

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. <i>Olive latent-1 virus</i> (OLV-1, Zeytin latent-1 virüsü).....	6
2.2. <i>Olive latent -2 virus</i> (OLV-2, Zeytin latent-2 virüsü).....	10
2.3. <i>Olive latent ringspot virus</i> (OLRSV; Zeytin latent halkalı leke virüsü).....	11
2.4. <i>Olive vein yellowing associated virus</i> (OVYaV; Zeytin damar sararması ile ilişkili Virüs).....	12
2.5. <i>Olive yellow mottling and decline associated virus</i> (OYMDaV; Zeytin sarı benek ve gerileme ile ilişkili virüs).....	13
2.6. <i>Olive leaf yellowing associated virus</i> (OLYaV; Zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs).....	14
2.7. <i>Olive semi latent virus</i> (OSLV; Zeytin yarı latent virüsü).....	15
2.8. <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV; Çilek latent halkalı leke virüsü).....	15
2.9. <i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV; Kiraz yaprak kıvrıklık virüsü).....	18
2.10. <i>Arabidopsis mosaic virus</i> (ArMV; Arabis mozaik virüsü).....	19
2.11. Diğer Virüsler	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1 Bitki Materyali/ Survey Çalışmaları.....	23
3.1.2. Test edilen virus etmenleri ve virus ile enfekteli pozitif kontrol örnekleri.....	23
3.2. Yöntem.....	24

3.2.1 Survey Çalışmaları ve Bitki Materyalinin Temini.....	24
3.2.2 Materyalin Muhafazası.....	24
3.2.3 Moleküler Çalışmalar	24
3.2.3.1. Nükleik Asit İzolasyonu	24
3.2.3.2. Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR; Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction).....	27
3.2.3.3. RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi : Agaroz Jel Elektroforezi.....	29
3.2.4. Baz dizilerinin temini ve filogenetik analizler.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Arazi çalışmaları ve gözlenen semptomlar.....	31
4.2 RNA ekstraksiyonu	32
4.3. Zeytin virüslerinin RT-PCR testlerinde sistem kurma çalışmaları.....	33
4.4. OLV-1 RT-PCR testleri.....	34
4.4.1. Tespit edilen OLV-1 izolatlarının karakterizasyonu.....	35
4.5. CMV RT-PCR testleri.....	38
4.6. OLV-2, OLRSV, CLRV, ArMV, SLRSV ve OLYaV RT-PCR testleri.....	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR.....	44
TEŞEKKÜR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	50

ÖZET**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ ZEYTİN BAHÇELERİNDEKİ VİRÜSLERİN YAYGINLIĞININ RT-PCR İLE BELİRLENMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yer alan Hatay, Adana, Osmaniye, İçel ve Kahramanmaraş illerindeki ticari bahçeler, kamuya ait ve özel fidanlıklardan toplam 431 zeytin ağacından sürgün örnekleri alınmış ve alınan örnekler *Olive latent-1 virus* (OLV-1, Zeytin latent-1 virüsü), *Olive latent-2 virus* (OLV-2, Zeytin latent-2 virüsü), *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Çilek yaprak kıvrılma virüsü), *Arabis mosaic virus* (ArMV, Arabis mozayik virüsü), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, Çilek latent halkalı leke virüsü), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV, Zeytin latent halkalı leke virüsü), *Cucumber mosaic virus* (CMV, Hıyar mozayik virüsü), *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV, Zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs)'lerine karşı Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile test edilmiştir ve tespit edilen virüs izolatlarının moleküler karakterizasyonu yapılmıştır.

Test edilen örneklerden Hatay/Altınözü'ünde iki zeytin ağacı OLV-1 ile enfekteli olarak bulunmuştur. Ayrıca Hatay ilinde 25, Adana'da 7, Osmaniye'de 5 ve İçel'de 1 ağaç CMV ile enfekteli olarak tespit edilmiştir.

Tespit edilen OLV-1 izolatlarının kısmi baz dizileri gen bankasındaki diğer izolatların baz dizileri ile karşılaştırılmış ve %99 oranında turuncgilden elde edilen OLV-1 izolatına, %94 oranında lale ve %95 oranında zeytin izolatlarının benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Bu çalışma zeytinlerde yaygın olarak bulunan ve genellikle symptom göstermeyen 8 önemli virüse karşı RT-PCR testleri uygulanarak ülkemizde yapılan ilk özgün çalışmadır.

2008, 50 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Zeytin, OLV-1, OLV-2, OLRSV, OLYaV, CLRV, SLRSV, ArMV, CMV

ABSTRACT**RT-PCR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF VIRUS SPREAD IN OLIVE ORCHARDS IN THE EAST MEDITERRANEAN REGION**

Totally 431 plant samples from olive trees were collected from commercial orchards and nurseries belong to government or private from provinces of Hatay, Adana, Osmaniye, İçel ve Kahramanmaraş in the Eastern Mediterranean Region. Collected samples were tested by Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) against to *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Arabid mosaic virus* (ArMV), *Olive latent virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) and the detected viruses were characterized.

Two olive trees were found OLV-1 infected in Hatay/Altınözü. Twenty five trees from Hatay, seven trees from Adana, five trees from Osmaniye and one tree from İçel were detected as infected by CMV.

The detected OLV-1 isolates were compared with the isolates from gen bank and they found 99% similar to citrus isolate, 94% and 95% to tulip and olive isolates, respectively.

Present study, is the first specific research of the application of RT-PCR test to 8 satisfactory viruses prevalent and symptomless.

2008, 50 Pages

Key Words: Olive, OLV-1, OLV-2, OLRSV, OLYaV, CLRV, SLRSV, ArMV, CMV

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Amplified fragment length polymorphisim
AIMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
ArMV	<i>Arabis mosaic virus</i>
BBSV	<i>Beet black scorch virus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz çifti (base pair)
BYSV	<i>Beet yellow stunt virus</i>
BYSV	<i>Beet pseudoyellows virus</i>
BYV	<i>Beet yellow virus</i>
CB	Gene otu (castor bean)
cDNA	Komplementer DNA (complementer DNA)
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i>
cm	Santi metre
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	Örtü proteini (Coat protein)
CTV	<i>Citrus tristesa virus</i>
cv	Cultivar
CYSDV	<i>Cucumber yellow stunt disorder virus</i>
Da	Dalton
DAS-ELISA	Double antibody sandwich-ELISA
d ₂ H ₂ O	Çift destile su
dNTP	2'-deoxynucloetide 5'-triphosphate
ds-RNA	Çift kollu RNA (Double-stranded RNA)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Etidyum bromid
FAO	Food and Agriculture Organization
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
GLRaV-1-5	<i>Grapevine leafroll asociated virus 1-5</i>
GLRaV-7	<i>Grapevine leafroll asociated virus-7</i>

GM6	Portekiz'deki zeytin ağaçlarından elde edilen izolat
IC	Immuno capture
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IEM	Immuno electron microscopy
K.Maraş	Kahramanmaraş
kb	Kilobaz
kDa	Kilo dalton
LChV	<i>Little cherry virus</i>
LIYV	<i>Lettuce infectious yellows virus</i>
LWSV	<i>Leek white stripe virus</i>
M	Molar
MgCl ₂	Magnezyum klorit
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MP	Hareket proteini (Movement protein)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nano gram
nm	Nano metre
n-PCR	Nested-PCR
nt	Nükleotid
OLRSV	<i>Olive latent ringspot virus</i>
OLV-1	<i>Olive latent-1 virus</i>
OLV-1/Tk	Türkiye'den elde edilen turunçgil izolatu
OLV-2	<i>Olive latent-2 virus</i>
OLYaV	<i>Olive leaf yellowing-associated virus</i>
OMMV	<i>Olive mild mosaic virus</i>
OPR	Açık okuma ucu (Open reading frame)
ORFs	Open reading frames
OSLV	<i>Olive semilatifent virus</i>
OYVaV	<i>Olive vein yellowing-associated virus</i>

OYMDaV	<i>Olive yellow mottling and decline associated virus</i>
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PaMV	<i>Papaya mosaik virüs</i>
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
pg	Piko gram
pmol	Piko mol
PVX	<i>Potato virus-X</i>
RFLP	Kesilmiş fragmentlerin uzunluğundaki polimorfizm (Restriction fragment length polymorphism)
RNA	Ribonükleik asit
RT	Revers transkripsiyon
RT-PCR	Revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SLRSV	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>
TAE	Tris asetat EDTA
TICV	<i>Tomato infectious chlorosis virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TNV-D	<i>Tobacco necrosis virus-D</i>
ToRSV	<i>Tomato ringspot virus</i>
U	Ünite
UV	Ultraviole
V	Volt
µg	Mikro gram
µl	Mikro litre

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Zeytin ağaçlarında enfeksiyon yaptığı belirlenen virüs etmenlerinin sınıflandırılması ve konukçuları.....	7
Çizelge 3.1. RT-PCR reaksiyon karışımının içerikleri ve konsantrasyonları.....	27
Çizelge 3.2. Tez kapsamında test edilen zeytin virüslerin primer dizilimleri (Faggioli ve ark., 2005).....	29
Çizelge 4.1. Doğu Akdeniz Bölgesi illerinden toplanan zeytin örneği ve ilçelere göre örnek miktarları.....	31
Çizelge 4.2. Tespit edilen OLV-1 izolatları ile gen bankasında kayıtlı izolatların nükleik asit benzerlik indeksi.....	36
Çizelge 4.3. Toplanan zeytin örneklerinden RT-PCR ile tespit edilen CMV ile enfekteli örneklerin il ve ilçe bazında miktarları.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Zeytin ağacının anavatanı ve dağılımı (Morettini, 1972'den Türkçeleştirilmiştir).....	1
Şekil 1.2. Zeytin yetiştiriciliğinin ülkelere göre dağılımı (FAO, 2005).....	2
Şekil 3.1. RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Germany) ile bitki dokularından toplam RNA ekstraksiyonunun şematik ifadesi.....	26
Şekil 3.2. Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)'nun şematik ifadesi.....	28
Şekil 4.1. Arazide gözlenen zeytinlerde orak şekilli yaprak simptomları (Hatay).....	32
Şekil 4.2. Araştırılan virüslerle enfekteli zeytin dokuları ile RT-PCR sistem kurma çalışmaları. M Markır (MBI Fermentas (GmbH, Almanya) 100 bp DNA ladder, 1, 2 OLRSV pozitif örnekler, 3 OLRSV su kontrol, 4, 5 SLRSV pozitif örnekler, 6 SLRSV su kontrol, 7, 8 CLRV pozitif örnekler, 9 CLRV su kontrol, 10, 11 OLV-2 pozitif örnekler, 12 su kontrol, 13 ArMV pozitif kontrol, 14 ArMV su kontrol, 15 CMV pozitif kontrol, 16 CMV su kontrol, 17, 18, 19 OLYaV pozitif kontrol, 20 OLYaV su kontrol, 21, 22, 23 OLV-1 pozitif kontroller, 24 su kontrolünü ifade etmektedir.....	33
Şekil 4.3 RT-PCR ile test edilen zeytin örneklerinde OLV-1 tespit edilen örnekler (1 ve 11 nolu örnekler). M; Markır, H; sağlıklı zeytin örneği, +C; OLV-1 pozitif kontrol, -C; su kontrolü ifade etmektedir.....	34
Şekil 4.4. Zeytin örneklerinden tespit edilen iki OLV-1 izolatının (Zeytin-1, Zeytin-11) nükleik asitlerinin gen bankasında mevcut diğer OLV-1 izolatlarının nükleik asitleri ile karşılaştırılması. Lale izolatu NCBI kayıt no: AB061815, Turunçgil izolatu kayıt no: NC-001721, GM6 zeytin izolatu kayıt no: DQ083996. Turunçgil izolatu	

- nukleik asitleri numaralandırmada kullanılmıştır. Siyah taralı alanlar aynı nükleotid dizilerini, renkli alanlar ise karşılaştırmada farklı olan nükleotid bölgelerini göstermektedir..... 35
- Şekil 4.5. Zeytin örneklerinden tespit edilen iki OLV-1 izolatı (Zeytin-1, Zeytin-11) nükleik asitleri ve Gen Bankasında mevcut diğer OLV-1 izolatlarının nükleik asitleri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç. Lale izolatı NCBI kayıt no: AB061815, Turunçgil izolatı kayıt no: NC-001721, GM6 zeytin izolatı kayıt no: DQ083996. Kollar üzerinde ifade edilen bootstrap değerleri 1000 tekerrür ile oluşturulmuştur..... 37
- Şekil 4.6. RT-PCR ile test edilen zeytin örneklerinde CMV tespit edilen örnekler (95, 125, 141, 142, 143, 44 ve 145 nolu örnekler). M; Markır, +K; CMV pozitif kontrol,- K su kontrolü ifade etmektedir..... 39

1. GİRİŞ

Akdeniz havzasında insan ve zeytin ağacı arasındaki ilişki en az insanlık tarihi kadar eskidir. Zeytin ağacının meyvesi ve yağının Akdeniz insanının gıdasına önemli oranda katkısı vardır ve bu bölgede gelişen eski medeniyetlerle bağlantılıdır. Zeytin dalı milletler arasında dostluk ve barışı sembolize etmiş ve eski zamanlarda olimpiik oyunları kazananlar zeytin dalıyla taçlandırılmıştır.

Zeytin ağacı (*Olea europea*), *Olea* cinsinin *Oleaceae* familyasına dahildir ve tüm dünyaya Anadolu'dan yayılmıştır (Şekil 1.1). Zeytin ağacı eskiden beri yetiştiriciliği yapılan bitkilerden biri olmasına rağmen, modern bilim zeytin kalitesini arttırmada sınırlı kalmıştır. Zeytin ağacı geleneksel yöntemlerle yetiştirildiği için modern tekniklerle kalitesini artırmak güç olmaktadır. Zeytin endüstrisinde yeni araştırmalar doğrultusundaki en büyük ilerleme 1974'den sonra Food and Agriculture Organization (FAO), modern bilimsel gelişmeler üzerine esaslandırılan uluslararası projeleri hayata geçirdiğinde başlamıştır.

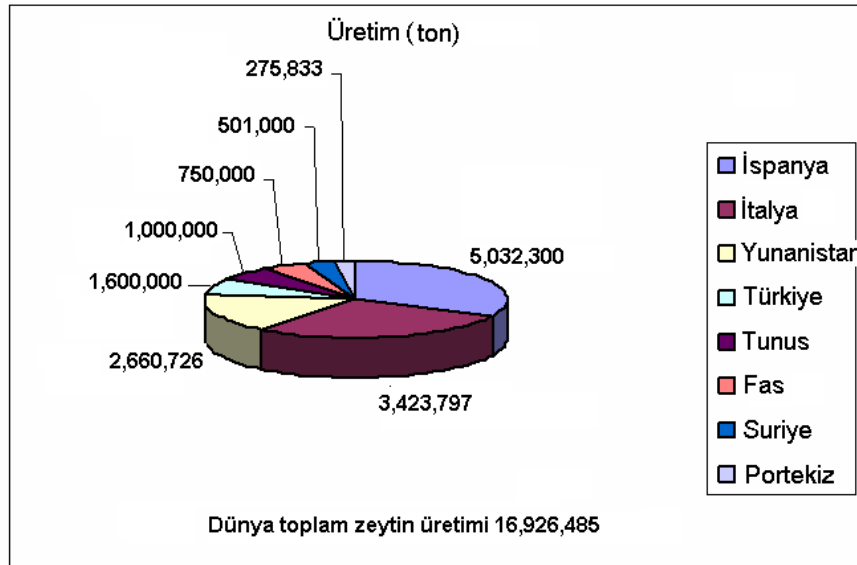
Zeytinde, FAO 2006 yılı üretim verilerine göre dünyadaki toplam üretim 16,926,485 ton'dur. Bu üretimin büyük çoğunluğunu başta İspanya (5,032,300) olmak üzere İtalya (3,423,797 ton), Yunanistan (2,660,726 ton) ve Türkiye (1,600,000 ton) gerçekleştirmektedir (Anonymous, 2006) (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Zeytin ağacının anavatanı ve Akdeniz ülkelerindeki dağılımı (Morettini, 1972'den Türkçe'leştirilmiştir).

Türkiye’de zeytin üretimi 2005 yılında; sofralık (400.000 ton) ve yağlık (800.000 ton) olmak üzere toplam 1.200.000 ton’dur. Bu üretimin %18’i sofralık olarak ve %19.1’i yağlık olarak, Doğu Akdeniz Bölgesinde bulunan Hatay, İçel, Osmaniye, Adana ve Kahramanmaraş illeri tarafından karşılanmaktadır (Anonim, 2005).

Ülkemizde; Karadeniz, Marmara, Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu olmak üzere beş bölgeye dağılmış olan 35 ilde zeytin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Zengin bir çeşit potansiyeline sahip Türkiye’de yağlık ve sofralık olarak değerlendirilmeye elverişli değişik bölgelere ait 28 zeytin çeşidinin yaygın olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu çeşitlerden Halhalı, Sarı haşebi, Saurani, Karamani, Sarı ulak, Büyük topak ulak, Küçük topak ulak ve Sayfi çeşitleri Doğu Akdeniz Bölgesi’nde oldukça yaygın olarak bulunan çeşitlerin başında gelmektedir (Anonim, 1991).



Şekil 1.2. Zeytin üretiminin ülkelere göre dağılımı (FAO, 2006)

Zeytin ağacında ekonomik öneme sahip bazı hastalık ve zararlılar mevcuttur. Bunlar; zeytin dal kanseri (*Pseudomonas savastanoi* Smith), zeytin solgunluğu (*Verticillium dahliae* Kleb), halkalı leke hastalığı (*Spilocaea oleagina* “Cast” Hugine=*Cycloconium oleaginum* Cast.) ve armillaria kök çürüklüğü (*Armillaria mellea* (Vall.) Quel) gibi zeytin hastalıkları ve zeytin sineği (*Bactrocera oleae* Gmel.), zeytin güvesi (*Prays oleae* Bern.), zeytin yara koşnili (*Pollinia pollini* Costa), zeytin

kabuklu biti (*Parlatoria oleae* Colv.) ve zeytin pamuklu biti (*Euphyllura olivina* Costa.) gibi zeytin zararlılarıdır. Bu hastalık ve zararlıların dışında zeytin ağaçlarında varlıkları kolay gözlenemeyen etmenler olan virüs ve fitoplazmalar da mevcuttur. Zeytinde saptanan virüsler; *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, Çilek latent halkalı leke virüsü), *Arabis mosaic virus* (ArMV, Arabis mozayik virüs), *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Kiraz yaprak kıvrılma virüsü), *Cucumber mosaic virus* (CMV, Hıyar mozayik virüsü), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV, Zeytin latent halkalı leke virüsü), *Olive latent-1 virus* (OLV-1, Zeytin latent-1 virüs), *Olive latent-2 virus* (OLV-2, Zeytin latent-2virüs), *Olive vein yellowing-associated virus* (OVYaV, Zeytin damar sararması ile ilişkili virüs), *Olive yellow mottling and decline associated virus* (OYMDaV, Zeytin sarı beneklenme ve geriye ölümle ilişkili virüs), *Tobacco mosaic virus* (TMV, Tütün mozayik virüsü), *Olive semilatif virus* (OSLV, Zeytin yarı latent virüs), *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV, Zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs) ve *Tobacco necrosis virus-D* (TNV-D, Tütün nekroz virüsü = *Olive mild mosaic virus*; OMMV, Zeytin ılımlı mozaik virüs)'dir. Zeytinde saptanan fitoplazmalar yıldız çiçeği sarılığı (aster yellows grup; *Candidatus Phytoplasma asteris*), karaağaç sarılığı (elm yellows grup; *Candidatus Phytoplasma ulmi*), palamutlaşma (stubborn; *Spiroplasma citri*) ve X hastalığı (X disease)'dir (Poggi Pollini et al, 1996; 2002).

Zeytin virüsleri çoğu kez simptomsuz (latent) olarak bulduklarından simptomla teşhis yapmak mümkün olmamaktadır. CMV, TMV ve TNV gibi virüslerin konukçu dizileri çok geniştir. SLRSV, ArMV ve CLRV gibi virüsler polifag olmakla birlikte özellikle SLRSV zeytinde verim kaybı ve kalite bozukluklarına yol açmaktadır. Diğerleri, yani zeytin ön ismi ile adlandırılan virüsler (OLRSV, OLV-2, OVYaV, OSLV ve OLYaV) konukçuya spesifik olarak saptanmış, ancak OLV-1 virüsü son zamanlarda Türkiye ve Japonya'da sırasıyla turunçgillerden ve lalelerden izole edilmiştir (Martelli ve ark., 1996; Kanematsu ve ark., 2001). Bu virüslerin bazıları toprak kökenli (SLRSV, ArMV, TNV) olsa da bazıları, doğrudan (TMV), tohumla (CLRV ve OLV-1), afitle (CMV) veya sadece mekanik inokulasyon ve aşıyla (OLV-2 ve OLRV) taşınabilmiştir. OLYaV'nin enfekteli zeytin ağacında beslenen unlu bit ve psillidlerde bulunduğu rapor edilmiştir (Sabanadzovic ve ark., 1999). Ancak bu böcekleri virüsün vektörü olarak değerlendirilmesi doğru değildir; çünkü taşıma denemelerinden başarılı sonuçlar alınmamıştır. Yapılan tüm bu çalışmalar zeytin

virüslerinin doğada nasıl yayıldığını anlamamıza yardımcı olsa da bu virüslerin doğal şartlar altında dağılımı ve yayılışını tam olarak anlayabilmek için daha geniş epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Virüslerin yayılmasını önlemenin en önemli yolu, sağlıklı bitki materyali üretebilmek için sanitasyon ve sertifikasyon programlarını kullanmaktır. İtalya, Portekiz ve İspanya'da zeytin ağaçları için çeşitli sertifikasyon programları başlatılmıştır. Sanitasyon ve sertifikasyon çalışmalarında hassas tanı yöntemleri gerekmektedir. Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) yöntemi zeytin ağaçlarında bazı virüslerin tespitinde kullanılmakta ancak tutarlı sonuçlar vermemektedir (Bertolini ve ark., 1998; Grieco ve ark., 2000). Uygun antiserum ve ELISA yöntemlerinin zeytin virüsleri için mevcut olmadığı, zeytin dokularındaki virüs konsantrasyonunun çok düşük olması nedeniyle ELISA ile test edilmesinin güvenilir olmadığı, moleküler yöntemlerden ds-RNA ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemlerle test edilmesi gerektiği bildirilmiştir (EPPO, 2006).

Zeytinin genç sürgünlerinin kabuklarından yapılan kazımlarla dsRNA'lar kolaylıkla izole edilebilmiş (Grieco ve ark., 2000) ve bunların virüs enfeksiyonunu gösteren iyi bir işaret olduğu bildirilmiştir, ancak, band örneklerinin tek tek virüslerin teşhisi için kullanılmasının uygun olmadığı belirlenmiştir (Martelli ve ark., 1995b; Sabanadzovic ve ark., 1999). Son yıllarda, zeytin virüslerinin zeytin dokularından hassas ve doğru olarak teşhisine olanak sağlayan PCR teknikleri geliştirilmiştir (Grieco ve ark., 2000; Faggioli ve ark., 2002). Hatta bu teknik pek çok zeytin virüsü sorvey çalışmalarında rutin olarak kullanılmaktadır (Fadel ve ark., 2005; Al Abdullah ve ark., 2005).

Ülkemizde zeytin virüsleri konusunda şimdiye kadar Balıkesir, Çanakkale, İzmir, Manisa, Aydın ve Hatay ilinde yürütülen üç farklı çalışmada, zeytin ağaçları DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiş ve bu virüslerden sadece SLRSV, CLRV, CMV ve ArMV konusunda sınırlı bilgiler elde edilmiştir (Ülkü ve Ertem, 1995; Tarla ve Çağlayan, 1998; Çağlayan ve ark., 2004).

Bu çalışmada, dünyada önde gelen zeytin üreticisi durumunda olan ülkemizin yoğun zeytin yetiştiriciliği yapılan bölgelerinden biri olan Doğu Akdeniz Bölgesi'nde SLRSV, CLRV, ArMV, OLRSV, OLV-1, OLV-2, CMV ve OLYaV enfeksiyonlarının moleküler yöntemlerle ortaya koyulmasına, karakterizasyonuna ve seçilen bölgede bu

hastalıkların öneminin belirlenmesine çalışılmıştır. Elde edilen bulgular, dünyada zeytin yetiştiriciliği yapılan bölgelerde son yıllarda oldukça önem kazanan virüs hastalıkları ile ilgili yapılan çalışmalara katkı sağlamıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zeytin, birçoğu latent enfeksiyonlara neden olan bazı virüslerin konukçusu durumundadır. Bu virüslerin bir kısmı sadece zeytinde enfeksiyon yapmaktadır ve bir kısmının da karakterizasyonu yapılmış, konukçu dizisi belirlenmiştir. Zeytinde virüs enfeksiyonlarının önemi henüz bilinmemekte, ürün kayıpları önemsenmeyecek düzeyde olabilmektedir. Muhtemel virüs hastalıkları konusunda ilk kayıtlar 1938’lerde İtalya Lazio’dan bildirilmiş (Martelli, 1999) ve bunu takiben 8 cinse ait 13 virüs hastalığı kaydedilmiştir. Zeytin virüsü kayıtlarının çoğunluğu İtalya ve Portekiz’den olup son yıllarda İspanya, Türkiye, Lübnan ve Suriye’den de enfeksiyonlar bildirilmiştir.

Zeytinde saptanan virüsler; *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV), *Olive latent-1 virus* (OLV-1), *Olive latent-2 virus* (OLV-2), *Olive vein yellowing-associated virus* (OVYaV), *Olive yellow mottling and decline associated virus* (OYMDaV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Olive semilatif virus* (OSLV), *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) ve *Tobacco necrosis virus-D* (TNV-D = *Olive mild mosaic virus*; OMMV)’dir (Tablo 2.1).

2.1. *Olive latent-1 virus* (OLV-1, Zeytin latent-1 virüsü)

OLV-1 *Tombusviridae* familyasının, *Necrovirus* cinsinin bir üyesidir. İtalya (Galitelli ve Savino, 1985), Ürdün (Martelli ve ark., 1995a), Türkiye (Martelli ve ark., 1996), Portekiz (Felix ve Clara, 1998), Lübnan (Saponari ve ark., 2002) ve Suriye (Al Abdullah ve ark., 2005)’de saptanmıştır. İzolatlar simptomsuz ya da zayıf zeytin ağaçlarından, turunçgil ağacından ve laleden elde edilmiştir.

Çizelge 2.1. Zeytin ağaçlarında enfeksiyon yaptığı belirlenen virüs etmenlerinin sınıflandırılması ve konukçuları

Virüs isimleri	Kısaltması	Cinsi	Familyası	Konukçuları
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ArMV	<i>Nepovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Çilek vb., şerbetçiotu, asma, şeker pancarı, <i>Sambucus nigra</i> , kereviz, glayol, at turpu, marul, zeytin
<i>Cherry leaf roll virus</i>	CLRV	<i>Nepovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Karaağaç, ceviz, zeytin, kiraz, ravent
<i>Olive latent ringspot virus</i>	OLRSV	<i>Nepovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Zeytin
<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	SLRSV	<i>Sadwavirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Çilek vb., asma, kiraz, erik, şeftali, zeytin, <i>Sambucus nigra</i>
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumoviridae</i>	Hıyar, zeytin ve diğerleri
<i>Olive latent virus 1</i>	OLV-1	<i>Necrovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	Zeytin, lale, turunçgil
<i>Olive latent virus 2</i>	OLV-2	<i>Oleavirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Zeytin
<i>Olive leaf yellowing associated virus</i>	OLYaV	<i>Closterovirus</i>	<i>Closteroviridae</i>	Zeytin
<i>Olive vein yellowing associated virus</i>	OvYaV	<i>Potexvirus</i>	-	Zeytin
<i>Olive yellow mottling and decline associated virus</i>	OYMDaV	Tanımlanmamış	-	Zeytin
<i>Olive semi latent virus</i>	OSLV	Tanımlanmamış	-	Zeytin
<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	<i>Tobamovirus</i>	-	Tütün, zeytin ve diğerleri
<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	<i>Necrovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	Tütün, lale, fasulye, hıyar, patates, armut, elma, turunçgil, asma, zeytin

OLV-1 ilk defa Güney İtalya'nın Apulia kentinde sptomsuz zeytin ağaçlarından mekanik inokulasyonla izole edilmiştir (Galitelli ve Savino, 1985). Diğer bir virüs enfeksiyonu 1998 yılında Felix ve Clara tarafından Portekiz'de zeytin meyvelerinden elde edilen ekstraktlarla inokule edilen simptomlu *Nicotiana benthamiana* bitkilerinden kaydedilmiştir (Felix ve ark., 2005). Yıllardır virüs sadece Avrupa'nın Akdeniz bölgelerinde sınırlı kalmışken 1995 yılında Ürdün'de zayıf zeytin ağaçlarında bulunmuştur (Martelli ve ark., 1995a). OLV-1'in sadece zeytin ağaçlarını enfekte ettiği düşünülürken virüs Türkiye'de klorotik cücelik hastalığı ile etkilenen turuncgil ağaçlarından izole edilmiştir (Martelli ve ark., 1996). Yakın zamanda Japonya'da *Tobacco necrosis virus* (TNV)'nin tipik nekrotik simptomlarını göstermeyen lalelerden izole edilmiştir (Kanematsu ve ark., 2001).

OLV-1 30 nm çapında izometrik partiküllere sahiptir ve 2699 nükleotid uzunluğunda pozitif anlamlı (pozitif sense) tek parçalı ssRNA'ya sahiptir (Grieco ve ark., 1996). Genomik RNA beş açık okunan bölge (Open reading frames; ORFs) içerir ve bunlar 5'-3' yönünde sırasıyla 23, 82, 8, 6 ve 30 kDa polipeptid kodlar. ORF1 (23 kDa protein) ve ORF2 (82 kDa protein)'nin ekspresyon ürünleri virüs replikasyonunda gereklidir. ORF3 (8 kDa protein) ve ORF4 (6 kDa protein)'ninkiler ise hücreden hücreye harekette görev alırlar ve ORF5 (30 kDa protein; kılıf protein) uzun mesafe taşınmaya yardım ederler (Pantaleo ve ark.,1999). Virüs aşılama ile taşınır ve son zamanlarda %82 oranında tohumla taşınma kaydedilmiştir (Saponari ve ark., 2002).

OLV-1 zeytin ağaçlarında herhangi bir simptom göstermeden bulunmasına rağmen *N. benthamiana* ve *Chenopodium amaranticolor* gibi otsu bitkilerde sırasıyla, sistemik mozaik ve nekrotik lokal lezyonlara sebep olur. Virüs turuncgil ağaçlarını klorotik cücelik simptomlarıyla veya herhangi bir simptom vermeden enfekte edebilir (Martelli ve ark., 1996). Daha önceleri Pare-P olarak adlandırılan lale OLV-1 izolatu, lale bitkilerinde benek veya sarı çizgi simptomlarına neden olur (Kanematsu ve ark., 2001).

Bir çok bitkide arazi simptomları etmen organizmanın ne olduğuyla ilgili ilk bulguları vermektedir; ancak bu durum zeytin ağaçlarında latent bulunduğundan dolayı OLV-1 için mümkün olamamaktadır. OLV-1'i tanımlamada kullanılabilecek farklı odunsu indikatörler bulunmadığından otsu konukçulara mekanik taşınma yoğun olarak

kullanılmaktadır. Zeytin ağaçlarında OLV-1'in immuno-enzimatik yöntemlerle teşhisi virüsün zeytin dokularında düşük konsantrasyonda bulunmasından dolayı tutarlı olamamaktadır (Grieco ve ark., 2000). Ancak OLV-1 zeytin meyvelerinin ekstraktlarıyla inokule edilen semptomatik *N. benthamiana* bitkilerinden DAS-ELISA ile başarılı bir şekilde teşhis edilebilmektedir.

OLV-1 teşhisinde basit, ucuz, kısmen çabuk ve çok etkili sonuç veren dsRNA tekniği de kullanılmıştır. Felix ve ark., (2005) zeytin örneklerinden *N. benthamiana* bitkilerine aktardıkları OLV-1 GM6 izolatından dsRNA'ları fenol ekstraksiyonu ve CF11 selüloz yardımıyla saflaştırarak elde etmişlerdir. Araştırmacılar 3.7, 1.5 ve 1.3 kb uzunlukta daha önce Merciega ve ark., (1996) tarafından gözlenenlere benzer üç büyük band tespit etmişlerdir. dsRNA testini gerçekleştirmek için kabuktan alınan dokuların en iyi kaynak olduğu, 5 gr doku örneğinden çok saf dsRNA ürünü elde edildiği bildirilmiştir (Grieco ve ark., 2000).

Apulia'da (Güney İtalya) tespit edilen OLV-1'in nükleotid uzunluğu 3699 nt olarak belirlenmiş (Grieco ve ark., 1996b) ve genom organizasyonu bildirilmiştir (Pantaleo ve ark., 1999). Nükleotid baz dizisi bilgisi kullanılarak OLV-1 için düzenlenmiş primerler mevcuttur (Grieco ve ark., 2000). Aynı primerler kullanılarak Lübnan'daki zeytin ağaçlarında OLV-1 tespit edilebilmiştir (Fadel ve ark., 2005). Bunun yanısıra, OLV-1 teşhisi için nested RT-PCR (RT-n-PCR), çoklu RT-PCR yöntemi de geliştirilmiştir (Bertolini ve ark., 2001).

OLV-1 genomik RNA'sı diğer *Necrovirus*'lar gibi poliadenilli değildir. ORF1 ve ORF2 tarafından kodlanan sırasıyla 23 kDa ve 82 kDa proteinler *Tombusviridae* familyası üyeleri olan *Tobacco necrosis virus A* (TNV-A) ile TNV-D ve akraba cinslerin (*Dianthovirus* ve *Machlomovirus*) serotiplerinin polimerazları ile oldukça yüksek baz dizisi benzerliği göstermiştir. ORF3 tarafından kodlanan 6 kDa protein, TNV-A 6kDa proteini ve *Shallot latent carlavirus*'un 11 kDa proteini ile yüksek benzerlik göstermiştir. OLV-1, TNV-A ve -D'nin yapısal ve yapısal olmayan proteinlerinin bilgisayar yardımı ile yapılan analizleri OLV-1 ve TNV-D'nin uzak akrabalar olduğunu açığa çıkartmıştır (Grieco ve ark., 1996b).

OLV-1/Tk (Türkiye'den elde edilen turuncuğil izolatı) TNV-A ve -D serotipleri ile ortak pek çok fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Ancak, OLV-1/Tk TNV-A ve -D

ile sadece serolojik olarak farklıdır ve bu nedenle *Necrovirus* cinsinde farklı bir tür olarak yer almaktadır (Martelli ve ark., 1996).

Portekiz'deki zeytin ağaçlarından izole edilen GM6 OLV-1 izolatının bazı dizileri diğer OLV-1 ve TNV izolatları ile karşılaştırılmıştır (Felix ve ark., 2005). GM6 izolatı OLV-1 lale izolatı ile (%97.7) turuncu izolatından (%87.7) daha yüksek baz dizisi benzerliği göstermiştir. Diğer taraftan TNV izolatı olan TNV-D'de daha düşük baz dizisi benzerliği (%43.3) belirlenmiştir. OLV-1 CP dizileriyle diğer *Necrovirus*'lerin bazı dizilerini karşılaştırmasıyla oluşturulan filogenetik ağaçta OLV-1 GM6 izolatı turuncu izolatından daha çok lale izolatına yakın yer almıştır.

2.2. Olive latent-2 virus (OLV-2, Zeytin latent-2 virüsü)

OLV-2 *Bromoviridae* familyasının *Oleavirus* cinsinin monotipik bir türüdür. İlk kez Güney İtalya'da Apulia'daki semptomsuz zeytin ağaçlarında mekanik inokulasyonla izole edilmiştir (Savino ve ark., 1984). İtalya'da yayılma göstermezken Suriye'de yayılabilmiştir (Al Abdullah ve ark., 2005). OLV-2'nin konukçu dizisi sadece zeytinle sınırlı iken Yunanistan'da gene otunda (castor bean; CB; *Ricinus communis* L.) yapraklarda sarımsı ağ damarlar ve sistemik benekler oluşturduğu bildirilmiştir (Grieco ve ark., 2002). Bu virüs zeytin türlerinde semptomsuzdur. Zeytin izolatı deneysel konukçulardan *Gomphrena globosa*'da kırmızımsı nekrotik lokal lezyonlar veya semptomsuz sistemik enfeksiyon, *C. quinoa*'da klorotik nekrotik lokal lezyonlar, *N. megalosiphone* ve *N. bentamiana*'da hafif beneklenme meydana getirir. CB izolatı *N. bentamiana*'da sistemik klorotik halkalı lekeler, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. glutinosa* ve *N. megalosiphone*'da klorotik nekrotik lokal lezyonları takiben sistemik beneklenme *N. rustica* ve *N. tabaccum* cv. White Burley'de sistemik klorotik halkalar ve benekler, *C. quinoa*'da klorotik nekrotik lokal lezyonlar; *Phaseolus vulgaris* cv. La Victoire yapraklarında klorotik nekrotik lokal lezyonları takiben beneklenme ve üst inokule edilmeyen yaprakların parçalanması, *G. globosa*'da kırmızı koyu lokal lezyonları takiben üst yaprakların beneklenmesi ve parçalanması, *Cucumis sativus*'da

klorotik lokal lezyonlar ve *Cucurbito pepo*'da klorotik lokal lezyonlar meydana getirir. OLV-2 sadece mekanik inokulasyonla taşınır.

OLV-2 *Alfalfa mosaic virus*'üne benzer küreselden çubuksuya değişen partiküllere sahiptir, ssRNA genomu poliadenilli değildir, pozitif anlamlı ve üç parçalıdır. Virionlar dört büyük RNA türüne sahiptir. RNA1 (3126 nt) ve RNA2 (2734 nt) tek gen taşıyan moleküllerdir ve replikasyonla ilgili proteinleri kodlarlar. RNA3 (2438 nt) iki gen taşıyan bir moleküldür ve 36.5 kDa hareket proteini (MP) ile 20 kDa viral kılıf proteini (CP)'ni kodlar. RNA4 (2078 nt) RNA3'le birlikte ve fonksiyonu belirlenmemiştir. Bir subgenomik RNA (1042 nt) enfekteli bitkilerde oluşturulmakta fakat kılıf ile örtülmeyebilmektedir (Grieco ve ark., 1995;1996a; Martelli ve Grieco, 1997).

OLV-2/CB izolatının 1696 bp uzunluğunda bir DNA parçası RNA 3 bölgesine karşılık gelen primerlerle çoğaltılmış ve tip strain OLV2'nin baz dizileriyle karşılaştırıldığında %93 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde CP ve MP'lerin aminoasit dizilerinin karşılaştırmaları yüksek ölçüde benzerliği (%96 CP, %94 MP) ortaya koymuştur (Grieco ve ark., 2002).

OLV2'nin dört RNA türünün baz dizileri belirlenmiş ve EMBL veri tabanına kaydedilmiştir (Grieco ve ark., 1995; 1996a). Çok az sayıda OLV2 izolatı tanımlanmasına rağmen PCR esaslı moleküler yöntemler için yeni primer çiftlerinin düzenlenmesi mümkündür. Örneğin 390 bp DNA parçasığı zeytin bitkilerinin başarılı bir şekilde test edilmesinde kullanılmıştır (Grieco ve ark., 1995). Bunun yanında zeytin bitkilerinden OLV2 teşhisi için RT-n-PCR geliştirilmiştir (Pantaleo ve ark., 2001).

2.3. Olive latent ringspot virus (OLRSV; Zeytin latent halkalı leke virüsü)

OLRSV, *Nepovirus* cinsinin *Comoviridae* familyasında yer alan bir virüstür. Virüs ilk olarak İtalya'nın merkezi Lazio'da simptom göstermeyen zeytin ağaçlarından izole edilmiştir (Savino ve ark., 1983) ve daha sonra Suriye'de rapor edilmiştir (Al Abdullah ve ark., 2005). OLRSV zeytin ağacında latent olarak bulunur; ancak teşhise uygun, bu virüse hassas olan *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da apikal lezyon

simptomları ve *G. globosa*'da uç yapraklarda şekil bozuklukları ve kırmızı kenarlı lokal lezyonlar gösterir. Virüs mekanik inokulasyon ve aşı ile taşınır.

OLRSV 28 nm uzunluğunda olan izometrik partiküllere sahiptir. İki bölümlü ssRNA genom Mr 1.4×10^6 (RNA2) ve 2.65×10^6 (RNA1)'li iki molekül içerir. OLRSV'nin RNA2'sinin baz dizisi tamamen belirlenmiştir (Alkowni ve ark., 2001). RNA2 3969 nt uzunluğundadır ve poliprotein N-terminal bölgesinde olduğu varsayılan MP'ler ve C-terminal'de yerleşmiş CP sistron'a sahip olan tek ORF içerir. OLRSV CP ve MP'lerinin diğer gen bankasında kayıtlı *Nepovirüs* proteinleriyle ikili karşılaştırılmaları sonucunda Domates halkalı leke virüsü (ToRSV; *Tomato ringspot virus*) (%69), ArMV (%61) ve Asma fanleaf virüs (GFLV) (%59) ile yüksek oranlarda benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir (Alkowni ve ark., 2001). Nepoviral MP baz dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaçta, OLRSV yukarıdaki adı geçen virüsler ile aynı grupta yer almıştır. Gen bankasında bulunan bazı *Comoviridae* RNA2 baz dizileri kullanılarak oluşturulan homoloji ağacında OLRSV (*Nepovirüs*'ün altgrup-b'si) ArMV, GFLV (*Nepovirüs*'ün alt grup-a'sı) ve ToRSV (*Nepovirüs*'ün alt grup-c'si) ile benzer şekilde aynı grupta yer almış altgrup-b OLSV'den farklı bir grupta toplanmıştır (Çağlayan ve ark., 2006).

OLRSV'nin RT-PCR ile test edilmesinde toplam RNA enfekteli kabuk dokularından RNeasy bitki ekstraksiyon kiti ile ekstraksiyon yapılmış ve RT-n-PCR yöntemi ile başarılı bir şekilde test edilmiştir (Pantaleo ve ark., 2001).

2.4. Olive vein yellowing associated virus (OVYaV; Zeytin damar sararması ile ilişkili Virüs)

OVYaV ilk olarak Roma yakınındaki çeşidi bilinmeyen bir zeytin ağacından izole edilmiştir. *Potexvirüs* cinsinin üyesi olduğu varsayılarak sınıflandırılan bu virüs 520 nm uzunluğunda ve 12 nm eninde, uzayan esnek partiküllere sahiptir (Faggioli ve Barba, 1995). Homolojik antiserum 1:1024 titresi vermiş ve IEM testlerde sırası ile 1:256 ve 1:10 sulandırma yapılan PVX ve Papaya mosaik virüs (PaMV) ile çapraz serolojik ilişkisi sergilemiştir. Homolog antiserumlar kullanılarak yapılan western

immunoblot testinde bir büyük ve iki küçük protein bandı gözlenmiştir. Büyük proteinin moleküler ağırlığı, sadece enfekteli örneklerde SDS-PAGE ile bulunan (29.500 daltons) ile aynı olmuştur. Küçük bandların virüs parçacıklarının parçalanma ürünleri mi yoksa konukçunun kirletici proteinleri mi olduğu bilinmemektedir. Morfolojik, kimyasal ve serolojik özellikler *Potexvirus* cinsinin bireyleri ile çok benzer olmasına rağmen daha dar konukçu dizisi ve kısa *in vitro* yaşam süresi ile *Potexvirus*'den farklıdır (Faggioli ve Barba, 1995). Bu virüs “yaprak sarılığı kompleksi (leaf yellowing complex)’e dahil edilmiş ve OVYaV olarak isimlendirilmiştir (Martelli ve ark., 2002b). OVYaV'nin genom özellikleri ve semptomlarına dair henüz kabul edilebilir bir kayıt yoktur.

2.5. Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV; Zeytin sarı benek ve gerileme ile ilişkili virüs)

Bu hastalık Sicilya'nın (Güney İtalya) iki farklı yöresinde, cv “Nostrana’ ve zeytin yaprak sarılığı (OLY) ile birlikte ‘Biancolilla’ çeşidinde saptanmıştır (Savino ve ark., 1996). OLY'nin otsu konukçulara taşınma denemesi başarısız olsa da, OYMDaV'nin 800 nm uzunluğundaki esnek ipliksi partikülleri, OYMD semptomları gösteren bitkilerden sınırlı sayıda konukçu otsu bitkilere inokulasyonla aktarılmıştır (Savino ve ark., 1996). Bu iki hastalık, OYMD de olduğu gibi ağacın genelinde açık sarı renk değişimleri, bunun yanında yaprak nekrozları, yoğun yaprak dökümü ve geriye ölüm ile karakterize edilmiştir (Sabanadzovic ve ark., 1999). Elektroforetik analizler tüm örneklerde kompleks dsRNA şekillerinin varlığını göstermiştir. Çok yüksek moleküler ağırlığa sahip olan *Grapevine leafroll asociated virus* (GLRaV) -2'nin tüm viral genlerinin replike olabilen formlarıyla aynı boyutta görünen bu band 15 kbp olarak belirlenmiştir. *Closteroviridae* familyasının üyelerine homolog bozulmuş primerler, OYMDaV ile enfekteli gerileme gösteren Nostrana çeşidinden ekstrakte edilen dsRNA amplifikasyonlarında kullanıldığında cDNA oluşumu gözlenmemiştir (Sabanadzovic ve ark., 1999). OYMDaV'nin hangi cinse ait olduğu henüz belirlenmemiştir.

2.6. Olive leaf yellowing associated virus (OLYaV; Zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs)

OLYaV, filogenetik akrabalarının belirlenebilmesi için çok sayıda moleküler veriye ihtiyaç olduğundan, *Closteroviridae* familyasının atanmamış türlerinden biridir (Martelli ve ark., 2002b). Bu hastalık ilk olarak İtalya’da kaydedilmiştir (Savino ve ark., 1996) ve İtalya’nın yöresel çeşidi olan Biancolilla yapraklarındaki açık sarıya dönen renk açılmalarıyla karakterize edilmiştir. Sağlıklı ‘Biancolilla’ çeşidine aşı yapılarak OLY hastalık tablosu tekrar elde edilmiş; ancak otsu konukçulara yapılan mekanik inokulasyonlarda başarılı olunamamıştır. Virionların gözlemlenmesinde başarılı olunmasa da, zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs (OLYaV) olarak isimlendirilmiştir.

OLY ile enfekteli bitkilerden yapılan doku ekstraktlarının oldukça kompleks dsRNA’ları içerdiğini ortaya koymuştur (Savino ve ark., 1996). Daha ileri çalışmalar *Closterovirüs* cinsinin bazı türlerinin tam genomik dsRNA’sı ile benzer olarak en büyüğü 15 kbp uzunluğunda olan bir dizi dsRNA bandlarını göstermiştir (Sabanadzovic ve ark., 1999).

Closteroviridae familyası üyelerinin HSP70 genine homolog bozulmuş oligonükleotid primerleri (HSP1 ve HSP2) RT-PCR testlerinde kullanıldığında cDNA’dan 600 nükleotid uzunluğunda DNA parçacığı çoğaltılmıştır (Sabanadzovic ve ark., 1999). Bu DNA parçacığının baz dizisi tayin edildiğinde 203 aminoasitlik bir polipeptidi kodlayan 611 nükleotidden oluştuğu belirlenmiştir. Tahmin edilen amino asid dizisinin kıyaslaması bu polipeptidin *Beet yellow virus* (BYV), *Citrus tristesa virus* (CTV), *Beet yellow stunt virus* (BYSV), *Beet pseudoyellows virus* (BYSV), *Little cherry virus* (LChV), GLRaV-1-5 ve GLRaV-7 closterovirüsleri, *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), *Cucumber yellow stunt disorder virus* (CYSDV) *Cirinivirüs*’ün HSP70 benzeri proteinleri ile %30 benzerliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Son zamanlarda *Closteroviridae* Martelli ve ark. (2002a) tarafından yeniden gözden geçirilmiş ve familia *Closterovirüs*, *Ampelovirüs* ve

Crinivirus olarak üç cinse ayrılmıştır. OLYaV, GLRaV-7 ve LChV-1 bu familyanın atanmamış türleri durumundadır.

2.7. Olive semi latent virus (OSLV; Zeytin yarı latent virüsü)

Şu ana kadar bu virüsün cinsi saptanamamıştır. Virüs yaklaşık 28 nm çapında izometrik partiküllere sahiptir ve enfekteli dokuda gözlenmiştir (Materazzi ve ark., 1996). Asıl belirtiler yaprak damarlarında oldukça hafif klorotik renk değişiklikleridir. Karakterize edilemeyen bu virüs mekanik olarak taşınabilmiştir ancak virüsün etiyolojik ilişkisi hakkında yeterli kadar bilgi yoktur (Martelli, 1999).

2.8. Strawberry latent ringspot virus (SLRSV; Çilek latent halkalı leke virüsü)

SLRSV, *Comoviridae* familyası *Sadwavirus* cinsindedir. Çok geniş bir konukçu dizisi ve yayılma alanı vardır. Genellikle belirtiler göstermeden çilek ve ahududuyu enfekte eder, ancak bazı çeşitlerde beneklenme ve gerilemenin değişik aşamaları gözlenebilir. Diğer konukçu bitki meyveleri frenküzümü, kırmızı frenküzümü, kiraz, üzüm, şeftali, zeytin ve siyah mürver (*Sambucus nigra*)'dir. SLRSV Avrupa virüsüdür, diğer kıtalara yayılımı sınırlıdır. Ayrıca İsrail, Kanada, ABD, Avustralya ve Yeni Zelanda'da da rapor edilmiştir (EPPO, 1994).

SLRSV ilk kez 1979 yılında merkez İtalya'daki cv Corregiolo zeytin ağacından izole edilmiştir (Savino ve ark., 1979). 1980 yılında Ascoli Viceno yakınında (Merkez İtalya) bir çok sofralık zeytin çeşidinde hastalıkla bağlantılı olarak şiddetli değişimler gözlenmiştir ve bu belirtiler gösteren hasta ağaçların genç yaprakları, kökleri ve çiçeklerinden tekrarlı bir şekilde izolasyon yapılmış ve otsu bitkilere taşınmıştır (Marte ve ark., 1986). Son yıllarda cinse özgü teşhis metotları kullanılarak görünürde belirtilsüz olan ağaçlarda SLRSV teşhisine imkan sağlamıştır (Saponari ve ark., 2001).

SLRSV 30 nm çapında izometrik partiküllere ve iki tek kollu RNA'dan oluşan bir genoma sahiptir. Birçok konukçu türde tohumla, vektör nematod *Xiphinema diversicaudatum* ile ve aşıyla taşınır (Cooper, 1986).

SLRSV çilek ve diğer meyve bitkilerinde genellikle latent olarak bulunsa da, zeytin yapraklarında şiddetli daralma ve kıvrımlara, salkımsı büyümelere, meyvelerde deformasyona ve zeytinlerde verim azalmasına neden olur (Faggioli ve ark., 2002; Çağlayan ve ark., 2006). Zeytin çeşitleri üzerindeki bazı simptomların SLRSV ile ilişkili olduğu İtalya'da rapor edilmiştir (Ferreti ve ark., 2002). Zeytin çeşitleri 'Raggiola' ve 'Frantoio' agronomik ve morfolojik açıdan farklılıklar gösterse de genetik analizleri (amplified fragment length polymorphism; AFLP) bu iki çeşidin yüksek oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Raggiola meyveleri ve yapraklarının morfolojisi SLRSV'nin neden olduğu simptomlarla benzer olduğundan, bu çeşit RT-PCR kullanılarak altı zeytin virüsüne karşı test edilmiş ve bu çeşidin SLRSV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Bu kayıtlar ileri sürmüştür ki SLRSV, Raggiola ve Frantoio çeşitleri arasında agronomik ve morfolojik farklılıklara neden olmuştur (Ferreti ve ark., 2002).

SLRSV Portekiz'de (Henriques ve ark., 1992; Rei ve ark., 1993), İspanya'da (Bertolini ve ark., 1998) ve Türkiye'de (Çağlayan ve ark., 2004) arazi örneklerinde DAS-ELISA ile başarılı bir şekilde teşhis edilmiştir ancak İtalya'da (Martelli, 1999) başarı sağlanamamıştır. Zeytin materyalleri dsRNA analizleri ve PCR esaslı metotlar ile test edildiğinde ELISA ile elde edilen pozitif sonuçları onaylayamadığı için DAS-ELISA'nın bazı hatalı pozitif reaksiyonlar verdiği ileri sürülmüştür (Bertolini ve ark., 1998).

Zeytin ağaçlarının dsRNA'sının ekstraksiyon ve analizi virüs enfeksiyonlarının varlığını belirleyebilmiş (Martelli ve ark., 1995a; Martelli ve ark., 1995b; Savino ve ark., 1996) ve aynı zamanda enfeksiyon yapan virüsün doğası hakkında ipuçları sağlayabilmiştir (Sabanadzovic ve ark., 1999). Zeytinlerde oldukça kolay bulunan dsRNA, geleneksel yöntemlerle teşhis edilemeyen ve sınıflandırılması yapılamayan virüslerin bulunması için oldukça önemlidir (Martelli, 1999). Bu teşhis yönteminin kullanımıyla, İtalya'nın zeytin yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı bazı bölgelerinde viral enfeksiyonların yaygın olduğu doğrulanmıştır. (Grieco ve ark., 2000).

Polimeraz zincir reaksiyonları üzerine kurulu moleküler metotlar hassasiyeti arttırır ve baz dizisi verilerinin analizini kolaylaştırır. Yakın zamanda zeytin yapraklarının kaba ekstraktlarında SLRSV'nin farklı PCR metotları kullanılarak tespit edildiği rapor edilmiştir (Giriceo ve ark., 2000). Hedef düşük konsantrasyonlarda olduğunda veya örnekler PCR inhibitörleri içerdiğinde veya simptomsuz zeytin ağaçlarında olduğu gibi patojenler düzensiz bir dağılıma sahip olduklarında daha hassas teşhis nested-PCR'la yapılabilmektedir. Doğal olarak enfekteli zeytin dokularında SLRSV, CLRV, ArMV, OLV-1, OLV-2 ve OLRV testi amacıyla nested-PCR yöntemleri geliştirilmiştir (Pantoleo ve ark., 2001). Bu çalışmada RT-n-PCR yöntemi ve bir dizi primer hassasiyet ve özelleşmeyle birlikte tanımlansa da, gelecek çalışmalarda kontaminasyon riskinin çözümlenmesi gerektiği rapor edilmiştir. Aynı yıl içerisinde, zeytin ağaçlarında bulunan SLRSV'yi de içeren altı virüsün eş zamanlı ve kolorimetrik (Renk reaksiyonu veren PCR yöntemi) olarak tanısı tek aşamalı çoklu (multiplex) RT-PCR ile gerçekleştirilmiştir (Bertolini ve ark.,2001). Bu metot zamandan tasarruf sağlaması ve maliyeti açısından monospesifik RT-PCR yöntemi ile kıyaslanmıştır. Kolorimetrik teşhis metodunu kullanma, birçok örneğin analizine olanak sağlamış, hassaslığı 10 kat arttırmış ve toksik etidyum bromid (EtBr) kullanılan jel kullanılmamıştır. Bu yöntem zeytinde sağlık ve sertifikasyon programlarında rutin olarak kullanım için önerilmiştir. İki yıl sonra aynı çalışma ekibi, zeytinin bir bakteri ve 4 virüsün (SLRSV, CLRV, CMV, ArMV) eş zamanlı olarak teşhis edilmesine olanak sağlayan çoklu nested RT-PCR'yi tek tüp içinde geliştirmiştir (Bertolini ve ark., 2003). Bu çalışmada 245 zeytin ağacı, her iki yöntemin hassasiyetini karşılaştırmak amacıyla, çoklu RT-PCR ve çoklu nested-RT-PCR yöntemleriyle analiz edilmiştir. Daha önce ilk olarak çoklu RT-PCR ile test edilip negatif bulunmuş olan 20 örnek, çoklu nested RT-PCR testi ile 4 virüsle enfekteli bulunmuştur. Çoklu nested RT-PCR ile 11 ağaçta (%4.5) SLRSV tespit edilmiş ve 'Manzanilla' çeşidi 4 ağaçta SLRSV ve CLRV'nin karışık enfeksiyonları (%1.6) belirlenmiştir. Bu metot nested ve çoklu tekniklerinin duyarlılık ve avantajlarını kombine etmiştir.

Tek aşamalı RT-PCR protokolü ayrıca İtalya'da zeytin ağaçlarının yapraklarında SLRSV'nin tespiti için geliştirilmiştir (Faggioli ve ark., 2002). Bu araştırmada düzenlenen ve kullanılan primerler, yanlış pozitif veya spesifik olmayan ürün vermeksizin SLRSV'nin etkin bir şekilde tespitine olanak sağlayan yüksek seçicilik

göstermiştir. Bu yöntem çok hızlı ve duyarlı bulunmuş ve zeytinde SLRSV'nin teşhisi için kitle ölçüm potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir.

2.9. *Cherry leaf roll virus* (CLRv; Kiraz yaprak kıvrıcılık virüsü)

CLRv *Nepovirus* cinsinin *Comoviridae* familyasının bir üyesidir. Zarfsız (non-enveloped), çok yüzlü (icosahedral) şekilli, 28 nm çapında partiküllere sahiptir. Doğrusal pozitif anlamlı ssRNA'sı iki parçalıdır ve RNA2'nin 3' ucunda 1,5 kb uzunluğunda kodlanmayan bölge mevcuttur (Gentkow ve ark., 2005). CLRv ilk olarak *Ulmus americana* (American karaağacı), *Prunus avium* (kiraz) ve *Juglans regia* (ceviz)'de rapor edilmiştir. CLRv çoğu kez dişbudak ve huş ağacında, kirazda, mürver ve cevizde dallarda yaprak gelişiminin gecikmesi, yaprakta klorotik çizgililik ve dalların ya da tüm ağacın geriye ölümleri şeklinde belirtilen semptomlar meydana getirir (Hamacher ve Giersiepen, 1989; Hamacher ve Quadt, 1991; Rebenstorf ve Obermeier, 2003), ancak zeytinlerde semptom vermez (Savino ve Galitelli, 1981). CLRv ayrıca *Rheum rhabarbarum* L. (ravent) gibi bazı otsu bitkileri de enfekte eder ancak virüsün kaynağı belirlenememiştir (Jones, 1985).

CLRv doğada asıl olarak tohum veya polenle taşınır, bu da bir bitki türü içindeki yayılımı sağlar; aşılama da kapsayan mekanik taşınma da mümkündür (Mircetich ve ark., 1980; Cooper ve ark., 1984). Son zamanlarda zeytinde CLRv'nin tohumla taşındığı ispatlanmış ve tohumdan kaynaklı enfeksiyonlar %41 olarak rapor edilmiştir (Saponari ve ark., 2002).

Avrupa'da ceviz fidanlıklarında CLRv'nin ekonomik öneme yol açtığı rapor edilmiştir. Son yıllarda ABD'de CLRv, *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) veya *Prune dwarf virus* (PDV) ile birlikte karışık enfeksiyon şeklinde ortaya çıktığında kiraz ağaçlarında verim azalmasına neden olmuştur (Rebenstorf ve ark., 2005). CLRv'nin zeytin ağaçlarında ekonomik önem taşıdığına dair bir kayıt yoktur. Zeytin ağaçlarında CLRv'nin dağılımı İtalya (1981), Portekiz (1990) ve İspanya (1998)'dan (Martelli, 1999); Türkiye (Çağlayan ve ark., 2004); Suriye (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Lübnan (Fadel ve ark., 2005)'den rapor edilmiştir.

CLRV'nin genomik yapısı hala bilinmemektedir, ancak morfoloji ve partikül şekli *Nepovirus*'lerde sınıflandırılan *Comoviridae* familyasının aynıdır (Jones, 1985). Son zamanlarda farklı CLRV izolatlarının karakterizasyonları üzerine yapılan iki çalışma Alman araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir. Farklı konukçu bitkilerinden alınan 10 CLRV izolatı DAS-ELISA ve Immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR) ile analiz edilmiştir (Gentkow ve ark., 2005). Test edilen 10 CLRV izolatı, siyah mürverden elde edilen CLRV izolatı partiküllerine karşı üretilen poliklonal antiserum ile teşhis edilememiştir.

Diğer bir çalışmada, zeytinin yer almadığı 17 farklı konukçu bitki türünden elde edilen 63 CLRV izolatı moleküler ve serolojik seviyede karakterize edilmiştir (Rebenstorf ve ark., 2005). Bu çalışmada, viral genomik RNA'nın 3' kodlanmayan bölgesindeki 280 bp uzunluğundaki fragmentinin filogenetik analizleri konukçu türlerine bağlı olarak altı farklı izolat grubunu açığa çıkarmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, CLRV strainlerinin önemli ölçüde değişken olmasının ve bunların belli konukçulara bağlı olarak değişmesinin nedeninin virüsün doğal taşınma yolunun polen yada tohumla olması, bu şekilde çapraz türler arasında taşınmanın etkisiz olması ve bu durumda hızlı genetik izolasyon ve CLRV varyantlarının özel konukçu türlerine adapte olmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

2.10. *Arabis mosaic virus* (ArMV; Arabis mozaik virüsü)

ArMV, *Nepovirus* cinsinin *Comoviridae* familyasına mensuptur. Çok geniş konukçu dizini olan ve *Xiphinema diversicaudatum* isimli vektör nematodla taşınan bu virüs polihedral viral partiküllere sahiptir. Mekanik olarak inokule edildiğinde, çift-kotiledonlu 28 familyadan 93 türü enfekte ettikleri gözlenmiştir (Schmelzer, 1963). Virüsün başlıca önemli konukçuları çilek, şerbetçiotu, asma (*Vitis spp.*), ahududu (*Rubus idaeus*), *Rheum spp.*, siyah mürver, şeker pancarı, kereviz, glayol, atturpu ve maruldur. Virüs aynı zamanda İtalya (Martelli, 1999), İspanya (Bertoloni ve ark., 2001), Türkiye (Çağlayan ve ark., 2004), Suriye (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Lübnan (Fadel ve ark., 2005)'da zeytinlerde de rapor edilmiştir.

ArMV'nin meydana getirdiği en yaygın semptomlar, yapraklarda beneklenme ve lekelenmeler, bodurlaşma ve enasyonları kapsayan deformasyonlardır. Semptomlar konukçu bitkideki değişime bağlıdır ancak virüs izolatu, bitki çeşidi, mevsim ve yıla da alakalıdır. Zeytinleri de kapsayan bir çok ArMV enfeksiyonu latenttir ve bitkiler hiçbir semptom göstermezler (Martelli ve ark., 2002b).

ArMV'nin neden olduğu hastalıklar belirlediği her yerde yıkıcı etkilere neden olabilir. Çilek ve ahududu ciddi şekilde etkilenebilir ve hatta virüs bazı çeşitlerde ölüme neden olabilir. Hastalıklar belli çeşitlerde çilekte mozaik ve sarı buruşukluk ve ahududunda sarı bodurlaşma diye adlandırılmasına neden olmuşlardır. Ancak bu hastalıklar İngiltere'nin güneyinde önceleri çok önemli iken günümüzde oldukça seyrek olarak bulunmaktadır (Jones ve ark., 1989). Almanya'da şerbetçiotunda ne semptomlar ne de karakteristik hasarların hiçbirini henüz gözlenmemesine rağmen gerçekte virüs bazı şerbetçiotu yetiştirilen bölgelerde test edilen bitkilerin %40'ında bulunmuştur (Adams ve ark., 1987). ArMV'nin PDV veya PNRSV ile karışık enfeksiyonları kirazlarda 'European rasp leaf' hastalığına neden olmuştur (Nemeth, 1986). ArMV'nin zeytinlerde ekonomik önem taşıdığına dair geçerli bir kayıt yoktur.

ArMV genomu pozitif anlamlı iki ssRNA içerir, RNA1 ve RNA2, RNA2'nin 3' ucu poliadenillidir ve 5' ucunda kovalent olarak bağlı küçük, genoma-bağlı viral protein (VPg) taşımaktadır. RNA2 son ürünü proteolitik ayrılma ile olgunlaşan N-terminus'da protein 2A içeren bir poliproteini kodlar. ArMV serolojik olarak GFLV ile uzak akrabadır (Dias ve ark., 1963). İlginç bir şekilde, ilk baz dizisi karşılaştırmaları ArMV izolatlarının 2A dizilerinin arasındaki değişkenliğin GFLV izolatlarının 2A dizileri arasındakinden daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Wetzel ve ark., 2001). Bu çalışmadan bir yıl sonra, İtalya'dan zeytin izolatu da içeren 19 ArMV izolatının 2A geninin klonlama ve baz dizisi tayini çalışmaları sonucunda 2A proteininin büyüklük ve dizi benzerliğine göre dört gruba ayrıldığı ileri sürülmüştür (Wetzel ve ark., 2002). Grup I bir asma izolatu, grup II farklı asma izolatları ve bir kurtboğan izolatu, grup II asma izolatları, bir zeytin, bir çilek ve bir alev çiçeği izolatu, grup IV asma izolatları, bir şeker pancarı izolatu, bir ahududu izolatu, bir şerbetçi otu izolatu, ve bir leylak izolatu içirmiştir. ArMV zeytin izolatu grup II'den asma-NW ve asma-We-ch izolatları ile sırasıyla %92 ve %93 benzerlik göstermiştir. Grup II'den asma-Dw-d2, asma-Sw-sr, asma-Musc, asma-W17, çilek-PV-215 ve alev çiçeği-PV216 arasındaki benzerlik %85-

86 arasında değişmiştir. ArMV zeytin izolatları grup I ve grup II üyeleri ile benzerlikleri sırasıyla %68 ve %73-76 olmuştur. Grup IV üyeleri ile olan benzerlik %68'den az olarak gerçekleşmiştir.

Son zamanlarda ArMV Lübnan ve Suriye'de dsRNA ve RT-PCR metotları kullanılarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada, ArMV'nin zeytinlerde bulunma sıklığının düşük olması ve virüsün diğer konukçularda bulunmayışından dolayı, virüsün her iki ülkeye enfekteli stoklarla giriş yaptığı sonucuna varılmıştır (Al Abdullah ve ark., 2005; Fadel ve ark., 2005).

2.11. Diğer Virüsler

CMV, TMV ve TNV-D (önceden Olive mild mosaic virus olarak adlandırılan) gibi çoğu zeytin virüsü simptomsuz ağaçlardan izole edilmiştir (Martelli ve ark., 2002b).

CMV ilk olarak Savino ve Galitelli (1983) tarafından simptom göstermeyen ağaçlardan izole edilmiştir ve bu sonuçlar Rei ve ark., (1993) tarafından onaylanmıştır. Bu araştırmada CMV tek başına veya SLRSV ile birlikte enfekteli olarak tespit edilmiştir. CMV zeytin ağaçlarında İtalya'da (1983), Portekiz'de (1993), İspanya'da (1998) (Martelli, 1999) ve Türkiye'de (1998) (Çağlayan ve ark.2004) tespit edilmiştir.

TMV, damar bantlaşması, yalnızca ana damarlarda renk değişimi, şiddetli yaprak dökümü ve gerileme gösteren hastalıklı bitkilerden izole edilmiştir (Triolo ve ark., 1996). Bu semptomlara neden olanın TMV olduğuna dair şimdye kadar kesin ispatlanmış bir şey yoktur.

TNV tütün, lale, fasulye, hıyar, patates gibi otsu konukçular ve armut, elma, turunçgil, asma ve son zamanlarda zeytin gibi bazı odunsu bitkilerde tespit edilmiştir (Kassanis, 1970; Kurtsak, 1981). Zeytinde enfeksiyon yapan virüslerin çoğu İtalya'dan rapor edilse de, TNV sadece Portekiz'de kaydedilmiştir (Felix ve Clara, 2002).

TNV saflaştırılmış virüs partiküllerinin serolojik ve moleküler özellikleri dikkate alınarak *Tobacco necrosis virus D* (TNV-D, *Necrovirus* cinsi, *Tombusviridae* familyası) türünün bir üyesi olarak tanımlanmıştır (Cardoso ve ark., 2004). Protein kılıf

dizileri temel alınarak yapılan analizler sonucu daha önce “*Olive mild mosaic virus*” (OMMV) olarak adlandırılırken *Necrovirus* cinsinin yeni bir üyesi olarak önerilmiştir (Cardoso ve ark., 2005). Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi’nin (ICTV) yedinci raporuna göre TNV izolatları TNV-A ve TNV-D olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu virüsler küçük, çok yüzlü, 28 nm çapında, pozitif anlamlı ssRNA içerirler ve genomu 3.8 kb uzunluğundadır ve doğal olarak toprak kökenli fungus *Opidium brassica* (wor.) Dang ile taşınırlar (Teakle, 1962). OLV-1, *Leek white stripe virus* (pırasa beyaz çizgi virüsü; LWSV) ve *Beet black scorch virus* (şekerpancarı siyah yanıklık virüsü; BBSV) nükleotid dizini ve genom organizasyonu tamamen bilinen diğer üç Necrovirüs’dür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali/ Survey Çalışmaları

Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki Hatay, Adana, Osmaniye, İçel ve Kahramanmaraş illerindeki ticari bahçeler, kamuya ait ve özel fidanlıklardan alınan sürgün örnekleri çalışmada bitki materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Test edilen virus etmenleri ve virus ile enfekteli pozitif kontrol örnekleri

Toplanan bitki materyalleri 8 farklı virüse karşı test edilmiştir. Bunlar:

- *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV, Çilek latent halkalı leke virüsü),
- *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV, Arabis mozayik virüs),
- *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Kiraz yaprak kıvrılma virüsü),
- *Cucumber mosaic virus* (CMV, Hıyar mozayik virüsü),
- *Olive latent ringspot virus* (OLRSV, Zeytin latent halkalı leke virüsü),
- *Olive latent-1 virus* (OLV-1, Zeytin latent-1 virüs),
- *Olive latent-2 virus* (OLV-2, Zeytin latent-2 virüs),
- *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV, Zeytin yaprak sararması ile ilişkili virüs)'dür.

Bu etmenlerin testinde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere CLRV, OLRSV, SLRSV, OLYaV ve OLV-2 için zeytin sürgünleri ve OLV-1 için tütün yaprakları Dr. F. Faggioli'den (Roma, İtalya) temin edilmiştir. OLYaV pozitif kontrol ayrıca Dr. A. Minafra (Bari/İtalya)'dan da temin edilmiştir. ArMV ve CMV pozitif kontrol örnekler ELISA kitlerinden temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Survey Çalışmaları ve Bitki Materyalinin Temini

Hatay, Adana, Osmaniye, İçel ve Kahramanmaraş illerinde bulunan ticari bahçeler, kamuya ait ve özel fidanlıklara 2006 yılının Mart-Nisan aylarında yapılan surveyler sonucunda, virüs simptomsu gösteren ağaçlardan ve virüslerin latent olarak taşındıkları göz önüne alınarak simptomsuz ağaçlardan da tesadüfi olarak bahçenin en az % 5 ini temsil edecek şekilde örnekler alınmıştır. Örnekler ağaçların 4 farklı yönünden 20-25 cm'lik sürgünler kesilerek alınmıştır. Alınan sürgünler plastik torbalara etiketlenerek yerleştirilmiş ve buz içeren kutularda nükleik asit izolasyonu yapıncaya kadar saklanmak üzere laboratuara taşınmıştır.

3.2.2. Materyalin Muhafazası

Araziden alınan ve bitki materyali olarak kullanılacak olan sürgünlerin kabuk kısımları kazınarak alınmış ve derhal sıvı azotta dondurularak nükleik asit izolasyonu yapıncaya kadar -80°C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

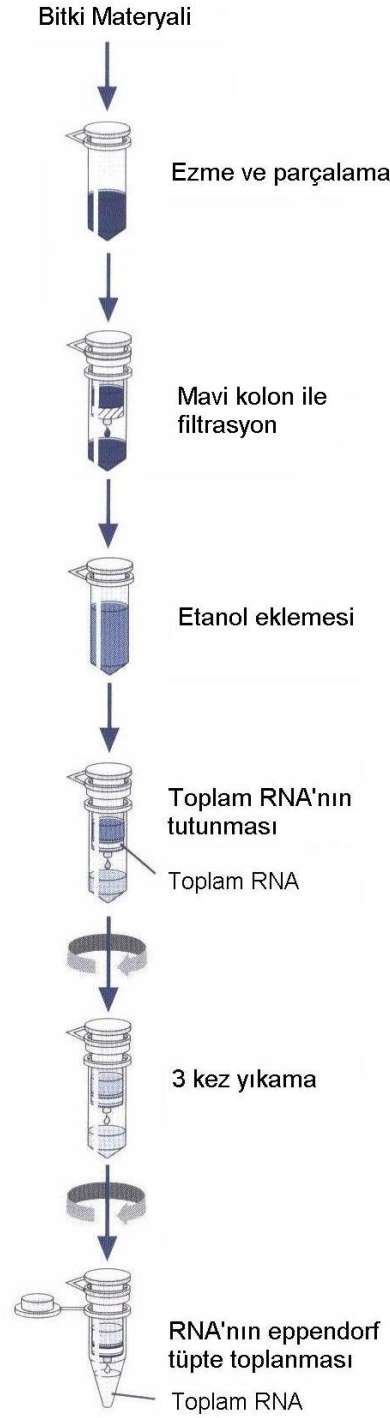
3.2.3.1. Nükleik Asit İzolasyonu

Nükleik asit izolasyonu Faggioli ve ark. (2005)'na göre yapılmıştır. Bu amaçla, zeytin ağaçlarından toplam RNA izolasyonu RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, GmbH,

Germany) ile firmanın önerdiği yöntemler doğrultusunda yapılmıştır (Şekil 3.1). Ekstraksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Zeytin ağacının değişik sürgünlerinden kazınan 1 gr örnek sıvı azot yardımıyla ezilmiş ve 1 gr alınmıştır.
2. Donmuş haldeki ezilmiş bitki örnekleri erimedden 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
3. Tüplere 450 µl RLT tampon çözeltisi eklenmiş ve girdap karıştırıcıda karıştırılmıştır. NOT: Kullanımdan hemen önce RLT tampona β -ME (Mercapto ethanol) eklenir. (10 µl β -ME / 1 ml RLT)
4. Karışım mor renkli kolonlara aktarılmış ve 15.000 rpm'de 2 dak. santrifüj edilmiştir.
5. Bitki artıklarının toplandığı kolon atılmış ve alt kısımda toplama tüpünde biriken 400 µl sıvı faz alınarak yeni 1.5 ml' lik ependorf tüplere aktarılmış, üzerine 200 µl %96'lık Ethanol (EtOH) eklenmiştir.
6. Karışım pembe kolonlara aktarılmış ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
7. Kolonun alt kısmında toplama tüpünde biriken sıvı dökülerek uzaklaştırılmış ve kolon tekrar aynı toplama tüpü içine yerleştirilmiştir.
8. Kolona 700 µl RW1 tamponu eklenmiş ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
9. Kolonun alt kısmındaki toplama tüpünde toplanan sıvı dökülmüş ve kolon yine aynı tüp üzerine yerleştirilmiştir.
10. Kolona 500 µl RPE tamponu eklenmiş ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
11. 9 ve 10 nolu yöntem aynen bir kez daha tekrar edilmiştir.
12. Kolon yeni bir toplama tüpü içine alınmıştır ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek kolon içerisindeki tüm sıvının uzaklaşması sağlanmıştır.
13. Toplama tüpü atılmış ve kolon RNA'nın toplanacağı yeni 1.5 ml'lik ependorf tüp içine yerleştirilmiştir.
14. Kolona 50 µl RNase içermeyen su eklenmiştir ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
15. Kolon atılmış ve ependorf içinde toplanan 50 µl RNA solüsyonu, RT-PCR yapılanaya kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. RT-PCR testlerinde 1/10 oranında sulandırılarak kullanılmıştır.

RNeasy Bitki Mini Kit Yöntemi



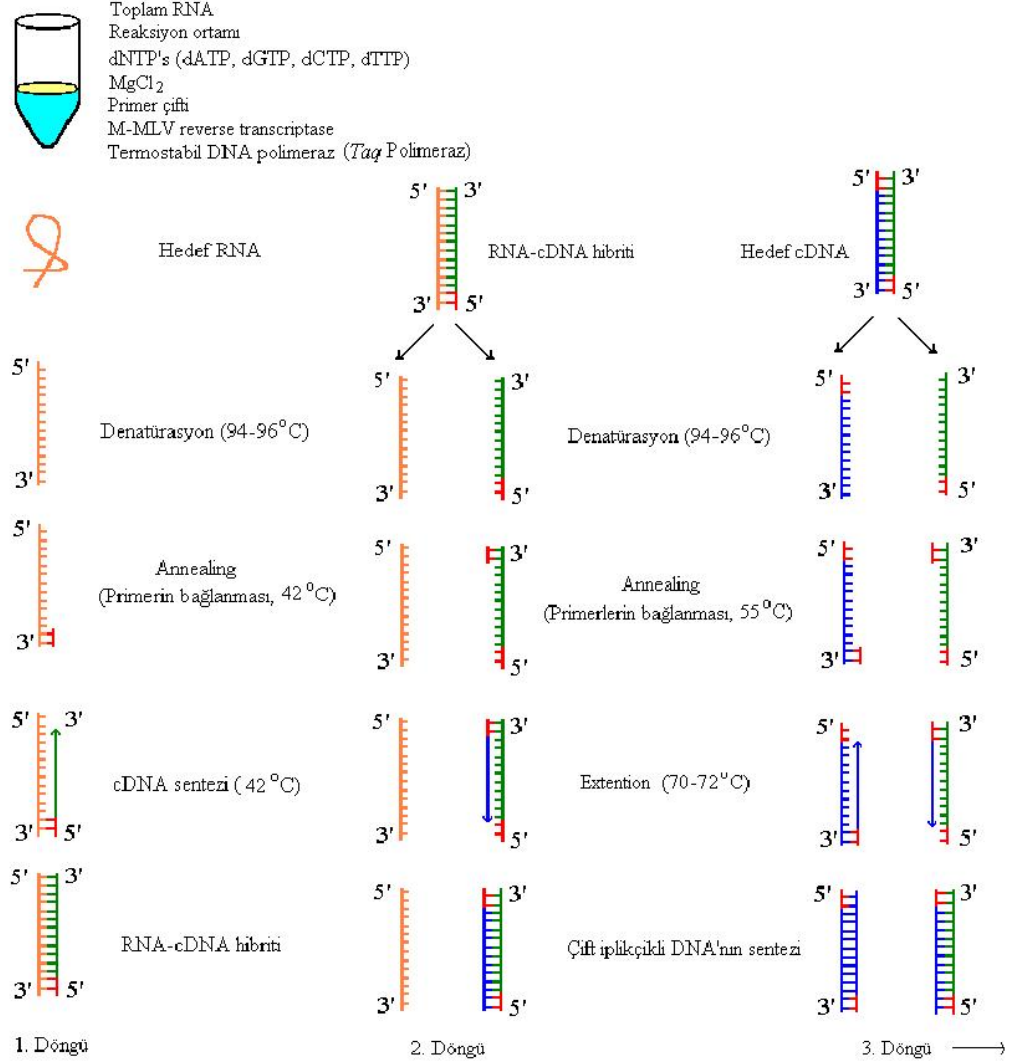
Şekil 3.1. RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Germany) ile bitki dokularından toplam RNA ekstraksiyonunun şematik ifadesi.

3.2.3.2. Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR; Reverse Transcription –Polymerase Chain Reaction)

RT ve PCR tek, kesintisiz bir yöntemle (Şekil 3.2) Faggioli ve ark. (2002)'na göre yapılmıştır. Her bir reaksiyon karışımı toplam 30 µl'den oluşmuştur. Tek bir reaksiyon karışımında (Çizelge 3.1) 1-2 µl RNA (1-2 µg), 1'er µl virüs spesifik primer çifti (Çizelge 3.2) (her biri 20 pmol/µl), 1 µl dNTP'ler (10 mM), 1.8 µl MgCl₂ (25 mM), 3 µl 10x reaksiyon ortamı, 2 U Taq DNA polimeraz (Promega, ABD), 20 U RNase inhibitörü (MBI Fermentas, GmbH, Germany) ve 20 U M-MuLV revers transkriptaz enzimi (MBI Fermentas, GmbH, Germany) ile hazırlanmıştır. Amplifikasyon için PCR cihazı 1 döngü 42 °C'de 30 dakika, 95 °C'de 3 dakika ve 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 45 saniye, son olarak 72 °C'de 7 dakika olarak programlanmıştır.

Çizelge 3.1. RT-PCR reaksiyon karışımının içerikleri ve konsantrasyonları

İçerik	Ambalaj Konsantrasyonu	1Xreaksiyon (30 µl)	Son Konsantrasyon
Steril d ₂ H ₂ O	-	20.4 µl	-
PCR buffer	10X	3 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	1.8 µl	1.5 mM
dNTP's	10 mM	1 µl	333 µM
Primerler (Forward/reverse)	20 pmol/µl	1+1 µl	0.6+0.6 pmol/µl
Taq polymerase	5 U/µl	0.2 µl	1 U
Reverse transcriptase (M-MuLV)	200 U/µl	0.1 µl	20 U
RNA (1:10 seyreltilmiş)	-	1.5 µl	1-2 µg



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

Çizelge 3.2. Tez kapsamında test edilen zeytin virüslerin primer dizilimleri (Faggioli ve ark., 2005)

Virüs	Primer yönü	Amplikon uzunluğu (nt)	Primer dizilimi (5'-3')
OLV1-HA	İleri	299	ACACAGAAATCATAAGTGCC
OLV1-CA	Geri		CCATAGCACCATCATAACC
SLRSV-5D	İleri	293	CCCTTGGTACTTTTACCTCCTCATTGTCC
SLRSV-3D	Geri		AGGCTCAAGAAAACACAC
ArMV-5A	İleri	302	TACTATAAGAAACCGCTCCC
ArMV-3A	Geri		CATCAAAACTCATAACCCAC
CLRV-5	İleri	416	TGGCGACCGTGTAACGGCA
CLRV-3	Geri		GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG
OLYaV-H	İleri	346	ACTACTTTTCGCGCAGAGACG
OLYaV-C	Geri		CCCAAAGACCATTGACTGTGAC
OLYaV-F	İleri	766	AGTGACGACTTCTCAGCAAAGC
OLYaV-R	Geri		CAATGACCCCTTCAACACCAGG
OLYaV-M1*	İleri	383	CGAAGAGAGCGGCTGAAGGCTC
OLYaV-M2*	Geri		GGGACGGTTACGGTCGAGAGG
CMV-CPN5	İleri	280	ACTCTTAACCACCCAACCTT
CMV-CPN3	Geri		AACATAGCAGAGATGGCGG
OLRSV-R1	İleri	356	GATTGCCAAGGAATATGCTG
OLRSV-R2	Geri		CTCCCAACAAATGATTGCTG
OLV2-H	İleri	206	GAAGGTGGCTCGCCTAGAG
OLV2-C	Geri		GCCAGGAGTTTGAGCTTTG

* Primer dizileri Sabanadzovic ve ark., 1999'dan alınmıştır.

3.2.3.3. RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi : Agaroz Jel Elektrofrez

RT-PCR ürünlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla, reaksiyondan sonra ürünler %1-1.5 agaroz jelde elektrofrez işlemi yapılmıştır. Elektrofrez 1XTAE ortamında yapılmış, aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 3 µl yükleme ortamı (6X; 15 ml için 75 mg bromophenol blue, 75 mg xylene cyanol, 18 g gliserol, 6 ml 50XTAE) ile birlikte 12 µl yüklenen RT-PCR ürünleri, 110 V'da 40

dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. İşlem bittikten sonra jel 1 mg/ml etidyum bromid (EtBr) içeren 1XTAE ortamında 5-10 dakika bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra UV transillüminatörde sonuçlar gözlenerek polaroid fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.4. Baz dizilerinin temini ve filogenetik analizler

Zeytin virüslerinden enfekteli olan örneklerden elde edilen RT-PCR ürünleri soğrudan baz dizisi tayin eden firmaya (İontek, İstanbul) çift yönlü okuma yapılmak üzere gönderilmiş ve firmadan baz dizileri e-mail yoluyla ulaştırılmıştır. Firmanın gönderdiği baz dizilerinin birleştirilmesi DNAMAN (Lynnon Corporation; Demo) programında yapılmış ve doğruluğu NCBI (National Center for Biotechnology Information; Bethesda, ABD)'ın bir hizmeti olan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Virüslerin nükleotid ve aminoasit dizilimlerinin çoklu sıralanması Clustal W çoklu dizilim sıralama programı kullanılarak yapılmıştır (Thompson et al., 1994). Benzerlik indeksi DNAMAN programı ile oluşturulmuştur. Eşleştirmeler PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0 Beta Version programı ile komşu eşleştirme metodu kullanılarak filogenetik ağaç oluşturmak için veri olarak kullanılmıştır (Swofford, 1993). Bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi çalışmaları ve gözlenen simptomlar

Doğu Akdeniz Bölgesi'nden Adana ilinin 3 ilçesi, Hatay ilinin 10 ilçesi, İçel'in 2, Kahramanmaraş'ın 1 ve Osmaniye'nin 2 ilçesinden örnekler toplanmıştır (Çizelge 4.1). Sörveyler sırasında toplam 85 bahçe ziyaret edilmiş ve toplanan 431 adet zeytin örneği OLV-1, OLV-2, OLRSV, CLRV, CMV, ArMV, SLRSV ve OLYaV virüsleri enfeksiyon durumlarını belirlemek amacıyla test edilmiştir.

Yapılan sörveylerde zeytin ağaçlarının büyük bölümünde herhangi bir simptom görülmezken en çok karşılaşılan simptomlar ağacın genelinde veya kısmi alanlarında kloroz, diğer ağaçlarla karşılaştırıldığında tüm yapraklarda küçülmeler ve orak şekilli yaprak oluşumlarıdır (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Doğu Akdeniz Bölgesi illerinden toplanan zeytin örneği ve ilçelere göre örnek miktarları

İller	Bahçe sayısı	Test edilen örnek sayısı
Adana	5	25
-Ceyhan	10	40
-Karaisalı	2	10
-Kozan		
Hatay	9	43
-Altınözü	5	25
-Antakya (Merkez)	5	25
-Belen	1	5
-Dörtyol	7	35
-Erzin	6	30
-Hassa	9	40
-Kırıkhan	1	1
-Reyhanlı	5	25
-Samandağ	5	25
-Yayladağ		
İçel	2	17
-Erdemli		
Kahramanmaraş (Merkez)	2	30
Osmaniye	8	40
-Akylar	3	15
-Kadirli		
Toplam	85	431

Tüm bu simptomlara ek olarak OLYaV, İtalya'nın yöresel çeşidi olan Biancolilla yapraklarındaki açık sarıya dönen renk açılmalarıyla karakterize edildiği bildirilmiştir (Savino ve ark., 1996). Ayrıca SLRSV çilek ve diğer meyve bitkilerinde genellikle latent olarak bulunsa da, zeytin yapraklarında şiddetli daralma ve kıvrımlara, salkımsı büyümelere, meyvelerde deformasyona ve zeytinlerde verim azalmasına neden olduğu gözlenmiştir (Faggioli ve ark., 2002; Çağlayan ve ark., 2006).

4.2. RNA ekstraksiyonu

Zeytin virüslerinin bitki dokusunda konsantrasyonlarının çok düşük olduğu ve ağaç bünyesinde düzensiz dağılım gösterdiği (Bertolini ve ark, 1998; 2001; Martelli, 1999) bildirilmiştir. Bu nedenle, RNA ekstraksiyonları yapılırken sekiz adet 1-2 yıllık zeytin sürgünlerinin gövdesindeki floem dokularından kazıma yöntemi ile 1 gr doku alınmış ve sıvı azotta ezilmiştir, içerisinde 0.1 gr'ı ekstraksiyonda kullanılmıştır.

Zeytin virüslerinin testinde kullanılan Qiagen ekstraksiyon kiti en iyi sonuç veren ve pratik bir yöntem olarak önerilmiştir (Faggioli ve ark., 2005). Araştırmacılar diğer yöntemlerle ekstraksiyonların virüs testinde sorun yarattığını ve yanlış negatif sonuçlar verdiğini ifade etmiştir (Kişisel iletişim).



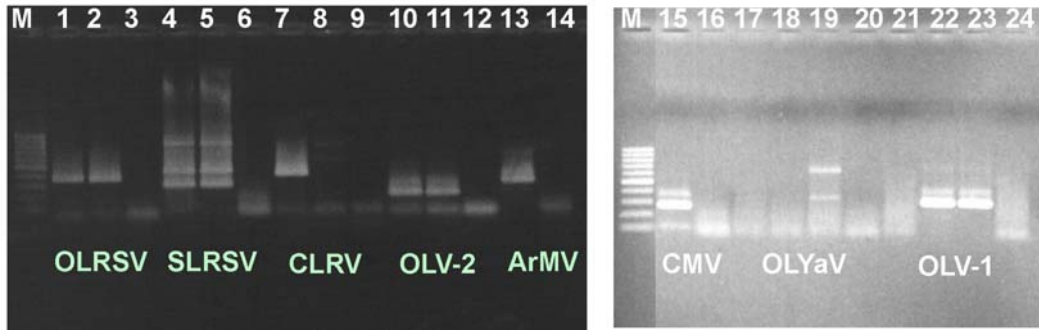
Şekil 4.1. Arazide gözlenen zeytinlerde orak şekilli yaprak simptomları (Hatay)

4.3. Zeytin virüslerinin RT-PCR testlerinde sistem kurma çalışmaları

Toplanan örnekler test edilmeden önce pozitif örnekler kullanılarak RT-PCR virüs test sistemleri kurulmuştur. Bu amaçla Dr. Faggioli'den temin edilen zeytin sürgünlerinden RNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş ve RT-PCR'ye tabi tutulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda OLV-1 için 299 bp, OLV-2 için 206 bp, OLRSV için 356 bp, CLRV 416 bp, CMV için 280 bp, ArMV 302 bp, SLRSV için 293 bp, OLYaV için 346 bp uzunluğunda spesifik DNA çoğalmaları tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Yapılan çalışmalarda RNA ekstraksiyonlarından doğrudan RT-PCR ve 1/10 sulandırılarak yapılan RT-PCR çalışmaları arasında fark görülmemiştir. Ancak fazla RNA kullanımının bitkiden gelen PCR inhibe edici maddeler içermesi ve yoğun RNA'nın PCR'ı olumsuz etkilemesi nedeniyle RNA'lar 1/10 sulandırılarak testlere devam edilmiştir.

Çalışma kapsamında aynı virüs için birden fazla pozitif örnek temin edilmesine rağmen yapılan testlerde hepsi pozitif reaksiyon vermemiştir. Bunun nedeni, örneğin alındığı mevsim, kullanılan organ ve virüs konsantrasyonunun az olması olarak düşünülmektedir..



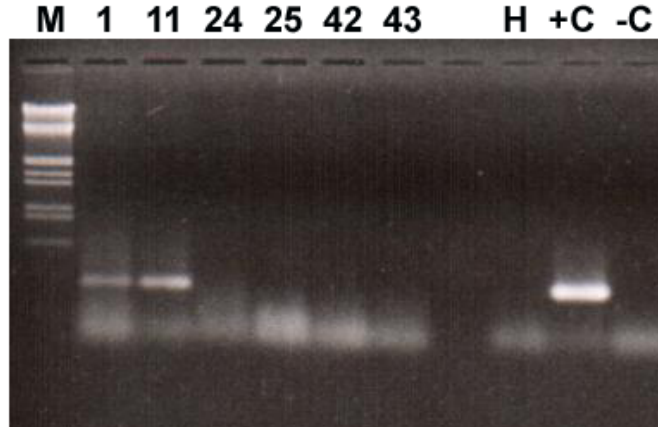
Şekil.4.2. Araştırılan virüslerle enfekteli zeytin dokuları ile RT-PCR sistem kurma çalışmaları. M Markır (MBI Fermentas (GmbH, Almanya) 100 bp DNA ladder, 1, 2 OLRSV pozitif örnekler, 3 OLRSV su kontrol, 4, 5 SLRSV pozitif örnekler, 6 SLRSV su kontrol, 7, 8 CLRV pozitif örnekler, 9 CLRV su kontrol, 10, 11 OLV-2 pozitif örnekler, 12 su kontrol, 13 ArMV pozitif kontrol, 14 ArMV su kontrol, 15 CMV pozitif kontrol, 16 CMV su kontrol, 17, 18, 19 OLYaV pozitif kontrol, 20 OLYaV su kontrol, 21, 22, 23 OLV-1 pozitif kontroller, 24 su kontrolünü ifade etmektedir.

OLV-1 ile enfekteli zeytin dokularından başarılı DNA çoğalmaları gerçekleşmemiş ve daha sonra OLV-1 ile enfekteli tütün dokuları temin edilerek, bu örnek yapılan RT-PCR testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ArMV ve CMV pozitif zeytin kontrol örnekleri zeytin virüsleri konusunda çalışan araştırmacılar tarafından bulunmadığı için ELISA kitlerindeki pozitif kontrol örnekleri daha sonraki RT-PCR testlerinde kullanılmıştır.

4.4. OLV-1 RT-PCR testleri

Toplam 431 adet zeytin örneğinin RT-PCR testleri sonucunda iki örnek OLV-1 ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. Pozitif örneklerin her ikisi de Altınözü/Hatay'dan 40 yaşındaki komşu iki bahçeden alınmıştır. Her iki zeytin örneğinde de RT-PCR sonucunda 299 bp seviyesinde DNA bandı gözlenmiştir (Şekil 4.3).

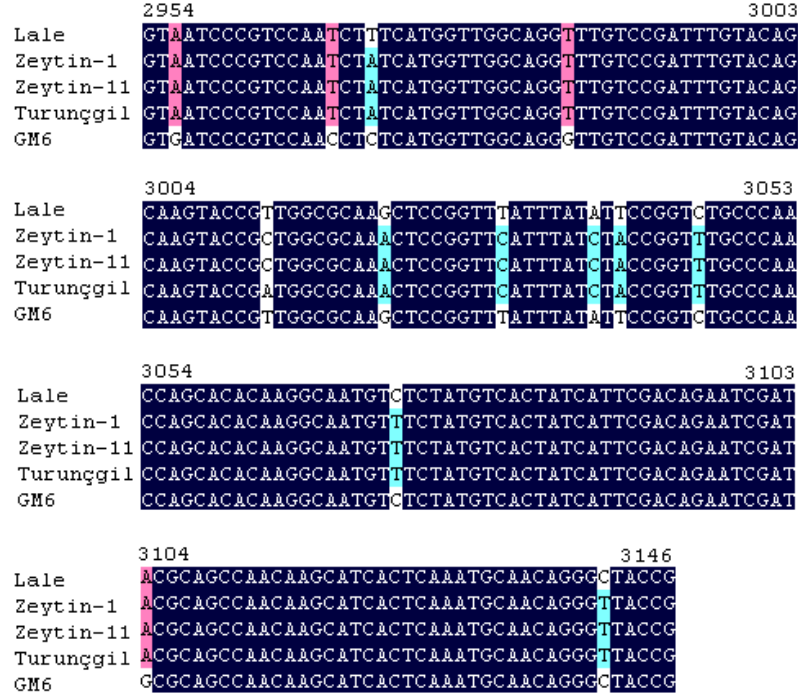
Bu iki örnek dışında toplam 19 örnekte de jelde hafif band oluşumları gözlenmiş, ancak 299 bp seviyesinde keskin bandlar yerine dağınık DNA grupları gözlenmiştir. Yapılan tekrarlı testler sonucunda bu örneklerin negatif olduklarına karar verilmiştir.



Şekil 4.3 RT-PCR ile test edilen zeytin örneklerinde OLV-1 tespit edilen örnekler (1 ve 11 nolu örnekler). M; Markır, H; sağlıklı zeytin örneği, +C; OLV-1 pozitif kontrol, -C; su kontrolü ifade etmektedir.

4.4.1. Tespit edilen OLV-1 izolatlarının karakterizasyonu

Zeytin virüslerinden OLV-1'in gen bankasında kayıtlı 3 izolatı bulunmaktadır. Zeytinden elde edilen GM6 izolatı DQ083996, turunçgilden elde edilen izolat NC-001721 ve laleden izole edilen izolat AB061815 kayıt kodları ile NCBI'da yer almaktadır. Bu çalışmada tespit edilen izolatları gen bankasındaki izolatlar ile karşılaştırmak amacıyla zeytin-1 ve zeytin-11 olarak kodladığımız OLV-1 izolatlarının RT-PCR ürünlerini baz dizisini tayin eden firmaya (İontek, İstanbul) gönderilerek DNA baz dizileri elde edilmiştir. Elde edilen baz dizilerinin ikili baz dizisi karşılaştırma yapan Blast Search yardımı ile analizi sonucunda gen bankasına kayıtlı OLV izolatları ile % 97 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen OLV-1 izolatlarının baz dizilerinin çoklu baz dizisi karşılaştırma analizlerinin sonuçları Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Zeytin örneklerinden tespit edilen iki OLV-1 izolatının (Zeytin-1, Zeytin-11) nükleik asitlerinin gen bankasında mevcut diğer OLV-1 izolatlarının nükleik asitleri ile karşılaştırılması. Lale izolatı NCBI kayıt no: AB061815, Turunçgil izolatı kayıt no: NC-001721, GM6 zeytin izolatı kayıt no: DQ083996. Turunçgil izolatı nükleik asitleri numaralandırmada kullanılmıştır. Siyah taralı alanlar aynı nükleotid dizilerini, renkli alanlar ise karşılaştırmada farklı olan nükleotid bölgelerini göstermektedir.

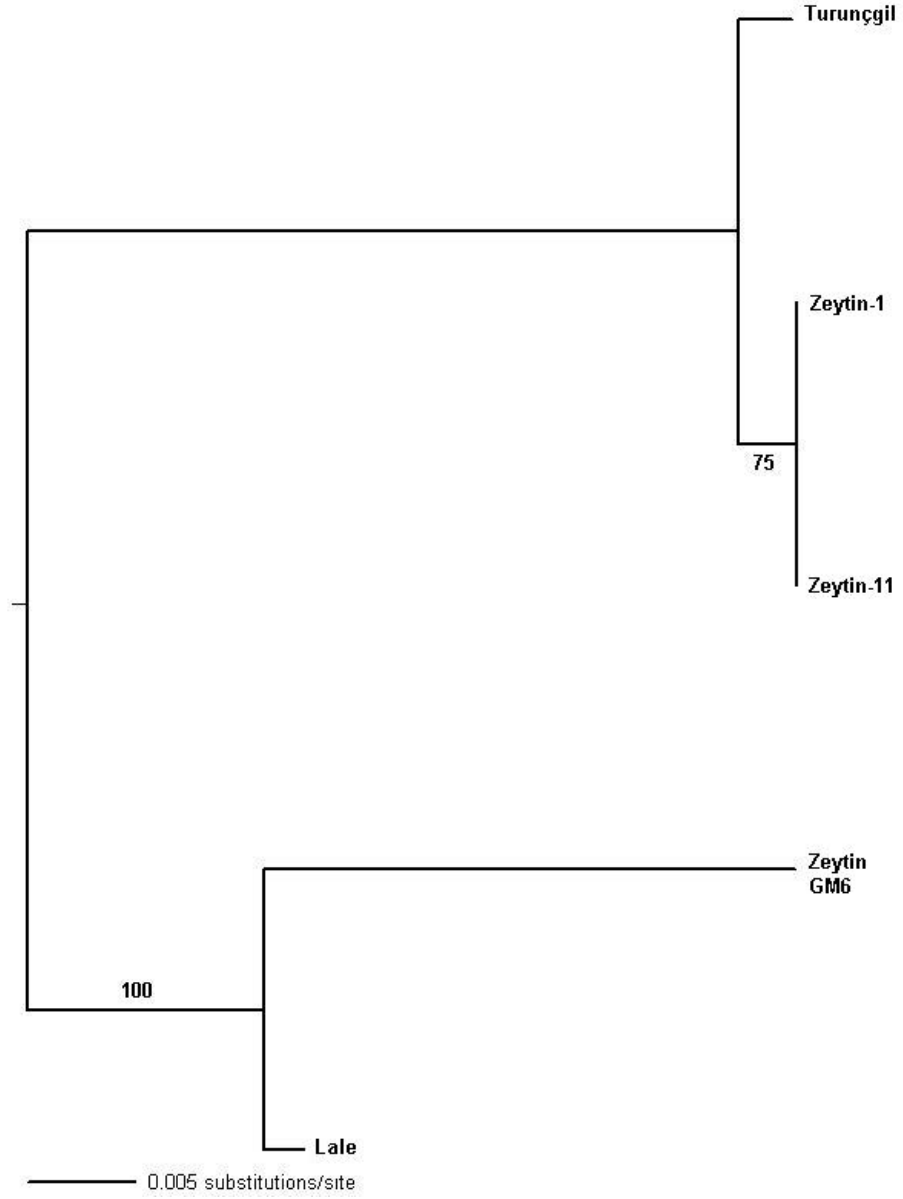
Tespit edilen izolatların baz dizilerinin birbirinin aynı olduğu görülmüştür. Bu durum her iki izolatın araştırılan bölge bakımından birbirinin aynı olduğunu ve aşı ile taşınmış olabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle bu iki izolatın komşu iki bahçeden alınmış olması aşı ile taşınması ihtimalini güçlendirmektedir. Aynı sonuçlar nükleik asit benzerlik indeksinde de gözlenmektedir (Çizelge 4.2). Zeytin-1 ve zeytin-11 izolatları arasındaki benzerlik indeksi 0 olarak ortaya çıkmıştır. Bu tablodaki değerlerin sıfıra yaklaşması izolatlar arasındaki yakınlaşmayı, 1' e yaklaşması ise uzaklaşmayı ifade eder. Benzerlik indeksine göre tespit edilen zeytin-1 ve zeytin-11 izolatları en çok turunçgil izolata benzemektedir (0.005).

Benzer şekilde nükleik asit dizileri ile oluşturulan filogenetik ağaçta (Şekil 4.5) tespit edilen zeytin-1 ve zeytin-11 izolatları turunçgil izolata ile aynı grupta yer almıştır. Turunçgil izolata Türkiye'den Adana ilinde bir turunçgil bahçesinde klorotik cüceleşme semptomu gösteren ağaçlardan izole edilmiştir (Martelli ve ark., 1996). Zeytinden izole edilen OLV-1'in turunçgil izolata benzemesi aşılama, polen vb etkenlerden ziyade daha çok vektörle taşınma ihtimalini ortaya koymaktadır. Ancak, bu virüsün çok yaygın olarak bulunmaması hareket açısından çok aktif olmayan vektörle taşınma olasılığını yansıtmaktadır. OLV-1 *Necrovirus* cinsinde yer almaktadır ve bu cins virüslerin fungus (Chytridiales) ile taşındığı ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından bildirilmiştir (Anonymous, 2007). Martelli ve ark., (1996) turunçgil izolata ile otsu bitkilerde yaptıkları fungusla taşınma araştırmalarında toprak kökenli fungal yapılar görememişlerdir.

Flogenetik ağaçta GM6 zeytin izolata ve lale izolatları oldukça yüksek boot strap değeri (100) ile Türkiye'den elde edilen izolatlardan ayrılmıştır. Bu durum izolatların elde edildiği coğrafyalara göre farklılık gösterdiği görülmüştür.

Çizelge 4.2. Tespit edilen OLV-1 izolatları ile gen bankasında kayıtlı izolatların nükleik asit benzerlik indeksi.

İzolat adı	Lale	Zeytin-1	Zeytin-11	Turunçgil
Lale	0			
Zeytin-1	0.047	0		
Zeytin-11	0.047	0.000	0	
Turunçgil	0.047	0.005	0.005	0
GM6-zeytin	0.026	0.068	0.068	0.068



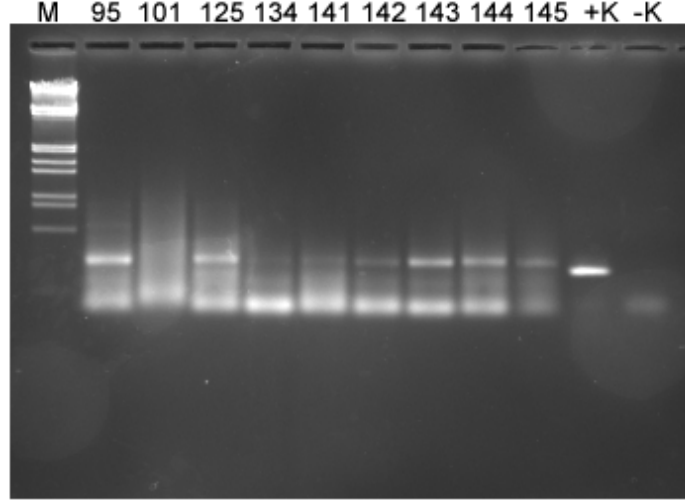
Şekil 4.5. Zeytin örneklerinden tespit edilen iki OLV-1 izolatı (Zeytin-1, Zeytin-11) nükleik asitleri ve Gen Bankasında mevcut diğer OLV-1 izolatlarının nükleik asitleri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç. Lale izolatı NCBI kayıt no: AB061815, Turunçgil izolatı kayıt no: NC-001721, GM6 zeytin izolatı kayıt no: DQ083996. Kollar üzerinde ifade edilen bootstrap değerleri 1000 tekrerrür ile oluşturulmuştur.

4.5. CMV RT-PCR testleri

CMV'nin geniş konukçu dizisi içerisinde zeytinler de yer almaktadır. Test edilen toplam 431 zeytin örneğinden 38 adedinde CMV virüsü tespit edilmiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.6). Türkiye'de Ege bölgesinde CMV enfeksiyonları zeytin yapraklarından ELISA testleri sonucunda %24 oranında bildirilirken çiçeklerden %21.9 olarak bildirilmiştir (Ülkü ve Ertem, 1995). Zeytin ağacında CMV enfeksiyonları İtalya (Savino ve Galitelli, 1983), İspanya (Bertolini ve ark., 2001) ve Portekiz'de (Rei ve ark., 1993) de bildirilmiştir. Etmen zeytin ağaçlarında yayılma göstermezken, son yıllarda, Suriye'de CMV enfeksiyon oranı %22.7 olarak bildirilmiştir (Al Abdullah ve ark., 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 mevcut değildir.

Çizelge 4.3. Toplanan zeytin örneklerinden RT-PCR ile tespit edilen CMV ile enfekteli örneklerin il ve ilçe bazında miktarları

Alındığı İl/İlçe	Örnek No
Hatay / Antakya	95, 124, 125, 134
Hatay / Erzin	314
Hatay / Dört Yol	424, 425
Hatay / Samandağ	518, 520, 529, 530
Hatay / Yayladağ	548, 562, 578
Hatay / Kırıkhan	618, 619, 628, 630, 694, 695, 696, 706
Hatay / Hassa	675
Hatay / Belen	724, 747
Osmaniye / Kadirli	456, 457, 458, 459, 460
Adana / Karaisalı	141, 142, 143, 144, 145,
Adana / Kozan	436, 447
İçel / Erdemli	817



Şekil 4.6. RT-PCR ile test edilen zeytin örneklerinde CMV tespit edilen örnekler (95, 125, 141, 142, 143, 144 ve 145 nolu örnekler). M; Markır, +K; CMV pozitif kontrol, -K su kontrolü ifade etmektedir.

4.6. OLV-2, OLRV, CLRV, ArMV, SLRSV ve OLYaV RT-PCR testleri

OLV-2 ilk kez İtalya'da tespit edilmiş (Savino ve ark., 1984) ve yayılma göstermemiştir (Faggioli ve ark., 2005), ancak Suriye'de yayılabilmiş (Al Abdullah ve ark., 2005) ve %2 oranında OLV-2 enfeksiyonu tespit edilmiştir (Fadel ve ark., 2005). Yapılan bu çalışmada test edilen 431 zeytin örneğinden 65, 448, 801, 806 ve 807 nolu örneklerde OLV-2 primerleri ile RT-PCR sonucu hafif band oluşumları gözlenmiş ancak tekrar edilen PCR testlerinde bu bandlar yeniden elde edilememiştir. Bu ağaçlardan yıl içinde farklı dönemlerde örnekler alınarak farklı primer çiftleri ile de yeniden test edilmeleri gerekmektedir. Diğer örneklerde OLV-2 tespit edilememiştir. OLV-2 *Bromoviridae* familyasının *Oleavirus* cinsinin monotipik bir türüdür ve yaygın olarak bulunmamaktadır. Son yıllarda Yunanistan'da zeytinden farklı bir konukçu olan gene otunda bildirilmiştir (Grieco ve ark., 2002).

OLRSV test edilen zeytin örnekleri arasında tespit edilememiştir. İlk kez zeytinde İtalya'da tespit edilmiş (Savino ve ark., 1983) daha sonraları RT-PCR ile

yapılan testler sonucunda %11.5 oranında Suriye’de (Al Abdullah ve ark., 2005) bildirilmiştir. Bu kayıtların dışında OLRVSV kaydedilmemiştir.

Zeytin ağaçlarında CLRV enfeksiyonları Türkiye’de DAS-ELISA yöntemine göre %23 (Çağlayan ve ark., 2004), RT-PCR yöntemine göre Suriye’de %15 (Al Abdullah, 2004), Lübnan’da %2 (Fadel ve ark., 2005) ve İtalya’da %4.9 (Faggioli ve ark., 2005) oranında bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma kapsamında test edilen 431 örnekte 797, 799, 800, 801, 802, 803 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815 ve 816 nolu örneklerde çok sayıda bandlar elde edilmiş ancak tekrar edilen testlerde pozitif kontrol örnekte gözlenen band örneklerde elde edilememiştir. Diğer tüm örneklerde CLRV enfeksiyonları RT-PCR ile belirlenememiştir. CLRV zeytinlerde simptom vermez ve zeytin ağaçlarında ekonomik kayba yol açtığına dair kayıt yoktur.

ArMV virüsü bu çalışma kapsamında test edilen zeytin örneklerinde tespit edilememiştir. ArMV’nin İtalya (Martelli, 1999) ve İspanya (Bertoloni ve ark.,2001)’dan bildirilmiş, Türkiye’de DAS-ELISA ile %7.1 (Çağlayan ve ark., 2004), RT-PCR ile Suriye’de %0.7 (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Lübnan’da %0.3 oranında (Fadel ve ark., 2005) zeytinlerde enfeksiyon yaptığı rapor edilmiştir. ArMV’nin zeytinlerde bulunma sıklığının düşük olması ve virüsün diğer konukçularda bulunmayışından dolayı, virüsün Suriye ve Lübnan’a enfekteli stoklarla giriş yaptığı sonucuna varılmıştır. ArMV’nin geniş bir konukçu dizisi olmasına rağmen diğer ülkelerde yapılan çalışmalara göre zeytinlerde yaygınlığı oldukça düşük olan bir virüs etmeni olduğu görülmektedir.

OLYaV ilk olarak İtalya’da kaydedilmiştir (Savino ve ark., 1996), son yıllarda Suriye’de %14.3 oranında (Al Abdullah ve ark., 2005) ve Lübnan’da %23.6 (Fadel ve ark., 2005) oranında enfeksiyon yaptığı tespit edilmiştir. Ülkemizde günümüze kadar bu virüse dair hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma kapsamında iki ayrı araştırmacıdan (Dr. Faggioli ve Dr. Minafra) temin edilen OLYaV ile enfekteli bitki dokuları ile sistem kurma çalışmaları yapılmıştır. Ancak, üç farklı primer çifti ve iki farklı pozitif kontrol araştırılmasına rağmen pozitif örneklerle jelde beklenen seviyede tek band elde edilememiştir (Şekil 4.2).

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 ve ark., 1992; Rei ve ark., 1993), İspanya’da (Bertolini ve ark.,1998) ve DAS-ELISA ile

Türkiye’de (Çağlayan ve ark., 2004) arazi örneklerinde teşhis edilmiştir. DAS-ELISA ile SLRSV teşhisleri İtalya’da (Martelli, 1999) başarı sağlamamıştır, zeytin materyallerinin dsRNA analizleri ve PCR esaslı metotlar ile test edildiğinde ELISA ile elde edilen pozitif sonuçları onaylayamadığı için DAS-ELISA’nın bazı hatalı pozitif reaksiyonlar verdiği ileri sürülmüştür (Bertolini ve ark., 1998). Son yıllarda RT-PCR yöntemi sörvey çalışmalarında kullanılmış ve Suriye’de SLRSV %5.7 (Al Abdullah ve ark., 2005), Lübnan’da %0.3 (Fadel ve ark., 2005) oranında SLRSV enfeksiyonları tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan primer çiftleri ile beklenen seviye dışında yer alan çoklu bandlar oluşmuş (Şekil 4.2), farklı annealing (primer bağlanma sıcaklığı) sıcaklıklarının uygulamasında da bu sorun giderilememiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemiz dünya zeytin üretimi bakımından İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan sonra dördüncü sırada olup 1.600.000 ton üretime sahiptir (Anonymous, 2006). Son yıllarda zeytin ve zeytinyağının insan sağlığı açısından öneminin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte zeytin yetiştiriciliğine yoğun bir talep olmuş ve zeytin stratejik öneme sahip bir ürün olmuştur. Zeytin bitkisinin genetik olarak kurak koşullara dayanıklı olması, diğer meyve türlerinin yetiştirilebilme olanağının olmadığı yerlerde de rahatlıkla yetiştirilebilmesi ve uzun ömürlü olması nedeniyle zeytin üretimi son yıllarda hızla artmıştır.

Zeytin ağaçları ortalama 100 yıl ekonomik verim verdiğiinden, yeni bir bahçe tesis ederken virüsten arî temiz üretim materyali ile bahçeyi tesis etmek verim ve kaliteyi arttıracığından üreticilere, sağlıklı ve temiz fidan temininin sağlanması bu konuda yapılacak çalışmaların başında gelmelidir.

Zeytin ağaçları konusunda İtalya, İspanya ve Portekiz'de ulusal ve uluslar arası marketlere virüsten arî üretme materyali sağlama ve virüs yayılımını engelleme amacıyla çeşitli sertifikasyon programları başlatılmıştır. Ancak, vejetatif olarak çoğaltılan zeytin ağaçlarında virüs eliminasyonuna dair (örneğin; ısı terapisi, meristem ucu kültürü, mikro aşılama) kayıtlar çok azdır. Bazı başarılı çalışmalar İtalya'dan bildirilmiştir (Bottalico ve ark., 2002) ve CLRv ve OLYaV'de sis terapisi ve sürgün ucu kültürünün başarılı olduğu kaydedilmiştir. Bazı virüsler toprak kökenli (SLRSV, ArMV, TNV) olmasına rağmen diğerleri ya doğrudan (TMV) ya da tohumla (CLRv ve OLV-1), afidle (CMV) veya mekanik inokulasyon ve aşılama ile 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.

Ülkemizde zeytin üretimi hızla artarken zeytin yetiştiriciliğinde virüs hastalıklarının durumu hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Bu nedenle, virüs

hastalıklarının enfeksiyon durumlarının araştırılması ve dağıtılan fidanların özellikle virüsler açısından sağlık durumlarının da değerlendirilmesi gerekmektedir.

Tüm zeytin virüslerine karşı antiserum bulunmaması ve ağaçta virüs konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle ELISA'nın zeytin virüslerinin teşhisinde güvenilir olmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Bu nedenle zeytin virüslerinin test edilmesinde moleküler teknikler özellikle de PCR yöntemi önerilmektedir.

Bu çalışma ile elde edilen bulgular, virüs hastalıklarından korunma yollarının geliştirilmesine yardımcı olacak ve zeytin fidan sertifikasyonunun düzenlenmesine temel oluşturacaktır. Bunun dışında sertifikalı ve virüs etmenlerinden arî temiz üretim materyalinin elde edilmesini sağlayacak temel tekniklerden biri olarak kullanılabilir. Ayrıca virüslerin ekonomik önemiyle ilgili yapılacak çalışmalar için de ilk adımı oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, A.N., Barbara, D.J. and Davies, D.L. 1987. The etiology of hop chlorotic disease. **Annals of Applied Biology**, 111: 365-371.
- Al Abdullah, A., T. El Beaino, M. Saponari, H. Hallak and M. Digiario (2005). Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Syria. **EPPO Bulletin** 35 (2), 249–252.
- Alkowni, R., Grieco, F. and Martelli, G.P. 2001. Complete nucleotide sequence of RNA-2 of *Olive latent ringspot virus*. **Archives of Virology**, 46: 127-133.
- Anonim, 1991. **Standard zeytin çeşitleri kataloğu**. T.C Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara
- Anonim, 2005. **Tarımsal yapı üretim, fiyat, değer**. T.C Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu.
- Anonymous, 2007. The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Images/index.htm>
- Anonymous. 2006. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>
- Bertolini, E., Fadda, Z., Garcia, F., Celada, B., Olmos, A., Gorris, M.T., Del Rio, C., Caballero, J., Duran-Vila, N. and Cambra, M. 1998. **Virosis del olivo detectadas en Espana, Nuevos metodos de diagnostico**. Phytoma, 102: 191-193.
- Bertolini, E., Olmos, A., Lopez, M.M. and Cambra, M. 2003. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastoni* pv. *savastoni* in olive trees. **Phytopathology**, 93: 286-292.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martinez, M.C., Gorris, M.T. and Cambra M. 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. **Journal of Virological Methods**, 96: 33-41.
- Bottalico, G., Rodio, M. E., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G. P. 2002. Preliminary Results of Sanitation Trials of Viruses-Infected Olive Tree. **Journal of Plant Pathology** 84: 171-200.
- Çağlayan, K., Ç. Ulubas Serçe and M. Gazel, “**Olive Viruses” Characterization, Diagnosis & Management of Plant Viruses**. ed. G.P. Rao, S.M.P. Khurana ve S.L. Lenardon, Vol. 1, 305-339, Industrial Crops, Published by Studium Press LLC, Texas, USA, 2006
- Çağlayan, K., U. Fidan, G. Tarla, and M. Gazel, 2004. First report of olive viruses in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 86 (1): 89-90.
- Cardoso, J.M.S., Felix, M.R., Clara, M.I.E. and Oliveira, S. 2005. The complete genome sequence of a new *Necrovirus* isolated from *Olea europaea* L. **Archives of Virology**, 150: 815-823.
- 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.
- Cooper, J. 1986. **Strawberry latent ringspot virus**. CMI/AAB Description of Plant Viruses, N° 126, 4 pp.
- Cooper, J.I., Massalski, P.R. and Edwards, M.L. 1984. *Cherry leaf roll virus* in the female gametophyte and seed of birch and its relevance to vertical transmission. **Annals of Applied Biology** 105: 55-64.

- Corte, A., Cifferi, R. and Rui, D. 1961. **Infections on privet and foliar abnormalities of olive**. *Rivista di Pathologia Vegetale* S. III 1: 251-260 (in Italian).
- Dias, H.F. and Harrison, B.D. 1963. The relationship between grapevine fanleaf, grapevine yellow mosaic and arabis mosaic viruses. **Annals of Applied Biology**, 51: 97-105.
- Fadel, C., Digiario, M., Choueiri, E., El Beaino, T., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2005. On the presence and distribution of olive viruses in Lebanon. **OEPP/EPPO Bulletin**, 35: 33-36.
- Faggioli F., Ferreti, L., Albanese, G., Sciarroni, R., Pasquini, G., Lumia, V. and Barba, M., 2005. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. **Journal of Plant Pathology**, 87:45-51.
- Faggioli, F. and Barba, M. 1995. An elongated virus isolated from olive. *Acta Horticulture*, 386: 593-600.
- Faggioli, F., Ferretti, L., Pasquini, G. and Barba, M. 2002. Detection of *Strawberry latent ring spot virus* in leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. **Journal of Phytopathology**, 150: 636-639.
- Felix, F. and Clara, M.I.E. 2002. Two *Necrovirus* isolates with properties of *Olive latent virus 1* and of *Tobacco necrosis virus* from Olive in Portugal. **Acta Horticulture**, 586: 725-728.
- Felix, M.R. and Clara, M.I. 1998. Características biológicas e bioquímicas da estirpe GI, do Necrovirus Olive Latent 1 isolado de *Olea europaea* L. **Actas da 2ª Reuniao Bienal da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia**, pp. 67.
- Felix, M.R., Cardoso, J.M.S., Oliverira, S. and Clara, M.I.E. 2005. Viral properties, primary structure and phylogenetic analysis of the coat protein of an *Olive latent virus 1* isolate from *Olea europaea* L. **Virus Research**, 108: 195-198.
- Ferreti, L., Faggioli, G., Pasquini, G., Sciarroni, R., Pannelli, G., Baldoni, L. and Barba, M. 2002. *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) cause of differentiation among Raggiola and Frantoio olive cultivars. **Journal of Plant Pathology**, 84: 171-200.
- Fidan ve Ertem 1995. ege yöresindeki zeytin ağaçlarında virus hastalıklarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi üzerinde araştırmalar. **VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi**, 26-29 Eylül 1995: 378-380, Adana.
- Gallitelli, D. and Savino, V. 1985. *Olive latent virus 1*. A single-RNA spherical virus isolated from in Apulia (Southern Italy). **Annals of Applied Biology**, 106: 295-303.
- Gentkow, J., Rebenstorf, S., von Barga, S. and Büttner. 2005. Biological and molecular characteristics of cherry leaf roll virus (CLRV) isolates from different host plants. 4th Meeting of Dutch and German Plant Virologist, WICC, Wageningen, March 10,11. **Viruskrankheiten der Pflanzen**, Abstract
- Grieco, F. and Martelli, G.P. 1997. *Olive latent virus 2*, representative of a putative new genus in the family *Bromoviridae*. **Phytoparasitica**, 25: 1.
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2000. Molecular detection of olive viruses. **OEPP/EPPO Bulletin**, 30: 469-473.
- Grieco, F., Dell'Orco, M. and Martelli, G.P. 1996. The nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 of *Olive latent virus 2* and its relationships in the family *Bromoviridae*. **Journal of General Virology**, 77(10): 2637-2644.
- Grieco, F., Martelli, G.P. and Savino, V. 1995. The nucleotide sequence of RNA3 and RNA4 of *Olive latent virus 2*. **Journal of General Virology**, 76: 929-937.

- Grieco, F., Parrella, G. and Vovlas, C. 2002. An isolate of *Olive latent virus 2* infecting castor bean in Greece. **Journal of Plant Pathology**, 84(2): 129-131.
- Grieco, F., Savino, V. and Martelli, G.P. 1996b. Nucleotide sequence of the genome of a citrus isolate of *Olive latent virus 1*. **Archives of Virology**, 141(5):825-838.
- Hamacher, J. and Giersiepen, R. 1989. Histologisch-cytologische Veränderungen in Kirschenblattrollvirus-infizierten und durch Luftschadstoffe gestreßten Betula-Arten. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 41: 124-130.
- Hamacher, J. and Quadt, A. (1991). Light- and electron microscopic studies of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) on European Ash (*Fraxinus excelsior* L.). **Journal of Phytopathology**, 131: 215-226.
- Henriques, N.I.C., Rei, F.T., Alit, F.A., Serena, J.F. and Poet, M.F. 1992. Virus diseases in *Olea europaea* cultivars: Immunodiagnosis of *Strawberry latent ringspot nepovirus*. **Phytopathologia Mediterranea**, 31 127-132.
- Jones, A.T. 1985. *Cherry leafroll virus*. CM/AAB Description of plant viruses, No. 306.
- Jones, T.A., Carlson I.T and Buxton, D.R. 1989. Legume compatibility of reed canary grass clones related to agronomic and morphological traits. **Crop Science**, 29: 1-7.
- Kanematsu, S., Taga, Y. and Morikawa, T. 2001. Isolation of *Olive latent virus 1* from Tulip in Toyoma Prefecture. **Journal of General Plant Pathology**, 67: 333-334.
- Kassanis, B. 1970. *Tobacco necrosis virus*. C.M.I./A.A.B. **Description of Plant Viruses** 14.
- Kurtsak, E. 1981. Handbook of plant virus infections. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Marte, M., Gadani, E., Savino, V. and Rugini, E. 1986. *Strawberry latent ringspot virus* associated with a new disease of olive in Central Italy. **Plant Disease**, 70: 171-172.
- Martelli, G.P. 1999. Infectious diseases and certification of olive: an overview. **OEPP/EPPO Bulletin**, 29: 127-133.
- Martelli, G.P. and Grieco, F. 1997. *Oleavirus*, a new genus in the family *Bromoviridae*. **Archives of Virology**, 142: 1933-1936.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J., Wisler, G.C. and Yoshikawa, N., (ICTV Study group on closteroviruses and allied viruses). 2002a. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**, 147: 2039-2044.
- Martelli, G.P., Sabanadzovic, S., Savino, V., Abu-Zurayk, A.R. and Masannat, M. 1995a. Virus-like diseases and viruses of olive in Jordan. **Phytopathologia Mediterranea**, 34: 133-136.
- Martelli, G.P., Salerno, M., Savino, V. and Prota, U. 2002b An appraisal of diseases and pathogens of olive. **Acta Horticulture**, 586: 701-708.
- Martelli, G.P., Savino, V., Di Terlizzi, B., Catalano, L. and Sabanadzovic, S. 1995b. Viruses and certification of olive in Apulia. **Acta Horticulture**, 386: 569-573.
- Martelli, G.P., Yilmaz, M.A., Savino, V., Baloğlu, S., Grieco, F., Güldür, M.E., Greco, N. and Laforteza, R. 1996 Properties of citrus isolate of *Olive latent virus 1*, a new *Necrovirus*. **European Journal of Plant Pathology**, 102(6): 527-536.
- Materazzi, A., Toni, S., Panatroni, A., Osti, M. and Triolo, E. 1996. **On the presence of a new isometric virus in *Olea europaea* L.** In: Atti convegno Annuale della Societa Italiana di Patologia Vegetale, pp. 57-59. Universita di Pisa (IT) (in Italian).

- Merciega, V., Boscia, D. and Savino, V. 1996. Comparison of five isolates of *Olive latent virus 1*. **Phytopathologia Mediterrenae**, 35: 1-8.
- Mircetich, S. M., Sanbom; R.R. and Ramos, D.E. 1980. Natural spread, graft-transmission, and possible ethiology of walnut blackline disease. **Phytopathology** 72: 988.
- Morettini, A., 1972. **Olivicoltura**, Ramo Editoriale degli Agricoltori. Rome, 522 pp.
- Nemeth, M., 1986. **Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees**. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands and Akademi Kiado, Hungary.
- Nicolini, J.C. and Traversi, B.A. 1950. **Observations of a new disease of olive in Argentina**. Informa de la Direction de Investigaciones Agricolas, Buenos Aires 3:1-6 (in Spanish).
- OEPP/EPPO 1994. Certification schemes No. 11, Pathogen-tested strawberry. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin** 24 875-889.
- OEPP/EPPO 2006. Schemes for the production of healthy plants for planting PM 4/17 (2), Pathogen-tested olive trees and rootstocks. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin** 36 77-83
- Pacini, E. and Ciresti, M. 1977. Viral particles in developing pollen grain of *Olea europaea*. **Planta**, 137: 1-4.
- Pantaleo, V., Grieco, F., Castellano, M.A. and Martelli, G.P. 1999. Synthesis of infectious transcripts of *Olive latent virus 1*: genes required for RNA replication and virus movement. **Archives of Virology**, 144: 1071-1079.
- Pantaleo, V., Saponari, M., and Galitelli, D. 2001. Development of a nested PCR protocol for detection of olive-infecting viruses in crude extracts. *Journal of Plant Pathology*, 83(2):143-146.
- Poggi Pollini, C., Bissani, R., Giunchedi, L. And Vindimian, F. 1996. First report of a phytoplasma infection in olive trees. **Journal of Phytopathology**, 144, 109-111.
- Poggi Pollini, C., Bissani, R., Ragozzino, A., Pasquini, F., Barba, M., Marzachi, C. and Boccoardo, G. 2002. Detection and characterization of phytoplasmas in olive trees from Italy. **Proc. 4th International Symposium on Olive Growing. Acta Horticulturae** 586, ISHS 2002, (2), 781-783.
- Rebenstorf, K. and Obermeier, C. 2003. Gefahr filr Gehölze: Das Kirschenblattrollvirus. **Deutsche Baumschule** 7: 54-55.
- Rebenstorf, K., Gentkow, J., Obermeier, C., Candresse, T., von Bargen, S. and Büttner, C. 2005. Characterization of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) isolates from different host plants. **Fourth Joint Meeting of Dutch and German Plant Virologists**. WICC, Wageningen, March 10 and 11, 2005 (Abstract).
- Rei, F.T., Henriques, M.I.C., Leitao, F.A., Serrano, J.F. and Potes, M.F. 1993. Immunodiagnosis of *Cucumber mosaic cucumovirus* in different olive cultivars. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, 23: 501-504.
- Robenstorf, K. 2005. **Biological and molecular characteristics of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) isolates from different host plants**. PhD thesis. Humbolt-Universität zu Berlin, Institute of Horticultural Sciences, Berlin, Gemany. Abstract. p.71-72
- Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., La Notte, P., Savino, V., Scarito, G. and Martelli, G.P. 1999. Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. **Journal of Plant Pathology**, 81(1): 37-45.

- Saponari, M., Nigro, F., Locansole, G., Romanazzi, G., Vovlas, N. and Cariddi, C. 2001. Distribuzione dei patogeni dell'olivo in Puglia. **Atti Progetto POM A32**, Locorotondo 4-7 dicembre 2001, 181-194.
- Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2002. Seed transmission in olive of two olive-infecting viruses. **Journal of Plant Pathology**, 84(3): 167-168.
- Sarderelli, P., Mibafra, A., Martelli, G.P. and Walter, B. 1994. Detection of *Grapevine leafroll associated closterovirus* III by molecular hybridization. **Plant Pathology**, 43: 91-96.
- Savino, V. and Galitelli, D. 1981. *Cherry leaf roll virus* in olive. **Phytopatologia Mediterranea**, 22: 76-77.
- Savino, V. and Galitelli, D. 1983. Isolation of *Cucumber mosaic virus* from olive in Italy. **Phytopatologia Mediterranea**, 22: 76-77.
- Savino, V., Barba, M., Galitelli, G. and Martelli, G.P. 1979. Two nepoviruses isolated from olive in Italy. **Phytopatologia Mediterranea**, 18: 135-142.
- Savino, V., Galitelli, D. and Barba, M. 1983. *Olive latent ringspot virus*, a newly recognized virus infecting olive in Italy. **Annals of Applied Biology**, 133(2): 243-249.
- Savino, V., Piazzola, T., Di Franco, A. and Martelli, G.P. 1984. ***Olive latent virus 2*, a newly recognized virus with a differently shaped particle**. In: Proceeding of the 6th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, pp. 24-26. Cairo (Egypt).
- Savino, V., Sabanadzovic, S., Scarito, G., Laviola, C. and Martelli, G.P. 1996. Two olive yellows of possible viral origin in Sicily. **Informatore Fitopatologico**, 46(5): 55-59 (in Italian)
- Schmelzer, K. 1963 [Investigations on viruses of ornamental and wild woody plants. 2nd part. Viroses of *Forsythia*, *Lonicera*, *Ligustrum* and *Laburnum*]. **Phytopathologische Zeitschrift** 46: 105-138.
- Swofford, D. L. 1993. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony**, Vers. 3.1.1. Washington, DC: Smithsonian Institution.
- Tarla, G., ve. Çağlayan K, 1998. Hatay Yöresinde Yetişen Zeytin Ağaçlarında Görülen Bazı Virüs Hastalıklarının Serolojik Olarak Saptanması. (Serologically detection of some virus diseases in olive grown in Hatay province) **VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Ankara**, pp.239-243.
- Teakle, D.S. 1962. Transmission of *Tobacco necrosis virus* by a fungus, *Olpidium brassicae*. **Virology**, 18: 224-231.
- Thomas. 1958. Sick leaf of olive. **Plant Disease Reporter**, 42: 1100-1154.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22:4673-4680.
- Triolo, E. , Materazzi, A. and Toni, S. 1996. An isolate of Tobacco mosaic tobamovirus from *Olea europaea*. **Advances in Horticultural Science**, 10: 39-45.
- Wetzel, T., Fuchs, M., Bobko, M. and Krczal, G. 2002. Size and sequence variability of the *Arabidopsis mosaic virus* protein 2A. **Archives of Virology**, 147: 1643-1653.
- Wetzel, T., Meunier, L., Jaeger, U., Reustle, G.M. and Krczal, G. 2001. Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of german isolates of *Grapevine fanleaf* and *Arabidopsis mosaic Nepoviruses*. **Virus Research**, 75: 139-145.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aőamasında büyük bir özveri ve sabırla yol gösteren, değerli fikir ve katkılarını esirgemeyerek çalıőmalarına ıőık tutan danıőman hocam sayın Doç. Dr. Çiędem ULUBAŐ SERÇE'ye sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım sırasında değerli görüő, katkı ve bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Kadriye AęLAYAN ve Yrd. Doç. Dr. Mona GAZEL'e teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım sırasında bana her konuda destek olan arkadaőlarım Nevin İNAN ve M. Ali İNAN'a, ayrıca tezimin her aőamasında ve hayatımın her alanında bana büyük bir özveri ve sabırla destek olan aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Tarsus'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 2001 yılında girdiğim Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden 2005 yılında mezun oldum. Aynı yıl M.K.Ü 'nin açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazandım. 2005-2006 döneminde CIHEAM kurumunun sağladığı bursla İtalya'nın Bari şehrinde 8 ay süreyle genel Bitki Koruma eğitimi aldım. 2006-2007 döneminde yüksek lisans tez aşamasına M.K.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı'nda devam ettim. Yüksek Lisans tezi çalışmalarının yanı sıra TÜBİTAK "İncir Mozaik Hastalığının Biyolojik, Serolojik, Mikroskopik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması ve Eriophyes Akarlarla Taşınma Etkinliklerinin Araştırılması" konulu projede 12 ay süre ile aktif olarak çalıştım.