Cezayir gibi önemli üretici ülkelerden elde edilmektedir. Bu ülkeler üretim oranlarına göre sıralandığında, üretimin % 38’i İspanya, % 15’i İtalya, % 9’u Yunanistan, % 7’si Türkiye, % 5’i Suriye ve % 4’ü Tunus tarafından yapıldığı görülmektedir (FAOSTAT, 2010). Türkiye bu ülkeler içerisinde gerek üretim ve gerekse zeytin alanı bakımından genellikle 5. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Dünya zeytin üretimi ve zeytin üretim alanlarının ülkelere göre sıralaması (FAOSTAT, 2010).

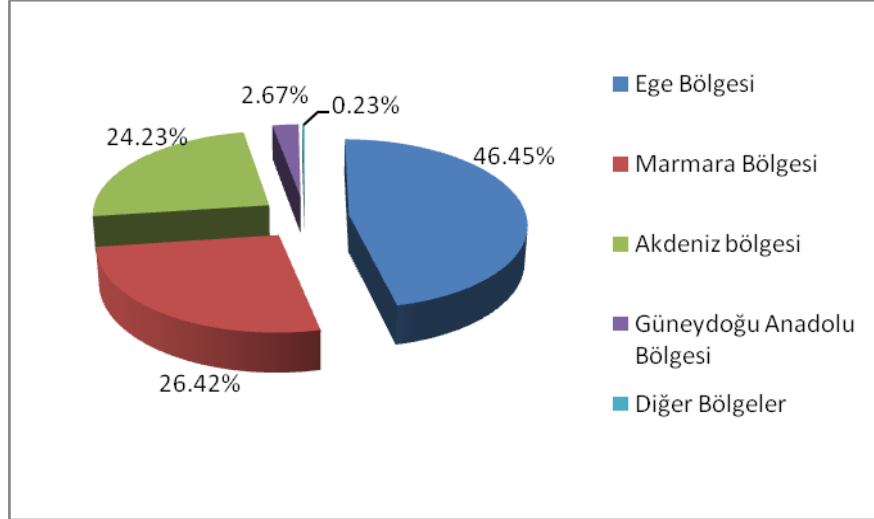
Ülkeler	Zeytin Üretimi (ton)	Ülkeler	Zeytin Alanı (ha)
İspanya	8.014.000	İspanya	2.092.800
İtalya	3.170.700	Tunus	1.645.100
Yunanistan	1.809.800	İtalya	1.190.800
Fas	1.483.510	Yunanistan	834.200
Türkiye	1.415.000	Türkiye	826.199
Suriye	960.400	Fas	735.400
Tunus	876.400	Suriye	647.500
Diğer Ülkeler	2.848.376	Diğer Ülkeler	1.426.624
Toplam	20.578.186	Toplam	9.398.623

2010 yılı istatistiklerine göre (TÜİK, 2010), Türkiye’de 159.473.907 adet zeytin ağacı mevcuttur. Bu ağaçların 115.569.647 adedi meyve veren yaşta, 43.904.260 adedi ise meyve vermeyen yaştadır. Bölgelerdeki ağaç sayısına bakılacak olursa, toplamın % 50,22’lik kısmı Ege Bölgesi’nde yer almaktadır. Ege Bölgesi’ni Akdeniz Bölgesi (% 25,50) ve Marmara Bölgesi (% 18,45) takip etmektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Türkiye’de bölgelere göre zeytin ağaç sayısı, oranı ve üretim miktarı değerleri (TÜİK, 2010)

Bölgeler	Ağaç Sayısı (Adet)			Ağaç Sayısına Göre Bölge Oranı(%)	Toplam Zeytin Üretimi (ton)
	Meyve Veren	Meyve Vermeyen	Toplam		
Ege	62.199.954	17.892.977	80.092.931	50.22	500.065.00
Akdeniz	21.795.654	18.863.437	40.659.091	25.50	260.850.00
Marmara	26.676.625	2.746.265	29.422.890	18.45	284.458.00
Güneydoğu	4.644.054	4.292.827	8.936.881	5.60	28.720.00
Karadeniz	227.37	39.465	266.835	0.17	2.297.90
Diğer	25.99	69.289	95.279	0.06	211.00
Toplam	115.569.647	43.904.260	159.473.907	100.00	1.076.601.90

2010 yılı istatistiklerine göre, Türkiye’de 1.076.601 ton zeytin üretilmekte üretimin % 46.45’i Ege Bölgesi’nde, % 26.42’si Marmara Bölgesi’nde, % 24.23’ü Akdeniz Bölgesi’nde, % 2.67’si Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde ve % 0.23’ü ise diğer bölgelerde gerçekleştirilmektedir (Şekil 1. 2).



Şekil 1.2 Türkiye’de bölgelere göre zeytin üretim oranları (TÜİK, 2010)

Aydın, İzmir ve Balıkesir illeri arasında 2010 yılı verilerine göre (TÜİK, 2010) en fazla ağaç sayısı 23.616.070 ile Aydın ilinde yer alırken bunu 18.346.660 ile İzmir ili takip etmektedir. Ağaç sayısı olarak 11.353.617 ile Balıkesir ili son sırada yer alırken, verime bakıldığında bu il İzmir ilinden sonra 2. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3 Aydın, İzmir, Balıkesir illerinde zeytin ağaç sayısı ve üretim miktarları (TÜİK, 2010)

İller	Ağaç Sayısı (Adet)		Toplam	Toplam Zeytin Üretimi(ton)
	Meyve Veren	Meyve Vermeyen		
Aydın	21.077.358	2.538.712	23.616.070	122.455
İzmir	14.966.950	3.379.710	18.346.660	183.125
Balıkesir	10.706.622	646.995	11.353.617	130.549

Zeytin ülkemizde yaklaşık 400.000 ailenin önemli gelir kaynağını oluşturmaktadır. Özellikle kıraç ve sulanmayan eğimli alanlarda, gerek erozyonun önlenmesinde ve gerekse diğer alternatif bitkilere göre oransal olarak ekonomik avantajı bakımından vazgeçilmez konumdadır. Bunun yanı sıra, zeytin son yıllarda bazı bölgelerde sulanabilir taban ve kır taban arazilerde de yoğun girdi kullanılan ileri tarım uygulamaları yoluyla, diğer ürünlerle rekabet edebilir düzeye ulaşmıştır.

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

Türkiye ekonomisinde önemli bir yere sahip olan zeytinin ürün verimine, kalitesine ve ömrünün uzunluğuna etki eden önemli faktörlerden birisi de hastalıklar ve zararlılardır. Ülkemizde birçok yerli zeytin çeşitlerinin çok eski çağlardan beri yetiştirilmesi ve ülkemizin bu bitki için gen kaynağı merkezi konumunda olması bu bitkideki özellikle virüs hastalıklarının incelenmesini önemli kılmaktadır. Virüs, viroid ve fitoplazma gibi etmenlerin yol açtığı hastalıklar ağaçların zayıflamasına ve ölümüne, ürünün kalite ve miktarının düşmesine, aşı tutma ve köklenme oranında azalmaya neden olabilmektedir (Candresse et al., 1995). Zeytinlerde bugüne kadar saptanan çok sayıda viral etmen ticari çeşitlerde genellikle gözle görülebilir belirtiler oluşturmamakta, ancak bu bitkiler üretim alanları için enfeksiyon kaynağı olarak önem taşımaktadırlar.

Zeytinde olası virüs hastalıklarına ilişkin ilk rapor, 1938 yılı gibi eski tarihlere kadar gitmektedir (Pesante, 1938). O yıllardan günümüze kadar zeytin ağacının 9 cinse ait 15 virüse konukçuluk ettiği ve değişik ülkelerde bulunduğu ortaya konulmuş ve bu virüslere yönelik bilgiler Çizelge 1.4'te verilmiştir.

Çizelge 1.4 Zeytin ağaçlarında saptanan virüsler, ilk kayıtları ve coğrafik dağılımları

Virüs Adı	Cins	İlk Kayıt	Coğrafik Dağılım
Strawberry latent ring spot virus (SLRSV)	Sadwavirus	İtalya Savino et al., (1979)	İtalya, Portekiz, İspanya, Mısır, Türkiye , A.B.D.
Arabis mosaic virus (ArMV)	Nepovirus	İtalya Savino et al., (1979)	İtalya, Portekiz, Mısır, Türkiye , A.B.D.
Cherry leaf roll virus (CLRV)	Nepovirus	İtalya Savino and Gallitelli, (1981)	İtalya, Portekiz, İspanya, Mısır, Lübnan, Türkiye , A.B.D.
Olive latent ring spot virus (OLRSV)	Nepovirus	İtalya Savino et al., (1983)	İtalya, Portekiz
Cucumber mosaic virus (CMV)	Cucumovirus	İtalya Savino and Gallitelli, (1983)	İtalya, Portekiz, İspanya, Türkiye , A.B.D.
Olive latent virus 1 (OLV-1)	Necrovirus	İtalya Savino et al., (1983)	İtalya, Ürdün, Türkiye , Mısır, Lübnan, A.B.D.
Olive latent virus 2 (OLV-2)	Oleavirus	İtalya Savino et al., (1984)	İtalya
Olive vein yellowing associated virus (OVYaV)	Potexvirus	İtalya Faggioli and Barba, (1995)	İtalya
Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV)	Undetermined	İtalya Savino et al., (1996)	İtalya
Tobacco mosaic virus (TMV)	Tobamovirus	İtalya Triolo et al., (1996)	İtalya
Olive semilaten virus (OSLV)	Undetermined	İtalya Materazzi et al., (1996)	İtalya
Olive leaf yellowing associated virus (OLYaV)	Closterovirus	İtalya Sabanadzovic et al., (1999)	İtalya, İsrail, Mısır, Lübnan, A.B.D.
Tobacco necrosis virus (TNV)	Necrovirus	Portekiz Félix and Clara, (2002).	Portekiz
Olive mild mosaic virus (OMMV)	Necrovirus	Portekiz Cardosa et al., (2004).	Portekiz
Olive latent virus 3 (OLV-3)	Tymovirus	İtalya Alabdullah et al., (2009).	İtalya, Suriye, Malta, Tunus, Portekiz, Türkiye , Lübnan, Yunanistan

Çizelge 1.4 incelendiğinde, zeytin ağaçlarındaki virüslerin enfeksiyonlarının büyük bir kısmının, ilk kez İtalya'da ortaya çıkarıldığı ve bu virüslerin genelde

Akdeniz bölgesindeki ülkelerde bulunduğu göze çarpmaktadır.

Zeytin virüsleri ağaçlarda çoğu kez belirti vermeksizin latent olarak bulduklarından, simptomla teşhis yapmak çoğunlukla yanıltıcı olmaktadır. CMV, TMV ve TNV gibi virüsler geniş bir konukçu dizisine sahiptir ve zeytinde simptom oluşturmadan bulunmaktadır. SLRSV, ArMV ve CLRV adlı virüsler ise polifag, olup bunlar arasında özellikle SLRSV, zeytinde önemli verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Zeytin ön ismi ile isimlendirilen OLRSV, OLV-2, OLYaV, OSLV ve OVYaV sadece zeytinde saptanmış olup OLV-1 virüsü Türkiye ve İtalya'da turuncgil, Japonya'da ise lale bitkilerinden izole edilmiştir (Martelli et al., 1996; Kanematsu et al., 2001).

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

Son yıllarda DAS-ELISA yönteminin zeytin virüslerinin rutin ve duyarlı teşhislerinde, ağaçtaki virüs konsantrasyonunun çok düşük olması ve zeytindeki inhibitör maddelerin yoğunluğu sebebiyle uygun bir teknik olmadığı pek çok çalışmada belirtilmiş ve zeytin virüslerinin teşhis çalışmalarının moleküler tekniklerle desteklenmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Bu çalışma ile İzmir, Aydın ve Balıkesir illerindeki zeytin ağaçlarında enfeksiyon oluşturan ve sertifikasyon programlarında testlenmesi öngörülen SLRSV, ArMV, CLRV, CMV, OLRSV, OLV-1, OLV-2 ve OLYaV adlı virüslerin biyolojik ve serolojik yöntemlerin yanı sıra, daha duyarlı ve güvenilir yöntemlerden RT-PCR ile saptanması, bulunma oranlarının daha sağlıklı olarak tespiti ve virüs ile enfekteli zeytin ağaçlarının meyve verim ve kalitesi ile ilişkili analizlerin (ağaç başına meyve verimi, meyve ağırlığı, meyve boyu, meyve eni) yapılarak, bu virüslerin ülkemiz zeytin yetiştiriciliğinde neden olabileceği ekonomik kayıplara yönelik bulguların ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Bu araştırma ile ilgili önceki yıllarda dünyada ve ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalar; zeytin ağaçlarında bulunan viral etmenler konusunda yürütülen araştırmalar, viral etmenlerin zeytin ağaçlarındaki semptomları ve taşınma şekilleri konusunda yapılan çalışmalar ve zeytin ağaçlarındaki viral etmenleri tanılamada yararlanılan yöntemler konusunda gerçekleştirilen araştırmalar belli bir sıralamaya göre ele alınmıştır.

Zeytin ağaçları birçok virüs ve virüs benzeri etmeden etkilenmektedir. Dünyada bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda, zeytin ağaçlarının 9 cinse ait 15 farklı virüse konukçuluk ettiği saptanmıştır (Grieco et al., 2002a). Zeytinde saptanan virüsler arasında; *Strawberry latent ringspot sadwavirus* (SLRSV, çilek latent halkalı leke virüsü), *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV, arabis mozaik virüsü), *Cherry leaf roll nepovirus* (CLRV, kiraz yaprak kıvrılma virüsü), *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV, hıyar mozaik virüsü), *Olive latent ringspot nepovirus* (OLRSV, zeytin latent halkalı leke virüsü), *Olive latent-1 necrovirus* (OLV-1, zeytin latent-1 virüsü), *Olive latent-2 oleavirus* (OLV-2, zeytin latent-2 virüsü), *Olive vein yellowing-associated potyvirus* (OVYaV, zeytin damar sararması ile ilişkili virüs), *Olive yellow mottling and decline associated virus* (OYMDaV, zeytin sarı beneklenme ve geriye doğru ölümle ilişkili virüs), *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV, tütün mozaik virüsü), *Olive semilatif virus* (OSLV, zeytin yarı latent virüs), *Olive leaf yellowing-associated closterovirus* (OLYaV, zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs), *Tobacco necrosis necrovirus-D* (TNV-D, tütün nekroz virüsü), *Olive mild mosaic necrovirus* (OMMV, zeytin ılımlı mozaik virüs) ve *Olive latent-3 tymovirus* (OLV-3, zeytin latent-3 virüsü) bulunmaktadır (Martelli, 1999; Cardoso et al., 2005; Felix and Clara, 2006; Alabdullah et al., 2009).

Zeytin ağaçlarında saptanan virüslerden TNV ve OMMV dışında kalan bütün virüslerin, ilk kayıt edildiği ülke İtalya'dır. Martelli et al. (1995) tarafından Ürdün'de yapılan çalışmada OLV-1'in varlığı saptanmıştır. Yapılan bu çalışmayla zeytinde, İtalya dışındaki bir ülkede OLV-1'in varlığı ilk kez ortaya konmuştur.

Zeytin virüsleri bitkide çoğu kez latent olarak bulunduğu için yalnızca simptomlara bakarak teşhis yapmak yanıltıcı olabilmektedir. CMV ve TMV gibi virüslerin konukçu dizileri çok geniştir ve zeytinde latent olarak bulunmaktadırlar. OLRV, OLV-2, OYVaV, OSLV ve OLYaV gibi virüsler konukçuya spesifik olarak saptanmakla birlikte, son zamanlarda OLV-1 Türkiye ve İtalya’da turunçgil ve lale bitkilerinden izole edilmiştir (Martelli et al., 1996; Kanematsu et al., 2001).

Polonya’da yapılan çalışmada ise, yapraklarında nekrotik lekeler bulunan domates bitkileri RT-PCR yöntemine göre testlenmiş ve domateste yeni bir OLV-1 izolatu saptanmıştır. Biyolojik ve genetik özellikleri ile Polonya CM1 ırkının diğer OLV-1 ırkından farklı olduğu belirtilmiş ve domateste OLV-1’in varlığı ilk kez ortaya konmuştur (Borodynko et al., 2010).

Zeytinde saptanan virüslerden SLRSV’nün küçük, armut şekilli buruşuk meyve oluşumuna, çekirdeklerde şekil bozukluklarına (tümsekli meyve) neden olup, yapraklarda daralma ve bükülmeye, boğum aralarında kısalmaya, sürgünlerde çalimsı büyümeye ve üründe azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Marte et al., 1986). Ayrıca, yaprak sararması kompleksi olarak adlandırılan hastalık “damar sararması” (Faggioli and Barba, 1995), “yaprak sararması” ve “yaprak beneklemesi ve geriye doğru ölüm” (Savino et al., 1996) olarak adlandırılan 3 farklı hastalık tarafından oluşturulmaktadır. Bu hastalık kompleksini karakterize eden özellikler zayıf meyve oluşumu ve yaprakların parlak sarı renkte oluşudur. Yaprak beneklenmesi ve geriye doğru ölüm olduğunda ise yaprakların nekrozlaşması ve yaygın yaprak dökülmesi sonucunda geriye doğru ölüm görülür. OYVaV damar sararması, OYMDaV ise yaprak beneklemesi ve geriye doğru ölüm gösteren bitkilerde tespit edilmiştir. Yaprak sararması simptomsu gösteren bitkilerden virüs izole edilememiştir, ancak aynı çeşidin sağlıklı bitkilerine yapılan aşılama sonucunda, yeniden aynı simptomlar elde edilmiştir.

Zeytin virüslerinin epidemiyolojisi hakkında çok fazla bilgi mevcut değildir. Dört virüsün toprak kaynaklı virüs olduğu ve bunlarında iki tanesinin (SLRSV ve ArMV) nematodla, diğer ikisinin ise (OLV-1 ve TMV) doğrudan bitkilerin birbirine teması ile bir bitkiden diğerine taşındığı bilinmektedir. Ancak, doğa

koşullarında zeytinde bu tip taşınma mekanizmasının nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir. Diğer konukçularında yaprak bitleri ile taşınan CMV'nin polenle taşınan CLRV'nün zeytinlerdeki epidemiyolojik davranışları da kesin olarak ortaya konulmamıştır (Martelli, 1999).

CLRV ve OLV-1'in zeytinde tohumla taşınması konusunda yapılan bir çalışmada, OLV-1'in 50 tohumun 41'inde (%82), CLRV'nün ise 50 tohumun 45'inde (%90) taşındığı belirlenmiş ve etmenlerin tohumun integumentlerinde ve internal dokularında taşındığını bildirmişlerdir (Saponari et al., 2002).

İtalya (Calabria ve Sicilya)'da Albanese et al. (2003), tek aşamalı RT-PCR çalışmaları ile *Euphyllura olivina* ve türü tam teşhis edilemeyen *Pseudococcus* cinsinde OLYaV'nün RNA dizilimini bulmuşlardır. Araştırmalar vektörler dışında bu virüsün tohumla, köklerin teması ve aşıyla da taşındığını ortaya koymuştur.

Bitki virüslerinin tanılanmasında, birden fazla yöntemden yararlanmak gerekmektedir. Birden çok yöntemi kullanarak virüslerin tanılanmasını yapmanın daha doğru sonuçlar elde edilmesine imkan sağladığı açıklanmaktadır (Valverde et al., 1990).

Simptomatoloji hastalıkların teşhisinde önemli aşamalardan birisidir. Belirtiler hastalık etmenin orijini hakkında bilgi vermesinin yanında, diğer teşhis teknikleri için de bir basamak oluşturmaktadır. Zeytin ağaçlarında simptom(lar)a bakarak teşhise gitmek bazen yanıltıcı olabilmektedir. Çünkü, zeytin ağaçlarında doğal virüs enfeksiyonlarının çoğu belirti vermemektedir. SLRSV bazı çeşitlerde (cv. Ascolana tenera) çok belirgin simptom verirken, aynı virüs belirtisiz ağaçlardan alınan örneklerde de saptanmıştır (Savino et al., 1979; Marte et al., 1986). ArMV orak yaprak şeklindeki belirti gösteren zayıf gelişmesi olan ağaçlardan saptanırken, aynı zamanda hiçbir simptom vermeyen ağaçlarda da belirlenmiştir. CLRV (Savino and Gallitelli, 1981) ve CMV (Savino and Gallitelli, 1983) enfeksiyonları görünüşte tamamen simptomsuz ağaçlardan tespit edilirken, TMV (cv. Leccino çeşidinde) damar bantlaşması ve çökme belirtisi gösteren ağaçlardan saptanmıştır (Triolo et al., 1996). Bu durum göz önüne

alındığında, zeytin virüslerinin teşhisinde doğa koşullarında oluşan belirtiler pek kullanılmamaktadır.

Zeytin virüslerinin teşhisi için otsu test bitkilerine mekanik inokulasyon yapılması Savino and Gallitelli (1981) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, otsu test bitkilerinde oluşan belirtilerin nekroz, mozaik ve halka lekeler şeklinde olduğunu gözlemiştir. Konukçu test bitkilerinde oluşan en önemli belirtiler; mozaik, nekrozlar ve halka lekelerdir (Savino and Gallitelli, 1981; Merciega et al., 1996). Buna karşın, Martelli (1999) otsu test bitkilerine yapılan mekanik inokulasyonun duyarlılığının düşük olduğunu belirtmektedir. Aynı araştırmacı, birçok odunsu bitkide bulunan virüsleri teşhis etmede yararlanılan odunsu test bitkilerinin henüz zeytin virüsleri için ayırt edici türlerin mevcut olmaması nedeniyle kullanılmasının mümkün olmadığını açıklamaktadır.

ELISA testininin zeytin virüslerinin teşhisinde kullanılması tartışmalıdır. SLRSV, ArMV, CLRV ve CMV DAS-ELISA yöntemi ile Portekiz ((Henriques et al., 1992; Rei et al., 1993; Felix et al., 2002) ve İspanya'da (Bertolini et al., 1998) başarılı bir şekilde teşhis edilmiştir. Portekiz'de zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı 25 farklı alandan toplanan 222 örnek, DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiş ve bu örneklerin % 10'u CMV ile enfekteli bulunmuş ve bazı örneklerde ise SLRSV olduğu tespit edilmiştir. Bu şekilde DAS-ELISA yöntemi, zeytin ağaçlarında SLRSV ve CMV adlı virüsleri teşhis etmede kullanılmıştır (Rei et al., 1993). Martelli (1999) tarafından İtalya'da yapılan çalışmada SLRSV, ArMV, CMV ve CLRV adlı etmenlerin tanılanmasında DAS-ELISA testinden sonuç elde edilememiştir. Triolo et al., (1996) zeytin dokularından kısmen saflaştırılmış ekstraktlarda, TMV'nü DAS-ELISA ile ortaya koymuşlar ancak DAS-ELISA tekniğinin zeytin virüslerinin rutin ve hassas teşhislerinde virüs konsantrasyonu çok düşük olduğu için, uygun bir teknik olmadığını belirtmişlerdir.

İtalya'da başlatılan sertifikasyon sisteminde, zeytin bitkisinde virüslerin saptanmasında nükleik asit temelli tekniklerin mutlaka kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Saponari and Savino, 2003).

Zeytin virüslerinin teşhisinde, biyolojik ve serolojik yöntemlerden daha duyarlı ve güvenilir olan moleküler tekniklerin kullanılması gerekmektedir. Bu moleküler teknikler dsRNA analizi, digoxigen işaretli probalar ile dot-blot hibridizasyon ve Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (tek aşamalı ve iki aşamalı RT-PCR, nested RT-PCR) yöntemleridir (Grieco et al., 2000).

ELISA yönteminin yanı sıra, dsRNA analizleri ve moleküler hibridizasyon yöntemleride, zeytin virüslerinin teşhisinde alternatif metotlar olarak önerilmiştir (Martelli et al., 1995; Grieco et al., 2000). dsRNA'lerin genç sürgünlerin kabuklarından yapılan kazıma şeklindeki preparasyonlarından kolaylıkla ekstrakte edilebildiği (Grieco et al., 2000) ve bunların enfeksiyon için iyi marker oldukları, ancak band örneklerinin tek tek virüslerin teşhisi için kolaylıkla kullanılmadığı belirlenmiştir (Martelli et al., 1995; Sabanadzovic et al., 1999).

Moleküler hibridizasyon (dot-blot) yöntemi, zeytin virüslerinin teşhisinde güvenilir ve duyarlı metot olarak önerilmiştir (Grieco et al., 2000). Yöntemin güvenilir olmakla birlikte DAS-ELISA yönteminde olduğu gibi, viral RNA konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle uygulanmasının zor olduğu bildirilmiştir.

Moleküler hibridizasyon yönteminde de hedef virüs RNA konsantrasyonunun düşük olması durumunda DAS-ELISA yönteminde olduğu gibi benzer zorluklarla karşılaşılacağı ancak bazı virüsler için kullanılabileceği açıklanmaktadır (Martelli, 1999). Virüse özgül probalar ile denatüre dsRNA'nın hibridizasyonu zeytini enfekte eden virüslerin moleküler tanımlanmasında mevcut yöntemler arasında güvenilir olarak kabul edilebilmektedir (Grieco et al. 1992; 2000).

Akdeniz havzasında zeytin virüslerinin saptanmasına yönelik yapılan çalışmada 10 ülkeden (İtalya, Yunanistan, Arnavutluk, Mısır, Lübnan, İspanya, Filistin, Malta, Tunus ve Kıbrıs) 83 lokasyondan toplam 527 örnek toplanmış ve moleküler hibridizasyon testi sonucunda örneklerde ArMV, CLRV, SLRV, OLYaV ve OLV-1'in bulunduğu saptanmıştır (Saponari et al., 2002).

RT-PCR zeytin virüslerinin tespit edilmesinde en yaygın kullanılan teşhis metotlarından biridir. RT-PCR ile DNA'nın belirli bölümlerinin DNA polimeraz enzimi ve sentetik oligonükleotitler yardımı ile çok sayıda kopyası oluşturulmaktadır (Kreuzer and Massey, 1996). Zeytinde bulunan sekiz virüsün genomik dizisi üzerinden özgül primer çiftleri OLRV (Alkowni et al., 2001), OLV-1 (Grieco et al., 1996), OLV-2 (Grieco et al., 1995) ve OLYaV (Sabanadzovic et al., 1999) Bari Üniversitesi'nde (İtalya) dizayn edilmiştir. Bu primer çiftleri başarılı bir şekilde RT-PCR testlerinde kullanılmaktadır.

Suriye'de ds-RNA ve RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan sorvey çalışmasında 80 bahçe dolaşmış ve toplam 300 örnek SLRSV, ArMV, OLRV, CMV, OLYaV, OLV-1, OLV-2 adlı virüslerin varlığı için testlenmiştir. Testlenen örneklerin % 51'inin bir veya birden fazla virüs ile enfekteli olduğu tesbit edilmiştir. CMV (% 22.7) en fazla saptanan virüs olurken, bunu sırasıyla CLRV (% 15), OLYaV (% 14.3) ve OLRV (% 11.5) takip etmiştir (Alabdullah et al., 2005).

Akdeniz Bölgesi'nde 8 ülkeyi (İtalya, Suriye, Malta, Tunus, Portekiz, Türkiye, Lübnan ve Yunanistan) kapsayan çalışmada RT-PCR ve dot blot hibridizasyon yöntemleri kullanılarak Olive latent-3 virus'un varlığına bakılmıştır. 8 Akdeniz ülkesinden örnekler alınmış ve yapılan analizler sonucunda, bu ülkelerin tümünde farklı oranlarda OLV-3 enfeksiyonu tespit edilmiştir. En yüksek enfeksiyon oranı Türkiye (% 56), Yunanistan (% 42), Tunus (% 40) ve İtalya (% 30)'da saptanmıştır (Alabdullah et al., 2009).

İtalya'da reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-n-PCR) geliştirilmiş ve doğal olarak enfekte olmuş zeytinlerden alınan çeliklerde ArMV, CLRV, OLV-1, OLV-2, OLRV ve SLRV adlı etmenlerin saptanmasında kullanılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda nested RT-PCR yönteminin klasik RT-PCR yöntemine göre daha hassas ve güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır (Pantaleo et al., 2001).

Lübnan'da zeytin virüslerinin dağılımı ve varlığı konusunda RT-PCR yöntemiyle yapılan bir çalışmada, bitkiler OLYaV (% 23.7), OLV-1 (% 8.3),

CLRV (% 2), ArMV (% 0.3) ve SLRV (% 0.3) oranlarında enfekteli bulunmuştur (Fadel et al., 2005).

Faggioli et al.(2005), zeytinde yaygın olarak bulunan sekiz virüsün (ArMV, CLRV, CMV, OLYaV, OLRSV, OLV-1, OLV-2 ve SLRSV) tanı ve teşhisini yapmak amacıyla tek aşamalı RT-PCR tekniğini kullanmışlardır. İtalya'da zeytin alanlarından topladıkları 345 örneğin % 32.8'ini enfekteli olarak bulmuşlardır. Bu örneklerden % 20.9'unun OLYaV, % 7.8'inin SLRSV ve % 4.9'unun CLRV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. İtalya'nın güneyinde en yaygın virüs olarak OLYaV'nü saptamışlardır.

Portekiz'de OLV-1'in turunçgil ve lalelerden elde edilen izolatlarla benzerliklerini saptamak amacıyla yapılan karakterizasyon çalışmasında OLV-1'in turunçgil izolatu ile % 95 oranında benzerlik gösterdiğini ortaya konmuştur. Ayrıca, OLV-1'in rutin ve hassas teşhisinde PCR ve dot blot hibridizasyon tekniklerinin güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Felix et al., 2007).

Arnavutluk'un en önemli zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlardan alınan 50 örnek ArMV, CLRV, SLRSV, OLV-1, OLYaV, CMV, OLV-2 ve TNV-D'ne karşı spesifik primerler kullanılarak tek aşamalı RT-PCR yöntemi ile testlenmiş ve sonuçta, örneklerde SLRSV ve OLYaV dışındaki virüsler saptanamamıştır (Luigi et al., 2009).

Tunus'ta ana damızlık parsellerden 19 farklı çeşitten toplanan 175 zeytin örneği, RT-PCR yöntemi ile ArMV, CLRV, CMV, OLRSV, OLV-1, OLV-2, OLYaV ve SLRSV spesifik primerleri kullanılarak testlenmiştir. PCR sonucu negatif çıkan örneklere, dsRNA ve mekanik inokulasyon testleri uygulanmıştır. RT-PCR sonucunda, ağaçların % 86' sının en az bir virüs ile enfekteli olduğu bulunmuştur. PCR sonucu negatif çıkan 24 örneğin 3 tanesinde, dsRNA analizi sonucunda bant elde edilmiştir. Örneklerde en yüksek oranda OLYaV (%49.1) bulunduğu saptanırken, bunu sırasıyla OLV-1 (% 34.3), CMV (% 25.7), OLRSV (% 16.6), CLRV (% 13.1), SLRSV (% 7.4) ve OLV-2 (% 6.9) enfeksiyonları izlemiştir (El Air et al., 2010).

Mısır'da, tek aşamalı RT-PCR yöntemi ile zeytinde yaygın olarak bulunan sekiz virüs hastalığının (CMV, OLRV, OLV-1, OLV-2, OLYaV, SLRSV, CLRV ve ArMV) varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Toplanan 300 örnek RT-PCR yöntemine göre analiz edilmiş ve en yüksek oranda CMV (% 24.7) saptanmıştır. Bu virüsü sırasıyla OLRV (% 6.7), OLV-1 (% 5.7), CLRV (% 4.7), OLV-2 (% 2.7), SLRSV (% 2.3), OLYaV (% 1.3) ve ArMV (% 0.7) izlemiştir (Youssef et al., 2010).

İtalya'da tek aşamalı RT-PCR yöntemi ve farklı primer setleri kullanılarak, 9 laboratuarda laboratuvarlar arası uyum testi yapılmıştır. Her laboratuarda aynı örnekler, aynı primer setleri ve aynı ekstraksiyon metotları kullanılarak, zeytin virüslerinin teşhis metotları oturtulmaya çalışılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda, zeytin virüslerinin rutin ve hassas teşhisinde tek aşamalı RT-PCR yönteminin kolaylıkla kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. Ayrıca, tek aşamalı RT-PCR protokolü ilk kez TNV ve OMMV için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Laconsole et al., 2010).

Hırvatistan'da yerel koleksiyon bahçelerinden belirtili ve belirti göstermeyen ağaçlardan alınan 25 örnek, RT-PCR yöntemine göre testlenmiştir. OLYaV, CLRV, SLRSV, ArMV, OLV-1, CMV, OLV-2 ve TNV-D'ye karşı testlenmiş ve 25 örneğin 6 tanesi CLRV ile enfekteli bulunmuştur. Enfekteli bitkilerin hepsinin meyvelerinde deformasyonlar, yapraklarında ise deformasyonlar ve sararmaların olduğu bildirilmiştir (Luigi et al., 2011).

Faggioli et al. (2002), İtalya'da zeytin ağaçlarının yapraklarında SLRSV'nün teşhisi için, tek aşamalı RT-PCR protokolünü geliştirmişler ve tek aşamalı RT-PCR protokolünün çok hızlı ve hassas olduğunu ve zeytin ağaçlarında çok fazla örnekteki SLRSV'nün teşhisi için kullanılabilirliğini belirlemişlerdir. İspanya'da Bertolini et al.(2001), zeytin ağaçlarında yaptıkları multiplex RT-PCR çalışmaları ile CMV, CLRV, SLRSV, ArMV, OLV-1 ve OLV-2 adlı virüsleri tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda, bu yöntemin sertifikasyon programlarında rutin olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuşlardır. Zeytin virüslerinin teşhisinde alternatif metot olarak ELISA yönteminin yanı sıra, dsRNA analizleri ve moleküler hibridizasyon yöntemleri de önerilmiştir. Ayrıca,

ilkbaharda toplanan örneklerin sonbaharda toplanan örneklerle göre daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir (Grieco et al., 2000).

Hırvatistan'da Frantoio ve Ascolana tenera çeşitlerinden elde edilen sızma zeytinyağının kalitesine, miktarına ve kimyasal özelliklerine CLRV'nün etkisini saptamak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. CLRV ile enfekteli zeytinlerde, sağlıklı olanlara göre yağ miktarı ve olgunluk indeksi oldukça düşük çıkmıştır. Enfekteli ağaçların meyvelerinden elde edilen yağın K_{232} ve K_{270} değerleri düşük, toplam fenolik bileşik içeriğinin ise çok yüksek olduğu bildirilmiştir (Godena et al., 2012).

Zeytin ağaçlarındaki virüslerin saptanması amacıyla Türkiye'de de birçok araştırma yapılmıştır. Ülkemizde Ege Bölgesi'nde Balıkesir, Çanakkale, İzmir ve Manisa illerindeki zeytin ağaçlarında DAS-ELISA testi sonucunda ArMV, CLRV, SLRSV ve CMV enfeksiyonlarının olduğu saptanmıştır (Fidan ve Ertem, 1995). Tarla ve Çağlayan (1998), tarafından Hatay ilinde yürütülen çalışma ile bu yörede yetiştirilen zeytin ağaçlarının DAS-ELISA yöntemine göre % 47.7 oranında SLRV, % 46.1 oranında CLRV ve % 32.2 oranında ise ArMV ile enfekteli olduğu saptanmış ve ağaçlarda OLRSV, OLV-1 ile OLV-2'ye rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışma sonuçları, daha sonra Türkiye'de zeytin ağaçlarında saptanan virüsler olarak dünya literatürüne ilk kayıt olarak aktarılmıştır (Çağlayan ve ark., 2004). Başka bir çalışma ise, Balıkesir, Bursa ve Aydın illerinde yürütülmüştür. Yine bu illerden toplanan örneklerden DAS-ELISA testi sonucunda CMV, CLRV, ArMV ve SLRSV virüsleri ve bunların karışık enfeksiyonları tespit edilmiştir (Beler ve Açıkgöz, 2005). Hatay ilinde yapılan çalışmada, daha önce turuncgillerden izole edilen OLV-1 RT-PCR yöntemi ile testlenmiş ve Türkiye'de zeytin ağaçlarında ilk kez tespit edilmiştir. Yöre, konu ve materyal yönünden benzer olan diğer bir çalışma, Doğu Akdeniz Bölgesi illerindeki (Hatay, Adana, Kahramanmaraş ve Osmaniye) kamu fidanlığı, özel fidanlıklar ve ticari bahçelerde yürütülmüştür. Bu bahçelerden alınan 414 örnek, OLV-1 ile OLV-2'ye karşı testlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda 2 örnekte OLV-1 saptanmış, OLV-2 tespit edilmemiştir (Ulubaş Serçe et al., 2007; Yalçın vd., 2007).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde zeytin ağaçlarında SLRSV'nün saptanmasına yönelik çalışmada, Hatay, Adana, Osmaniye, Kahramanmaraş, İçel illerinden 552 zeytin örneği alınmış ve RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir. Yapılan testler sonucunda, 141 ağacın SLRSV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe vd., 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Araştırmada Kullanılan Materyal

3.1.1 Bitkisel örnekler

Çalışmanın materyalini; Aydın, Balıkesir ve İzmir illeri zeytin üretim alanlarından virüs hastalıkları belirtileri gösteren ve virüsler ile enfekteli olduklarından şüphe edilen ağaçlardan alınan yaprak-sürgün örnekleri ile bu illerdeki fidanlıklardan alınan fidan örnekleri oluşturmuştur.

3.1.2 Test bitkileri

Survey çalışmaları sonucu, zeytin üretim alanlarından alınan örneklerdeki virüslerin biyolojik tanılarını gerçekleştirmek amacıyla kullanılan otsu test (indikatör) bitkileri, bu bitkilerin bilimsel ve Türkçe adları, çalışmada kullanıldıkları gelişme dönemleri Çizelge 3.1’de verilmiştir (Marte et al., 1986). Test bitkileri Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji iklim odası ve serasında yetiştirilmiştir.

Çizelge 3.1 Biyolojik testlerde kullanılan test bitkileri ve kullanıldıkları dönemler

Bilimsel Adı	Türkçe Adı	Familya	Dönem
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn.	Kaz ayağı	<i>Chenopodiaceae</i>	6 yapraklı devre
<i>Chenopodium quinoa</i> Quin	Akkaz ayağı	<i>Chenopodiaceae</i>	6 yapraklı devre
<i>Datura stramonium</i> L.	Şeytan elması	<i>Solanaceae</i>	2-4 yapraklı devre
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Hanım düğmesi	<i>Amaranthaceae</i>	4-8 yapraklı devre
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı devre
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun, Xanthi, Maden	Tütün	<i>Solanaceae</i>	4 yapraklı devre

3.1.3 Serolojik testlerde kullanılan materyal

Çalışmada serolojik test yöntemi olarak uygulanan DAS-ELISA testleri ticari olarak temin edilen tanı kitleri ve reagentleri (antiserumlar, pozitif ve negatif örnekler ile kaplama, ekstraksiyon, konjugat, substrat ve yıkama çözeltileri), Elisa tabakları, Elisa okuyucusu, otomatik pipetler, pipet uçları ve saf su kullanılarak yapılmıştır. DAS-ELISA testlerinde, Bioreba AG (İsviçre) firmasına ait ticari tanı kitleri kullanılmıştır. DAS-ELISA testlerinde kullanılan solüsyon ve çözeltiler, 96 çukurlu mikrolateler (Nunc F96 Maxisorp), yine aynı firmadan temin edilmiştir.

Test sonuçlarının değerlendirilmesinde 405 nm dalga boyunda okuma yapan EMax Precision Microplate marka ELISA okuyucusundan yararlanılmıştır.

3.1.4 PCR testlerinde kullanılan materyal

3.1.4.1 Total nükleik asit ekstraksiyonu aşamasında kullanılan materyal

RNA ekstraksiyonu sırasında steril havan ve havan eli, tampon çözeltiler, ependorf tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, Sigma D37520 marka santrifuj, çözeltiler, ETG MBT 250 marka ısıtıcı ve -80°C'ye kadar soğutma kapasitesine sahip derin dondurucu kullanılmıştır. TNA ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan kimyasallar Ek 1'de gösterilmiştir.

3.1.4.2 cDNA sentezi aşamasında kullanılan materyal

Daha önce hazırlanmış olan TNA örnekleri, Fermantas marka cDNA sentez kiti, ısıtıcı, çalkalayıcı (Heidolph Unimax 2010) ve inkubatör (Binder) materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.4.3 PCR testlerinde kullanılan materyal

Eppendorf marka thermocycler, solüsyonlar, çözeltiler, viral etmenlere spesifik primerler ve Eppendorf marka PCR tüpleri materyal olarak kullanılmıştır. RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve kullanılan sıcaklık döngüleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve sıcaklık döngüleri

Hedef Virüs / Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	PCR Döngüleri
ArMV-5A ArMV-3A	TACTATAAGAAACCGCTCCC CATCAAAACTCATAACCCAC (Grieco et al., 2000)	302 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
ArMV-F ArMV-R	TTGGCCAGATATAGCGTAAAAAT CAGCGGATTGGGAGTTCGT (MacKenzie et al., 1997)	519 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 50 °C 45sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 5dk.)
CMV-CPN5 CMV-CPN3	ACTCTTAACCACCCAACCTT AACATAGCAGAGATGGCGG (Faggioli et al., 2005)	280 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
CMV-F CMV-R	GCCGTAAGCTGGATGGACAA TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG (Youssef et al., 2010)	499 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 50 °C 45sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 5dk.)
SLRSV-5D SLRSV-3D	CCCTTGGTTACTTTTACCTCCTCATTGTCC AGGCTCAAGAAAACACAC (Faggioli et al., 2005)	293 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
CLRV-5 CLRV-3	TGGCGACCGTGTAAACGGCA GTCGGAAAGATTACGTA AAAAGG (Faggioli et al., 2005)	416 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLRSV-R1 OLRSV-R2	GATTGCCAAGGAATATGCTG CTCCCAACAAATGATTGCTG (Faggioli et al., 2005)	356 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLYaV-H OLYaV-C	ACTACTTTCGCGCAGAGACG CCCAAAGACCATTGACTGTGAC (Faggioli et al., 2005)	346 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLYaV-F OLYaV-R	GGGACGGTTACGGTCGAGAGG CGAAGAGAGCGGCTGAAGGCTC (Sabanadzovic et al., 1999)	383 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV1-HA OLV1-CA	ACACAGAAATCATAAGTGCC CCATAGCACCATCATAAC (Faggioli et al., 2005)	299 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV1-F OLV1-R	CTCACCCATCGTTGTGTGG CACCCACCAAATGGC (Grieco et al., 2000)	747 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV2-H OLV2-C	GAAGGTGGCTCGCTAGAG GCCAGGAGTTGAGCTTTG (Faggioli et al., 2005)	206 bp	1 X (95°C 3 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 45 sn) 1 X (72°C 7dk.)
OLV3-F OLV3-R	CCCGTTGAGCAAGTTGTCTTCC GCAGTGGCTGGAGAGCATGGAG (Alabdullah et al., 2009)	176 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 58 °C 45sn. / 72°C 20 sn) 1 X (72°C 5dk.)

3.1.4.4 Coğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyal

Hoefer Scientific marka jel elektroforez düzeneği, örneklerin ve jellerin hazırlanmasında ve boyanmasında kullanılan kimyasallar, çözeltiler ve DNA markerı materyal olarak kullanılmıştır. Tüm jellerin fotoğrafları ETX-20.M marka jel görüntüleme cihazında çekilmiştir.

3.1.5 Meyve verim ve kalite analizlerinde kullanılan materyal

Virüs saptanan ağaçlarda, meyve verim ve kalite analizlerini yapmak amacıyla alınan meyve örnekleri bu bölümün ana materyalini oluşturmuştur.

3.1.6 Çalışmada kullanılan diğer materyaller

Araştırma kapsamında; Bioreba AG örnek ezme makinası, mikrodalga fırın, Sigma mikrosantrifuj, Sartorius hassas terazi, Scotsman buz makinası, Heidolph Unimax 2010 çalkalayıcı, Binder inkubatör, Memmert marka etüv, Agimatic manyetik karıştırıcı, Heidolph tüp karıştırıcı, Crison GLP 22 pH metre ve Sigma marka santrifuj tez çalışmasının çeşitli aşamalarında kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Survey yöntemi

3.2.1.1 Örnekleme yerlerinin saptanması

Yapılan surveyin amacı, çalışma alanındaki 3 ilde zeytin yetiştiriciliği yapılan alanlarda zeytin ağaçlarında bulunan viral etmenleri saptayabilmek amacıyla, zeytin ağaçlarından yaprak-sürgün örneklerinin alınması ve gerekli analizler sonucu, virüs saptanan ağaçlarda verim ve meyve kalitesine yönelik analizlerin yapılabilmesi amacıyla enfekteli ağaçların belirlenmesidir.

Survey alanını belirlemek için Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinin Tarım İl Müdürlüklerinden zeytin üretim alanlarını ve miktarını belirten listeler ve veriler temin edilmiştir. Örnek sayısı, işgücü, zaman ve örneklerin değerlendirilmesi göz önüne alındığında, zeytin ağacı sayısının en fazla olduğu ilçelerden örnekler alınmıştır. Örnek alınacak ilçeler belirlenirken, ağaç sayısının 700000 üstünde olması dikkate alınmıştır (Çizelge 3.3). Karaburun ilçesinde ağaç sayısı 700000 altında olmasına rağmen İzmir ilinin farklı bir yönünde olduğundan bu ilçeden de örnek alınmıştır. Bu ilçelerden ağaç sayısının en fazla olduğu 3 köy/mevki seçilmiş, buralardan ise alt sınırı 500 ağaç olan, 4 bahçeden örnekler toplanmıştır.

Çizelge 3.3 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde zeytin ağacı sayısına göre örnekleme yapılan ilçeler

	İlçeler	Toplam Ağaç Sayısı (Sofralık+Yağlık)
İzmir	Buca	91900
	Bornova	77600
	Güzelbahçe	73300
	Gaziemir	18300
	Balçova	15000
	Karşıyaka	14400
	Narlıdere	10500
	Konak	9000
	Çiğli	220
	Merkez Toplam	310220
	<u>Bayındır</u>	3280500
	<u>Kemalpaşa</u>	1329000
	<u>Torbalı</u>	1165400
	<u>Selçuk</u>	991000
	<u>Bergama</u>	964000
	<u>Tire</u>	825600
	<u>Ödemiş</u>	814500
	<u>Seferihisar</u>	742200
	Aliğa	741900
	Urla	597950
	Menderes	578450
	<u>Karaburun</u>	501350
	Dikili	491500
	Kiraz	252900
	Foça	251640
	Beydağ	233000
Kınık	177250	
Menemen	161200	
Çeşme	140600	
	TOPLAM	14239940
Aydın	<u>Bozdoğan</u>	3315600
	<u>Cine</u>	2971000
	<u>Merkez</u>	2537050
	<u>Koçarlı</u>	2220450
	<u>Sultanhisar</u>	1780939
	<u>Germencik</u>	1521420
	<u>Söke</u>	1492340
	<u>Karpuzlu</u>	1424250
	<u>Karacasu</u>	1075000
	<u>Köşk</u>	1009500
	<u>Kuyucak</u>	958850
	<u>Nazilli</u>	836000
	Yenipazar	684500
	İncirliova	681100
	Didim	454000
	Kuşadası	435200
Buharkent	112000	
	TOPLAM	23509199
Balıkesir	<u>Edremit</u>	3000000
	<u>Burhanive</u>	1950000
	<u>Avvalık</u>	1757000
	<u>Gömeç</u>	1140000
	<u>Havran</u>	900000
	<u>Erdek</u>	884000
	Bandırma	280000
	Marmara	115000
	TOPLAM	10026300

3.2.1.2 Örneklerin alınması

Yaprak-sürgün örneklerini almak için, illere göre zeytin vejetasyon dönemi ve çeşitler dikkate alınarak Nisan sonu Haziran ayları arasında araziye çıkılmıştır. 2009 yılında İzmir ilinden 136 örnek, Aydın ilinden 157 örnek alınmış, 2010 yılında Balıkesir ilinden 82 örnek toplanmıştır. Adı geçen illerden toplam 375 örnek alınmıştır (Çizelge 3.4).

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

Çizelge 3.4 İzmir, Aydın ve Balıkesir illerinde ilçe bazında toplanan örnek sayısı

	İlçeler	Tarih	Toplanan Örnek Sayısı
İzmir	Kemalpaşa	17/04/09	12
	Bayındır	20/04/09	13
	Tire	20/04/09	22
	Seferihisar	21/04/09	12
	Selçuk	21/04/09	12
	Bergama	22/04/09	17
	Torbalı	27/04/09	16
	Ödemiş	27/04/09	14
	Karaburun	30/04/09	18
		TOPLAM	

Çizelge 3.4 (devam)

	İlçeler	Tarih	Toplanan Örnek Sayısı	
Aydın	Karacasu	13/05/09	12	
	Kuyucak	13/05/09	12	
	Nazilli	13/05/09	13	
	Sultanhisar	14/05/09	12	
	Köşk	14/05/09	14	
	Bozdoğan	14/05/09	14	
	Koçarlı	15/05/09	13	
	Karpuzlu	15/05/09	12	
	Çine	15/05/09	15	
	Söke	18/05/09	13	
	Germencik	18/05/09	13	
	Merkez	18/05/09	14	
		TOPLAM		157
	Balıkesir	Gömeç	27/04/10	13
Ayvalık		28/04/10	14	
Burhaniye		03/05/10	15	
Edremit		12/05/10	14	
Havran		12/05/10	12	
Erdek		13/05/10	14	
		TOPLAM		82
		GENEL TOPLAM		375

3.2.2 Fidan örneklerinin alınması ve muhafazası

Fidan örnekleri Çizelge 3.5’de görüldüğü üzere Aydın, Balıkesir ve İzmir illerine ait fidanlıklardan alınmıştır. Fidan örnekleri alınırken her ilde 8 fidanlığa gidilip 5 adet örnek alınmıştır. Toplam 120 adet fidan örneği alınarak, fidanlık kayıtları tutulmuş ve alınan örnekler tül seraya konmuştur (Şekil 3.1).

Çizelge 3.5 İzmir, Aydın ve Balıkesir illerinde fidanlıklardan alınan örnek sayıları

	Fidanlıklar *	Toplanan Örnek Sayısı
İzmir	İzmir1	5
	İzmir2	5
	İzmir3	5
	İzmir4	5
	İzmir5	5
	İzmir6	5
	İzmir7	5
	İzmir8	5
		İl Toplamı

Çizelge 3.5 (devam)

	Fidanlıklar*	Toplanan Örnek Sayısı
Aydın	Aydın1	5
	Aydın2	5
	Aydın3	5
	Aydın4	5
	Aydın5	5
	Aydın6	5
	Aydın7	5
	Aydın8	5
	İl Toplamı	40
Balıkesir	Balıkesir1	5
	Balıkesir2	5
	Balıkesir3	5
	Balıkesir4	5
	Balıkesir5	5
	Balıkesir6	5
	Balıkesir7	5
	Balıkesir8	5
	İl Toplamı	40
Genel Toplam	120	

* Fidanlıklar iller bazında kodlanarak verilmiştir.



Şekil 3.1 Tül sera içerisinde bulunan fidanların görünüm

3.2.3 Biyolojik testler

3.2.3.1 Test bitkilerinin yetiştirilmesi

Biyolojik testler için kullanılan test bitkileri, iklim odasında yetiştirilmiştir. Yetiştirme ortamı olarak kullanılan harç 1:1:1 toprak, gübre ve kum karışımından oluşmuştur. Test bitkilerinin tohumları küvetlere ekilmiş ve tohum ekimi yapılan test bitkileri 4000-6000 lüks ışık şiddeti, 16 saat/gün aydınlanma periyodu ve 20-24 °C sıcaklığa sahip olan iklim odası koşullarında yetiştirilmiştir (Nogay, 1983;

Matthews, 1991). Bitkiler belirli aralıklarla insektisit ve fungusitlerle ilaçlanarak oluşabilecek muhtemel hastalıklara ve zararlılara karşı önlem alınmıştır. Daha sonra uygun gelişme dönemlerinde fideler küçük boy (10 cm çaplı) saksılara şaşırtılmıştır ve belli süreler sonrasında inokule edilmiştir (Şekil 3.2).

3.2.3.2 Test bitkilerinin mekanik olarak inokulasyonu

Test bitkileri uygun gelişme dönemlerine ulaştıkları zaman 1g zeytin yaprak örneklerinden % 0.1 sodyum sülfid içeren 0,01 M fosfat tamponu (pH=7.0) +% 2.5 Nicotinkullanılarak (1/5; g/ml) hazırlanan ekstraktlar, belirlenmiş test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak inokule edilmiştir. İnokulumun içine enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırmak amacı ile, celite ilave edilmiştir ve cam spatül aracılığı ile test bitkilerine inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyondan 1-2 dakika sonra test bitkilerinin yaprakları çeşme suyu ile yıkanmıştır. Bu bitkilerde belirti oluşup oluşmadığı, inokulasyon sonrasında gözlemlenmiş ve oluşan belirti tipleri değerlendirilerek, fotoğrafları çekilmiş ve kaydedilmiştir (Yorgancı, 1975; Savino and Gallitelli, 1981; Matthews, 1991).



Şekil 3.2 İklim odasında yetiştirilen test bitkilerinin görünümü

3.2.4 Serolojik test yöntemi (DAS-ELISA)

Viral etmenlerin belirlenmesi amacı ile zeytin ağaçlarından toplanan örneklere, serolojik yöntemlerden DAS-ELISA testi uygulanmıştır. Bu testlerde

toplam 375 zeytin örneğine, Çizelge 3.6'da gösterilen viral etmenler için DAS-ELISA testleri uygulanmıştır (Şekil 3.3).

DAS-ELISA testlerinin uygulanması aşağıda belirtilen aşamaların izlenmesiyle gerçekleştirilmiştir (Clark and Adams, 1977; Erkan vd., 1995):

1. ELISA tabaklarının her bir çukuruna (Bioreba firması ticari kitleri), kaplama tamponunda 1:1000 oranında seyreltilmiş olan IgG'den 200 µl eklenerek 37°C'de 4 saat inkube edilmesi.

2. ELISA tabaklarının yıkama tamponu ile yıkanarak, 3 dakika beklenmesi ve bu işlemin 4 kez tekrarlanması.

3. Ekstraksiyon tamponu ile hazırlanan tohum örnekleri, pozitif ve negatif kontrollerin her bir çukura 200 µl olacak miktarda eklenerek, 4°C'de bir gece inkube edilmesi.

4. ELISA tabaklarının ikinci aşamada açıklandığı şekilde tekrar yıkanması.

5. Konjuge edilmiş IgG, konjuge tamponu içerisinde 1:1000 oranında seyreltilip her bir çukura 200 µl eklenerek, 37 °C'de 4 saat inkube edilmesi.

6. ELISA tabaklarının ikinci aşamada açıklandığı şekilde tekrar yıkanması.

7. Substrat çözeltisine 1mg/ml olacak şekilde substrat (paranitrofenilfosfat) her bir çukura 200 µl konularak, oda sıcaklığında inkube edilmesi.

Sonuçlar Elisa reader cihazı kullanılarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Örneklerde, sağlıklı kontrolün 2 katı olan absorbans değerleri enfekteli olarak değerlendirilmiştir (Martelli and Galitelli, 1985; Rei et al., 1993; Erkan vd., 1995).



Şekil 3.3 Zeytin örneklerine uygulanan DAS-ELISA testinin görünümü

Çizelge 3.6 Zeytin sürgün ve fidan örneklerinde serolojik ve moleküler yöntemler ile testlenen viral etmenler.

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

3.2.5 Moleküler yöntemler

3.2.5.1 Yaprak ve sürgün örneklerinin kullanım için hazırlanması

DAS-ELISA testi sonucunda enfekteli çıkan örnekler ve test sonucunda enfeksiyon olduğu tespit edilemeyen örnekler, RT-PCR çalışmaları için ayrılmıştır. Ayrılan bu örneklerden, 0.5 g yaprak, 0.5 g sürgünden kazıma yapılmış ve sıvı azotla muamele edilmiştir (Şekil 3.4). Eppendorf tüpler içinde toz

haline getirilen doku parçaları, RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuya konmuştur (Faggioli et al., 2005).



Şekil 3.4 Yaprak ve sürgün örneklerine sıvı azot uygulanması

3.2.5.2 Total Nükleik Asit (TNA) ekstraksiyonu

TNA ekstraksiyonunda kullanılan tüm malzemeler, yapısına uygun olarak ekstrakte edilmiştir. Her izolat için yaklaşık 0,2 g örnek (yaprak+sürgün kazıma) 10 ml % 1 mercapto-ethanol içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi varlığında steril örnek poşetleri içinde homojenize edilmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70°C 10 dakika inkube edildikten sonra, 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 300 μl alınarak, yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 μl ethanol, 300 μl 6M NaI, 50 μl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üst sıvı atılmış tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için, 500 μl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150 μl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. 70°C 'de 4 dakika ısıtıcıda inkube edilen tüpler 13000

rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 145µl alınarak, yeni tüplere aktarılmış ve TNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve PCR uygulamaları yapılincaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac et al., 2001).

3.2.5.3 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

TNA ekstraksiyonu yapılmış olan örneklere komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri kullanılmış ve firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemde göre ilk olarak eppendorf tüplerin içerisine 0,1–5 µg total RNA, 1 µl oligo (dT) primer konulmuş ve DEPC su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. 65°C'de 5 dakika inkubasyon uygulandıktan sonra, tüpler buz üzerine konulmuş ve içlerine sırasıyla 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl Ribolock Ribonuclease inhibitor, 2 µl 10mM dNTP mix eklenmiştir. Kısa süreli santrifüj (3-5 saniye) uygulandıktan sonra 25°C'de 5 dakika inkubasyon uygulanmıştır ve tüplerin içine 1 M-MuLV reverse transcriptase eklenerek, toplam 20 µl hacme ulaşılmıştır. Karışım daha sonra 42°C'de 60 dakika ve 70 °C'de 5 dakika inkubasyon uygulanarak, cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır(Şekil 3.6).

3.2.5.4 RT-PCR yöntemi

PCR işlemi Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 50 µl hacimde yapılmıştır. Çizelge 3.2'de verilen spesifik primerler ile RT-PCR testleri gerçekleştirilmiştir.

Steril PCR tüplerine 25 µl 2x PCR master mix, 1 µl primer1, 1 µl primer 2, 2 µl cDNA ve 21 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanmıştır (Candresse et al., 1995). Tüm işlemler boyunca eldiven kullanılmış ve herhangi bir kontaminasyon olasılığını belirlemek için de nükleik asit eklemekten sadece karışımın yer aldığı bir tüpte (kontrol), PCR programında çoğaltma işlemine alınmıştır.

3.2.5.5 Agaroz Jel Elektropherez yöntemi

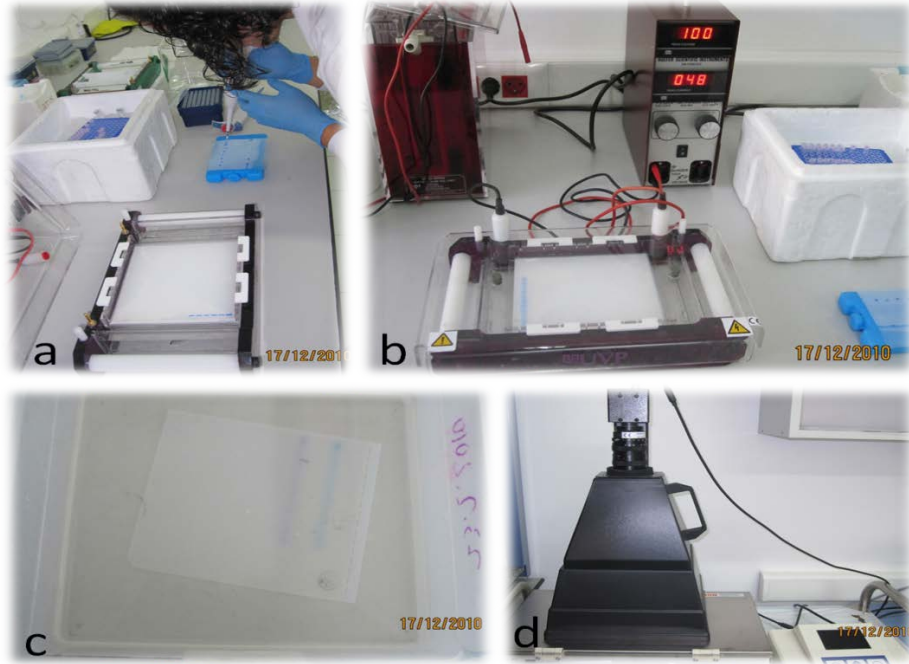
Agaroz jel 100 ml 1X TAE tamponu içine 1,5g agaroz konulup, mikrodalga fırında 3.5 dakika tutularak hazırlanmıştır.

Agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez koşulunda kullanılan 1X TAE tamponu, stok 50 X TAE tamponunun seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Stok TAE 50X tamponu; 40mM Tris-acetate (pH 8), 57.1 ml Glacial Acetic Acid, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8)'den oluşmaktadır. Bu karışım 1000 ml'ye tamamlanarak stok solüsyon oluşturulmuştur. Stok çözeltiden 20 ml alınarak, distile H₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 1X TAE konsantrasyon hazırlanmıştır.

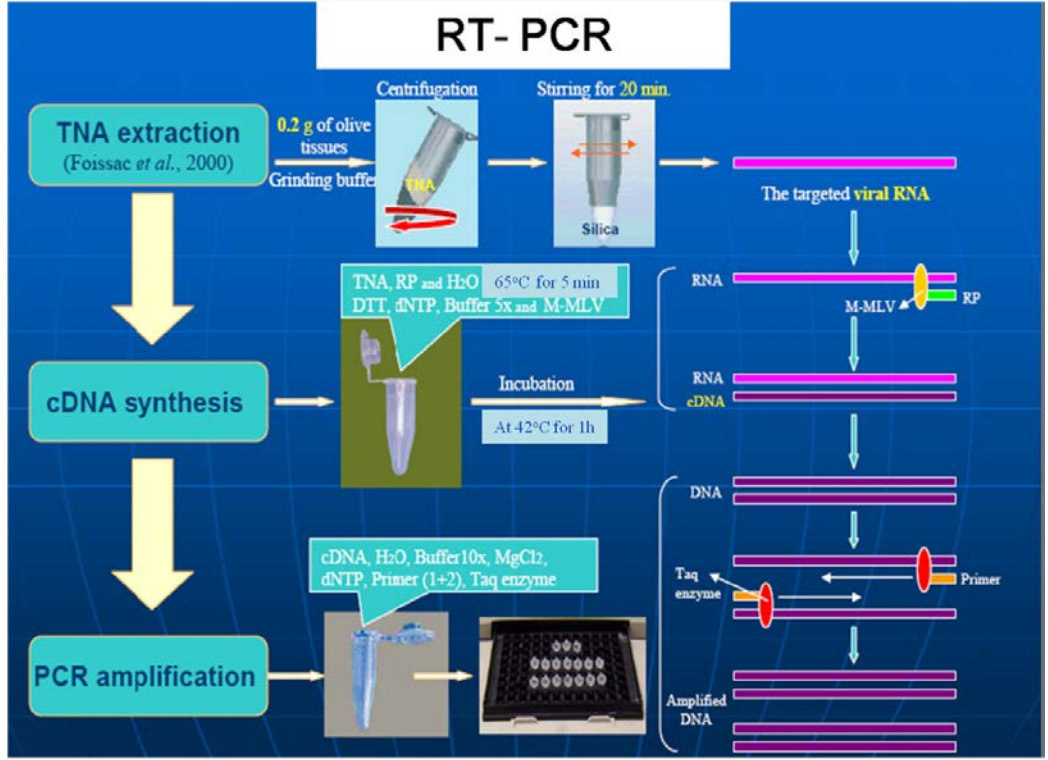
Elektropherez koşumu, 100 V'da, yatay düzenekte 60 dakika süreyle ve 1X TAE çözeltisi içerisinde uygulanmıştır. Jel yükleme yapılmadan önce, örneklere (10 µl örneğe) 2 µl yükleme tamponu eklenmiştir (Şekil 3.5).

3.2.5.6 Jel Görüntüleme Cihazında PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan jel, ETX-20.M marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 RT- PCR ürünlerinin elektroforez aşamaları a) PCR ürünlerinin agar jele yüklenmesi b) Jele konulan ürünlerin 100 V' da koşumu c) Ethidium bromide uygulaması d) Jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmesi



Şekil 3.6 RT-PCR yönteminin şematik olarak gösterilmesi (Alabdullah et al., 2005) .

3.2.6 Meyve kalite analizleri

Meyve verim ve kalitesi ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için meyve örneklerinin alındığı ağaçlar besin elementi yönüyle toprak analizlerinin yapıldığı bahçelerden seçilmiştir. Örnek alınan bahçelerdeki ağaçların tek bir virüs ile enfekteli olmasına, karışık enfeksiyon olmamasına dikkat edilmiştir. Bu amaçla, Ayvalık çeşidi olduğu belirlenen ve sadece SLRSV ile enfekteli ağaçların bulunduğu farklı iki bahçeden meyve örnekleri toplanmıştır. Her iki bahçeden de tek virüs ile enfekteli birer ağaçtan ve virüs saptanmayan birer ağaçtan örnekler alınmıştır. Ağaç başına meyve verimini belirlemek amacıyla örnek alınmadan önce her iki ağacın bütün meyveleri hasat edilmiş ve tartılmıştır. Meyve ağırlığını belirlemek için tek bir virüs ile enfekteli ağaç ve sağlıklı ağaçtan tesadüfe bağlı olarak her birinden alınan 50'şer adet meyvenin hassas terazide tartılması sonucu, elde edilen ortalama ağırlıklarının karşılaştırılması ile yapılmıştır (Şekil 3.7). Proje önerisinde meyve kalite kriterlerinde belirlenmesi planlanan meyve boyu ve meyve eni kriterleri ise Zeytincilik Araştırma İstasyonu konu uzmanlarının önerisi ile meyve hacmi olarak değiştirilmiştir. Virüs saptanan ve virüs saptanmayan ağaçlardan tesadüfe bağlı olarak alınan 50'şer meyvenin mezür içinde belli miktarda bulunan suya 10'ar adet atılması ile arttırdığı su miktarı belirlenmiştir (Kaya ve Tekintaş, 2006).

Elde edilen bulgulara SPSS 15.0 İstatistik Programında Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmış, hastalıklı ve sağlıklı ağaçlardan alınan meyvelerin hacim ve ağırlık olarak farklılıkları ortaya konulmuştur (Miran, 2002).



Şekil 3.7 Meyve kalite analizleri ile ilgili çalışmaların çeşitli aşamaları

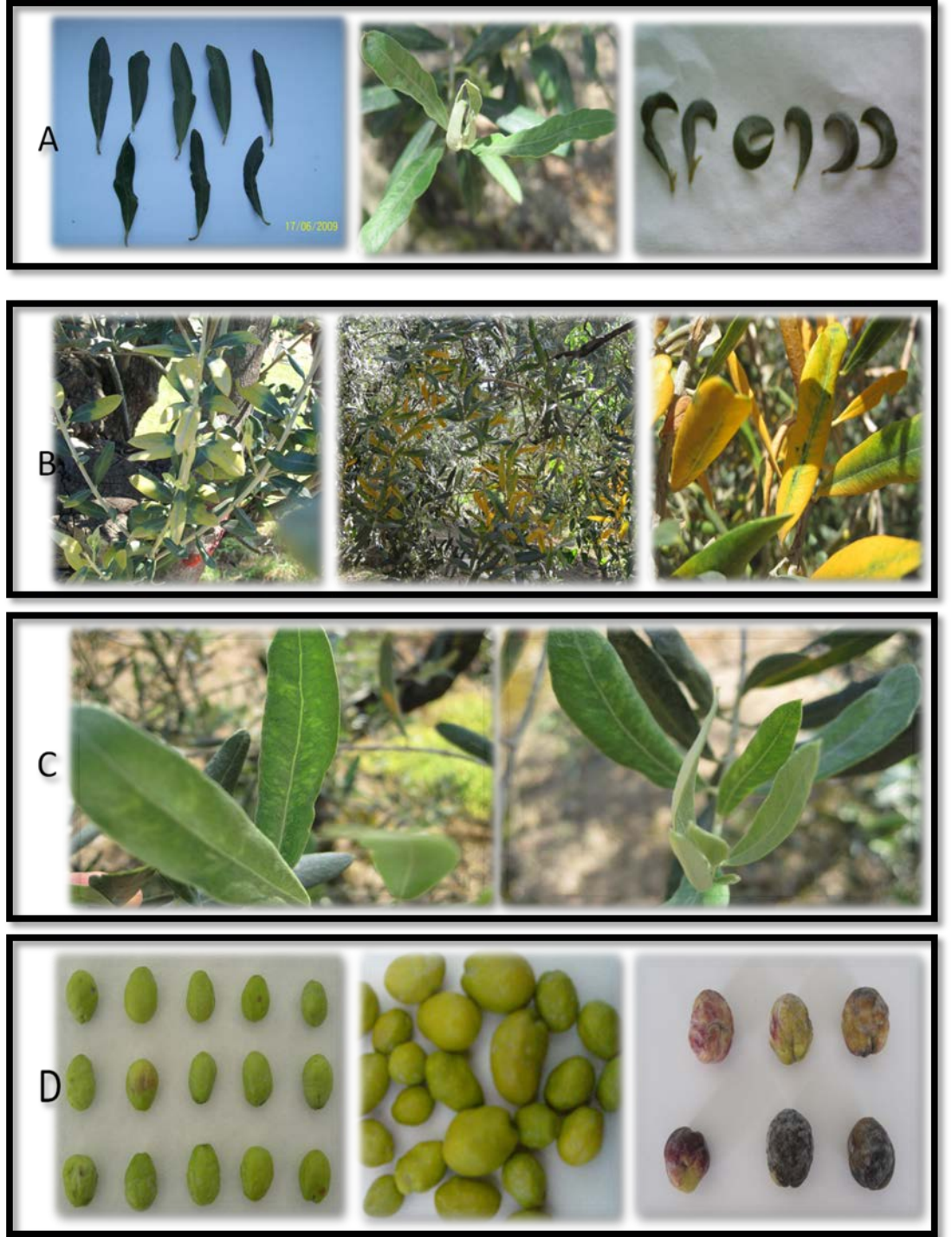
4. BULGULAR

4.1 Bitki Örneklerinde Gözlenen Belirtiler

2009 yılında Aydın ve İzmir illerinde, 2010 yılında Balıkesir ilinde yapılan surveyler sonucunda, bölgeyi temsil edebilecek olan bahçeler belirlenmiştir. Bu bahçelerden virüs belirtisi görülen ve belirti görülmeyen ağaçlardan örneklemeler yapılmıştır. Örnekleme yapılırken, ağaçlar önce simptomatolojik açıdan incelenmiş ve görülen belirtilerin viral etmenlerden kaynaklanabileceğinin yanı sıra diğer patojenler ya da etkenler tarafından oluşturulabileceği de göz önünde tutulmuştur. Ayrıca, hiç belirti göstermeyen ve sağlıklı bir görünüme sahip olan ağaçlarda da virüs enfeksiyonu olabileceği, daha sonra yapılan testler sonucunda gözlemlenmiştir. Surveyler sırasında incelenen ağaçlarda ve alınan bitki örneklerinde, bazı viral enfeksiyonların olabileceği şüphesini yaratan yapraklarda şekil bozulmaları, orak yaprak oluşumu, yapraklarda renk değişimi ve mozaik, meyvelerde şekil bozukluğu ve ağaçlarda ise zayıf sürgün oluşumu, çalılışma vb. belirtiler olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.1).

4.2 Biyolojik Testlerin Sonuçları

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



Şekil 4.1 Survey çalışmaları sırasında zeytin ağaçlarında görülen bazı belirtiler A) Yapraklarda şekil bozulmaları ve orak yaprak oluşumu B) Yapraklarda renk değişikliği C) Yapraklarda mozaik D) Meyvelerde şekil bozukluğu

4.3 Serolojik Testlerin Sonuçları

Zeytin virüslerinin saptanması amacıyla Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan örnekler DAS-ELISA yöntemi ile ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV adlı etmenlere ait tanı kitleri kullanılarak testlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3’de gösterilmiştir. Buna göre, 2009 yılında Aydın ilinden 157 ve İzmir ilinden 136 olmak üzere toplam 293 adet örnek toplanmış, 2010 yılında ise Balıkesir ilinden 82 adet örnek alınarak, tümü serolojik yöntemle test edilmiştir.

Çizelge 4.1 2009 yılında Aydın ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde DAS-ELISA yöntemine göre virüslerin bulunma durumu.

İl	İlçeler	Alınan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Adı			
			ArMV	CMV	CLRV	SLRSV
Aydın	Karacasu	12/2	2	--	--	--
	Kuyucak	12/0	--	--	--	--
	Nazilli	13/0	--	--	--	--
	Sultanhisar	12/3	3	--	--	--
	Köşk	14/0	--	--	--	--
	Bozdoğan	14/3	2	--	--	1
	Koçarlı	13/0	--	--	--	--
	Karpuzlu	12/1	1	--	--	--
	Çine	15/1	1	--	--	--
	Söke	13/2	2	--	--	--
	Germencik	13/1	1	--	--	--
	Merkez	14/4	4	--	--	--
	Toplam	157/17	16	--	--	1

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere, Aydın ilinden 157 örnek toplanmış ve bu örneklerin % 10.82’sinde virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerin % 10.19’unda ArMV olduğu saptanırken, sadece % 0.63’ünde SLRSV bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda alınan örneklerde CMV ve CLRV enfeksiyonunun olmadığı saptanmıştır. İlçeler bazında bakıldığında, en fazla virüs enfeksiyonu Merkez, Bozdoğan ve Sultanhisar ilçelerinde saptanmış, buna karşın Kuyucak, Nazilli, Köşk ve Koçarlı ilçelerinde viral enfeksiyon olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 2010 yılında Balıkesir ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde DAS-ELISA yöntemine göre virüslerin bulunma durumu.

İl	İlçeler	Alınan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Adı			
			ArMV	CMV	CLRV	SLRSV
Balıkesir	Gömeç	13/0	--	--	--	--
	Ayvalık	14/0	--	--	--	--
	Burhaniye	15/0	--	--	--	--
	Edremit	14/0	--	--	--	--
	Havran	12/0	--	--	--	--
	Erdek	14/0	--	--	--	--
	Toplam	82/0	--	--	--	--

2010 yılında Balıkesir ilinden toplanan 82 adet zeytin örneği ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV adlı etmenlere ait tanı kitleri ile DAS-ELISA yöntemine göre testlenmiştir. Virüs varlığı yönünden yapılan testlemlerde bu ilden toplanan örneklerde virüs enfeksiyonu olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

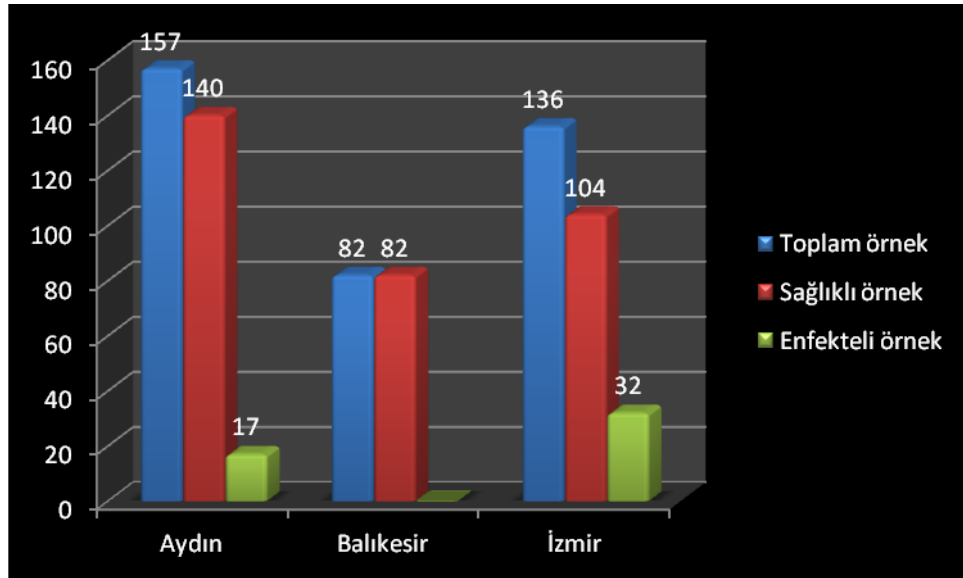
Çizelge 4.3 2009 yılında İzmir ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde DAS-ELISA yöntemine göre virüslerin bulunma durumu.

İl	İlçeler	Alınan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Adı			
			ArMV	CMV	CLRV	SLRSV
İzmir	Kemalpaşa	12/3	3	--	--	--
	Bayındır	13/2	2	--	--	--
	Tire	22/7	7	--	--	--
	Seferihisar	12/3	3	--	--	--
	Selçuk	12/3	3	--	--	--
	Bergama	17/4	4	--	--	--
	Torbali	16/3	3	--	--	--
	Ödemiş	14/2	2	--	--	--
	Karaburun	18/5	5	--	--	--
	Toplam	136/32	32	--	--	--

DAS-ELISA testi sonucunda 2009 yılında İzmir ilinde toplanan 136 örneğin % 23.52'sinde ArMV enfeksiyonu olduğu saptanmıştır. Örneklerde yapılan analizler sonucunda CMV, CLRV ve SLRSV enfeksiyonlarının olmadığı tespit

edilmiştir. İlçeler ele alındığında; Tire, Karaburun ve Bergama ilçelerinde en yüksek düzeyde virüs enfeksiyonu bulunduğu tespit edilirken Bayındır ve Ödemiş ilçelerinde virüs enfeksiyonu daha düşük olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Genel bir değerlendirme yapıldığında; 2009 ve 2010 yıllarında adı geçen üç ilden toplanan 375 adet zeytin bitkisi örneğinden % 12.8'inin ArMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiş ve 1 örnekte ise SLRSV'nün bulunduğu saptanmıştır. Aydın ilinde toplam 157 adet örnekte % 10.82 oranında ve İzmir ilinde toplam 136 adet örnekte % 23.52 oranında virüs enfeksiyonu olduğu ortaya konmuştur. DAS-ELISA testleri sonucunda Aydın ilinde ArMV ve SLRSV, İzmir ilinde sadece ArMV adlı virüslerin bulunduğu, Balıkesir ilinde toplanan örneklerde ise testlenen dört virüsün enfeksiyonunun olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde toplam örnek, virüs ile enfekteli ve sağlıklı örnek miktarı.

4.4 Moleküler Testlerin Sonuçları

4.4.1 Zeytin bahçelerinden toplanan örneklerin sonuçları

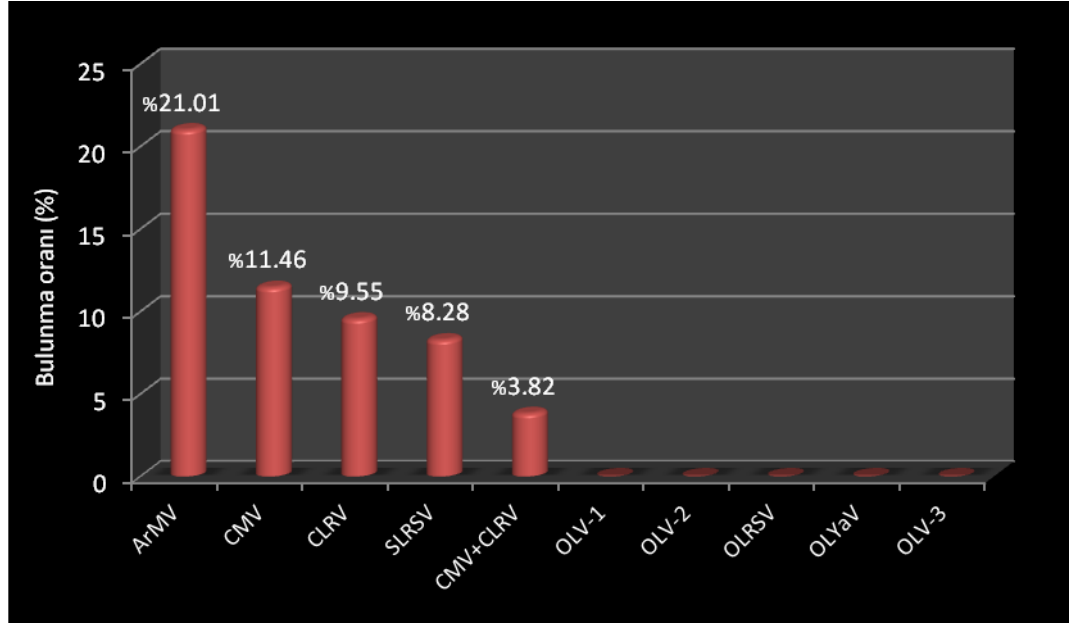
Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan 375 örnek 9 virüse ait spesifik primerler kullanılarak, RT-PCR yöntemine göre testlenmiştir. Testlenen örneklerin iller bazında moleküler test sonuçları Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6 ile Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir. RT-PCR çalışmalarında, virüslere özgü primer çiftleri kullanılarak CLRV, ArMV, SLRSV ve CMV adlı virüslere ait DNA

bantları elde edilmiştir. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden zeytin bahçelerinden alınan örneklerle yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar sonucunda, CLRV için 416 bp, ArMV için 302 bp, SLRSV için 293 ve CMV için 280 bp uzunluğunda spesifik DNA bantları tespit edilmiş olup, buna karşın OLV-1, OLV-2, OLV-3, OLYaV ve OLRVSV adlı virüslerin spesifik primerleri ile yapılan RT-PCR çalışmalarında ilgili etmenlere yönelik DNA bantlarının oluşumu ise gözlenmemiştir (Şekil 4.8- 4.17).

Çizelge 4.4 2009 yılında Aydın ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin RT-PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İl	İlçeler	Alınan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Adı									
			ArMV	CMV	CLRV	SLRSV	CMV+CLRV	OLV-1	OLV-2	OLRSV	OLYaV	OLV-3
Aydın	Karacasu	12/9	5	2	2	--	--	--	--	--	--	--
	Kuyucak	12/6	1	1	--	2	2	--	--	--	--	--
	Nazilli	13/6	--	2	3	--	1	--	--	--	--	--
	Sultanhisar	12/8	4	2	1	1	--	--	--	--	--	--
	Köşk	14/4	2	2	--	--	--	--	--	--	--	--
	Bozdoğan	14/12	5	3	2	2	--	--	--	--	--	--
	Koçarlı	13/6	--	2	1	3	--	--	--	--	--	--
	Karpuzlu	12/8	4	--	2	1	1	--	--	--	--	--
	Çine	15/4	1	--	2	1	--	--	--	--	--	--
	Söke	13/6	3	2	1	--	--	--	--	--	--	--
	Germencik	13/4	2	--	1	1	--	--	--	--	--	--
	Merkez	14/12	6	2	--	2	2	--	--	--	--	--
	Toplam	157/85	33	18	15	13	6	--	--	--	--	--

Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi, Aydın ilinden toplanan örneklerle yapılan RT-PCR testi sonuçlarına göre örneklerde % 54.14 oranında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda, ArMV (% 21.01) en yaygın virüs etmeni olarak saptanırken, bunu sırasıyla CMV (% 11.46), CLRV (% 9.55) ve SLRSV (% 8.28) izlemiştir. 6 örnekte ise CMV ve CLRV’nün birlikte bulunduğu belirlenmiştir. Bu ilden alınan örneklerde OLV-1, OLV-2, OLRVSV, OLYaV ve OLV-3 enfeksiyonu belirlenmemiştir (Şekil 4.3). İlçelere göre virüs enfeksiyonu bulunma durumu değerlendirildiğinde, Merkez, Bozdoğan ve Karacasu ilk üç sırayı almaktadır. Köşk, Çine ve Germencik ilçelerinde virüs enfeksiyonu sayısı daha düşük tespit edilmiştir.



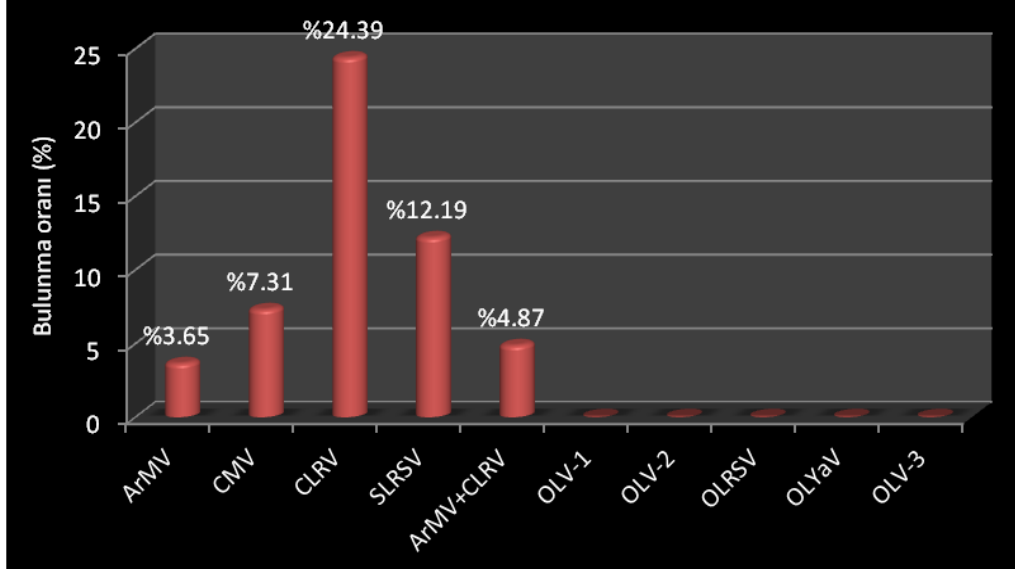
Şekil 4.3 Aydın ilinde RT-PCR yöntemine göre testlenen örneklerde virüslerin bulunma durumları.

Çizelge 4.5 2010 yılında Balıkesir ili ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin RT-PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İl	İlçeler	Alınan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Adı									
			ArMV	CMV	CLRV	SLRSV	ArMV+CLRV	OLV-1	OLV-2	OLRV	OLYaV	OLV-3
Balıkesir	Gömeç	13/5	--	--	3	--	2	--	--	--	--	--
	Ayvalık	14/8	--	1	5	2	--	--	--	--	--	--
	Burhaniye	15/7	1	1	2	3	--	--	--	--	--	--
	Edremit	14/8	--	1	4	2	1	--	--	--	--	--
	Havran	12/6	2	2	1	1	--	--	--	--	--	--
	Erdek	14/9	--	1	5	2	1	--	--	--	--	--
	Toplam	82/43	3	6	20	10	4	--	--	--	--	--

Çizelge 4.5 incelendiğinde, Balıkesir ilinden alınan örneklerde % 52.43 oranında virüs enfeksiyonu olduğu görülmektedir. Yapılan analizler sonucunda alınan örneklerde ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV enfeksiyonlarının bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca, bu ildeki örneklerde ArMV ve CLRV'nün % 4.87 oranında karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu belirlenmiştir. En yaygın virüs olarak CLRV (% 24.39) saptanmış olup bunu sırasıyla SLRSV (% 12.19), CMV (%

7.31) ve ArMV (% 3.65) izlemiştir. Testlenen örneklerde OLV-1, OLV-2, OLRV, OLYaV ve OLV-3 enfeksiyonu tespit edilememiştir (Şekil 4.4). Balıkesir ilinde virüs enfeksiyonu sayısı ilçelere göre değerlendirildiğinde, en yüksek virüs enfeksiyonu bulunan ilçelerin Erdek, Edremit ve Ayvalık ilçelerinde olduğu, Gömeç ilçesinde ise daha düşük oranda virüs enfeksiyonu belirlenmiştir.

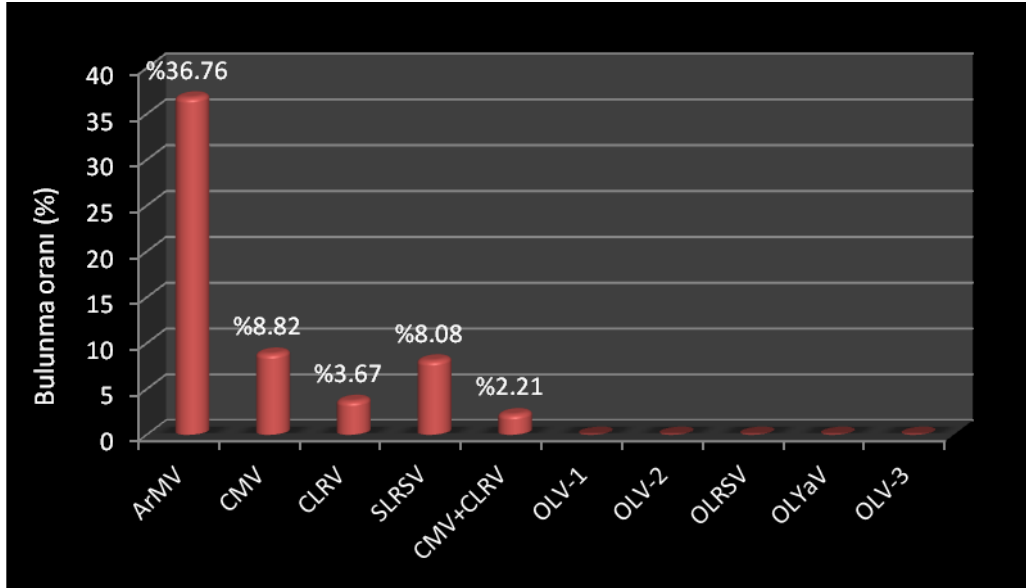


Şekil 4.4 Balıkesir ilinde RT-PCR yöntemine göre testlenen örneklerde virüslerin bulunma durumu.

Çizelge 4.6 2009 yılında İzmir il ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde virüslerin RT-PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İl	İlçeler	Alınan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Adı									
			ArMV	CMV	CLRV	SLRSV	CMV+CLRV	OLV-1	OLV-2	OLRV	OLYaV	OLV-3
İzmir	Kemalpaşa	12/6	3	2	--	--	1	--	--	--	--	--
	Bayındır	13/9	5	3	--	1	--	--	--	--	--	--
	Tire	22/16	11	2	1	2	--	--	--	--	--	--
	Seferihisar	12/7	5	--	--	2	--	--	--	--	--	--
	Selçuk	12/8	5	2	1	--	--	--	--	--	--	--
	Bergama	17/9	4	1	1	2	1	--	--	--	--	--
	Torbalı	16/8	5	1	--	1	1	--	--	--	--	--
	Ödemiş	14/6	5	--	--	1	--	--	--	--	--	--
	Karaburun	18/12	7	1	2	2	--	--	--	--	--	--
Toplam	136/81	50	12	5	11	3	--	--	--	--	--	

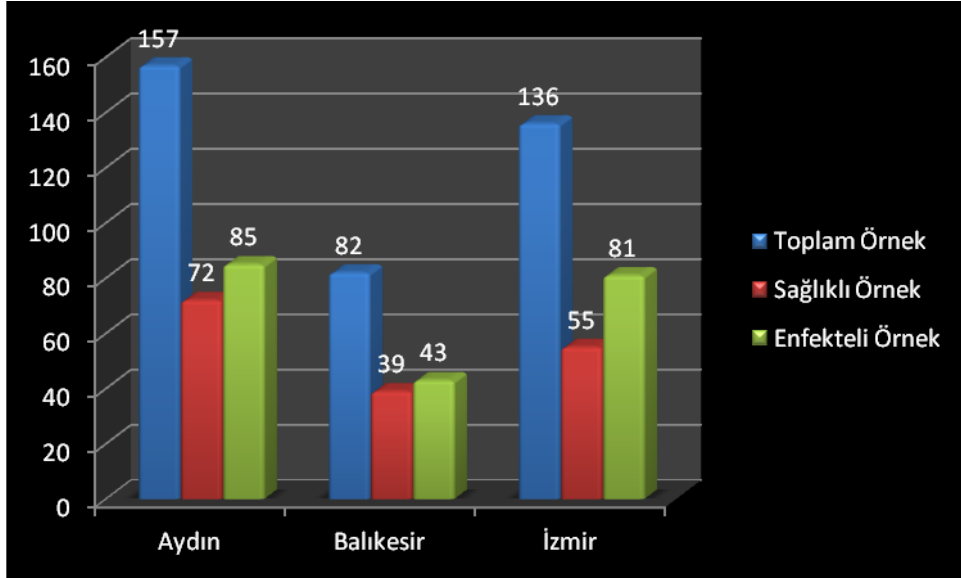
Çizelge 4.6'da bulunan veriler incelendiğinde, İzmir ilinden alınan örneklerde RT-PCR yöntemi ile yapılan analiz sonuçlarına göre, % 59.05 oranında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Örneklerde ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV adlı virüslerin bulunduğu tespit edilmiştir. Testlenen örneklerde OLV-1, OLV-2, OLRV, OLYaV ve OLV-3 enfeksiyonu belirlenmemiştir. İzmir ilinde zeytin ağaçlarında ArMV (% 36.76) en yaygın viral etmen olarak belirlenirken, bunu sırasıyla CMV (% 8.82), SLRSV (% 8.08) ve CLRV (% 3.67) izlemiştir. Ayrıca toplanan örneklerde CMV ve CLRV'nün % 2.21 oranında karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). İzmir ilinde Tire ve Karaburun ilçelerinde en yüksek virüs enfeksiyonunun olduğu saptanırken Ödemiş ve Kemalpaşa ilçelerinde diğer ilçelere oranla daha düşük virüs enfeksiyonunun olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5 İzmir ilinde RT-PCR yöntemine göre testlenen örneklerde virüslerin bulunma durumu.

Moleküler testler sonucunu genel olarak değerlendirildiğinde; 2009 ve 2010 yıllarında adı geçen üç ilden toplanan 375 adet zeytin bitkisi örneğinde RT-PCR analizleri sonucunda % 55.73 oranında virüs enfeksiyonu olduğu görülmektedir. Aydın ilinden toplanan 157 adet örnekte % 54.14 oranında, Balıkesir ilinden alınan 82 adet örnekte % 52.43 oranında, İzmir ilinden alınan 136 adet örnekte % 59.05 oranında virüs enfeksiyonu bulunduğu tespit edilmiştir. Viral etmenler açısından bakılacak olursa % 22.93 oranında ArMV, % 9.6 oranında CMV, % 10.66 oranında CLRV ve % 9.06 oranında SLRSV enfeksiyonu olduğu ortaya

konmuştur. % 2.4 oranında CMV ile CLRV'ün ve % 1.06 oranında ArMV ile CLRV'ün birlikte karışık enfeksiyonlar oluşturduğu belirlenmiştir. Toplanan 375 örnekte RT-PCR testleri sonucunda OLV-1, OLV-2, OLRSV, OLYaV ve OLV-3 adlı virüslerin olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde toplam örnek, virüs ile enfekteli ve sağlıklı örnek miktarı.

4.4.2 Fidanlıklardan alınan örneklerin sonuçları

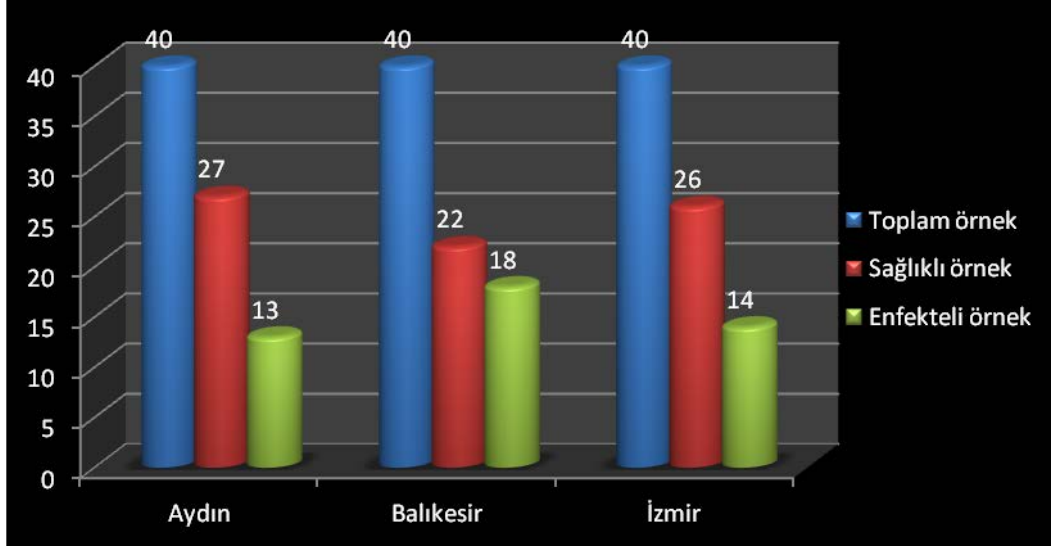
Aydın, Balıkesir ve İzmir illerine ait fidanlıklardan alınan toplam 120 adet fidan örneğinin yalnızca RT-PCR yöntemi kullanılarak analizleri yapılmıştır. Alınan fidan örneklerinde yapılan analizler sonucunda; Aydın ilinde % 32.5, Balıkesir ilinde ise % 45 ve İzmir ilinde % 35 oranlarında virüs enfeksiyonu olduğu tespit edilmiştir. Viral etmenler yönünden bakıldığı zaman; toplanan örneklerde İzmir ilinde % 27.5 CMV ve % 7.5 ArMV, Aydın ilinde % 20 CMV ve % 12.5 ArMV, Balıkesir ilinde ise % 30 CMV ve % 15 oranlarında ArMV adlı etmenlerin bulunduğu belirlenmiştir. Fidanlıklardan alınan örneklerde CLRV, SLRSV, OLV-1, OLV-2, OLRSV, OLYaV ve OLV-3 adlı virüslerin enfeksiyonunun olmadığı analizler sonucunda ortaya konmuştur (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). Moleküler analizlerde Çizelge 3.6'da verilen spesifik primerler kullanılarak ArMV için 302 bp, CMV için 280 bp uzunluğunda DNA bantları elde edilmiştir.

Çizelge 4.7 2011 yılında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde fidanlıklardan alınan örneklerde RT-PCR yöntemine göre virüslerin bulunma durumu.

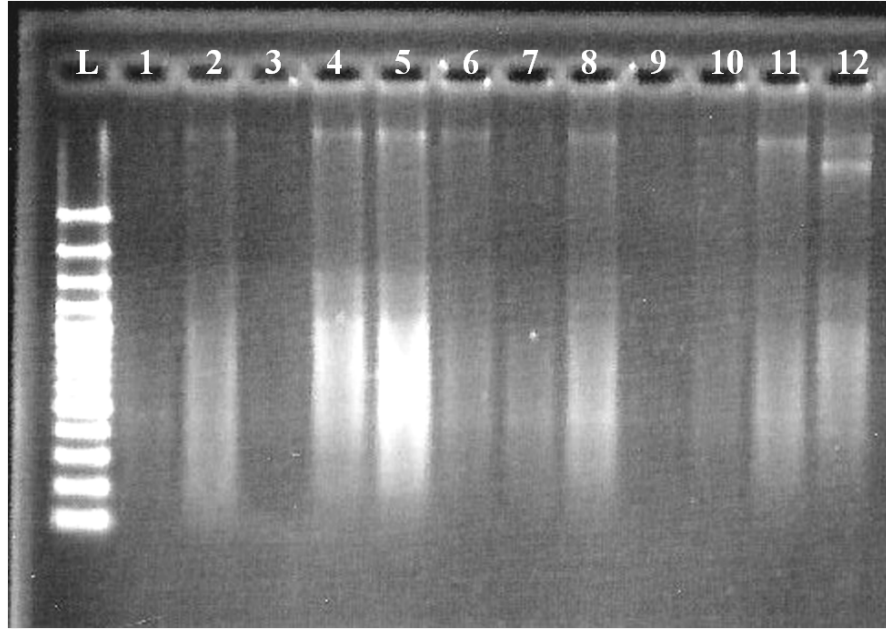
	Fidanlıklar*	Toplanan Örnek Sayısı/Enfekteli Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı									
			CMV	ArMV	CLRV	SLRSV	OLV-1	OLV-2	OLRSV	OLYaV	OLV-3	
Aydın	Aydın 1	5	--	1 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--
	Aydın 2	5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Aydın 3	5	3 ^M	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Aydın 4	5	1 ^G	1 ^W	--	--	--	--	--	--	--	--
	Aydın 5	5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Aydın 6	5	1 ^M	2 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--
	Aydın 7	5	2 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Aydın 8	5	1 ^G	1 ^M	--	--	--	--	--	--	--	--
	İl Toplamı	40/13	8	5	--	--	--	--	--	--	--	--
Balıkesir	Balıkesir 1	5	1 ^A	2 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--
	Balıkesir 2	5	3 ^D	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Balıkesir 3	5	--	1 ^A	--	--	--	--	--	--	--	--
	Balıkesir 4	5	1 ^A	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	Balıkesir 5	5	3 ^A	1 ^D	--	--	--	--	--	--	--	--
	Balıkesir 6	5	2 ^{A,G}	1 ^A	--	--	--	--	--	--	--	--
	Balıkesir 7	5	2 ^{D,A}	1 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--
	Balıkesir 8	5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	İl Toplamı	40/18	12	6	--	--	--	--	--	--	--	--
İzmir	İzmir 1	5	1 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	İzmir 2	5	--	2 ^A	--	--	--	--	--	--	--	--
	İzmir 3	5	3 ^{A,G}	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	İzmir 4	5	2 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	İzmir 5	5	1 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	İzmir 6	5	2 ^{A,G}	1 ^G	--	--	--	--	--	--	--	--
	İzmir 7	5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	İzmir 8	5	2 ^{A,G}	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	İl Toplamı	40/14	11	3	--	--	--	--	--	--	--	--
	Genel Toplam	120/45	31	14	--	--	--	--	--	--	--	--

* Fidanlıklar iller bazında kodlanarak verilmiştir.

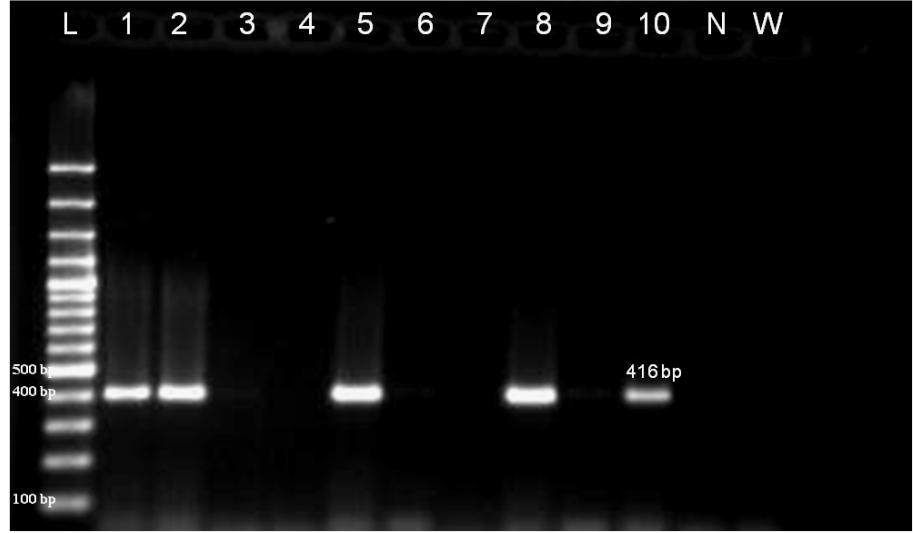
A: Ayvalık G: Gemlik D: Domat M: Memecik W: Manzanilla



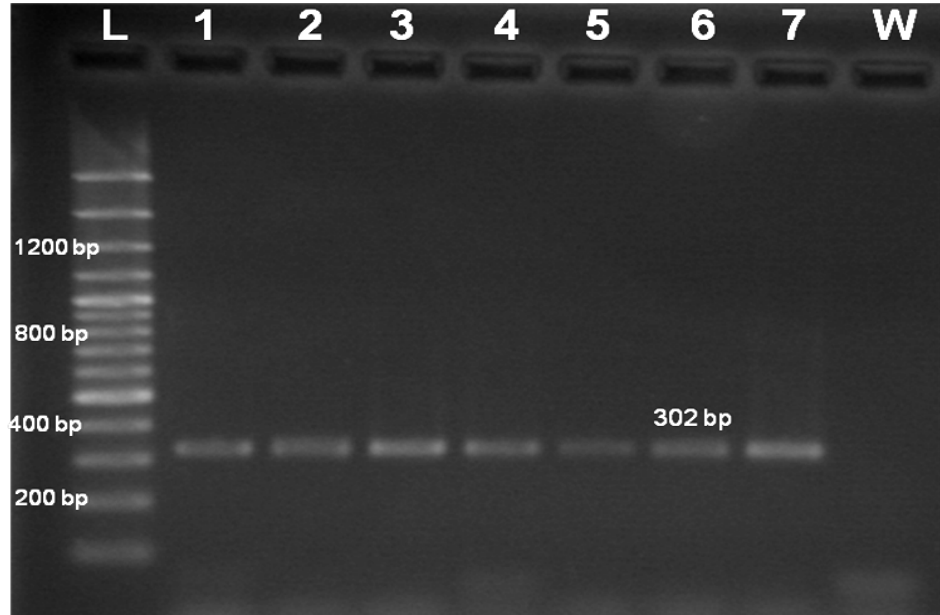
Şekil 4.7 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerindeki fidanlıklardan alınan örneklerde virüslerin bulunma durumu.



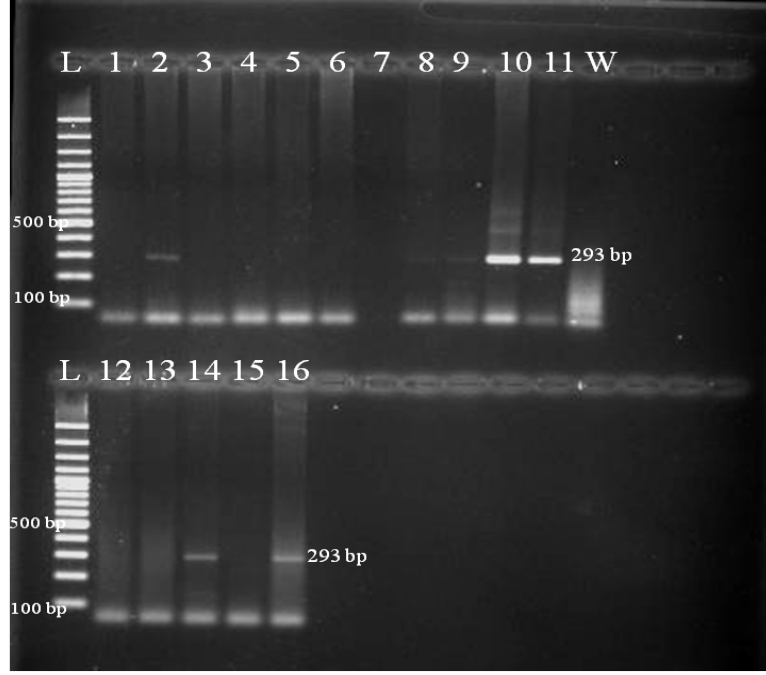
Şekil 4.8 Zeytin örneklerinden elde edilen nükleik asitlerin (TNA) jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1-12: Total nükleik asit izolasyonu yapılmış örnekler



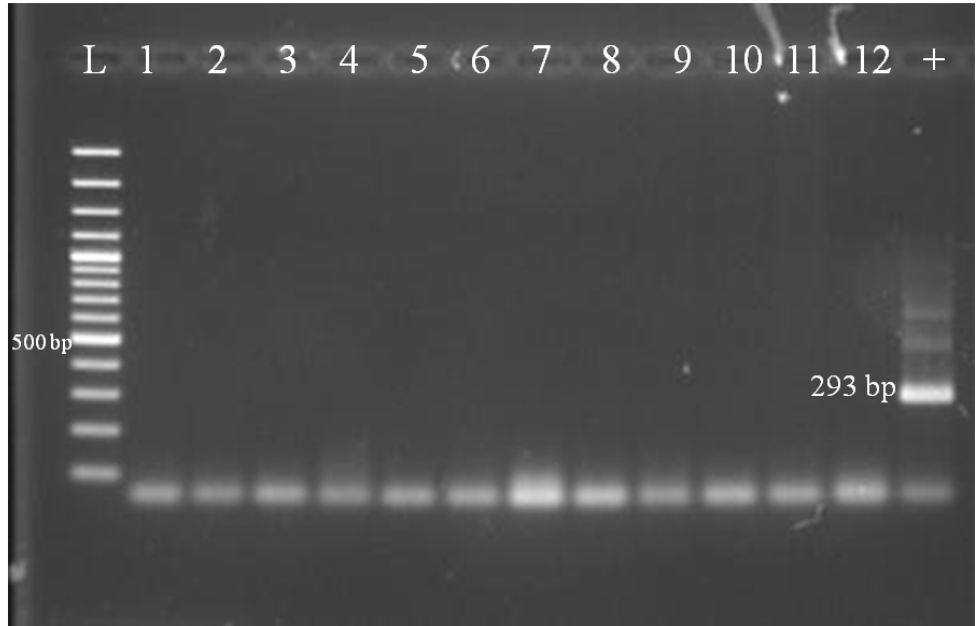
Şekil 4.9 CLRV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1,2,5,8,10: CLRV ile enfekteli pozitif örnekler N: Negatif kontrol; W: su kontrol



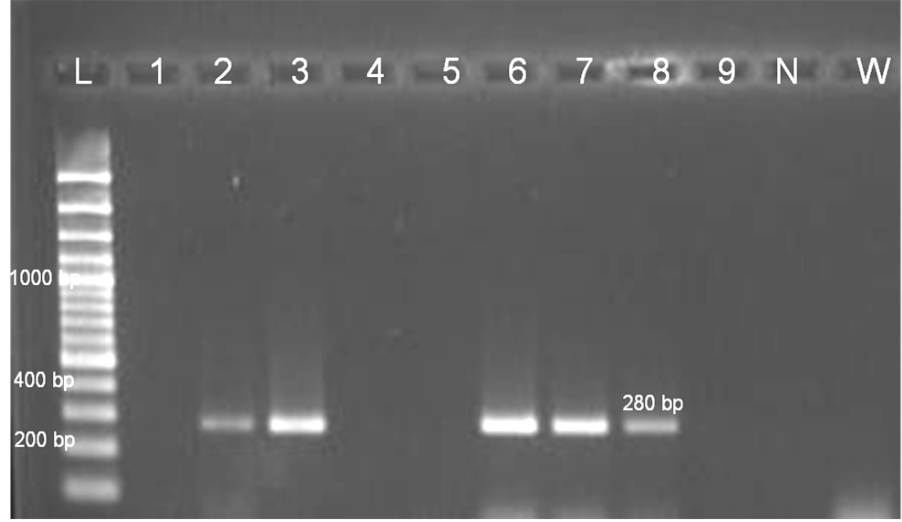
Şekil 4.10 ArMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1,2,3,4,5,6,7:ArMV ile enfekteli pozitif örnekler; W: su kontrol



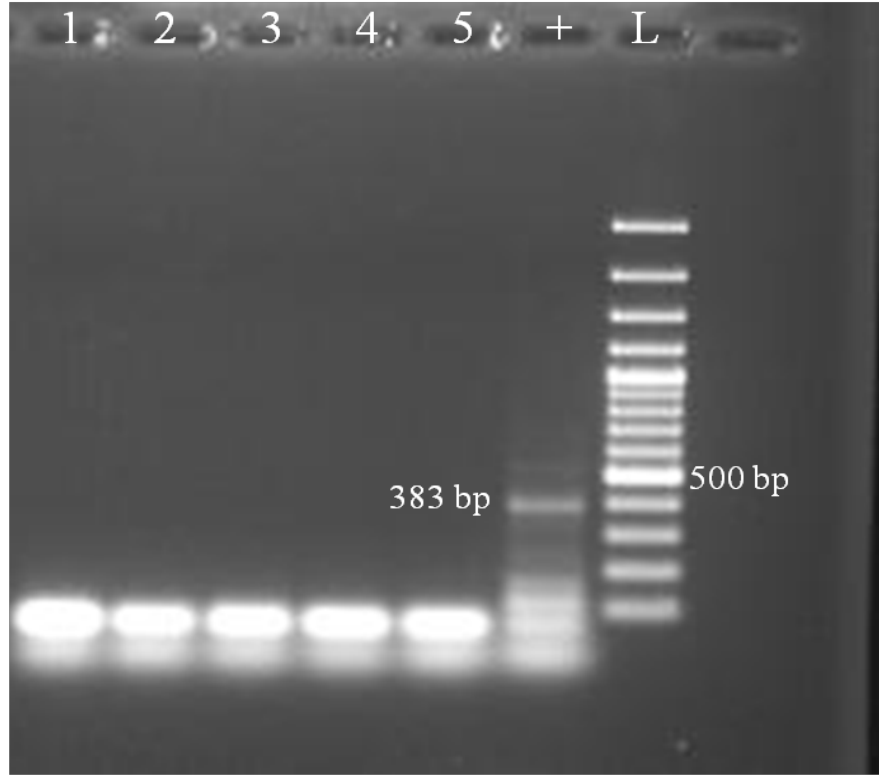
Şekil 4.11 SLRSV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 2,9,10,11,14,16: SLRSV ile enfekteli pozitif örnekler; W: su kontrol



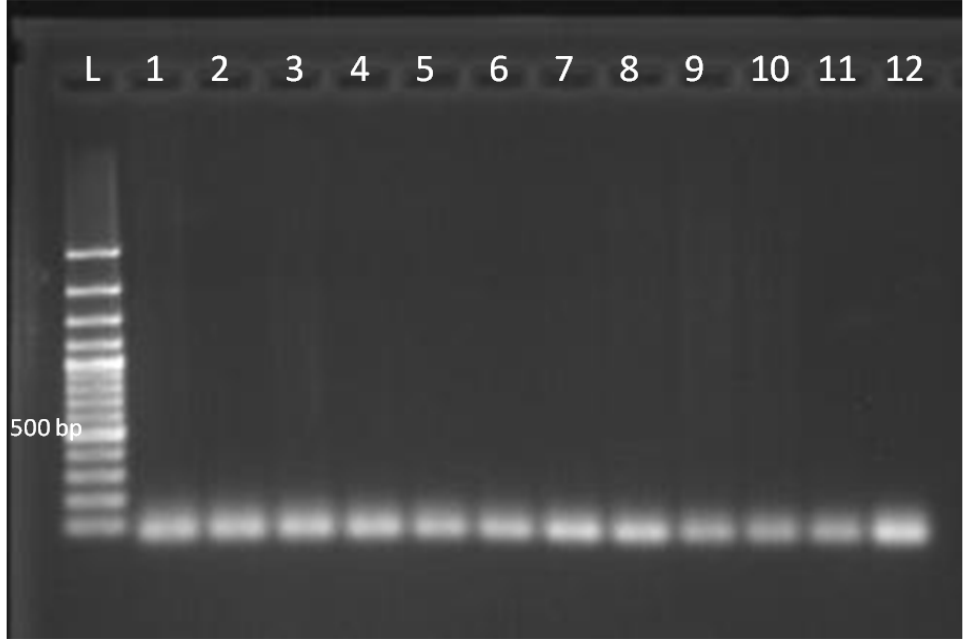
Şekil 4.12 SLRSV etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak tespit edilen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü L: 100bp DNA ladder; 1-12: örnekler; +: Pozitif kontrol



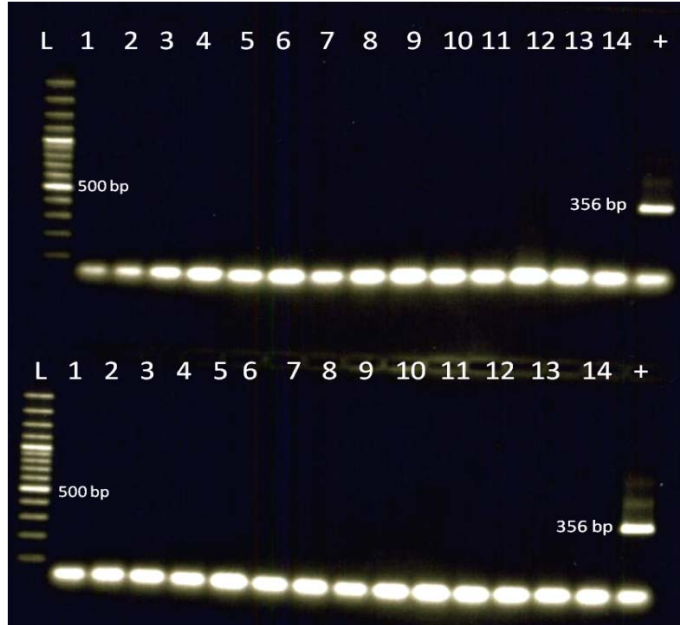
Şekil 4.13 CMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 2,3,6,7,8: CMV ile enfekteli pozitif örnekler N: Negatif kontrol; W: su kontrol



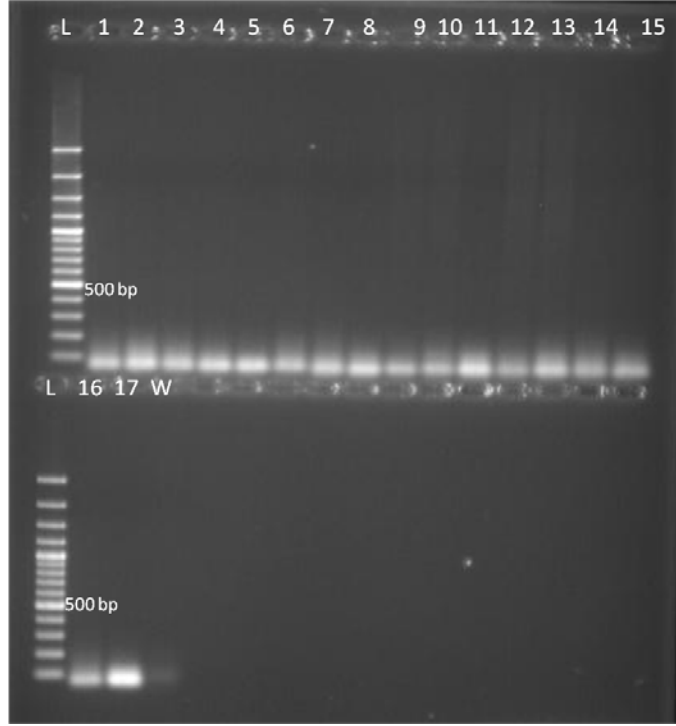
Şekil 4.14 OLYaV etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak tespit edilen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1-5: örnekler; +: Pozitif kontrol



Şekil 4.15 OLV-1 etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak tespit edilen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü. L: 100bp DNA ladder; 1-12: örnekler



Şekil 4.16 OLRV etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak tespit edilen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü



Şekil 4.17 OLV-2 etmenine karşı RT-PCR yöntemi ile sağlıklı olarak tespit edilen zeytin örneklerinin jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü

4.5 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması

Değişik örneklere ait deneme sonuçlarından baz alınarak uygulanan virüs tanılama yöntemleri arasında karşılaştırma yapılmıştır. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden örnekleme yapılan ilçelerden temsili olarak birer örnek seçilmiş ve bu örnekler üzerinden kullanılan virüs tanılama yöntemlerinin karşılaştırılmalı sonuçları ve başarı oranları Çizelge 4.8’de verilmiştir. RT-PCR sonucunda enfekteli çıkan 27 adet örneğin, yalnızca 5 adedi DAS-ELISA sonucuna göre enfekteli olarak belirlenmiştir. Bu örneklerin test bitkilerine inokulasyonu sonucunda beklenen belirtiler elde edilmemiştir. Simptomlar göz önüne alındığında simptom belirlenen 3 örnekte RT-PCR sonucunda virüs enfeksiyonu olduğu ortaya konmuştur. Viral enfeksiyon belirlenen 24 örnekte virüs benzeri belirtiye rastlanmamıştır.

Çizelge 4.8 Virüs tanılama yöntemlerinin karşılaştırılmalı sonuçları

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

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

4.6 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi

Zeytin ağaçlarında görsel olarak yapılan semptom incelemesinin bulguları ile biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; araştırma kapsamında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanarak testlenen toplam 375 bitki örneğinde DAS-ELISA ve RT-PCR testi sonucunda % 55.73 oranında viral enfeksiyon olduğu belirlenmiştir. Her iki analiz yöntemine göre alınan örneklerde Aydın ilinde % 22.66, Balıkesir ilinde % 11.46 ve İzmir ilinde % 21.60 oranında viral enfeksiyon olduğu tespit edilmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda; toplanan 375 örnekte % 13.06 oranında virüs enfeksiyonu bulunduğu belirlenirken, RT-PCR sonucuna göre alınan örneklerin % 55.73 oranında virüslerle enfekteli oldukları saptanmıştır (Çizelge 4.9).

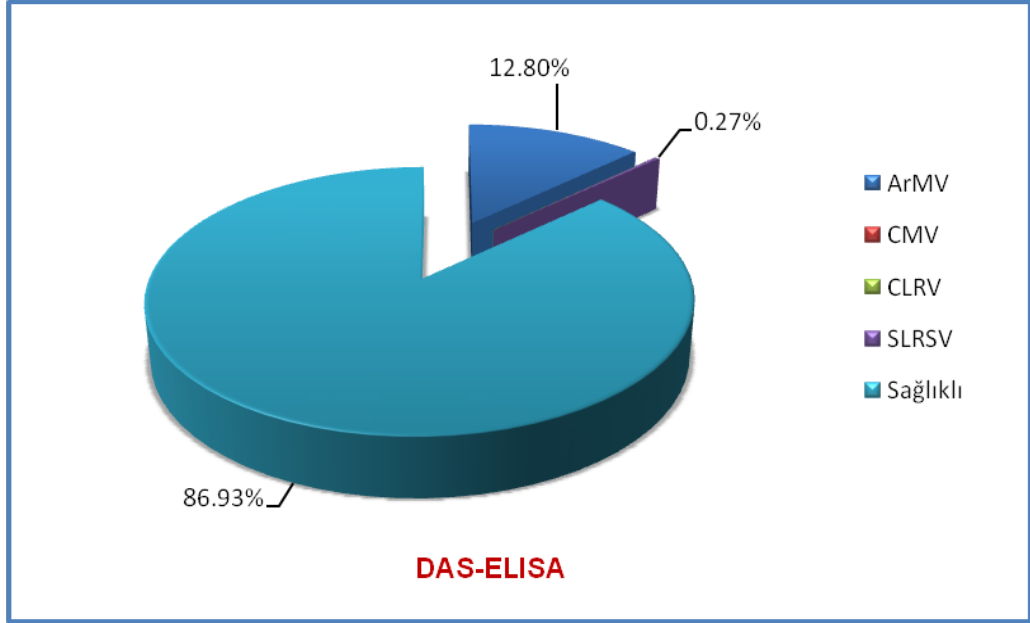
Çizelge 4.9 Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden alınan zeytin örneklerinde kullanılan tanılama yöntemlerine göre enfekteli ve sağlıklı örnek sayıları.

İller	Örnek Sayısı			
	Enfekteli		Sağlıklı	Genel Toplam
	DAS-ELISA	RT-PCR		
Aydın	17	85	72	157
Balıkesir	0	43	39	82
İzmir	32	81	55	136
Genel Toplam	49	209	166	375

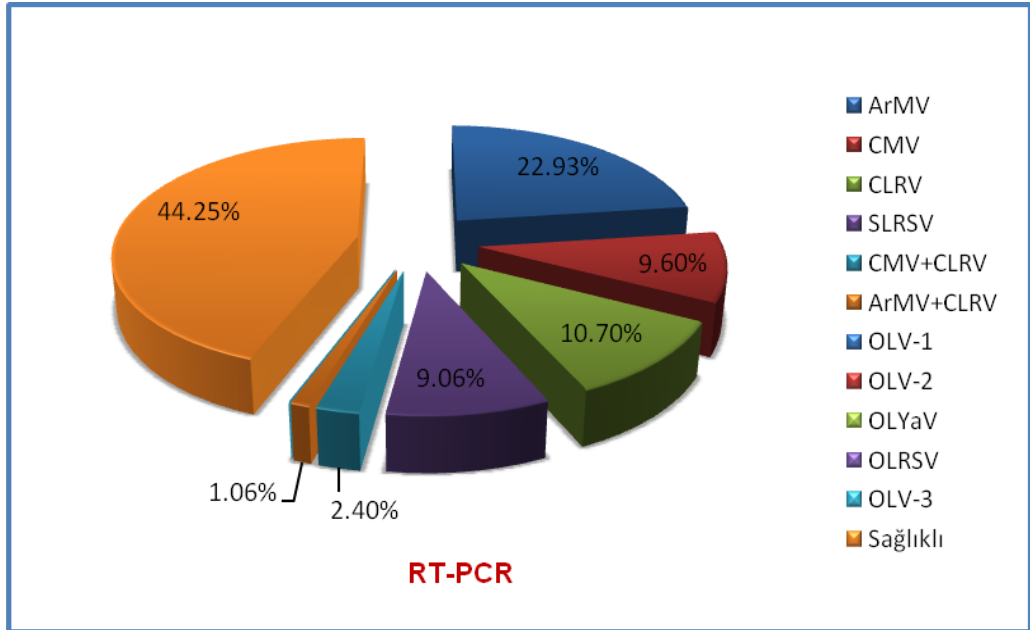
DAS-ELISA testi sonuçlarına göre Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan 375 adet örnekte % 12.8’inde ArMV bulunduğu saptanırken, sadece 1 örnekte ise SLRSV olduğu saptanmıştır. RT-PCR analizi sonucunda, örneklerin % 22.93’ünde ArMV, % 9.6’sında CMV, % 10.66’sında CLRV, % 9.06’sında SLRSV enfeksiyonunun var olduğu belirlenmiştir. 9 örnekte CMV+ CLRV, 4 örnekte ise ArMV+CLRV karışık enfeksiyon şeklinde tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda örneklerin tamamında OLV-1, OLV-2, OLRSV, OLYaV ve OLV-3 adlı etmenlerin bulunmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.18-4.19).

Çizelge 4.10 Zeytin örneklerinde DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemine göre belirlenen viral etmenler ve bulunma durumları.

Viral Etmenler	Enfekteli Örnek Sayısı	
	DAS-ELISA	RT-PCR
ArMV	48	86
CMV	0	36
CLRV	0	40
SLRSV	1	34
CMV+CLRV	0	9
ArMV+CLRV	0	4
OLV-1	--	0
OLV-2	--	0
OLRSV	--	0
OLYaV	--	0
OLV-3	--	0
Toplam	49	209



Şekil 4.18 Zeytin örneklerinde DAS-ELISA yöntemine göre saptanan virüsler ve bulunma durumları.



Şekil 4.19 Zeytin örneklerinde RT-PCR yöntemine göre saptanan virüsler ve bulunma durumları.

4.7 Meyve Verim ve Kalite Analizlerine Ait Bulgular

Ağaç başına verim ve meyve kalite analizlerine yönelik yapılan çalışmalarda, SLRSV ile enfekteli Ayvalık çeşidinin bulunduğu bahçelerden örnekler alınmıştır. Bu deneme alanlarının seçiminde aynı bahçe içerisinde hem tek bir virüs ile enfekteli ve sağlıklı ağaçların tespit edilmesi, hemde lokasyon

olarak bahçeler arasında fark olmaması etkili olmuştur. Virüs enfeksiyonu olan zeytin bahçelerinde pomolojik analizlerden ağaç başı verim, meyve ağırlığı ve meyve hacmi (meyve eni+meyve boyu) analizleri sonucunda, ağaç başına verim, meyve ağırlığı ve meyve hacmi açısından ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Bu verilere ait varyans analiz tablosu Çizelge 4.11 ve 4.12’de, istatistiki gruplandırmalar ise Çizelge 4.13’te verilmiştir.

Çizelge 4.11 Meyve ağırlıklarına ait varyans analiz tablosu.

Ağırlık	Kareler toplamı	Sd	Kareler ortalaması	F	Anlamlılık
Gruplar arası	1521,000	1	1521,000	21,021*	0,000
Grup içi	1013,000	14	72,357		
Toplam	2534,000	15			

* Önemli %5 alfa seviyesinde

Çizelge 4.12 Meyve hacmine ait varyans analiz tablosu.

Hacim	Kareler toplamı	Sd	Kareler ortalaması	F	Anlamlılık
Gruplar arası	1580,063	1	1580,063	15,623*	,001
Grup içi	1415,875	14	101,134		
Toplam	2995,938	15			

* Önemli %5 alfa seviyesinde

Çizelge 4.13 Virüs saptanan ve virüs saptanmayan ağaçlarda meyvelerin ağırlık, hacim ve verimlerinin karşılaştırılması.

Bahçe No	Ağaçların Enfeksiyon Durumu	Ağırlık Ortalaması (g)	Hacim Ortalaması (ml)	Verim (kg)
1	Virüs saptanan	107,71b*	107,5c	179
	Virüs saptanmayan	131,127a	131,25a	218
2	Virüs saptanan	108,487b	109,75bc	118
	Virüs saptanmayan	124,222a	125,75ab	157

* Farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.

Çizelge 4.13'de verilen verilere göre; ağırlık açısından bakıldığında, 1 numaralı bahçede virüs saptanan ağaç ile virüs saptanmayan ağaç arasında fark olduğu görülmektedir. Ağırlık açısından 2 numaralı bahçeye bakıldığında yine virüs saptanan ve virüs saptanmayan ağaçların meyve ağırlıkları arasında fark belirlenmiştir. Bu veriler ışığında, virüs saptanan ağaçların meyve ağırlıklarının virüs saptanmayan ağaçlara oranla azaldığı dikkati çekmektedir.

Aynı bahçelerde hacim açısından bakılacak olursa, 1 numaralı bahçede virüs saptanan ve virüs saptanmayan ağaçlar arasında fark olduğu belirlenmiştir. 2 numaralı bahçede hacimsel olarak benzerlik olduğu görülmektedir. Her iki bahçede de virüs tespit edilen ağaçların meyvelerinde, hacim olarak bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

Ağaç başına verime bakıldığında, 1 numaralı bahçede virüs saptanan ağaçta verim 179 kg tespit edilirken, sağlıklı olan ağaçta verim 218 kg olarak belirlenmiştir. 2 numaralı bahçede tek başına virüs saptanan ağaçta verim 118 kg olarak belirlenirken, sağlıklı olan ağaçta verim 157 kg olarak saptanmıştır. Ağaç başına verim ile ilgili değerler dikkate alındığında, virüs saptanan ağaçlarda yaklaşık olarak % 18 ile % 25 oranlarında bir verim azalması olduğu dikkati çekmektedir.

5. TARTIŞMA

Dünya üzerindeki üretiminin büyük bir kısmı Akdeniz havzasındaki ülkelerde gerçekleştirilen zeytin, ülkemiz ekonomisinde de önemli yeri olan bir meyve türüdür. Akdeniz iklim kuşağında olan Türkiye son derece uygun ekolojik koşullara sahip olması nedeniyle, zeytin üretimi ülkemiz tarımını önemli ölçüde etkilemektedir.

Pek çok kültür bitkisinde olduğu gibi, zeytin ve zeytinyağı üretimini sınırlayan birçok zararlı ve hastalık mevcuttur. Ülkemizde özellikle zeytin zararlıları konusunda çok sayıda bilimsel araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, virüs hastalıkları konusunda yapılan çalışma sayısı fazla değildir. Ürünün kalite ve miktarında kayıplara neden olduğu bilinen virüs hastalıkları ile mücadelede en önemli esas hastalığın tanısının doğru konmasıdır. Bu amaçla arazide gözlemlere ve semptomlara bakılarak, konulan tanılar laboratuarda yapılacak testler ile mutlaka doğrulanmalıdır. Çünkü, aynı viral etmen birden fazla konukçuyu enfekte etmekte ve her birinde farklı tipte belirti oluşturabilmektedir. Ayrıca, birçok virüs etmeni de bitki fenolojisine bakıldığında, belirti oluşturmadan latent olarak bitkide bulunabilmektedir. Surveyler sırasında bu gibi latent enfeksiyonlar, doğru tanı konulmasını zorlaştırıcı faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yürütülen bu tez çalışması ile, zeytin yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde zeytin ağaçlarındaki viral etmenlerin semptomatolojik, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile tanınması ve bu etmenlerin bulunma durumlarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise belirli kriterler göz önünde bulundurularak, seçilen enfekteli bazı zeytin ağaçlarının meyve verim ve kalitesi ile ilişkili analizleri (ağaç başına meyve verimi, meyve ağırlığı, meyve boyu, meyve eni) yapılmış, bu virüslerin ülkemiz zeytin yetiştiriciliğinde meydana getirdiği ekonomik kayıpların ortaya konulmasına çalışılmıştır.

Araştırma için toplanan örneklerin semptomatolojik açıdan incelenmesi sonucunda, bazı viral enfeksiyonların olabileceği izlenimi uyandıran yapraklarda şekil bozulmaları, orak yaprak oluşumu, renk değişimi ve mozaik, meyvelerde şekil bozukluğu ve ağaçlarda zayıf sürgün oluşumu, çalılışma vb. belirtilerin bulunduğu dikkati çekmiştir (Bkz. Şekil 4.1). Zeytinde saptanan virüslerden SLRSV'nün küçük, armut şekilli buruşuk meyve oluşumuna, çekirdeklerde şekil bozukluklarına (tümseklî meyve) neden olup, yapraklarda daralma ve bükülmeye, boğum aralarında kısılmaya, sürgünlerde çalimsı büyüme ve üründe azalmaya

yol açtığı bildirilmiştir (Marte et al., 1986). Ayrıca, yaprak sararması kompleksi olarak adlandırılan hastalık “damar sararması” (Faggioli and Barba, 1995), “yaprak sararması” ve “yaprak beneklenmesi ve geriye doğru ölüm” (Savino et al., 1996) olarak adlandırılan 3 farklı hastalık tarafından oluşturulmaktadır. Bu hastalık kompleksini karakterize eden özellikler zayıf meyve oluşumu, yaprakların parlak sarı renkte oluşudur. Yaprak beneklenmesi ve geriye doğru ölüm olduğunda ise, yaprakların nekrozlaşması ve yaygın yaprak dökülmesi sonucunda geriye doğru ölüm görülür. OYVaV damar sararması, OYMDaV ise yaprak beneklemesi ve geriye doğru ölüm gösteren bitkilerde tespit edilmiştir. Bu belirtileri gösteren zeytin örnekleri ile yapılan biyolojik, serolojik ve moleküler testlerin ardından; anormalliklerin viral etmenlerden kaynaklı olabileceği gibi, diğer patojenler ya da etkenler tarafından da oluşturulabileceği sonucuna varılmıştır. SLRSV bazı çeşitlerde (Ascolana tenera) çok belirgin semptom verirken, aynı virüs belirtisiz ağaçlardan alınan örneklerde de saptanmıştır (Savino et al., 1979; Marte et al., 1986). ArMV orak yaprak şeklindeki semptom gösteren zayıf gelişmesi olan ağaçlarda saptanırken, aynı zamanda hiçbir semptom vermeyen ağaçlarda da belirlenmiştir. CLRV (Savino and Gallitelli, 1981) ve CMV (Savino and Gallitelli, 1983) görünüşte tamamen semptomsuz ağaçlardan saptanırken, TMV (cv. Leccino çeşidinde) damar bantlaşması ve çökme belirtisi gösteren ağaçlardan saptanmıştır (Triolo et al., 1996). Semptomatolojik olarak herhangi bir semptom göstermeyen ve görünüşte sağlıklı olarak değerlendirilen zeytin örneklerinde de virüs enfeksiyonlarının olabileceği, yapılan laboratuvar analizleri sonucunda görülmüştür. Çizelge 4.8’de görüldüğü üzere analizi yapılan 27 örneğin 3 adetinde semptom kaydedilmiş ve viral etmen saptanmıştır. 24 örnekte ise hiçbir semptom kaydedilmemesine rağmen tamamında virüs enfeksiyonu olduğu tespit edilmiştir. Nitekim, bu sonuçlar ele alındığında saptanan virüsler ile zeytin ağaçlarında bulunan belirtiler karşılaştırıldığında, aralarında tam bir ilişki kurulamamıştır. Ayrıca bu çalışma ile bölgemizde zaman zaman zeytin meyvelerinde şikayet konusu olan şekil bozukluğu belirtilerinin tek başına virüslerden kaynaklanmadığı da belirlenmiş olmaktadır. Dünyada yapılan çalışmalar incelendiğinde de, zeytin virüslerinin bir çoğunun hiç semptom göstermeyen ağaçlardan saptandığı belirtilmektedir (Savino et al., 1979; Savino and Gallitelli, 1981; 1983; Savino et al., 1983; Gallitelli and Savino, 1985; Martelli and Gallitelli, 1985; Marte et al., 1986; Merciega et al., 1996; Triolo et al., 1996).

Zeytin virüslerinin teşhisinde test bitkilerine mekanik inokulasyon çalışmaları Savino and Gallitelli (1981) tarafından kullanılmıştır. Konukçu test

bitkilerinde (*C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *N. glutinosa* ve *N. tabacum*) oluşan belirtiler mozaik, nekrozlar ve halka lekelerdir (Savino and Gallitelli, 1981; Merciega et al., 1996). Laboratuvar analizleri sonucunda pozitif çıkan örnekler test bitkilerine mekanik olarak inokule edilmiştir. Zeytinde saptanan virüslerin yapay olarak test bitkilerine bulaştırma çalışmaları sonucunda test bitkilerinde belirti çıkmadığı görülmüştür. ArMV, SLRSV, CMV ve CLRV gibi virüslerin zeytin dışındaki bitkilerden test bitkisine kolaylıkla taşınabildiği, ancak zeytinden bu virüsleri izole etmenin daha zor olduğu belirtilmektedir (Brunt et al., 1996). Karşılaşılan bu zorluklar ise; zeytin özsuyunda virüs partiküllerinin düşük konsantrasyonda olması, bitki içerisinde virüslerin düzensiz dağılımı, zeytin özsuyunda bulunan inhibitörlerin, virüsün enfekte etme özelliğini engellemesi şeklinde açıklanmaktadır (Alabdullah et al., 2005).

Bitki virüslerinin tanılanmasında genellikle birden fazla yöntemden yararlanmak gerekmektedir. Birden çok yöntemi kullanarak tanılama yapmak daha doğru sonuçlara ulaşmak için gereklidir (Valverde et al., 1990). Bu araştırma kapsamında toplam 375 ağaçtan alınan örneklerde DAS-ELISA testi sonucuna göre % 12.8'inin ArMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda 1 örnekte ise SLRSV'nün bulunduğu belirlenmiştir. Aydın ilinde toplam 157 adet örnekte % 10.82 oranında ve İzmir ilinde toplam 136 adet örnekte % 23.52 oranında virüs enfeksiyonu olduğu ortaya konmuştur. DAS-ELISA testi sonucunda Aydın ilinde ArMV ve SLRSV, İzmir ilinde sadece ArMV adlı virüslerin bulunduğu, Balıkesir ilinde ise hiçbir etmenin olmadığı saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve Şekil 4.2). DAS-ELISA testi sonucunda örneklerin hiçbirisinde CMV ve CLRV enfeksiyonu olmadığı belirlenmiştir. Buna karşın ülkemizde Ege Bölgesi'nde Balıkesir, Çanakkale, İzmir ve Manisa illerindeki zeytin ağaçlarında DAS-ELISA testi sonucunda ArMV, CLRV, SLRSV ve CMV enfeksiyonlarının olduğu saptanmıştır (Fidan ve Ertem, 1995). Benzer çalışma Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Hatay ilinde yapılmıştır. Araştırma yöresinde toplam 180 ağaçtan örnek alınmış 86 adedinde (% 47.77) SLRSV, 83 adedinde (% 46.11) CLRV ve 58 adedinde (% 32.22) ArMV tespit edilmiştir. Aynı bahçelerden alınan 76 örnekte OLV-1, OLV-2 ve OLRV tespit edilmemiştir (Tarla ve Çağlayan, 1998). Başka bir çalışma ise Balıkesir, Bursa ve Aydın illerinde yürütülmüştür. Yine bu illerden toplanan örneklerden DAS-ELISA testi sonucunda CMV, CLRV, ArMV ve SLRSV virüsleri ve bunların karışık enfeksiyonları tespit edilmiştir (Belser ve Açıkgoz., 2005).

Zeytin virüslerinin tespit edilmesinde en yaygın kullanılan teşhis metodlarından biri RT-PCR yöntemidir. RT-PCR ile DNA'nın belirli bölümlerinin DNA polimeraz enzimi ve sentetik oligonükleotitler yardımı ile çok sayıda kopyası oluşturulmaktadır (Kreuzer and Massey, 1996). Zeytin virüslerinin tespit edilmesinde, DAS-ELISA yönteminin duyarlılığının düşük olması nedeniyle Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan 375 örnek 9 virüse ait spesifik primerler kullanılarak, RT-PCR yöntemine göre testlenmiştir. RT-PCR çalışmalarında virüslere özgü primer çiftleri kullanılarak CLRV, ArMV, SLRSV ve CMV adlı virüslere ait DNA bantları elde edilmiştir, buna karşın OLV-1, OLV-2, OLV-3, OLYaV ve OLRV'nün spesifik primerleri ile yapılan RT-PCR çalışmalarında, ilgili etmenlere yönelik DNA bantlarının oluşumu ise gözlenmemiştir. Çalışmamızda kullandığımız primer çiftleri çeşitli araştırmalarda RT-PCR testlerinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Grieco et al., 2000, Faggioli et al., 2005).

Araştırma kapsamında Aydın ilinden toplanan örneklerde RT-PCR testi sonuçlarına göre % 54.14 oranında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda, ArMV (% 21.01) en yaygın virüs olarak saptanırken, bunu sırasıyla CMV (% 11.46), CLRV (% 9.55) ve SLRSV (% 8.28) izlemiş ve 6 örnekte ise CMV ve CLRV'nün birlikte bulunduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3).

Balıkesir ilinde toplam 82 örnekte % 52.43 oranında virüs enfeksiyonu olduğu görülmektedir. Yapılan analizler sonucunda alınan örneklerde ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV enfeksiyonlarının bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca, örneklerde ArMV ve CLRV'nün % 4.87 oranında karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu belirlenmiştir. En yaygın virüs olarak Balıkesir ilinde CLRV (%24.39) saptanmış olup bunu sırasıyla SLRSV (% 12.19), CMV (% 7.31) ve ArMV (% 3.65) izlemiştir (Bkz. Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4).

İzmir ilinden alınan örneklerde RT-PCR yöntemi ile yapılan analiz sonuçlarına göre % 59.05 oranında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Örneklerde ArMV, CMV, CLRV ve SLRSV adlı virüslerin bulunduğu tespit edilmiştir. Testlenen örneklerde OLV-1, OLV-2, OLRV, OLYaV ve OLV-3 enfeksiyonu belirlenmemiştir. İzmir ilinde zeytin ağaçlarında ArMV (% 36.76) en yaygın viral etmen olarak belirlenirken, bunu sırasıyla CMV (% 8.82), SLRSV (% 8.08) ve CLRV (% 3.67) izlemiştir. Ayrıca toplanan örneklerde CMV ve CLRV'nün % 2,21 oranında karışık enfeksiyon şeklinde bulunduğu belirlenmiştir

(Bkz. Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5). Benzer çalışma Doğu Akdeniz Bölgesi illerinden (Hatay, Adana, Kahramanmaraş, Osmaniye) kamu fidanlığı, özel fidanlıklar ve ticari bahçelerde yürütülmüştür. Bu bahçelerden alınan örneklerde RT-PCR yöntemi ile yapılan analizler sonucunda OLV-1 ve SLRSV saptanmıştır (Ulubaş Serçe et al., 2007; 2009, Yalçın vd., 2007).

Ülkemizde zeytin virüslerinin saptanmasına yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır. Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda saptanan etmenler yönünden paralellik bulunmaktadır. Faggioli et al. (2002), İtalya'da zeytin ağaçlarının yapraklarında SLRSV'nün teşhisi için RT-PCR protokolünü geliştirmişler ve kullanmışlardır. RT-PCR protokolünün çok hızlı ve hassas olduğunu ve zeytin ağaçlarında çok fazla örnekteki SLRSV'nün teşhisi için kullanılabileceğini belirlemişlerdir. İspanya'da Bertolini et al. (2001), zeytin ağaçlarında yaptıkları RT-PCR çalışmaları ile CMV, CLRV, SLRSV, ArMV, OLV-1 ve OLV-2 adlı virüsleri tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda bu yöntemin sertifikasyon programlarında rutin olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

ArMV bu çalışma kapsamında, DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri sonucunda test edilen toplam 375 zeytin örneğinin % 10.13'ünde tespit edilmiştir. ArMV'nün zeytinlerdeki varlığı İtalya ve İspanya'dan bildirilmiş, Türkiye'de DAS-ELISA ile % 7.1, RT-PCR ile Suriye'de % 0.7 ve Lübnan'da % 0.3 oranında enfeksiyon yaptığı rapor edilmiştir (Martelli, 1999; Bertoloni et al., 2001; Çağlayan ve ark., 2004; Alabdullah et al., 2005; Fadel et al., 2005). ArMV'nin geniş bir konukçu dizisi olmasına rağmen, diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda zeytinlerde yaygınlığı oldukça düşük iken bu çalışmada Balıkesir dışında Aydın ve İzmir'de en fazla saptanan bir virüs olduğu görülmektedir.

Geniş konukçu dizisine sahip olan CMV, zeytinde de yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Test edilen toplam 375 zeytin örneğinden, % 9.6'sında CMV virüsü tespit edilmiştir. Türkiye'de Ege Bölgesi'nde yapılan çalışmada CMV enfeksiyonları zeytin yapraklarından ELISA testleri sonucunda % 24 oranında bildirilirken, zeytinin çiçeklerinden yapılan analizlerde % 21.9 oranında saptanmış bildirilmiştir (Fidan ve Ertem, 1995). Zeytin ağacında CMV enfeksiyonları ilk olarak İtalya daha sonra İspanya ve Portekiz gibi ülkelerden rapor edilmiştir (Savino and Galitelli, 1983; Bertolini et al., 2001; Rei et al., 1993). Etmen zeytin ağaçlarında yayılma göstermezken, son yıllarda Suriye'de CMV enfeksiyon oranı % 22.7 olarak bildirilmiştir (Alabdullah et al., 2005). CMV otsu konukçularında 60'dan fazla afit türü (*Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora* ve *Myzus persicae*

vb.) ile non-persistent şekilde ve mekanik yolla ve tohumla taşınabilmektedir. Ancak, zeytin ağaçlarında CMV enfeksiyonunun etiyojisi ve epidemiyolojisi tam olarak anlaşılabilmiş değildir ve bu konuda kaynak bulunmamaktadır.

Zeytin ağaçlarında CLRV enfeksiyonları, Türkiye’de DAS-ELISA yöntemine göre % 23 oranında (Çağlayan et al., 2004), RT-PCR yöntemine göre Suriye’de % 15 (Alabdullah, 2005), Lübnan’da % 2 (Fadel et al., 2005) ve İtalya’da % 4.9 (Faggioli et al., 2005) oranında enfeksiyona sebep olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma kapsamında test edilen 375 örneğin % 10,66’sında CLRV saptanmıştır. CLRV’nün zeytin ağaçlarında genel olarak latent bulunduğu belirtilmektedir.

Çok geniş bir konukçu dizisi ve yayılma alanı olan SLRSV, ilk kez 1979 yılında İtalya’da tespit edilmiş ve daha sonraları RT-PCR ile Portekiz’de (Henriques et al., 1992; Rei et al., 1993), İspanya’da (Bertolini et al., 1998) ve DAS-ELISA ile Türkiye’de (Çağlayan et al., 2004) arazi örneklerinde teşhis edilmiştir. İtalya’da SLRSV, DAS-ELISA yöntemi ile tespit edilememiştir (Martelli, 1999). Zeytin materyallerinin dsRNA analizleri ve PCR esaslı metotlar ile test edildiğinde DAS-ELISA ile elde edilen pozitif sonuçları onaylayamadığı için DAS-ELISA’nın bazı hatalı pozitif reaksiyonlar verdiği ileri sürülmüştür (Bertolini et al., 1998). Son yıllarda RT-PCR yöntemi survey çalışmalarında kullanılmış ve Suriye’de SLRSV % 5.7 (Alabdullah et al., 2005), Lübnan’da % 0.3 (Fadel et al., 2005) oranında SLRSV enfeksiyonları tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan primer çiftleri ile Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde toplam 375 örneğin % 9,33’ünde SLRSV enfeksiyonu olduğu tespit edilmiştir.

Toplam 375 adet zeytin örneğinin RT-PCR testleri sonucunda örneklerde. OLV-1’in olmadığı tespit edilmiştir. Zeytin virüslerinden OLV-1’in, gen bankasında kayıtlı 3 izolatu bulunmaktadır. OLV-1 virüsü ilk olarak İtalya’da zeytin ağaçlarında tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda Türkiye’de ve İtalya’da turunçgillerden, Japonya’da ise lalelerden izole edilmiştir (Martelli et al., 1996; Kanematsu et al., 2001). Hatay ilinde zeytin virüsleri konusunda yapılan çalışmada daha önce turunçgillerden izole edilen OLV-1 RT-PCR yöntemi ile testlenmiş ve Türkiye’ de zeytin ağaçlarında ilk kez tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe et al., 2007; Yalçın vd., 2007).

OLV-2 ilk kez İtalya'da tespit edilmiş (Savino et al., 1984) ve yayılma göstermemiştir (Faggioli et al., 2005), ancak Suriye'de yayılabilmiş (Alabdullah et al., 2005) ve % 2 oranında OLV-2 enfeksiyonu tespit edilmiştir (Fadel et al., 2005). Yapılan bu çalışmada, test edilen 375 zeytin örneğinde OLV-2 primerleri ile yapılan RT-PCR analizleri sonucunda örneklerde bu etmen belirlenmemiştir. OLV-2 *Bromoviridae* familyasının *Oleavirus* cinsinin monotipik bir türüdür ve yaygın olarak bulunmamaktadır. Son yıllarda Yunanaistan ve İtalya'da zeytinden farklı bir konukçu olan *Ricinus communis* bitkisinde bulunduğu bildirilmiştir (Grieco et al., 2002b; Parella et al., 2007).

OLRSV yapılan bu çalışma kapsamında, test edilen zeytin örneklerinde tespit edilmemiştir. Bu virüs ilk kez zeytinde İtalya'da tespit edilmiş (Savino et al., 1983) ve daha sonraları ise RT-PCR ile yapılan testler sonucunda, Suriye'de zeytin ağaçlarında % 11.5 oranında (Alabdullah et al., 2005) bulunduğu bildirilmiştir. Bu kayıtların dışında, zeytin ağaçlarında OLRSV enfeksiyonu kaydedilmemiştir.

OLYaV ilk olarak İtalya'da kaydedilmiştir (Savino et al., 1996), son yıllarda Suriye'de % 14.3 oranında (Alabdullah et al., 2005) ve Lübnan'da % 23.6 (Fadel et al., 2005) oranında enfeksiyon yaptığı tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında, İtalya'dan getirtilen (Dr. Francesco Faggioli) pozitif kontroller ve OLYaV ait spesifik primerlerle yapılan çalışma sonucunda pozitif kontrol çalışmış, ancak örneklerimizde virüs tespit edilmemiştir.

Proje çalışmalarının yürütülmesi sırasında zeytinde yeni bir viral etmen saptandığı, literatür taramaları sonucunda ortaya çıkmıştır. OLV-3 Akdeniz Bölgesi'nde 8 ülkeyi (İtalya, Suriye, Malta, Tunus, Portekiz, Türkiye, Lübnan, Yunanistan) kapsayan çalışmada RT-PCR yöntemi ile yapılan analizler sonucunda bu ülkelerin hepsinde farklı oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. En yüksek enfeksiyon oranının Türkiye (% 56), Yunanistan (% 42), Tunus (% 40) ve İtalya (% 30) belirlenmiştir (Alabdullah et al., 2009). Yapılan bu çalışma Türkiye'de % 56 oranında bir enfeksiyon olduğunu gösterdiği için OLV-3'de tez çalışmalarına dahil edilmiştir. Bu çalışma kapsamında OLV-3 spesifik primerleri ile yapılan RT-PCR analizleri sonucunda, elimizde bulunan örneklerde bu virüsün varlığı tespit edilmemiştir.

Aydın, Balıkesir ve İzmir illerine ait fidanlıklarından alınan 120 adet fidan örneklerinde yapılan analizler sonucunda; Aydın ilinde % 32.5, Balıkesir ilinde

ise % 45 ve İzmir ilinde % 35 oranlarında virüs enfeksiyonu olduğu tespit edilmiştir. Toplanan örneklerde İzmir ilinde % 27.5 CMV ve % 7.5 ArMV, Aydın ilinde % 20 CMV ve % 12.5 ArMV, Balıkesir ilinde ise % 30 CMV ve % 15 oranlarında ArMV adlı etmenlerin bulunduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). Beler ve Açıkgöz (2005) tarafından yürütülen çalışmada, Balıkesir, Bursa ve Aydın illerine ait fidanlıklardan alınan örneklerde CMV, CLRV, ArMV ve SLRSV virüsleri ve bunların karışık enfeksiyonları tespit edilmiştir. Zeytin fidanları virüs hastalıklarının önemli bir taşıyıcısıdır. Örneklerin alınması esnasında yapılan değerlendirme ve laboratuvar analizleri sonuçlarına göre ülkemizde zeytin fidanı üretimi yapılan yerlerde, zeytin fidanı üreticilerinin fidan üretiminde kullandıkları çelikleri ağaçlardan alırken hastalıklarla ilgili bilinçli bir seçim yapmadıkları gözlenmiştir. Böylece ağaçlarda varolan fungal, bakteriyel ve viral etmenleri çelikler vasıtasıyla fidanlıklara buradan da fidan satışlarıyla başka alanlara ve bölgelere taşımaktadırlar. Bilindiği gibi zeytin, virüs hastalıklarının simptomsuz taşıyıcısıdır ve zeytindeki viral etmenler üretim materyali ile taşınmaktadır (Barba, 1993).

Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden zeytin bahçelerinden ve fidanlıklardan alınan örneklerle yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar sonucunda CLRV, ArMV, SLRSV ve CMV için elde edilen baz uzunluğu değerlerinin (Bkz. Şekil 4.9,4.10,4.11,4.13) daha önce İtalya ve Mısır'da benzer primer çiftleri kullanılarak yürütülen araştırmalardakine (Faggioli et al., 2005; Laconsole et al., 2010; Youssef et al., 2010) uyumlu oldukları görülmüştür.

Çalışmanın yürütüldüğü üç ilde, Çizelge 3.2'de görülen ilçeleri temsil edecek şekilde her ilçeden birer örnek alınarak, toplam 27 örnekte kullanılan tanılama yöntemlerinin duyarlılığı karşılaştırılmıştır. Değişik örneklerin deneme sonuçlarından baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda, tanılama yöntemleri arasında RT-PCR yöntemi, zeytin örneklerinin tanılanmasında daha başarılı bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.8). RT-PCR sonucunda enfekteli çıkan 27 adet örnekte DAS-ELISA testi sonucuna göre yalnızca % 18.51 oranında enfeksiyon olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerin test bitkilerine inokulasyonu sonucunda beklenen belirtiler elde edilmemiştir. Bu durum zeytinde bulunan virüslerin düşük konsantrasyonda bulunması nedeniyle yeterli miktarda partikülün test bitkisine ulaşamadığı kanısını oluşturmaktadır. Ayrıca, test bitkisinde bulunan bazı maddelerin enfeksiyonu engellemiş olabileceği de düşünülmektedir. Ele alınan 27 örneğin 3 tanesinde semptom belirlenmiş ve RT-PCR sonucunda virüs enfeksiyonu olduğu ortaya konmuştur. Viral enfeksiyon belirlenen 24 örnekte

virüs benzeri belirtiye rastlanmamıştır. Birçok bitki türünde simptomlar virüs enfeksiyonlarının varlığı konusunda ilk kanıtı vermektedir. Yalnız zeytin için bunu söylemek pek mümkün değildir. Doğal enfeksiyonların çoğu simptomsuz (latent) olduğu ya da bu virüslerin belirli çeşitlerde simptom verirken başka çeşitlerde latent olarak bulunduğu belirtilmektedir (Martelli, 1999). Bu çalışma kapsamında alınan örneklerde bulunan virüslerle belirtiler arasında tam bir bağlantı kurulamamıştır. Alınan çoğu örnekte belirti olmamasına rağmen, diğer analizler sonunda çoğunda virüs saptanmıştır.

Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinden toplanan 375 örneğin DAS-ELISA testi sonuçlarına göre % 12.8'inde ArMV bulunduğu saptanırken, sadece 1 örnekte SLRSV saptanmıştır. RT-PCR analizi sonucunda örneklerin %22.93'ünde ArMV, % 9.6'sında CMV, % 10.66'sında CLRV, % 9.06'sında SLRSV enfeksiyonun var olduğu belirlenmiştir. 9 örnekte CMV+ CLRV, 4 örnekte ise ArMV+CLRV karışık enfeksiyon şeklinde tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.10 ve Şekil 4.18-4.19). Bu sonuçlar doğrultusunda bakıldığında, RT-PCR yöntemin DAS-ELISA yönteminden daha duyarlı olduğu görülmektedir. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda da RT-PCR yönteminin duyarlılık ve güvenilirlik yönünden DAS-ELISA'dan daha iyi bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Zeytin ağaçlarında SLRSV, CMV, CLRV ve ArMV gibi virüsler, Portekiz ve İtalya'da DAS-ELISA yöntemi ile başarılı bir şekilde saptanırken, İtalya'da bu yöntemden başarılı sonuçlar alınamamıştır. Zeytin dokularından kısmen arıtılmış ekstraktlarda TMV DAS-ELISA ile ortaya koyulmuş, ancak klasik DAS-ELISA tekniğinin zeytin virüslerinin rutin ve hassas teşhislerinde örnekteki virüs konsantrasyonu çok düşük olduğu için, uygun bir teknik olmadığını belirtmişlerdir (Triolo et al., 1996). Son olarak uygun antiserum (tanı kiti) sayısının az olması nedeniyle DAS-ELISA yönteminin zeytinde saptanan virüslerin çoğu için uygulanma durumu pek fazla olmamaktadır. Ayrıca, fenolik madde içeriği yüksek olan zeytin dokularının DAS-ELISA ile test edilmesinin güvenilir bulunmadığı belirtilerek, testlemelerde dsRNA ve PCR gibi moleküler yöntemlerin kullanılması gerekliliği ifade edilmektedir (Henriques et al., 1992; Rei et al., 1993; Félix et al., 2002; Bertolini et al., 1998; Martelli, 1999; Martelli et al., 1996; Martelli, 1999; Grieco et al., 2000; Faggioli et al., 2005; Bertolini et al., 2001) .

Virüslerin kültür bitkilerine verdiği zararlarla ilgili pek çok kayıt bulunmaktadır. Ancak, ülkemizde hangi virüsün, hangi bitkide ne kadar zarara sebep olduğu, bu zararların verim ve kaliteye olan etkisi ve ekonomik analizi ile

ilgili veriler, henüz yeterince mevcut değildir. Zeytin virüslerinin verim ve kalite üzerine etkilerini araştıran çalışmalar ülkemizde hiç yapılmadığı gibi dünya literatüründe de SLRSV dışında son derece sınırlıdır. Bazı araştırmacıların yapmış olduğu denemeler sonucunda, yaprak ve meyvelerde hastalık simptomsu gösteren ağaçlardan alınan aşı çubuklarının simptomsu göstermeyenlerden alınanlara oranla daha düşük seviyede köklenme yeteneğine sahip olduklarını bildirmişlerdir (Rei et al., 1993). SLRSV'nün cv. Ascolana tenera çeşidinde yapraklarda daralma, bükülme, çalılışma ve ürün azalmasına sebep olduğu belirtilmektedir (Marte et al., 1986; Rebenstorf et al., 2006). CLRV'nün Avrupa'da ceviz yetiştiriciliğinde ekonomik zarar neden olduğu, son yıllarda Amerika'da kiraz ağaçlarında ürün azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Çağlayan et al., 2007).

Zeytin ağaçlarında CLRV'nün ekonomik önemine ilişkin bir kayıt olmamasına rağmen, bu konuda yeni bir çalışma Hırvatistan'da yapılmıştır. Frantoio ve Ascolana tenera çeşitlerinden elde edilen sızma zeytinyağının kalitesine, miktarına ve kimyasal özelliklerine CLRV'nün etkisini saptamak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. CLRV ile enfekteli zeytinlerde, sağlıklı olanlara göre yağ miktarı ve olgunluk indeksi oldukça düşük çıkmıştır. Enfekteli ağaçların meyvelerinden elde edilen yağın K_{232} ve K_{270} değerleri düşük, toplam fenolik bileşik içeriğinin ise çok yüksek olduğu bildirilmiştir (Godena et al., 2012).

Bu çalışma kapsamında yapılan verim ve meyve kalite analizlerinde; ağaç başına verim 1. bahçede tek başına SLRSV ile enfekteli ağaçta 179 kg tespit edilirken, kontroldeki ağaç başı verim ise 218 kg olarak belirlenmiştir. 2. bahçede tek başına SLRSV ile enfekteli ağaçta verim 118 kg olarak belirlenirken, kontroldeki ağaç başına verim 157 kg olarak saptanmıştır. Meyve ağırlığında, her iki bahçede de virüs saptanan ve virüs saptanmayan ağaçlar arasında ağırlık açısından fark belirlenmiştir. Meyve hacminde, yine her iki bahçede de virüs saptanan ve virüs saptanmayan zeytinlerde hacim açısından fark olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma olgun bitkilerde ve sadece bir yıllık verilerle değerlendirilmiş olup, virüs enfekteli ve sağlıklı bitkiler arasında fark olduğu görülmüştür. Bunun en önemli sebebinin virüs enfeksiyonlarının çok yıllık bitkilerin verim ve kalitesine uzun yıllar sonra belirgin etki yapması olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, virüs enfeksiyonlarının bitkilerde verim kalite ve gelişme üzerine etkilerinin belirlenmesi için yapılacak çalışmaların, gelişme

döneminde olan bitkilerle ve 5-10 yıllık dönemler halinde yapılması gerekmektedir.

Araştırmacıların elde ettiği bulgulara göre, genelde virüs hastalıklarının meyve verim ve kalitesine, morfolojik olarak bazı farklılıklara neden olduğu bildirilmiştir. Ancak, virüslerin verim ve kaliteye etkileriyle ilgili yapılacak çalışmaların, fidan döneminden itibaren enfekte edilecek virüslerin gözlenmesine dayanarak planlanmasıyla elde edilecek sonuçların daha sağlıklı olacağı belirtilmektedir. Virüs hastalıklarının etkilerinin belirlenmesinde, ancak meyve ağaçlarındaki verim ve kalite kriterlerindeki değişikliklerin, uzun yıllar etkileri belirlenerek, daha net verilerin ortaya konulacağı ifade edilmiştir (Kaymak vd. 2012).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

2009 ve 2012 yılları arasında Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde ve bu illere ait fidanlıklarda yürütülen bu çalışma ile, zeytinlerde enfeksiyon yapan virüsler ve bu virüslerin bulunma durumları belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile zeytin üreticiliği açısından önemli bir potansiyele sahip bu üç ilde, zeytin ağaçlarındaki viral etmenlerin son durumu ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Araştırmanın ilk bölümünde, elde edilen sonuçlara göre; ülkemiz için ekonomik yönden önemi olan zeytin ağaçlarından alın örneklerde, virüslerin tek başlarına mevcut olmalarının yanında, bazı örneklerde karışık enfeksiyonlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Araştırma süresince biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile test edilen 375 bitki örneğinde DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemi ile yapılan analizler sonucunda % 55.73 oranında viral enfeksiyonlar olduğu ortaya konmuştur. Aydın, Balıkesir ve İzmir illerinde fidanlıklardan alınan 120 fidan örneğinde ise, % 37 oranında enfeksiyon olduğu belirlenmiştir. Viral etmenlerin fidanlıklarda saptanmasıyla, ağaçlarda bulunan etmenlerin çelikler vasıtasıyla fidanlıklara ve buradan ise fidan satışıyla diğer alanlara ve bölgelere taşınabildiği gözlenmiştir.

Tüm zeytin virüslerine karşı teşhis amacıyla kullanılan antiserumların bulunmaması ve ağaçta virüs konsantrasyonunun düşük olması nedenleriyle DAS-ELISA'nın zeytin virüslerinin teşhisinde güvenilir olmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. RT-PCR testlerinin, özellikle zeytin virüslerinin tanılmasında duyarlı ve güvenli bir yöntem olduğu belirlenmiştir. ELISA testleri ile saptanmayan enfeksiyonların RT-PCR yöntemi ile tanınması, bu moleküler yöntemin etkinliğini vurgulamaktadır. Çok düşük orandaki enfeksiyonların hızlı ve güvenilir bir şekilde saptanabilmesi için, RT-PCR gibi duyarlı yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Böylece, fidan üretiminde ve ithalatında alınacak önlemler ile virüsten arı fidanların üreticiler tarafından kullanılması sağlanacak ve böylece zeytin üretiminde verim ve kaliteyi artırmak mümkün olacaktır.

Çalışmanın ikinci bölümünde, zeytin virüslerini verim ve kaliteye etkisi konusundaki parametreler incelenmiştir. Bu amaçla yapılan alan denemelerinde virüs saptanan ağaçlarda hem verimde, hem de meyve kalitesinde azalma olduğu istatistikî analizlerle ortaya konmuştur.

Bu sonuçlardan yola çıkarak;

- Zeytin ağaçları ortalama 100 yıl süre ile ekonomik olarak verim verebildiğinden, yeni bir bahçe kurarken virüsten arı temiz üretim materyali ile bahçeyi tesis etmek, verim ve kaliteyi arttıracığından üreticilere sağlıklı ve temiz fidan temininin sağlanması bu konuda yapılacak çalışmaların başında gelmelidir.
- Ülkemizde zeytin virüs hastalıklarının saptanması üzerinde fazla çalışma olmadığından ve zeytin bitkisinin virüs hastalıklarının simptomsuz taşıyıcısı olduğundan, ülkemiz fidanlıklarının ve bu fidanlıkların tesisinde kullanılan anaçların virüs hastalıkları açısından incelenmesi, hastalıklarla enfekteli olanların tespiti ve mevcut virüs hastalıklarının tanımlarının yapılması ve böylece virüs hastalıklarıyla etkili bir şekilde mücadele yoluna gidilmesi gerekmektedir.
- Yapılan bu çalışma ile, gerek zeytin bahçelerinde gerekse fidanlıklarda viral etmenlerin yüksek düzeyde görülmesi, bölgede virüs hastalıklarının potansiyel tehlikesini ortaya koymaktadır. Bu nedenle zeytinde virüssüz üretim materyali elde etmek için fidanlardan değil, fidanlar yerine temin edildiği damızlıklardan alınacak olan örneklerle ilgili testler uygulanmalıdır. Yapılacak testlerden sonra, virüssüz olduğu belirlenen damızlıklar seçilmeli ve bu damızlıklardan fidan üretilmelidir.
- Uygun antiserum (tanı kiti) sayısının az olması nedeniyle DAS-ELISA yönteminin zeytinde saptanan virüslerin çoğu için uygulanma durumu pek fazla olmamaktadır. Ayrıca, fenoloik madde içeriğinin yüksek olması ve ağaçta virüs konsantrasyonunun düşük olması gibi nedenlerle DAS-ELISA yönteminin zeytin virüslerinin teşhisinde güvenilir olmadığı belirtilerek, testlemelerde dsRNA ve PCR gibi moleküler yöntemlerin kullanılması gerekliliği, çeşitli araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir. Yapılan bu çalışma ile RT-PCR'ın DAS-ELISA yönteminden daha güvenilir ve etkili olduğu bir kez daha belirlenmiştir. Bu sonuçlar, zeytin ağaçlarında viral etmenlerin saptanmasında, DAS-ELISA yönteminin yeterli olmadığını daha hassas bir yöntem olan RT-PCR kullanılması gerekliliğini bir kez daha ortaya koymuştur.
- Zeytin virüslerinin bazıları toprak kökenli (SLRSV, ArMV, TNV) olmasına rağmen, bazıları ya temasla (TMV) ya da tohumla (CLRV ve OLV-1), yaprak biti ile (CMV) veya aşı yoluyla yayılmaktadır. Bununla

birlikte, arazi koşullarında zeytin virüslerinin taşınma mekanizması hakkında sınırlı bilgi mevcut olup, virüslerin ağacın genelinde herhangi bir ekonomik öneme sahip olup olmadığına dair, şimdiye dek yapılan kesin bir araştırma bulunmamaktadır. Çalışmaların bu yöne doğru kaydırılması gerekmektedir.

- Virüsün yayılmasında vejetatif çoğaltım materyallerinin yanı sıra vektörler ve vektörlere ara konukçuluk yapan yabancı otlarda etkili olmaktadır. Virüs enfeksiyonlarıyla kimyasal mücadele mümkün olmadığından, etkili kontrol yöntemleri 'koruyucu önlemler' üzerine dayanmaktadır. Mevcut virüs inokulum kaynakları yok edilmeli, arazi içerisinde etkili mücadele yöntemleri geliştirilmeli ve uygun kültürel uygulamalar kullanılmalıdır.
- Zeytin ağaçları konusunda İtalya, İspanya ve Portekiz'de ulusal ve uluslar arası marketlere virüsten arı üretim materyali sağlama ve virüs yayılımını engelleme amacıyla çeşitli sertifikasyon programları başlatılmıştır. Bu nedenle Türkiye'de de sertifikalı ve virüs etmenlerinden arı temiz üretim materyalinin elde edilmesini sağlayacak temel tekniklerin ortaya konması ve zeytin fidan sertifikasyonunun yeniden gözden geçirilmesi gerekmektedir.
- Virüslerin meyve ağaçlarında verime ve kaliteye etkileriyle ilgili yapılacak çalışmaların uzun ve zahmetli olması bu konuda çalışma yapan araştırmacı sayısını kısıtlamaktadır. Ülkemizde bu konuda çalışma yapan virolog ve agronomistlerin meyve verimi, meyve kalitesi ve depo koşullarına dayanıklılık üzerine olumsuz etkisi olabilecek bu hastalıkların, bütün meyve türlerinde ve anaçlarında daha detaylı olarak araştırma yapılması ve mücadelesine yönelik bulgular elde edilmesine ihtiyaç vardır.
- Çok yıllık ağaçlarda verim ve kaliteyi etkileyen pek çok çevresel ve yetiştiricilik faktörünün olması, virüslerin etkisini tespit etmemizi zorlaştırmaktadır. Virüs hastalıklarının etkilerinin belirlenmesinde, ancak meyve ağaçlarındaki verim ve kalite kriterlerindeki değişikliklerin, uzun yıllar etkilerinin belirlenerek, daha net ortaya konulacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alabdullah, A., El Beaino, T., Saponari, M., Hallak, H. and Digiario, M.,** 2005. Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Syria. *EPPO Buletin* 35 (2): 249-252.
- Alabdullah, A., Elbeaino, T., Minafra A., Digiario, M. and Martelli G.P.,** 2009, Detection and variability of *olive latent virus 3* in the mediterranean region. *Journal of Plant Pathology* 91 (3): 521–525.
- Albanese, G., Faggioli F., Ferretti L., Sciarroni R., Rosa R., Barba, M.,** 2004, Sanitary status evaluation of olive cultivars in Calabria and Sicily. *Journal of Plant Pathology* **85**: 304.
- Alkowni, R., Grieco, F. and Martelli, G.P.,** 2001, Complete nucleotide sequence of RNA-2 of olive latent ring spot virus. *Archives of Virology* 146 (1): 127-133.
- Bakırhoğlu, D.,** 2006, Avrupa Birliğindeki Önemli Zeytinyağı İhracatçıları ve Türkiye, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi İşletme Fakültesi, 152 s.
- Barba, M.,** 1993, Viruses and virus-like diseases of olive. *EPPO Buletin* 23: 493-497.
- Belir, Ö. ve Açıkgöz, S.,** 2005, Ege ve Marmara Bölgelerindeki zeytin fidanlıkları ve ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının Elisa testi ile saptanması. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 2(1) : 79 - 84
- Bertolini, E., Fadda, Z., Garcia, F., Celada, B., Olmos, A., Gorris, M. T., Del Rio, C., Caballero, J., Duran-Vila, N. and Cambra, M.,** 1998, Virus diseases of olive detected in Spain. New diagnostic methods. *Phytoma España* 102: 191-193.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bertolini, E., Olmos, A., Gorris, M.T., Martinez, M.C. and Cambra, M.,** 2001, Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol. Methods* 96: 33-41.
- Bora, T. ve Karaca, İ.,** 1970, Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi, E.Ü. Zir. Fak. Yardımcı Ders Kitabı. No: 167. Bornova 43 p.
- Borodynko, N., Hasiów-Jaroszewska, B. and Pospieszny, H.,** 2010, Identification and characterization of an Olive Latent Virus 1 isolate from a new host: *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Pathology* 92 (3): 789-792
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J.,** 1996, `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/> (Erişim tarihi: 25 Ağustos 2012).
- 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 europea* L. *Archives of Virology*. 150: 815-823.
- Candresse, T., Lannneau, T., Revers, F., Grasseau, N., Macquaire, G., German, S., Malinowsky, T., Dunez, J.,** 1995, An Immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of apple chlorotic leafspot virus. *Acta Horticulturae*, 386: 136-147.
- Çağlayan, K., Fidan, U., Tarla, G., and Gazel, M.,** 2004, First report of olive viruses in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 86 (1): 89-90.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çağlayan, K., Ulubaş Serçe, Ç. and Gazel, M.,** 2007, Olive Viruses. Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses. Vol. 1: Industrial Crops. p. 305-338.
- Çavuşoğlu, A.,** 1980, Ege Bölgesinin Belli Başlı Yerli ve Yabancı Zeytin Çeşitlerinin Pomolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Sonuç Raporu. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, İzmir.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.,** 1977, Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- Demirci, M. ve Bölükbaşı, B.,** 2003, “Akdeniz Beslenme Tarzında Zeytinyağının Önemi”, Türkiye 1. Zeytinyağı ve Sofralık Zeytin Sempozyumu Bildirileri, s.41-48.
- El Air, M., Mahfoudi, N., Digiario, M., Najjar, A. and Elbeaino, T.,** 2010, Detection of olive-infecting viruses in Tunisia. *Journal of Phytopathology* (2011) 159: 283-286.
- Erkan, S., Özaktan, H., Yorgancı, Ü. ve Yoltaş, T.,** 1995, Sanayi domatesi tohum örneklerinde domates mozaik virüsü ve bakteriyel solgunluk etmenlerinin bulunma durumunun saptanması üzerinde araştırmalar. Sanayi Domates Üretimini Geliştirme Projesi çalışma Raporu. İzmir, 47.
- Fadel, C., Digiario, M., Choueiri, E., El Beaino, T., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P.,** 2005, On the presence and distribution of olive viruses in Lebanon. *OEPP/EPPO Bulletin* 35: 33-36.
- Faggioli, F. and Barba, M.,** 1995, An elongated virus isolated from olive (*Olea europaea*). *Acta Horticulturae* 386, p. 593-599.
- Faggioli, F., Ferretti, L., Pasquini, G., and Barba, M.,** 2002, Detection of *Strawberry latent ring spot virus* in leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology* 150: 636-639.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Faggioli, F., Ferretti, L., Albanese, G., Sciarroni, R., Pasquini, G., Lumia, V. and Barba, M.**, 2005, Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 87 (1): 49-55.
- Food and Agriculture Organization Statistics Division.**
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
 (Erişim Tarihi: 05 Nisan 2012).
- Felix, M.R.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. Proceedings of 4th International Symposium on Olive Growing. *Acta Horticulturae* 586 (2): 725-727.
- Felix, M.R.F., Clara, M.I.E., Leitao, F.A. and Fernandes Serrano, J.M.**, 2002, Virus incidence in four *Olea europaea* cultivars evaluated by mechanical inoculation and immunological assays. Proceedings of 4th International Symposium on Olive Growing. *Acta Horticulturae* 586 (2): 721-723.
- Felix, M.R. and Clara, M.I.E.**, 2006, Characterization of viruses occurring on *Olea europaea* L. In: Rao G.P., Valverde A., Dovas C.I. (eds). *Techniques in Diagnosis of Plant Viruses*, pp. 173-216. Studium Press, Houston, TX, USA.
- Felix, M. R., Cardoso J.M.S., Oliveira, S. and Clara, M.I.**, 2007, Biological and molecular characterization of *Olive latent virus-1*. *Plant Viruses* 1 (2): pp. 170-176. Global Science Books ISSN: 1749-6209 UK.
- Fidan, Ü. ve Ertem, G.**, 1995, Ege Bölgesi'ndeki zeytin ağaçlarında virüs hastalıklarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi üzerinde araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, s. 555.
- Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J. and Candresse, T.**, 2001, Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo, and Foveaviruses by nested RTPCR using degenerated and inosine-containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae* 550: 37-44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gallitelli, D. and Savino, V.**, 1985, Olive latent virus 1. A single RNA spherical virus isolated from olive in Apulia (southern Italy). *Annals of Applied Biology* 106: 295-303.
- Grieco, F., Martelli, G.P., Savino, V. and Piazzolla, P.**, 1992, Properties of olive latent virus 2. *Rivista di Patologia Vegetale* 2 (S.V): 125-136.
- Grieco, F., Martelli, G.P. and Savino, V.**, 1995, The nucleotide sequence of the RNA3 and RNA4 of olive latent virus 2. *Journal of General Virology* 76: 929-937.
- Grieco, F., Savino, V. and Martelli, G.P.** 1996, Nucleotide sequence of the genome of a citrus isolate of olive latent virus 1. *Archives of Virology* 141 (5): 825-838.
- Grieco, F., Saponari, M., Alkowni, R, Savino, V. and Martelli, G.P.**, 2000, Molecular detection of olive viruses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 30: 469-473.
- Grieco, F. R., Alkowni, M., Saponari, Pantaleo, V., Savino, V. and Martelli, G.P.**, 2002a, Molecular detection of Olive-Infecting Viruses. *Acta Hort.* 586: 737-740.
- Grieco, F. R. Parrella, G. and Vovlas, C.**, 2002b, An isolate of *Olive latent virus -2* infecting Castor Bean in Greece. *Journal of Plant Pathology*, **84** (2): 129-131.
- Godena, S., Bendini, A., Giambanelli, E., Cerretani, L., Dermic, D. and Dermic, E.**, 2012, Cherry leafroll virus: impact on olive fruit and virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 114(2).
- Henriques, M.I.C., Rei, F.T., Leitão, F.A., Serrano, J.F. and Potes, M.F.**, 1992, Virus diseases in *Olea europaea* L. cultivars. I. Immunodiagnosis of Strawberry latent ring spot nepovirus. *Phytopathologia Mediterranea* 31: 127-132.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- International Olive Oil Council.** www.internationaloliveoil.org (Erişim Tarihi: 8 Ağustos 2012).
- Kanematsu, S., Taga, Y. and Morikawa, T.,** 2001, Isolation of Olive latent virus 1 from tulip in Toyoma prefecture. *J. Gen. Plant Pathol.* 67:333-334.
- Kaya, H. ve Tekintaş, F.E.,** 2006, Aydın ilinde yetiştirilen yamalak sarısı mahalli zeytin çeşidinin fenotipik özelliklerinin tanımlaması. *ADU Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(2): 69-76.
- Kaymak, S., Öztürk, Y., Çevik, B., İşçi, M., Şenyurt, H., Atay, E. ve Akol, S.,** 2012, Elma virüs hastalıklarının Granny Smith elma çeşidinde verime ve kaliteye olan etkisi. *Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (SONUÇ RAPORU)*.
- Kreuzer, H. and Massey, A.,** 1996, Recombinant DNA and biotechnology, A guide for students. American Society for Microbiology. Washington D.C., 542.
- Loconsole, G., Saponari, M., Faggioli, F., Albanese, G., Bouyahia, H., Elbeaino, T., Materazzi, M., Nuzzaci, M., Prota, V., Romanazzi, G., Trisciuzzi, N. and Savino, V.,** 2010, Inter-laboratory validation of PCR-based protocol for detection of olive viruses. *EPPO Bulletin* 40 (3): 423-428.
- Luigi, M., Mangli, A., Thomaj, F., Buonauro, R., Barba, M. and Faggioli, F.,** 2009, Phytosanitary evaluation of olive germplasm in Albania. *Phytopathol. Mediterr.* 48: 280-284.
- Luigi, M., Godena, S., Dermic, E., Barba, M. and Faggioli, F.,** 2011, Detection of viruses in olive trees in Croatian Istria. *Phytopathol. Mediterr.* 50: 150-153.
- MacKenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. and Green, M.,** 1997, Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 81: 222-226.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Merciega, V., Boscia, D. and Savino, V.,** 1996, Comparison of five isolates of Olive latent virus 1. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 1-8.
- Marte, M., Gadani, F., Savino, V. and Rugini, E.,** 1986, Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in central Italy. *Plant Disease*, 70: 171-172.
- Martelli, G.P. and Gallitelli, D.,** 1985, Virus diseases of olive. *Italia Agricola* 122: 150-156.
- Martelli, G.P., Savino, V., Di Terlizzi, B., Catalano, L., Sabanadzovic, S. and Greco, N.,** 1995, Viruses and certification of olive in Apulia. *Acta Hort.* 386: 569-573.
- Martelli, G.P., Yılmaz, M.A., Savino, V., Baloğlu, S., Grieco, F., Güldür, M.E., Greco, N. and Laforteza, R.,** 1996, Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a new necrovirus. *Eur. J. Plant Path.* 102: 527-536.
- Martelli, G.P.,** 1999, Infectious diseases and certification of olive: an overview. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 29: 127-133.
- 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. Università di Pisa (IT) (in Italian).
- Matthews, R.E.F.,** 1991, *Plant Virology*, 3rd ed., Acad. Pres, New York, 897 pp.
- Miran, B.,** 2002, *Temel İstatistik*, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova. 189s.
- Nogay, A.,** 1983, Marmara Bölgesi *Cucurbitaceae* Familyası Kültür Bitkilerinde Görülen Virüs Hastalıklarının Tanılanması, Tohumla Geçiş Durumlarının ve Konukçu Dizilerinin Saptanması Üzerinde Araştırmalar. (Doktora tezi). Erenköy- İstanbul, 120 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Öztürk, F.**, 2008, “Türkiye’de ve Dünyada Zeytincilik Sektörü”, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, Basılmamış Bilgisayar Kayıtları (İzmir – 2008).
- Pantaleo, V., Saponari, M. and Gallitelli, D.**, 2001, Development of a nested PCR protocol for detection of olive-infecting viruses in crude extracts. *J. Plant Pathol.* 83 (2): 143-146.
- Parrella, G., De Stradis, A. and Vovlas, C.**, 2007, First report of *Olive latent virus 2* in wild castor bean (*Ricinus communis*) in Italy. *New Disease Reports* 15: 34.
- Pesante, A.** 1938, On an unknown disease of olive. *Bollettino della Stazione di Patologia Vegetale, Roma*, 18: 401-428.
- Rebenstorf, K., Candresse, T., Dulucq, M. J., Büttner, C. and Obermeier, C.**, 2006, Host species dependent population structure of a pollen-borne plant virus, Cherry leaf roll virus. *Journal of Virology* 80: 2453-2462.
- Rei, F.T., Henriques, M.I.C., Leitao, F.A., Serrano, L.F. and Potes, M.F.**, 1993, Immunodiagnosis of cucumber mosaic cucumovirus in different olive cultivars. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 23: 510-514.
- Sabanadzovic, S., Abou, G.N., Notte, P., Savino, V., Scarito, G. and Martelli, G.P.**, 1999, Partial molecular characterisation and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *J. Plant Pathol.* 81: 37-45.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.**, 1989, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (US).
- Saponari, M., Alkowni, R., Grieco, F., Driouech, N., Hassan, M., Di terlizzi, B., Digiario, M., Pantaleo, V., Savino, V. and Martelli, G.P.**, 2002, Detection of olive-infecting viruses in Mediterranean basin. *Acta Horticulture* 586: 787-790.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P.**, 2002, Seed transmission in olive of two olive-infecting viruses. *J. Plant Pathol.* 84 (3): 167-168.
- Saponari, M. and Savino, V.**, 2003, Virus ed agenti virus-simili dell'olivo. *Informatore Fitopatologico*, p. 25-29.
- Savino, V., Barba, M., Gallitelli, D. and Martelli, G.P.**, 1979, Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Pytopathologia Mediterranea* 18: 135-142.
- Savino, V. and Gallitelli, D.**, 1981, Cherry leafroll virus in olive. *Phytopathologia Mediterranea* 20: 202-203.
- Savino, V. and Gallitelli, D.** 1983, Isolation of *cucumber mosaic virus* from olive in Italy. *Pytopathologia Mediterranea* 22: 76-77.
- Savino, V., Gallitelli, D. and Barba, M.**, 1983, Olive latent ringspot virus, a newly recognized virus infecting olive in Italy. *Annals of Applied Biology* 103: 243-249.
- Savino, V., Piazzolla, P., Di Franco, A. and Martelli, G.P.**, 1984, Olive latent virus 2, a newly recognized virus with differently shaped particles. *Proceeding of the VI Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Cairo 1984*, p. 24-26.
- Savino, V., Sabanadzovic, S., Scarito, G., Laviola, C. and Martelli, G.P.**, 1996, Two olive yellows of possible origin in Sicily *Informatore Fitopatologico* 46 (5): 55-59.
- Türkiye İstatistik Kurumu.** <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim Tarihi: 01 Temmuz 2012)
- Tarla, G. ve Çağlayan, K.**, 1998, Hatay yöresinde yetişen zeytin ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının serolojik olarak saptanması. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Ankara, s. 239-243.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Triolo, E., Materazzi, A. and Toni, S.,** 1996, An isolate of Tobacco mosaic tobamovirus from *Olea europaea*. *Advances in Horticultural Science*, 10: 39-45.
- Ulubaş Serçe, Ç., Yalçın, S., Gazel, M., Çağlayan, K. and Faggioli, F.,** 2007, First report of *Olive latent virus-1* from olive trees in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 89 (3):73.
- Ulubaş Serçe, Ç., Yalçın, S., Gazel, M. ve Çağlayan, K.,** 2009, Doğu Akdeniz Bölgesi zeytin ağaçlarında *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)'ün saptanması ve karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, s.174.
- Valverde, K.A., Nameth, S.T. and Jordan, R.L.,** 1990, Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. The American Phytopathological Society. *Plant Disease* 74: 255-258.
- Yalçın, S., Ulubaş Serçe, Ç., Çağlayan, K. and Gazel, M.,** 2007, Doğu Akdeniz Bölgesi zeytin ağaçlarındaki virüslerin RT-PCR ile belirlenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, s.307.
- Yorgancı, Ü.,** 1975, İzmir İlinde Domateslerdeki Virüs Hastalıkları, Yayılma ve Zarar Durumları, Elde Edilen İzolatlarla Biyolojik ve Serolojik Araştırmalar (Doçentlik Tezi). TOAG/127 No'lu Proje Nihai Raporu. Ege Üniv. Ziraat Fak. Bornova-İzmir. 102 s.
- Youssef, S.A., Moawed, S.M., El-Sayed, M. and Shalaby, A.A.,** 2010, Detection of olive tree viruses in Egypt by one-step RT-PCR. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 427 p.

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı, 29/12/1977 tarihinde Erzurum'da doğdu. İlkokul öğrenimini Erzurum, ortaokul ve lise öğrenimini ise İzmir'de tamamladı. 1995 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ne kayıt oldu. 1999 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden mezun oldu ve Ziraat Mühendisi ünvanını aldı. 2001 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve 2002 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ne Tahsisli Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2005 yılında “*Bursa ve Çanakkale İllerinde Bazı Yörelerde Üretilen Şeker Pancarı Bitkilerindeki Viral Hastalıkların Saptanması*” konulu yüksek lisans tezini tamamladı ve aynı yıl Bornova Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsüne atandı. 2006 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. Halen aynı enstitüde, viroloji laboratuvarında görev yapmaktadır.

EKLER

Ek 1 TNA ekstraksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

Ek 1 TNA ekstraksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

Tampon	Malzemeler	Miktar	Not
Grinding buffer pH 5.6-5.8	Guanidine thiosianate. NaOAc, pH 5.2 EDTA. KOAc PVP-40	4M 0.2 M 25 mM 1.0 M 2.5%	CH ₃ COOH ekleyerek pH ayarlanır ve otoklavda sterilize edilir. 4°C'de saklanır.
NaI	Na ₂ SO ₃ NaI (Sigma S8379)	0.75 g 36 g	40 ml distile suda çözdürülür. Otoklav ile sterilize edilir. 4°C'de saklanır.
Silika çözeltisi pH 2.0	Silika partikülü (Sigma 12% S5631)	12 %	Mezürün içine 6 g silica ve ardından 50 ml'ye kadar saf su konulur. Mezürün ağzı parafilm ile iyice sarılır ve tamamen çözüne kadar çalkalanır. 1 gün bu şekilde bekletilir. 1 gün sonra sıvı kısım atılır. (yaklaşık 47 ml) Mezürün alt kısmında katı kısım ve 1-2 ml sıvı kalıyor. Bu kısım tekrar saf su ile 50 ml'ye tamamlanır. 1 gün daha beklenir ve aynı şekilde 1 gün sonra sıvı kısım atılır (44 ml). Kalan katı kısım ve 1-2 ml sıvı kısım iyice tamamen çözüne kadar karıştırılıp bir kapa alınır. HCL ile pH 2'ye ayarlanır. Otoklav ile sterilize edilir. Karanlıkta oda sıcaklığında saklanır.
Washing buffer 1x	Tris-HCl, pH7.5 (1 M) EDTA (5 M) NaCl (0.5 M) Ethanol	10.0 mM 0.5 mM 50.0 mM 50 %	Etanol eklemeyen önce otoklav ile sterilize edilir. 4°C'de saklanır.