İSTANBUL İLİ'NDE DİKİMİ YAPILAN LALELERDEKİ VİRÜS HASTALIKLARININ SAPTANMASI VE TANILANMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Serkan DENİZER

Yüksek Lisans Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇITIR

2014

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL İLİ'NDE DİKİMİ YAPILAN LALELERDEKİ VİRÜS HASTALIKLARININ SAPTANMASI VE TANILANMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Serkan DENİZER

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. AHMET ÇITIR

TEKiRDAĞ-2014

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Ahmet ÇITIR danışmanlığında**,** Serkan DENİZER tarafından hazırlanan **"**İstanbul İli'nde Dikimi Yapılan Lalelerdeki Virüs Hastalıklarının Saptanması Ve Tanılanması Üzerine Araştırmalar" isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ahmet ÇITIR *İmza:*

Üye: Prof. Dr. Havva İLBAĞI *İmza:*

Üye: Doç. Dr. Şevket ALP *İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İSTANBUL İLİ'NDE DİKİMİ YAPILAN LALELERDEKİ VİRÜS HASTALIKLARININ SAPTANMASI VE TANILANMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Serkan DENİZER

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇITIR

Gösterişli çiçeklerinden dolayı süs bitkisi olarak tarihten günümüze, artan ilgiye sahip olan lale (*Tulipa* spp) tür ve çeşitleri,"Monocotyledoneae" Bitki Dünyası'nın "Liliaceae" familyasından çok yıllık soğanlı ve otsu bir bitkidir. Günümüzde lale İstanbul'un simgesi olarak kabul edilmekte bu yüzden İstanbul'da her yıl açık yeşil alanlarda yoğun bir şekilde dikilmektedir. Her kültür bitkisinde olduğu gibi lalenin de yetiştiriciliği yapılırken, hastalık ve zararlı etmenler görülmektedir. Bu çalışma ile 2013-2014 yıllarında İstanbul İli'ndeki açık yeşil alanlardaki lalelerde görülen virüs hastalıklarını saptamak serolojik ve moleküler yöntemlerle virüsleri tanılamak amaçlanmıştır. Karakteristik mozayik, cücelik, kloroz ve diğer sistemik hastalık simptomları sergileyen bitkilerden 274 adet örnek elde edilmiştir. 264 adet simptomatik petal yaprak örneğine uygulanan Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS–ELISA) yöntemi ile serolojik teste tabi tutularak *Tobacco rattle virus* (TRV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) ve *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) virüsleri araştırılmıştır. Ancak araştırılan bu virüslerin hiçbirine bu örneklerde rastlanmamıştır. Lalelerde renk kırılması ve cüceliğe neden olan virüsün saptanması için LEAF- DIP metodu ile Scanner Elektron Mikroskop (SEM) çalışması yapılmış ancak aranan esnek çubuk formundaki virionlara rastlanmamıştır. Geriye kalan 10 örnekten RNA ekstraksiyonu yapılarak *Tulip breaking virus* (TBV)'e özgü cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Virüsün tüm genom dizilimine ait üç primer çifti ile TBV 'nün kapsülünü oluşturan protein alt ünite molekülü sentezini kodlayan 3 çift primerler kullanılarak Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) testi gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR sonucu her yıl İstanbul'da dikimi yapılan lalelerin petal yapraklarındaki renk kırılması ve cüceliğe neden olan virüsün TBV olduğu kanıtlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Tulipa* spp., *Tulip breaking virus* (TBV), DAS-ELISA, SEM, Real-Time RT-PCR

2014, sayfa 39

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION AND IDENTIFICATION OF TULIP VIRUS DISEASES ON TULIPS IN ISTANBUL PROVINCE OF TURKEY

Serkan DENİZER

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÇITIR

For their elegant flowers as a perennial herbaceous ornamental bulb plant with many cultivars, tulip (*Tulipa* spp.) have been attracted attention historically and classified into "Monocotyledoneae" Liliaceae family of plant world. Today tulip has been considered as a symbol of Istanbul and planted intensively in recreational areas every year. Like every cultivated and produced plant species, tulips suffer from their pests and diseases. In order to determine tulip virus diseases and identify their viruses on tulips grown in Istanbul this research study was implemented during the years of 2013 and 2014. For this purpose 274 leaf samples from symptomatic tulip petals and leaves exhibiting characteristic mosaic, color breaking, dwarfing and chlorosis were collected in parks, gardens, forests and other amusement sites in Istanbul. By employing Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) tests presence of *Tobacco rattle virus* (TRV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) and *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) viruses were searched on 264 petal leaf samples. However none of these viruses were found in tested samples. In order to observe flexible rot shape virions of *Tulip breaking virus* (TBV) visually leaf-dip method was implemented by using Scanning Electron Microscopy (SEM). Merely there was none flexible virions on prepared grids. 10 remaining tulip leaf samples were used for RNA extraction and cDNA synthesis was done. By employing 3 pairs of primer of full genome of TBV and 3 pairs of primers of code protein of TBV gene Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) test was implemented. As a result of qRT-PCR tests at least 2 samples of symptomatic tulip plants of Istanbul revealed the presence of TBV.

Key words: *Tulipa* spp., *Tulip breaking virus* (TBV), DAS-ELISA, SEM, qRT-PCR

2014, pages 39

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET……..	**i**
ABSTRACT……...	**ii**
İÇİNDEKİLER…….....	**iii**
ÇİZELGE DİZİNİ……	**iv**
ŞEKİL DİZİNİ……..	**v**
SİMGELER DİZİNİ ……	**vi**
1. GİRİŞ……	**1**
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI……	**8**
3. MATERYAL ve YÖNTEM……	**13**
3.1 Materyal……...	13
3.1.1. Sürvey çalışma alanları ve lale yaprak örneklerinin toplanması……..	13
3.1.2. Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) testinde kullanılan materyaller…….…….	14
3.1.3 Scaning Elektron Mikroskop (SEM) çalışması için kullanılan materyaller …….	14
3.1.4. Real -Time PCR (qRT-PCR) testinde kullanılan materyaller……..	15
3.2. Yöntem…….	17
3.2.1. Sürvey metodu ve virüs enfekteli lalelerin saptanması…….	17
3.2.2. Double Antibody Sandwich Enzyme Linked İmmunosorbent Assay (DAS ELİSA) testi……	17
3.2.3. Scanner Elektron Mikroskopi (SEM) çalışması……..	18
3.2.4. Real- Time Polimeraz Chain Reaction (qRTPCR)testi……	19
3.2.4.1. Bitki dokusunun homojenize edilmesi……...	19
3.2.4.2 RNA izolasyonu……..	19
3.2.4.3 RNA ölçümü……...	20
3.2.4.4 cDNA sentezi……..	21
3.2.4.5 Real Time PCR protokolü……...	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA……	23
4.1 Sürvey sonuçları ve gözlemlenen hastalık belirtileri……	23
4.2 DAS- ELISA test sonuçları……...	**27**
4.3. Scaning Elektron Mikroskopi (SEM) çalışması sonuçları…….	28
4.4. Real-Time PCR (qRT-PCR) test sonuçları……	28
5. SONUÇ ve ÖNERİLER……	29
6. KAYNAKLAR……...	30
7.TEŞEKKÜR…….	**33**
ÖZGEÇMİŞ……..…….	**34**
EK 1……..……	35
EK 2……	37

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Türkiye'de başlıca lale türleri isim listesi…….. 2

Çizelge 3.1: İstanbul Lalelerinde *Tulip breaking virus* (TBV) araştırması Dizayn edilen ve kullanılan Primer çiftleri……. 16

Çizelge 3.2: qRT-PCR çalışması için örneklerden izole edilen RNA miktarları…. 21

Çizelge 3.3: cDNA sentezi için qRT-PCR protokolü…… 21

Çizelge 3.4: Real Time PCR Protokolü……. 22

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1: İstanbul İl'inde lale dikimi yapılan ve örnek toplanan alanlar…….. 14

Şekil 3.2: Örneklerden elde edilen RNA ekstraksyon basamakları……... 20

Şekil 4.1: İstanbul Silivri'de lale soğan üretim tarlasında saptanan renk kırılması, cücelik ve goncadaki şekil bozukluğu belirtileri……. 23

Şekil 4.2**:** Aynı çeşitten oluşturulan lale çiçek tarhında sağlıklı laleler arasında tek bir bireydeki renk kırılması ve gerçek yapraklarında sarılık belirtileri……... 24

Şekil 4.3: Park alanındaki çiçek tarhında aynı çeşit lalede değişik derecelerde lale renk Kırılması belirtilerinin görünüşü……. 24

Şekil 4.4: Çiçek tarhında aynı çeşit enfekteli lalelerde değişik boyutlarda gonca oluşması… 25

Şekil 4.5: Çiçek tarhına dikilmiş hastalıklı soğanlardan çıkan değişik renk kırılması ve goncalardaki deformasyonların görünüşü……..……..... 25

Şekil 4.6: İstanbul Emirgan Korusu'nda farklı iki çeşit renkli sağlıklı lalelerin oluşturduğu çiçek tarhı……. 26

Şekil 4.7: İstanbul Beykoz'daki Hidiv Kasrı Bahçesi'nde renk kırılması enfekteli çeşitli renklerden lalelerin oluşturduğu çiçek tarhı (solda) ve sağlıklı beyaz lalenin oluşturduğu çiçek tarhı (sağda) yer almıştır……. 26

SİMGELER DİZİNİ

TBV	*Tulip breaking virus*
TBBV	*Tulip band- breaking virus*
TTBV	*Tulip top-breaking virus*
THNV	*Tulip halo necrosis virus*
TCBV	*Tulip chlorotic blotch potyvirus*
TBV sinonimi	*Tulip mosaic virus*
TVX	*Tulip X virus*
TRV	*Tobacco rattle virus*
TMV	*Tobacco mosaic virus*
ArMV	*Arabis mosaic virus*
SLRSV	*Strawberry latent ringspot virus*
TMMMV	*Tulip mild mottle mosaic virus*
SEM	Scaning Elektron Mikroskop
DAS – ELISA	Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay
qRT-PCR	Real-Time RT-PCR
RNA	Ribonükleikasit
cDNA	Complementer deoksiribonükleikasit
PBST	Fosfat Tuz Tampon Çözeltisi
HCl	Hidroklorik asit
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen sülfat
NaI	Sodyum iyodür
NaOAc	Sodyum asetat
EtOH	Ethanol
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
lt	Litre
sn	Saniye

1. GİRİŞ

Bulundukları ortama dekoratif, ilgi çekici bir görünüm sağlayan ve canlılık kazandıran, soğanlı bitkilerin, kesme çiçek, saksılı ve bahçe çiçeği olarak her geçen gün kullanımı artmaktadır. Artan bu kullanım, süs bitkileri ticareti içinde, soğanlı süs bitkileri ticaretini küçümsenmeyecek bir düzeye ulaştırmıştır. Halen 800'den fazla soğanlı süs bitki tür ve çeşidinin ticaretinin yapıldığı süs bitkileri sektöründe Lale (*Tulipa*), Nergis (*Narcissus*), Glayöl (*Gladiolus*), Süsen (*Iris*), Zambak (*Lilium*), Çiğdem (*Crocus*) ve Sümbül (*Hyacinthus*) ticareti en çok yapılan soğanlı süs bitkileridir. Bu yedi türün, toplam soğanlı süs bitkileri ticaretindeki payı % 90'dır (Alp ve ark. 2010, Benschop ve ark. 2010).

En çok ticareti ve üretimi yapılan soğanlı bitkilerden biri olan lâlenin kökeni, Orta Asya'ya dayanmaktadır. Anavatanı, kuzeyde Pamir yaylalarına, Tien-Şan dağlarına, güneyde Hindistan'ın Keşmir Bölgesi'nde 4000 m rakımdaki dağlara, doğuda Çin, batıda ise Doğu Anadolu'dan Kafkasya'ya kadar uzanan geniş bir coğrafyadır (Everett, 2013).

Lalenin botanik taksonomideki yeri aşağıda gösterilmiştir.

Alem: Plantae
Şube: Magnoliophyta
Bölüm: Monocotiledoneae
Sınıf: Magnoliopsida
Takım: Liliales
Familya: Liliaceae
Cins: *Tulipa*

Halen yetiştiriciliği yapılan başlıca lale türlerinin isim listesi ise Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Türkiye'de başlıca lale türleri isim listesi (Akalın, 1952).

LATİNCE ADI	TÜRKÇE ADI
Tulipa acuminata Vakl.	Ucu sivri lale
Tulipa elegans hort.	Zarif lale
Tulipa fulgens hort.	Parlak kırmızı
Tulipa montane Lindl.	Dağ lalesi
Tulipa oculus Solis amans.	Güneş gözü
Tulipa praecox Ten.	Er açan lale
Tulipa pubescens willd.	Yumuşak tüylü lale
Tulipa pulchella fenzel	Pek güzel
Tulipa retroflexa hort.	Ters Lale
Tulipa seratina Reboul.	Geç açan lale
Tulipa silvestris L.	Orman lalesi
Tulipa suaveolens	Güzel kokulu lale
Tulipa hispanica willd.	İspanyol lalesi
Tulipa biflora hort.	Çift renkli lale
Tulipa tricolor Ledeb.	Üç renkli lale
Tulipa sintenisii Baker in Gard	Muş lalesi

Lale soğanı, botanik anlamda gerçek soğandır. Lale çiçeği altı adet taç yaprak, 6 erkek organ (iki sıralı), üç karpelli dişi ovaryum organdan oluşur. "*Tulipa*" cinsi yaklaşık 125 tür içerir. Lale, Anadolu'nun dağlık bölgeleri, yazın kuru ve sıcak, kışın soğuk ve nemli geçen iklime sahip bölgelerde doğal olarak yetişmektedir. Türkiye'de "*Tulipa*" cinsinden 17 tür, 1 alt tür ve 1 botanik varyete olarak toplam 19 adet taksona mensup lale doğal olarak yetişmektedir. Türkiye'nin doğal bitki örtüsü de lale türleri açısından oldukça zengindir. *Tulipa humulis* Herbert, gibi birçok tür Antalya'dan başlayarak, Van ve Hakkari'e kadar geniş bir yayılış alanına sahiptir. Aynı zamanda sahip olduğumuz türler çok ciddi varyasyonlar göstermektedir. Örneğin, *T. humilis* lale ve gülde hemen hemen hiç sahip olmadığı koyu leylak (mavi) rengine sahip tiplerden bahsedilmektedir. Aynı şekilde endemik bir türümüz olan Muş lâlesi *Tulipa sintenisii* Baker in Gard'nin Muş ovasındaki popülasyonunda büyük varyasyonlardan bahsedilmektedir (Eker 2010, Alp 2012, Alp ve ark. 2013, Everett 2013).

Lale, açık yeşil alanlarda süs bitkisi, ev içi dekorasyonlarda ve bezeme sanatlarında motif olarak çeşitli ülkelerin yaşamlarında yer almıştır. Ayrıca bir tarımı yapılan bitkisel

üretimin bir ürünü olarak da önemi düşünüldüğünde, ülkenin tarihinde, kimliğinde, ekonomisinde ve kültüründe son derece önemli yeri olduğu görülür. Osmanlı İmparatorluğunun XVII. yüzyılın başındaki "Lale Devri" ve Hollanda'nın başta lale olmak üzere diğer soğanlı ve yumrulu bitkilere dayalı ekonomisinin, turizmle birlikte ülke açısından ne derece önemli olduğu bilinmektedir. Bitkisel ürün olarak Türkiye'de her geçen gün önemi artmakta olan Lale (*Tulipa spp.*) Türk İslam kültüründe de önemli bir yere sahiptir. Lale kültürümüzde, Allah'ın varlığını ve tekliğini simgelemektedir (Atasoy 2002, Alp 2006, Alp ve Aşur 2006).

Bugün Hollanda topraklarının yaklaşık dörtte birinde lale yetiştirilmektedir. Bu büyük miktarda üretim sonucunda her yıl yaklaşık 3 milyar lale soğanı üretilmekte ve bunun 2 milyarı diğer ülkelere ihraç edilmektedir. Hollanda lalelerini satın alan ülkelerin başında A.B.D, Japonya ve Almanya gelmektedir. Üretilen yeni melez türlerde; yeni renk tonları, yeni formlar, farklı çiçeklenme periyotları, daha dayanıklı ve uzun süreli çiçek açabilecek özellikler geliştirilmektedir (Alp ve ark. 2010, Benschop ve ark. 2010).

Lâlenin, Türkiye'den Avrupa'ya hangi tarihte götürüldüğü, kesin olarak bilinmemektedir. Avusturya-Macaristan İmparatoru'nun, Sultan Süleyman nezdindeki büyükelçisi O. G. Busbecq'in, İstanbul'dan Avrupa'ya götürdüğü bitkiler arasında lâle soğanlarının da bulunduğu sanılmaktadır. Busbecq, hayatında ilk defa karşılaştığı lâlenin, Edirne ile İstanbul arasındaki tarlalarda yetiştirildiğini, 1554 ilkbaharında bu yoldan geçerken gördüğünü kaydeder. Aynı yoldan 1673 yılında geçen Fransız elçilik memuru A. Galland, 15 Mayıs 1673 pazartesi günü, Lüleburgaz civarında lâle tarlaları gördüğünü belirtmektedir. İstanbul'dan Avrupa'ya götürülen ilk lâle türlerinin hangileri olduğu tam olarak bilinmemektedir (Baytop 1998, Pavord 1999).

Lâlenin Avrupa'da tanınması ve yayılmasında, Fransız botanikçi Charles de l'Escluse (1526-1609), katkıda bulunmuştur. Bütün Avrupa'yı dolaşmış olan bilim adamı, 1573-1576 yıllarında Viyana Botanik Bahçesi Direktörlü'ğü yaptığı sırada, İstanbul'dan birçok soğanlı bitki elde etme olanağı bulmuştur (Baytop 1998, Pavord 1999).

Lalenin kültüre alındığı ilk topraklar Anadolu olmasına karşın, ticari süs bitkisi olarak bilimsel nitelikte yetiştiriciliği Hollanda'nın Leiden Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanı Botanikçi Carolus CLUSIUS tarafından 1590 yılından itibaren başlatılmıştır. CLUSIUS 1576 yılından itibaren lale yetiştirme konusunda yaptığı çalışmalar esnasında homojen renkli lale çeşitlerinde renk kırılması ve mozayik tipte petal yapraklardaki

renklenmeyi fark ederek bu özelliği taşıyan lale soğanlarından homojen renkli diğer lale soğanlarına taşınabildiğini saptamıştır. Bu bulgusunu lalede yeni çeşitler üretim tekniği olarak değerlendirmiştir (Lesnaw ve Ghabrial 2000). Avrupa'da çılgınlık derecesinde lale sevgisi ve üretim (Tulipamania) dönemi yaşanırken 1656 yılında Londra'da yayımlanan Parkinson's Herbal Kitabı'nda ağaç baskı tekniği ile lalelerde farklı renklerin ve renk tonlarının iç içe yer aldığı lale çiçek resimleri, lalede renk kırılması virüs hastalığının o zamandan var olduğunun bir kanıtıdır (Matthews 1970). Ancak bu belirtiler bir sistemik virüs hastalığının etkisinden ziyade hasta lalelerin bir çeşit özelliği olarak değerlendirilmiştir ve böyle çiçek açan lale soğanlarından tek bir adedinin 3000 Gulden'e satıldığı yani zengin ve geniş bir ailenin bir yıllık geçimini sağlayacak harcama tutarına eşdeğer olduğu bildirilmiştir (Lesnaw ve Ghabrial 2000).

18 yüzyılın başından itibaren yaşanan İstanbul'daki Lale devri (1711-1730)'de 200'den fazla farklı lale çeşidine ait soğanların yetiştirildiği ve heveslilere sunulduğu bildirilmiştir. Başta Saadabat Sarayı ile Haliç kıyıları, Boğaziçi'nde Küçüksu Kasrı, Yalı Bahçeleri ve Koruluklar lalelerin en çok dikildiği ve süs bitkisi olarak değerlendirildiği rekreasyon alanları olarak Osmanlı Başkenti İstanbul'a hizmet etmiştir. Şüphesiz İstanbul dışında Bursa ve Edirne gibi önceki başkentler yanında özellikle şehzadelerin yöneticileri olduğu Manisa, Konya ve Amasya gibi sancak beyliklerinde de laleler en makbul çiçek tür ve çeşitleri olarak önemli yer tutmuştur. Tarihi geçmişi bakımından bu denli önemli olan lale modern Peyzaj Mimarlığı açısından da çok değerli bir tarh çiçeği ve bitkisel peyzaj malzemesi olarak değerlendirilmektedir (Atasoy 2002, Korkut ve ark. 2010).

Lale Osmanlı döneminde İstanbul'u süsleyen bir süs bitkisi olarak çok kullanılmışsa da daha sonraları kullanımı azalmıştır. İstanbulun, lalenin kültüre alınması ve tarihsel gelişiminde önemli bir yeri olmuştur. İstanbul'a özgü olan lalenin, tekrar vatanı ile buluşturmaya yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. "Lale Vatanına Geri Dönüyor" sloganı ve programı çerçevesinde İstanbul Büyükşehir Belediyesi lalenin açık yeşil alanlarda süs bitkisi olarak kullanımına başlanmıştır. Günümüzde İstanbul'da 38 milyon adet lale soğanı açık yeşil dış mekanlar da kullanılmaktadır.

Halen İstanbul Büyükşehir Belediyesi Başkanlığı tarafından desteklenen ve kurulan İstanbul Lale Vakfı lalenin her türlü kültürel ve bilimsel araştırma ve geliştirmeye yönelik faaliyetlerini düzenlemektedir. Bu bağlamda 2013 yılında 5. Dünya Lale Zirvesi geniş bir uluslararası katılımla İstanbul'da gerçekleştirilmiştir. 2014 yılında ise yine 9. Uluslararası İstanbul Lale Festivali'nin düzenlenmiş olması bu çiçeğe atfedilen önemin bir göstergesidir.

Her kültür bitkisinde olduğu gibi lalede çiçek kalitesini ve soğan verimini olumsuz yönde etkileyen zararlılar dışında patojenik hastalıklar bulunmaktadır. Lale başta olmak üzere soğanlı bitkilerde önemli 12 fungal hastalık yanında 11 farklı virüs hastalığı da çiçek kalitesini ve soğan verimini düşürmektedir (Daughtrey ve Wick 1995). Lalede hastalıklara neden olan, *Tulip breaking virus* (TBV), *Tulip band-breaking virus* (TBBV), *Tulip top-breaking virus* (TTBV), *Tulip halo necrosis virus* (THNV) *Tulip chlorotic blotch potyvirus* (TCBV), *Tulip mosaic virus* (TBV sinonimi), *Tulip X virus* (TVX) *Tobacco rattle virus* (TRV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) ve *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) virüsler, lalenin önemli patojenleri olarak ön plana çıkmışlardır. Her ne kadar laleler de renk kırılması tarihsel geçmişi bakımından en çok bilinen hastalık belirtisi ise de, bunun nedeninin bir virüs olduğu hususu 1932 yılından itibaren fark edildiği Smith (1972) tarafından bildirilmiştir. Türkiye'de ise lalede mozayik hastalığının bulunduğu ilk defa Bremer (1954) tarafından bildirilmiştir. Benzer lale hastalıklarına neden olan virüsler ise Miller (1966), Langeveld ve ark. (1991), Dekker ve ark. (1993) tarafından tanımlanmış ve listelenmiştir. Buna göre lalelerde *Tulip breaking virus* (TBV) yanında *Tulip top breaking virus* (TTBV) adı öne çıkmaktadır. Ancak en son Kings ve ark. (2012) tarafından yapılan virüslerin isimlendirilme ve taksonomisinde *Tulip breaking virus* (TBV), *Tulip mosaic virus* (TuMV) türleri ile TBV-IN Hindistan ırkı ve TuMV-JP Japonya ırkların *Potyviridae* familyasında *Potyvirus* cinsi içersinde yer verilmiştir. Fakat *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV)'ü ise *Ophioviridae* familyasında *Ophiovirus* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. Doğal olarak lalelerde görüldüğü bildirilen bu virüslerle birlikte lale soğanı çeşitlerinin 22 virüs türüne duyarlı oldukları, lale soğan ve çiçek kalitesini düşürdükleri Sochacki (2013) tarafından bildirilmiştir. TBV hakkında bir diğer çalışma Ege bölgesinde gerçekleştirilmiş olup Türkoğlu ve Fidan (1996) krizantem, nergis ve zambak yanında lalelerdeki virüs hastalıklarını biyolojik özelliklerine göre araştırmıştır. Lalelerde renk kırılması virüsü TBV'nün indikatör tütün *Nicotiana clevelandii* ve hanım düğmesi *Gomphreana globosa* bitkilerine yaptıkları mekanik inokulasyonla, sistemik mozayik belirtileri gösterilerek TBV olasılığını dile getirmişlerdir.

Brunt ve ark. (1996) lalelerde renk kırılmasına neden olan beş farklı virüs hastalığını tanımlarken asıl etmenin TBV olduğuna işaret etmişlerdir. TBV'nün konukçu çevresinin ise *Tulip* ve *Lilium* türleri ile sınırlı olduğunu bildirmişlerdir. Lesnaw ve Ghabrial (2000) yaptıkları derleme çalışmasında, laledeki renk kırılması simptomlarını klasik ve tarihi özellikleri olan ünlü ressamların tablolarındaki görüntülerle tanımlamışlardır. Ayrıca değişik

lale çeşitlerindeki renk kırılması hastalık belirtilerinin de farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Bunlardan Rembrandt lale çeşidinde renk kırılmasına neden olan TBV'nün farklı bir izolat olabileceğini de vurgulamışlardır. Lalelerde renk kırılması mekanizmasının petal yapraklardaki anthocyanin pigmentinin sentez mekanizmasının *ph1-ph6* adlı altı gen tarafından kontrol edildiğini petunya bitkisi örneğinde açıklamışlardır.

Brunt ve ark. (1996)'nın yaptıkları derlemeye göre TBV'nün özellikleri şöyle sıralanmıştır. Tek sarmal RNA içeren virüs 750-775 nm boyunda 14 nm çapında esnek çubuk formunda olup 1586 nt'den oluşan bir genom yapısına sahiptir. Virüs duyarlı konukçu hücreleri içersinde Rüzgar Gülü şeklinde ilgi cisimcikleri oluşturmaktadır. Benzer ilgi cisimciklerini TVX tarafından da oluşturulabildiği Rivas ve ark. (2009) tarafından da bildirilmiştir. Adı geçen araştırıcılar Hollanda'dan Brezilya'ya ithal edilen lale soğanlarında TMV ile TVX virüslerini ilgi cisimciklerinin şekli ile saptamışlardır. Mekaniksel inokulasyonla taşınan bu virüs bitki dokularının birbirlerine teması ile taşınmazken, soğan aşısı ile taşınabilir. Polenle ve gerçek tohumla taşınmayan TBV non-persistent bir davranışla *Myzus persicae, Aphis gossypii, Aphis fabae, Macrosiphum euphorbiae, Dysaphis tulipae, Aulocorthum circumflexum* (Aphididae, Homoptera) etkin bir şekilde taşınmaktadır.

Doğal olarak TBV'nün inokulum kaynağı enfekteli lale ve zambak soğanlarıdır. Virüs altı farklı vektör yaprak biti türleri ile non-persistent olarak hasta bireylerden sağlıklı olanlara etkin bir şekilde taşınmaktadır. TBV'nün Dünya'daki yayılışı ise uluslar arası lale soğanı ticareti ile olmaktadır. Nitekim bazı ülkeler uyguladıkları karantina önlemleri ile enfekteli lale soğanı partilerini saptayabilmişlerdir. ABD'nin Illinois Eyalet Üniversitesi'nin Yayım Servisi'nce önerilen lale virüs hastalıkları ile mücadele yöntemleri olarak (Anonim, 1990);

-Gerek lale soğanı üretim alanlarında ve gerekse lale çiçek tarhlarında gözlemler yapılarak çiçek petal yapraklarında renk kırılması simptomları sergileyen bireylerin soğanı ile birlikte sökülerek imha edilmelidir.

-Lale soğanı üretiminde, dikim ve bakım işlemlerinde kullanılan her türlü budama ve bakım aletlerinin steril olmasına dikkat edilmelidir.

-Gerek lale soğanı üretim alanlarında ve gerekse lale çiçek tarhlarında vektör yaprak bitlerinin beslenmesinin engellenmesi için yazlık yağ (DNOC) uygulaması gerekir.

-Hoş görüntüleri nedeniyle lale ve zambaklarda renk kırılması sergileyen enfekteli soğanların oluşturdukları çiçek tarhlarının, homojen renkli çiçekler açan lale ve zambak çeşitlerine ait çiçek tarhlarından uzakta tesis edilmesi önerilir.

-Gerek lale soğanı üretim alanlarında ve gerekse lale çiçek tarhlarında yabancı ot mücadelesi yapılarak olası virüs inokulum kaynaklarının önüne geçilmiş olur.

-Lale soğanlarının üretim parsellerinde ve lale soğanlarının park ve bahçelere dikiminde, çiçek tarhlarını tesis ederken çiçek rengine göre hareket edilmelidir. Koyu renkli çiçek açan çeşitlerle beyaz ve sarı renkli çiçek açan çeşitleri, parlak açık renkli pembe, kırmızı, kahverengi ve turuncu renkli çiçek açan çeşitlerden daha uzak mesafelere dikilmesi yerinde olur. Böylece yaprak bitlerinin virüsleri taşıması sınırlandırılmış olur.

Son yıllarda bir ileri teknoloji ürünü olarak Hollanda'da lalelerde renk kırılması virüs hastalığı ile mücadele için lale soğanı üretim parsellerindeki TBV enfekteli soğanları ayıklayıp uzaklaştırmak için Polder ve ark. (2010), Polder ve ark. (2014) tarafından tasarlanan optik algılayıcılar (sensörler) ve bu sensörleri taşıyan hareketli robotların kullanımı önerilmektedir.

İstanbul tarih sahnesinde yerini aldığı günden bu yana çağ açıp, çağ kapatacak kadar stratejik, Dünya Kültür Mirası listesinde bulunan eserleri ile tarihin çeyiz sandığı konumundadır. Ormanları, Koruları ve Boğazı ile doğa hazinesi metropol bir şehirdir. Böylesi farklı güzellikleri barındıran, sanayi, ticaret, sağlık, kültür, finans ve ulaşım merkezi konumda bir cazibe şehir olan İstanbul, her geçen gün aldığı iç göç artışı ile birlikte 14.167.460 nüfusu ile 17 Avrupa ülkesinden daha kalabalık bir yerleşim merkezidir (Anonim 2013). Hızla artan nüfus miktarı, çarpık kentleşmesi ve betonlaşması ile İstanbul İli'nde yeşil alanlara olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Yeşil alanlardaki Peyzaj düzenlemeleri içerisinde de en önemli ornamental süs bitkilerinden birisi olan Lale ve yetiştiriciliği gün geçtikçe önem arz etmektedir. Lale *(Tulipa* spp.*)* türleri İstanbul başta olmak üzere Türkiye'nin pek çok illeri ile özdeşleşmiş soğanlı süs bitkilerindendir. Yapılan gözlemlerde her yıl artan ölçüde üretimi yapılan lalelerde, renk kırılması hastalığı başta olmak üzere sistemik virüs hastalıkları belirtileri gözlenmektedir.

İstanbul İli'nin park, bahçe, koru, ve diğer regreasyon alanlarındaki lalelerde görülen virüs hastalıklarını saptamak, tanılamak ve mücadelesine yönelik önerilerde bulunmak bu çalışmanın başlıca amacını oluşturmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bremer (1954) Türkiye'de lalede mozaik hastalığının bulunduğunu ilk defa gözlemlemiş ve bildirmiştir.

Miller (1966) tarafından *Tulip breaking virüs* (TBV) ve benzeri lale hastalıklarına neden olan virüs patojenlerini listelemiştir. Buna göre lalelerde *Tulip breaking virus* (TBV) yanında *Tulip top breaking virus* (TTBV) adı öne çıkmaktadır.

Matthews (1970) 1656 yılında Londra'da yayımlanan Parkinson's Herbal Kitabı'nda ağaç baskı tekniği ile lalelerde farklı renklerin ve renk tonlarının iç içe yer aldığı lale çiçek resimlerinin lalede renk kırılmasına neden olan virüs hastalığının o zamandan beri var olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca TBV potyvirus cinsine mensup olduğunu bildirmiştir.

Smith (1972) laleler de renk kırılması belirtisinin nedeninin bir virüs etmeni olduğu hususunun 1932 yılından itibaren anlaşıldığını bildirilmiştir.

Anonim (1990) ABD'nin Illinois Eyalet Üniversitesi'nin Yayım Servisi'nce lale virüs hastalıkları ile mücadele yöntemleri olarak; renk kırılması simptomları sergileyen lale soğanlarının sökülerek imha edilmesini, üretim, dikim, bakım işlemlerinde kullanılan her türlü budama ve bakım aletlerinin steril olmasına dikkat edilmesini, vektör yaprak bitlerinin beslenmesinin engellenmesi için yazlık yağ (DNOC) kullanılmasını, hoş görüntüleri nedeniyle renk kırılması sergileyen enfekteli soğanların oluşturdukları çiçek tarhlarının, homojen renkli çiçek çeşitlerinden uzakta tesis edilmesini, yabancı ot mücadelesi yapılarak olası virüs inokulum kaynaklarının önüne geçilmesini, lale soğanlarında çiçek rengine göre hareket edilip, koyu renkli çiçek açan çeşitlerle, parlak açık renkli çiçek açan çeşitlerin birbirinden daha uzak mesafelere dikilerek yaprak bitlerinin virüsleri taşıma etkinliğinin sınırlandığını belirtmişlerdir.

Langeveld ve ark. (1991) dejenere primer çiftleri kullanılarak potyvirus cinsine mensup türlerden TBV'nin zambaktaki ırkının RT-PCR testi uygulanarak tanısını gerçekleştirilmiştir. TBV'nin 1586 nt içeren tek sarmal RNA'ya sahip olduğu gösterilerek Coat Protein (CP) molekülünün sentezini gerçekleştiren bölgeden elde edilen 335 nt içeren primer çifti kullanmak sureti ile CP oluşturan protein alt ünite molekülünün amino asit sekans analizini gerçekleştirmişlerdir.

Dekker ve ark. (1993) lale ve zambak çiçeklerinde renk kırılmasına neden olan beş ayrı poytvirus türünü serolojik ve PCR yöntemi ile tanılamışlar ve bunları genom yapılarına göre değerlendirerek, yaptıkları filogenetik analizle diğer 27 potyvirus türü ile ilişkilerini saptamak suretiyle bunların birbirleri ile olan farklılıklarını ortaya koymuşlardır.

Le Nard ve De Hertogh, (1993) Lale soğanlarının anatomik yapısını şöyle tanımlamışlardır; Lale soğanları, iki ile altı etli pul şeklinde yapraklarının tabanda birleşmesinden oluşmuştur. Kökler soğan tabanından çıkar. Normal de lale soğanının kökleri noncontroctile (büzülemez) dallanamaz, kök saçak oluşturmaz. Gözler pulların iç tabanında veya tunik iç kısmında bulunur. Genellikle pul başına bir adet tomurcuk bulunur. Eğer soğan küçük çaplı yani vegetatif dönemde ise sadece bir göz oluşur.

Daughtrey ve Wick (1995) Lale başta olmak üzere soğanlı bitkilerde önemli 12 fungal hastalık yanında 11 farklı virüs hastalığının da çiçek kalitesini ve soğan verimini düşürmekte olduğunu bildirmişlerdir.

Türkoğlu ve Fidan (1996) Ege bölgesinde krizantem, nergis ve zambak yanında lalelerdeki virüs hastalıklarını biyolojik özeliklerine göre araştırıp, *Tulip breaking virus* (TBV)'nün indikatör tütün *Nicotiana clevelandii* ve hanım düğmesi *Gomphreana globosa* bitkileri üzerine mekanik inokulasyonla sistemik mozayik belirtileri elde edip TBV'nün biyolojik tanısını gerçekleştirmişlerdir.

Brunt ve ark. (1996) lalelerde renk kırılmasına neden olan beş farklı virüs hastalığını tanımlarken, asıl etmenin TBV olduğuna işaret etmişlerdir. Mekaniksel inokulasyonla taşınan bu virüs bitki dokularının birbirlerine teması ile taşınmazken, soğan aşısı ile taşınabilmektedir. Polenle ve gerçek tohumla taşınmayan TBV non-persistent bir davranışla *Myzus persicae, Aphis gossypii, Aphis fabae, Macrosiphum euphorbiae, Dysaphis tulipae, Aulocorthum circumflexum;* (Aphididae, Homoptera) etkin bir şekilde taşındığı bildirmişlerdir. Ayrıca TBV'nün konukçu çevresinin ise *Tulip* ve *Lilium* türleri ile sınırlı olduğunu belirlemişlerdir. Yazarlar TBV'nün özelliklerinden bahsederken, tek sarmal RNA içeren bu virüsün 750-775 nm boyunda 14 nm çapında esnek çubuk formunda olduğunu ve 1586 nt'den oluşan bir genom yapısına sahip bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca virüse duyarlı konukçu bitki hücrelerinin içerisinde **Rüzgar Gülü** şeklinde ilgi cisimcikleri oluşturduklarını ve benzer ilgi cisimciklerini TVX tarafından da oluşturulabildiğini ileri sürmüşlerdir.

Lesnaw ve Ghabrial (2000) lalenin anavatanının Türkiye olmasına karşın, ticari süs bitkisi olarak bilimsel nitelikte yetiştiriciliği Hollanda'nın Leiden Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanı Botanikçi Carolus CLUSIUS tarafından 1590 yılından itibaren başlatıldığını bildirmişlerdir. Clusius'un 1576 yılından itibaren lale yetiştirme konusunda yaptığı çalışmalar esnasında homojen renkli lale çeşitlerinde renk kırılması ve mozayik tipte petal yapraklardaki renklenmeyi fark ederek bu özelliği taşıyan lale soğanlarından homojen renkli diğer lale soğanlarına taşınabildiğini saptamış olduğunu, bu bulgusunu lalede yeni çeşitler üretim tekniği olarak değerlendirmiş olduğunu belirtmişlerdir. Ancak bu gösterişli belirtilerin bir sistemik virüs hastalığının etkisinden ziyade laleler bir çeşit özelliği olarak değerlendirilmiş olduğunu açıklamışlardır. O dönemde böyle çiçek açan lale soğanlarından tek bir adedinin 3000 Gulden'e satıldığını, bu miktarın zengin ve kalabalık bir ailenin bir yıllık geçimini sağlayacak harcama tutarına eşdeğer olduğu bildirilmişlerdir. Yazarlar yaptıkları derleme çalışmasında laledeki renk kırılması simptomlarını klasik ve tarihi özellikleri olan ve tanınmış ressamların tablolarındaki görüntülerle tanımlamışlardır. Ayrıca değişik lale çeşitlerindeki renk kırılması hastalık belirtilerinin de farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Bunlardan Rembrandt Lale Çeşidinde renk kırılmasına neden olan TBV'nün farklı bir izolat olabileceğini de vurgulamışlardır. Lalelerde renk kırılması mekanizmasının petal yapraklardaki anthocyanin pigmentinin sentez mekanizmasının *ph1-ph6* adlı altı gen tarafından kontrol edildiğini petunya bitkisi örneğinde açıklamışlardır.

King (2005) Günümüzde lalenin kesme çiçekçilikte, saksılı ve bahçelerde ve peyzaj alanlarında kullanıldığını belirterek, lalelerin yüzlerce çeşidiyle en fazla üretilen soğanlı bitkilerin başında geldiğini ileri sürmüştür. Lale üzerinde 1980'li yıllardan sonra yapılan ıslah çalışmalarıyla elde edilmiş yüzlerce çeşidi bulunduğunu ve yüzlerce çeşidiyle her türlü iklim koşullarında yetişen lale çeşidi bulmak mümkün olduğunu ileri sürmüştür.

Alp (2006) Soğanlı bitkilerin bir tarım ürünü olarak da önemi yanında, ülkenin tarihinde, kimliğinde, ekonomisinde ve kültüründe de son derece farklı yerleri bulunduğuna işaret etmiştir. Osmanlı İmparatorluğunun XVII. yüzyılın başındaki "Lale Devri" döneminde halkın refah seviyesinin yükseldiğine dikkat çekerek günümüzde soğanlı bitkilerin ihracatının Hollanda Ekonomisi'ne olan çok olumlu katkısını da bunun en tipik örneği olarak göstermiştir.

Rivas ve ark. (2009) Hollanda'dan Brezilya'ya ithal edilen lale soğanlarında TMV ile TVX virüslerini ilgi cisimciklerinin şekli ile saptamışlardır

Korkut ve ark. (2010) tarihi geçmişi bakımından önemli olan lale bitkisini modern Peyzaj Mimarlığı açısından da çok değerli bir tarh çiçeği ve peyzaj bitkisel malzemesi olarak değerlendirilebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Polder ve ark. (2010) bir ileri teknoloji ürünü olarak Hollanda'da lalelerde renk kırılması virüs hastalığı ile mücadele için lale soğanı üretim parsellerindeki TBV enfekteli soğanları ayıklayıp uzaklaştırmak amacı ile optik algılayıcılar (sensörler) tasarlamışlardır.

Eker (2010) *Tulipa* cinsinin revizyonunu gerçekleştirerek Dünya'daki 125 *Tulipa* türü arasında Türkiye'de de 17 adet tür, 1 alt tür ve 1 botanik varyetenin bulunduğunu, bu türlerin ve taksonların doğal olarak Türkiye Florasında yer aldıklarını ileri sürmüştür.

Kings ve ark. (2012) tarafından yapılan virüslerin isimlendirilmesi ve taksonomisinde, lalelerde renk kırılmasına neden olan virüslerden; *Tulip breaking virus* (TBV), *Tulip mosaic virus* (TulMV) türleri ile TBV-IN Hindistan ırkı ve TulMV-JP Japonya ırklarını *Potyviridae* Familyasında *Potyvirus* cinsi içerisinde göstermişlerdir. *Tulip mild mottle mosaic virüs* (TMMMV)'üne ise *Ophioviridae* familyasında *Ophiovirus* cinsi içerisinde yer vermişlerdir.

Sochacki (2013) Polonya'nın lale plantasyonlarında *Tulip breaking virus* (TBV) ve *Tobacco rattle virus* (TRV) başta olmak üzere *Tobacco necrosis virus* (TNV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Lily symptomless virus* (LSV)'lerinin doğal olarak görüldüğünü ve epidemik boyutlarda hastalık yaptıklarını bildirmiştir. Adı geçen bu virüslerle birlikte lale çeşitlerinin 22 virüs türüne duyarlı olduklarını, lale soğan ve çiçek kalitesini düşürdüklerini saptamıştır. Çalışmalarda DAS-ELISA ve RT-PCR testleri ile indeksleme çalışmalarını Leen van der Mark ve Strong Gold lale çeşitleri üzerinde yoğunlaştırmıştır. Her iki çeşit lalenin de araştırılan beş virüse duyarlı olduklarını saptamıştır.

Alp ve ark.(2013) ise Türkiye'de *Tulipa* cinsine giren bazıları endemik olmak üzere 17 tür, 1 alt tür, bir botanik varyeteden meydana gelen toplam 19 lale takson'u olduğunu bildirmişlerdir. Bunu Türkiye açısından genetik materyal zenginliği olarak değerlendiren araştırıcılar, Türkiye'de yeni lale türleri bulunabileceği gibi yeni çeşitlerin ıslah edebilme potansiyeline işaret etmişlerdir.

Anonim (2013) İstanbul'un tarih sahnesinde yerini aldığı günden bu yana çağ açıp, çağ kapatacak kadar stratejik, Dünya Kültür Mirası listesinde bulunan eserleri ile tarihin çeyiz sandığı konumunda olduğu bildirilmiştir. Ayrıca İstanbul'un, sahip olduğu ormanları, koruları ve boğazı ile doğa hazinesi bir Metropol yerleşim alanı olduğu vurgulanmıştır. Böylesi farklı güzellikleri barındıran, sanayi, ticaret, sağlık, kültür, finans ve ulaşım merkezi konumdadır. Bu özelliklerinden dolayı bir cazibe kenti olan İstanbul, her geçen gün aldığı iç ve dış göç artışı ile birlikte 14.167.460 nüfusa ulaşarak 17 Avrupa ülkesinden daha kalabalık bir yerleşim merkezi konumuna yükselmiş olduğu değerlendirilmiştir.

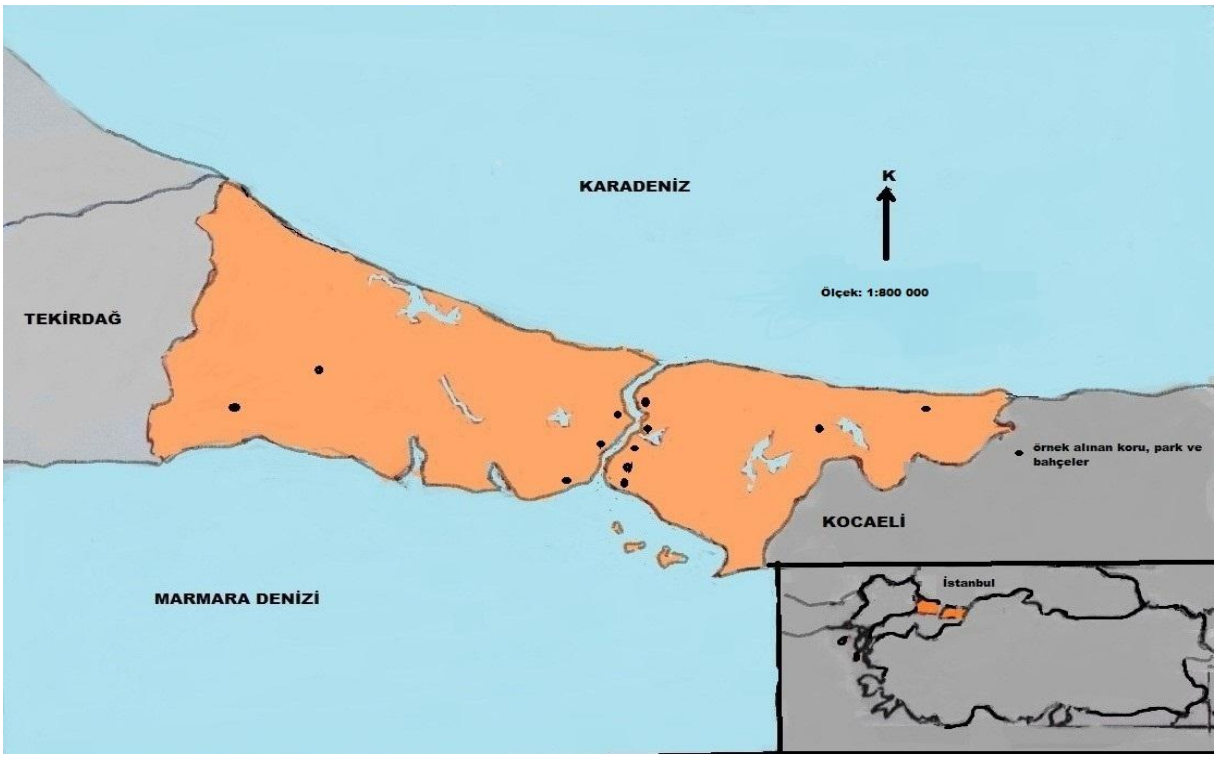
Polder ve ark. (2014) Hollanda'da 2010 yılında tasarladıkları sensörleri taşıyan hareketli robotları üreterek üreticilerin kullanımına sunmuşlardır. Böylece TBV' nin neden olduğu lalede renk kırılma hastalığı ile mücadele için modern bir teknolojiyi devreye sokmuşlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sürvey çalışma alanları ve lale yaprak örneklerinin toplanması

Tezin uygulamasına yönelik olarak 2013-2014 yılında gerçekleştirilen surveyler, Şekil 3.1'de gösterilen İstanbul İli'nde lale dikimi yapılan alanları Merkezde; Emirgan, Yıldız, Beykoz Koruları, Boğaz içindeki diğer korular ve kasır bahçeleri, Göztepe Parkı, Gülhane Parkı ve Yedikule'deki Soğanlı Bitkiler Koleksiyonu'nu içeren Uluslararası Barış Parkı'nı ve Şile ilçe merkezini kapsamıştır. Ayrıca Silivri ve Çatalca İlçelerindeki lale soğanı üretim alanlarında da gözlemler yapılmıştır. Lale çiçek, petal yapraklarının farklı renk ve renk tonlarının bir araya geldiği, renk kırılmalarını sergileyen çiçekler ve bitki yaprakları çalışmanın konusu olup hasta ve simptomatik lalelerin petal ve gerçek yapraklarından alınan yaprak örnekleri araştırma materyalini oluşturmuştur. Böylece çalışma, İstanbul İli sınırları içerisinde bulunan Park, Bahçe, Koru, Regreasyon alanlarına dikilen, lale soğanlarının Mart ve Nisan aylarındaki çiçeklenme döneminde, karakteristik mozayik, cücelik, kloroz, şekil bozukluğu ve diğer sistemik renk değişikliği sergileyen 274 adet bitkinin taç yapraklarından örnekler toplanmıştır. Toplanan örnekler etiketli polietilen torbalara konularak buz kutusu içerisine yerleştirilip, serolojik ve moleküler testlerde materyal olarak kullanılmak üzere laboratuara getirilmiştir. Serolojik ve moleküler testler uygulanıncaya kadar örnekler – 20 ºC'de çalışan derin dondurucuda muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.1 İstanbul İl'inde lale dikimi yapılan ve örnek toplanan alanlar

3.1.2. Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay(DAS-ELISA) testinde kullanılan materyaller

Sürvey alanından toplanan 264 adet lale taç yaprak örnekleri Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) testinde materyal olarak kullanılmıştır. DAS-ELISA testinde *Tobacco rattle virus* (TRV), *Tobacco mosaic virus* (TMV)'lerine karşı hazırlanmış poliklonal antiserumlar, pozitif ve negatif kontroller ve serolojik test kitleri LOEWE BIOCHEMICA, (Sauerlach – GERMANY) firmasından temin edilmiştir. Ayrıca *Arabis mosaic virus* (ArMV) ve *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)'lerine karşı hazırlanmış poliklonal antiserumlar, pozitif ve negatif kontroller ve serolojik test kitleri ise SEDIAG S.A.S (Longvic – FRANCE) firmasından temin edilmiştir. Örneklerin 405 nm dalga boyunda absorbsiyon değerlerinin ölçülmesi için Thermo Scientific Multiskan FC ELISA Plate Reader cihazı kullanılmıştır.

3.1.3. Scaning Elektron Mikroskopi (SEM) çalışması için kullanılan materyaller

Lalelerde renk kırılmasına neden olan esnek çubuk forumunda virionlar içeren virüslerin ve bu virüslerin agregatlaşması sonucu ortaya çıkan Rüzgar gülü şekilindeki ilgi cisimciklerini görmek amacı ile Scaning Elektron Mikroskop (SEM) çalışması yapılmıştır. Bu

amaçla forumwar kaplı gridler, bistüri ve enfekteli lale yaprak örnekleri ile görüntünün elde edilmesi için Zeiss marka Scaning Elektron Mikroskop (SEM) kullanılmıştır.

3.1.4. Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) testinde kullanılan materyaller

Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) testini uygulamak amacıyla lale örnekleri arasından RNA izolasyonunda kullanılmak üzere 1 adet sağlıklı kontrol ve 2 adet renk kırıklığı belirtisi sergileyen lale yaprak örnekleri materyal olarak seçilmiştir. Kalan örnekler ise –80 ^{o}C'de çalışan derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu için PureLink® RNA Mini Kit kullanılarak aşağıdaki protokol uygulanmıştır. qRT-PCR için de aşağıda listesi verilen dejenere primer çiftleri ve cDNA reverse transcriptase kiti kullanılmıştır. Örneklerin 460 nm dalga boyunda absorbsiyon değerlerinin ölçülmesi ve 560 nm dalga boyunda tanılaması için de ABI 7500 F RT-PCR Plate Reader cihazı kullanılmıştır. *Tulip breaking virus* (TBV) için tasarlanan ve kullanılan primer çiftleri Çizelge 3. 1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1. İstanbul Lalelerinde *Tulip breaking virus* (TBV) araştırması için tasarlanan ve kullanılan Primer çiftleri.

Tüm Genoma Özgü Primer Çiftleri	
P1- 8 F (Forward)	GGACCACTTTGCGAACACTT
R (Revers)	AGTGGCTAAGAAGACGCGAG
P2-14 F (Forward)	TGGTGATGACCTATTGCTGG
R(Revers)	AGTGGCTAAGAAGACGCGAG
P3-17 F (Forward)	TGGTGATGACCTATTGCTGG
R(Revers)	AGCTCGGTTCCCAACTACAA
Proteine Alt Ünite Moleküllünü Sentezleyen Gene Özgü Primer Çiftleri	
PRO1 F (Forward)	GACATCACCGAACATAAATGGA
R(Revers)	TTCTCTAGCCCGATTAGGAGTT
PRO2 F (Forward)	GACATCACCGAACATAAATGGA
R(Revers)	TTCTCTAGCCCGATTAGGAGT
PRO3 F (Forward)	GACATCACCGAACATAAATGG
R(Revers)	TTCTCTAGCCCGATTAGGAGTT
Relatif Gen Ekspresyonunu Normalize Eden 18S Primer Çifti	
18S.up1	TGGTTGATCCTGCCAGTA

3.2. Yöntem

3.2.1. Sürvey metodu ve virüs enfekteli lalelerin saptanması

Lalelerin çiçeklenme döneminde gerçekleştirilen sürveyler esnasında gezilen bütün alanlarda çiçeklerin petal yapraklarındaki renk kırılma belirtileri gözlenmiş ve bunların karakteristik simptomlar sergileyen bireylerinin renkli fotoğrafları çekilerek kayıt altına alınmıştır. Ayrıca petal yapraklarından virüsleri test etmek için örnekler sağlanmıştır. Böylece İstanbul İli'nde bütün lale dikim alanlarını temsil edebilecek sayıda toplam 274 adet örnek elde edilmiştir.

3.2.2. Double Antibody Sandwich Enzyme Linked İmmunosorbent Assay (DAS-ELISA) testi

Lale petal yaprak örneklerinde virüslerin serolojik yöntemle araştırılmasında Clark ve Adams (1977)'ın önerdiği Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) yöntemi ile anti serumların ve test kitlerinin sağlandığı LOEWE BİOCHEMİCA ve SEDIAG (S.A.S) firmalarının önerdikleri protokoller izlenmiştir.

Bitki doku örneklerinin hazırlanmasında, her bir örneğin 1 g miktarı için 10 ml Ekstraksiyon tampon çözeltisi isabet edilecek şekilde steril porselen havanlara konulan örnekler homojenize edilerek, virüsleri içerdiğinden şüphe edilen bitki özsuyu örnekleri steril 20 ml'lik etiketli şişelere transfer edilip + 4 ^{o}C'de buzdolabında test edilene kadar muhafaza edildiler.

1) Kaplama tampon çözeltisi ile 200 defa seyreltilen IgG ELISA Plate'lerinin her bir çukuruna 0,2 ml konularak 4 saat süre ile 37 ^{o}C inkube edildi.

2) Plateler yıkama tampon çözeltisi ile 4 defa yıkandı. Bu amaçla her bir seferde yıkama tampon çözeltisi konulan plateler 3 dakika süre ile bekletildikten sonra ters çevrilerek boşaltıldı ve sıvıdan tamamen arındırıldı.

3) Homojeniz'e edilerek hazırlanan yaprak örnekleri, Conjugate tampon çözeltisi ile 20 misli seyreltilerek Pozitiv ve Negativ Antijen kontrolleri ile birlikte, Platelerdeki her bir çukura 0,2 ml düşecek şekilde doldurulduldu. Her bir örnek iki yenilemeli olarak hazırlanıp ıslak

kâğıt havlulara sarılarak paketlenen platler, bir gece süre ile + 4^{o} C'lik buzdolabında inkübe edildi.

4) İnkübasyondan sonra Plateler yıkama tampon çözeltisi ile 4 defa yıkandı. Bu amaçla her bir seferde yıkama tampon çözeltisi konulan plateler 3 dakika süre ile bekletildikten sonra ters çevrilerek boşaltıldı ve sıvıdan tamamen arındırıldı.

5) Conjugate tampon çözeltisi ile 200 misli seyreltilen Anti Body AF Conjugate, Platelerdeki her bir çukura 0,2 ml düşecek şekilde dolduruldu. 4 saat süre ile 37 ^{o}C'de inkube edildi.

6) Plateler yıkama tampon çözeltisi ile 4 defa yıkandı. Bu amaçla her bir seferde yıkama tampon çözeltisi konulan plateler 3 dakika süre ile bekletildikten sonra ters çevrilerek boşaltıldı ve sıvıdan tamamen arındırıldı.

7) Kullanımdan hemen önce hazırlanmış olan Substrate çözeltisinden Platelerdeki her bir çukura 0,2 ml düşecek şekilde dolduruldu. 2 saat süre ile oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildi.

8) Platler önce gözle daha sonrada 405 nm dalga boyunda absorbsiyon değerlerinin saptamak için Thermo Scientific Multiskan FC ELISA Plate Reader cihazında ölçüldü.

Böylece Lale çiçek ve petal yaprak örneklerinde TRV, TMV, ArMV ve SLRSV virüslerin varlığı serolojik olarak araştırılmıştır. SEDIAG (S.A.S) Firmasından temin edilen ArMV ve SLRSV virüslerine karşı hazırlanmış poliklonal antiserumlar kullanılarak örneklerin ELISA testinde ise aynı yöntem takip edilmiştir. Ancak bazı inkubasyon süreleri 4 saat yerine 2 saat, yıkama işlemi ise ArMV için 3 defa ve SLRSV için ise 5 defa yapılmıştır.

3.2.3. Scanner Elektron Mikroskopi (SEM) çalışması

Yaprak Bandırma (Leaf- Dip) Brandes and Paul (1957) metodu'na göre bakır elektron mikroskop gridleri 200 mesh'lık Formwar ile kaplanarak hazırlanmıştır. Her bir grid üzerine 1'er damla ultra filitre edilmiş saf su konulmuştur. Keskin bistürü ile bitki yaprağı kesilerek, kesilmiş yüzeyden sivri bir uç oluşturulmuştur. Bu uç 3 defa grid üzerindeki su damlasına bandırılarak içerdiği partiküller ve ilgi cisimciklerinin saf suya karışması sağlanmıştır. Daha sonra gridler karbonla fikse edilerek kromla kaplanıp Scanner Elektron Mikroskobunda

incelenerek esnek çubuk formunda virionlar ve bunların oluşturduğu Rüzgar Gülü şeklindeki ilgi cisimcikleri (Inclusion Bodies) aranmıştır.

3.2.4. Real Time RT-PCR (qRT-PCR) testi

Lale petal yaprak örneklerinde TBV virüsünün moleküler yöntemle araştırılmasında RNA izolasyonu için PureLink® RNA Mini Kit kullanıldı ve aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

3.2.4.1. Bitki dokusunun homojenize edilmesi

Seçilen materyallerin çiçek kısımları öncelikle sıvı azot ile parçalanmıştır. Toz haline getirilen örneklerden DNA-RNA içermeyen 4 ayrı eppendorf tüpüne 200'er mg kadar alınmıştır. % 1 lik 2- merkaptoetanol içeren taze lysis tampon çözeltisi hazırlanmış ve her bir tüpe 800 µl eklenmiştir. Tüplere SSB02-RNA 0.2 mm RNase-free boncuklardan eklenerek örnekler Tissue lyser, Next Advance marka doku parçalayıcısında maksimum hızda 4 dakikada parçalanarak homojenize edilmiştir.

3.2.4.2. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için Şekil 3.2.'de gösterilen basamaklar izlenmiştir. Buna göre;

a) Homojenize edilen örnekler 20.000 g de 5 dk döndürülerek santrifüj edilmiştir.

b) Sıvı fazdan yeni eppendorf tüplerine 400 µl alınarak her birinin üzerine 400 µl %70'lik etanolden eklenmiştir.

c) Örnekler vortekslenmiş ve 700 µl örnek spin kolona aktarılmıştır.

d) 12.000 g de 15 sn santrifüje tabi tutulduktan sonra b ve c adımları tekrarlanarak örnekler tekrar vortekslenerek santrifüje edilmiştir.

e) Spin kolona 700 µl yıkama tampon çözeltisi I eklenerek 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiştir.

f) Pelet kısmı atılarak sulu faz yeni bir koleksiyon tüpüne alınmıştır.

g) Spin kolona 500 µl yıkama tampon çözeltisi II eklenmiş ve 12.000 g de 15 sn santrifüj edilmiştir.

h) g adımı tekrarlanarak 12.000 g de 2 dk santrifüj edilmiştir.

ı) Spin kolon yeni bir eppendorfa tüpüne alınarak 30-100 µl RNase-free su eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dk bekletildikten sonra 12.000 g' de 2 dk santrifüj edilip RNA molekülleri eppendorft tüpüne aktarılmıştır.

Şekil 3.2. Örneklerden elde edilen RNA ekstraksyon basamakları

3.2.4.3 RNA ölçümü

RNA miktarları nanodrop ile (Thermo, Multiscan Go) A_{260} sonuçlarına göre aşağıdaki formülle belirlenmiştir. Bir sonraki cDNA aşaması için miktarlar tabloda belirtildiği şekilde eşitlenmiştir.

RNA(µg/ml)=260 nm'deki OD (Absorbans değeri) x sulandırma oranı x 40

3.2.4.4. cDNA sentezi

cDNA sentezi için High capacity cDNA reverse transcription kit (applied biosystem) kullanılmış ve aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

10X RT Tampon çözeltisi	2.0 µl
25X dNTP Mix (100mM)	0.8 µl
10X RT Random Primer	2.0 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0 µl
Nuclease-free su	4.2 µl

Yukarıdaki bileşenlerden hazırlanan karışımdan 10 µl PCR tüplerine paylaştırılmış ve son hacim 10 µl olacak şekilde Çizelge 3.2.'e göre RNA ve su miktarları eklenmiştir.

Çizelge 3.2. qRT-PCR çalışması için örneklerden izole edilen RNA miktarları.

Örnek	RNA miktarı(ng/ µl)	Alınan RNA miktarı(µl)	Nuclease-free su (µl)
K3	242	7	3
K8	214	8	2
Ö17	197	9	1
Ö20	195	9	1

Çizelge 3.3. cDNA sentezi için qRT-PCR protokolü.

	1. basamak	2. basamak	3. basamak	4. basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 sn	∞

3.2.4.5 Real Time PCR Protokolü

Çizelge 3.3.'de gösterilen protokole göre elde edilen cDNA'lardan virüs RNA ekspresyonunu belirlemek için aşağıda Çizelge 3.3.'de belirtilen Real Time PCR protokolü

uygulanmıştır. Reaksiyonda, virüs tüm genomuna ve coat proteine özgü primerler kullanılmış ayrıca endojenik kontrol olarak 18S genine özgü primer seçilmiştir. Virüs genomuna özgü primerler Biology Workbench ve Primer3 programları ile belirlenmiştir. Tüm çalışmalar 3 tekrarlı yapılmıştır.

Çizelge 3.4. Real Time PCR Protokolü.

Power Sybr Green PCR master mix		12.5 µl
Forward primer (100nm)		2.4 µl
Reverese primer(100nm)		2.4 µl
cDNA		2 µl
Su		5.7 µl
95^{o}C	10 dk	
95^{o}C	15 sn	} 50 döngü
60^{o}C	1 dk	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sürvey sonuçları ve gözlemlenen hastalık belirtileri.

İstanbul İli'nde Lale soğanı dikim alanları ve lale soğanı üretim alanlarında yapılan gözlemler sonucunda çiçeklenme döneminde lalelerde renk kırılması sergileyen bitkilere rastlanmıştır. Böyle hasta bitkilerin petal yapraklarında lale çeşitlerine özgü homojen renkler bozularak, bu renklerin değişik tonlarından oluşan mozaik belirtileri saptanmıştır. Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi petal yapraklarındaki renk kırılması yanında cücelik belirtileri gözlemlenen ve sık rastlanan ayrı bir belirtidir. Böylece gözlem sonuçları ile Bremer (1954), Türkoğlu ve Fidan (1996), Lesnaw ve Ghabrial (2000) tarafından ileri sürülen lale'lerdeki karakteristik mozaik ve renk kırılması hastalığının varlığı doğrulanmıştır.

Şekil 4.1. İstanbul Silivri'de lale soğan üretim tarlasında saptanan renk kırılması, cücelik ve goncadaki şekil bozukluğu belirtileri.

Şekil 4.2. Aynı çeşitten oluşturulan lale çiçek tarhında sağlıklı laleler arasında tek bir bireydeki renk kırılması ve gerçek yapraklarında sarılık belirtileri.

Şekil 4.3. Park alanındaki çiçek tarhında aynı çeşit lalede değişik derecelerde lale renk kırılması belirtilerinin görünüşü.

Şekil 4.4. Çiçek tarhında aynı çeşit enfekteli lalelerde değişik boyutlarda gonca oluşması.

Şekil 4.5. Çiçek tarhına dikilmiş hastalıklı soğanlardan çıkan değişik renk kırılması ve goncalardaki deformasyonların görünüşü.

Şekil 4.6. İstanbul Emirgan Korusu'nda farklı iki çeşit renkli sağlıklı lalelerin oluşturduğu çiçek tarhı

Şekil 4.7. İstanbul Beykoz'daki Hidiv Kasrı Bahçesi'nde renk kırılması enfekteli çeşitli renklerden lalelerin oluşturduğu çiçek tarhı (solda) ve sağlıklı beyaz lalenin oluşturduğu çiçek tarhı (sağda) yer almıştır.

Şekil 4.2.' te görüldüğü gibi petal yapraklarda renk kırılması yanında gerçek yapraklarda da sistemik sarılık ve nekrotik uç kurumaları dikkati çekmiştir. Şekil 4.3. ve Şekil 4.4. incelendiğinde görüleceği gibi lalelerdeki renk kırılması, değişik derecelerde oluşabilmekte ve goncaların boyutlarında da varyasyonlar dikkati çekmektedir. Tanımlanan bu belirtiler Brunt ve ark. (1996), Lesnaw ve Ghabrial (2000) tanımladıkları, Sochacki (2013)'nin ise Polonya'da gözlemledikleri belirtilerle uyum göstermektedir.

Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da dikkati çekeceği gibi hastalıklı lalelerin goncalarındaki boyutlar genellikle küçülmekte hastalık şiddetine bağlı olarak bazı goncalar iri kalırken diğerleri küçülmektedirler. Şekil 4.6.'da görüleceği gibi sağlıklı olan lale soğanlarından oluşturulan çiçek tarhlarında renk kırılması olayına rastlanmamış olduğu halde Şekil 4.7 'de görüldüğü gibi enfekteli soğanlardan oluşturulan çiçek tarhındaki tüm lalelerin renk kırılması belirtilerini göstermesi yanındaki beyaz çiçek açan lale tarhı ile mukayese edildiğinde hastalıklı lalelerin kısa kaldığı ve cücelik sergiledikleri dikkati çekmektedir. Saptanan TBV hastalık belirtileri, Anonim (1990)'in estetik görünümlü TBV enfekteli lalelerin sağlıklı lalelerin yer aldığı çiçek tarhlarından uzak tutulması önerilerini teyit etmektedir

4.2. DAS- ELISA test sonuçları

İstanbul ve çevresindeki tüm alanlarda rastlanan simptomatik lale bitkilerinden toplanan 274 adet örneğin 264 adedi Double Antibody Sandwich Enzyme Linked İmmunosorbent Assay (DAS - ELİSA) testine tabi tutularak bitkilerde renk kırlmasına neden olan virüslerin varlığı araştırılmıştır. Ticari serolojik test kitleri sağlanan ve poliklonal anti serumları elde edilen virüslerden *Tobacco rattle virus* (TRV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) ve *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) olmak üzere dört virüs üzerinde çalışılmıştır. Ancak ticari serolojik test kiti ve anti serumu sağlanamayan *Tulip breaking virus* (TBV) serolojik olarak bu çalışmada araştırılamamıştır.

Elde edilen DAS – ELİSA test sonuçlarına göre testi yapılan dört virüsün hiçbirinin örneklerde bulunmadığı görülmüştür. Elde edilen negatif DAS-ELISA test sonuçları serolojik olarak Rivas ve ark. (2009) Brezilya'da saptamış oldukları iki virüs *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tulip virus* X (TVX) ve Sochacki (2013)'nin Polonya lale plantasyonlarında saptamış olduğu beş lale virüsünün bulgularının aksini göstermiş olup İstanbul lalelerinde TBV dışında diğer virüslerin bulunmadığı görülmüştür.

4.3. Scaning Elektron Mikroskopi (SEM) çalışması sonuçları

Leaf- Dip metodu ile hazırlanan elektron mikroskop gridlerinin hiçbirinde esnek çubuk forumundaki vironlara ve bu vironların oluşturduğu düşünülen ilgi cisimciklerine rastlanmamıştır. Aynı cinse mensup *Turnip mosaic virus* (TuMV) için leaf-dip yöntemi ile hazırlanan gridlerinde virüsün esnek çubuk formundaki virionları Çıtır (1975) Transmission Elektron Mikroskopi (TEM) yöntemi ile görüntülenmiş ve benzer şekilde Rivas ve ark. (2009) TBV'ün oluşturduğu rüzgar gülü benzeri ilgi cisimciklerini lalenin mezofil hücreleri içerinde görüntülemişlerdir. Bu çalışmada alınan olumsuz sonuç kullanılan Elektron Mikroskobun Scanning Elektron Mikroskop (SEM) olmasından kaynaklanabilir.

4.4. Real Time Polimeraz Chain Reaction (RT-PCR) test sonuçları

İstanbul Park ve Bahçelerindeki çiçek tarhlarından toplanan ve petal yapraklarında renk kırılması belirtileri sergileyen 10 lale yaprak örneği Real Time Polimeraz Chain Reaction (RT-PCR) testine tabi tutuldu. Sonuçta lale yaprak örnekleri, dizayn edilen primer çiftleri kullanılarak virüsün kılıf protein alt ünite moleküllerinin sentezini sağlayan ve 277 nt içeren genom bölgesinin ekspresyon çalışması sonucu elde edilen cDNA fragmentlerinin nükleotid dizi analizleri yapıldı. Örneklerden elde edilen iki izolatın Uluslararası Gen Bankası'ndaki TBV'ne ait S60804 numaralı aksesiyon ile % 95 olasılıkla aynı kümede yer aldıkları kanıtlanmıştır. Böylece İstanbul ve çevresinde yaygın olarak görülen lalelerdeki renk kırılması hastalık etmeninin *Tulip breaking virüs* (TBV) olduğu kanıtlanmış ve saptanmıştır. Elde edilen bu bulgular TBV tanısı için Langeveld ve ark. (1991), Dekker ve ark. (1993) ile Sochacki (2013)'nin gerçekleştirdikleri RT-PCR test sonuçları ile uyum göstermiştir. RT-PCR çalışmalarına ilişkin şekil ve Çizelgeler EK-2 de gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada virüsün mevcut tüm genetik materyalinin belirlenmesi için dizayn edilmiş P2 primer çiftinin yalnız virüs 1 izolatı için, P3 primer çiftinin ise yalnız virüs 2 izolatı için istatistiksel anlamda önemli gen ekspresyonu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ancak virüsün protein bölgesinde spesifik primer olan Pro2 primer çiftinin her iki virüs izolatı örneğinde önemli düzeyde gen ekpresyonu oluşturduğu belirlenmiştir. Kontrole kıyasla Pro2 primerinin çoğalttığı gen bölgesi TBV özgü bulunmuş, kontrol ve TBV enfekteli örneklerine özgü protein bölgesine ait gen ekspresyonları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli düzeyde saptanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye'nin ve en önemli Metropol Kenti olan İstanbul ile özdeşleşen lalenin hastalıkları konusunda yapılacak her türlü çalışma kamu ve yerel yönetimler tarafından desteklenmeyi hak etmektedir.

Bu amaçla özellikle lale soğanı üretim alanlarında ve ithal edilen lale soğanı partilerinde, lalede verimi ve kaliteyi olumsuz yönde etkileyen beş ayrı virüsün araştırılması gerekir. Bu çalışma ile lalelerde sadece TBV saptanmıştır. Buna ek olarak Avrupa ülkelerinden ithal edilen lale soğanı partilerinde, *Tulip virus* X (TVX), *Tobacco rattle virus* (TRV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) ve *Cucumber mosaic virüs* (CMV)'lerinin araştırılması, karantina listelerinde girişi yasak patojenler olarak değerlendirilmesi yerinde olacaktır.

Lalenin gen kaynakları arasında Türkiye yer aldığına göre ve halen bu topraklarda lalede renk kırılması hastalığı TBV dışında bir başka virüs hastalığına rastlanmamış olması, uluslararası süs bitkileri ticaretinde ve lale soğanı üretiminde Türkiye'ye önemli bir avantaj sağlayabilir. Bu sayede kesme çiçek sanayi sektörü dışında soğanlı bitkiler ihracatında önemli bir gelir kaynağı olarak değerlendirilebilir.

Öte yandan Türkiye Florası'ndaki laleye ilişkin tür ve varyasyon zenginliği genetik kaynakları değerlendirilerek yeni ve hastalıklara dayanıklı lale çeşitlerinin ıslahı ve Dünya'ya tanıtılması da desteklenmeye değer bir başka araştırma alanıdır.

Ayrıca lale soğan üretiminin ve lale dikim faaliyetlerinde İstanbul Büyükşehir Belediyesi örnek alınarak sadece İstanbul ile sınırlı kalmayıp tüm Türkiye çapında yerel yönetimler için peyzaj ve süs bitkisi materyalli olarak değerlendirilmesi yerinde olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Anonim (1990). Tulip Breaking or Mosaic Report on Plant Diseaseş RPD no: 634 Universtiy of IllİInois Extension services. Urbana – Champaıgn USA.

Anonim (2013) T.C Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK) verileri www.tuik.gov.tr

Alp Ş., Aşur, F., (2006) Geofitlerin Peyzaj Planlama Çalışmalarındaki Önemi Ve Gene l Kullanım Esasları, III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, , İzmir 393-399.

Alp Ş., (2006) Doğal Çiçek Soğanları, Ters Lale, Koruma Önlemleri ve Yetiştiriciliği, Doğal Çiçek Soğancıları Derneği, Yayın No 2 S: 1-44 (ISBN 975-00731-1-8); Yalova

Alp Ş., Keskin S., Türkoğlu N., (2010) Bazı İklim Verileri Kullanılarak Soğanlı Bitki Yetiştiriciliği Açısından Ülkemizde En Uygun Bölgenin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. IV. Süs Bitkileri Kongresi Mersin 20-22: 296 -301.

Alp, Ş., Zeybekoğlu E., Salıman A., Karaağaçlı, M., Özzambak M.E. (2013)Lale Bitkisinin Islahı ve Kültüre Alınmasında Ülkemizin Önemi V. Süs Bitkileri Kongresi Bildiriler Yalova 1: 252-254.

Akalın, Ş. (1952) Büyük Bitkiler Klavuzu, Güzel Sanatlar Matbaası, Ankara 1380 s.

Atasoy N., (2002) Hasbahçe : Osmanlı kültüründe bahçe ve bahçecilik, Aygaz yayınları İstanbul s.367

Benschop, M., Kamenetsky, R., Nard Le, M., Okubo, H., Hertogh De, A., (2010) The Global Flower Bulb Industry: Production, Utilization, Research. Horticultural Reviews, Volume 36 Wiley-Blackwell
.

Bremer, H. (1954) Türkiye Fitopatolojisi Cilt: 3 Ziraat Vekaleti, Neşriyat ve Haberleşme Müdürlüğü Sayı 715 İstiklal Matbaası, Ankara 295 s.

Brandes, J. And H.L. Paul (1957) Das elektronen mikroskop als hilfsmittel bei der diagnose pflanzlicher virosen. Archiv fur Mikrobiologie 26: 358-368

Brunt A.A, Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. (1996) Viruses of Plants Descriptions and Lists from the Vide Database CAB İnternational University press Cambridge UK. 1484 p.

Clark M, Adams AM (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, J. Gen. Virol., 34: 475-83.

Çıtır A. (1975) Identification , Bioassay, Ecology and Control of an Endive Mosaic Virus in N.J The Graduate School of Rutgers University, Doktora tezi New Brunswick, New Jersey, USA. 99 p.

Daughtrey, M.L., Wick R.L. (1995) Compendium of Flowering Potted Plant Diseases APS pres St. Paul Minesota USA 90 p.

Dekker, E.L , Derks A.F.L.M, Asjes C.J, Lemmers M.E.C, Bol J.F, and Langeveld S.A (1993) Characterization of Potyviruses from Tulip and Lily which cause Flower – Breaking.Journal of General vırology 74: 881-887 p.

Everett D. (2013) The Genus Tulipa Tulips of the World, Kew Publishing Royal Botanic Garden Kew

Eker, İ. (2010) Revision of the Genus Tulipa L. (Liliaceae) in Turkey. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitisü Basılmamış Doktora Tezi Bolu

Lesnaw, J A ve Ghabrial, S A. 2000. Tulip breaking: Past, present and future. Plant Disease 84 (10): 1052-1060 p.

Matthews, R.E.F (1970) Plant Virology Academic Press, Newyork- USA 778 p.

Miller, P.R (1966) Index of Plant Vırus Diseases Agriculture Handbook No.307 Agricultural Research Service U.S Department of Agriculture Washington, D.C., USA. 446 p.

King, R., 1979. The Quest for Paradise. A History of the World's Gardens, Mayflowers Books, New York,

King , A.M.Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., ve Lefkowitz ,E. J. (2012) Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press London, U.K.. NewYork, USA. 1272 p.

Korkut A.B, Şişman E.E, Özyavuz M. (2010) Peyzaj Mimarlığı, Verda Yayıncılık ve Danışmanlık Hizmetleri, Ada Ofset Matbaacalık, İstanbul 419 s.

Rivas, E.B, Galletti, S.R, Alexandre, M.A.V, Duarte , L.M.L, Chagas C.M (2009) Scientific Communication İnterceptation of Viruses on Foreıgn Tulips in Brazil. Instituto Biologico, Sao Paulo- Brasil 76: 501-504.

Sochackı, D. (2013) The Occurrence of the Vıruses in Tulip Crops in Poland. Journal of Horticultural Research, 21: 5-9.

Smith, K.M (1972) Textbook of Plant Vırus Diseases Academic Press, Newyork- USA 684.

Langeveld, S. A.; Dore, J-M; Memelink, J.; Derks, A. F. L. M.; Vlugt, C. I. M. V.; Asces, C.J.; Bol, J. F. (1991). Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenarate primers. J. General Virology 72: 1531-1541.

Polder, G., Heijden, G.W.A.M, Van der Doom , J. Van, Baltissen, A.H.M.C (2104) Automatic Detection of Tulip Breaking Virus (TBV) in Tulip Fileds Using Machine Vision Biosystems Engineering 117: 35-42.

Polder, G., Heijden, G.W.A.M, Van der Doom , J. Van, Elevers, JG.P.W., Schoor R.Van der,Baltissen, A.H.M.C (2010) Detection of the Tulip Breaking Virus (TBV) in Tulips using Optical Sensors Presicion Agriculture 2: 397-412.

Türkoğlu, T. ve Fidan Ü. (1996) Ege Bölgesinde Krizantem, Nergis, Zambak ve Lalelerde görülen virüs hastalıklarının tanıtılması. Bitki Koruma Bülteni 36: 73-78.

7. TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında bana yol gösteren ve tecrübelerinden her zaman yararlanarak, desteğini arkamda hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇITIR'a ,

Serolojik testlerin laboratuvar çalışmasına yardımcı olan, aynı zamanda tez savunma sınavının değerli jüri üyesi Sayın Prof. Dr. Havva İLBAĞI'na ve Real-Time RT-PCR Laboratuvar çalışmasının yapılmasında emeği geçen TÜTAGEM Yetkililerine;

Kendilerinden Yüksek Lisans derslerimi aldığım Ziraat Fakültesi Öğretim Üyelerinden Bitki Koruma Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Nihal ÖZDER ile Yrd. Doç. Dr. Adnan KARA, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Rıfat BİRCAN'a

Tez savunma sınavına katılmasından onur duyduğum lale ıslahı konusunda çalışmalar yapan YYÜ. Ziraat Fakültesi Öğretim Üyelerinden, Peyzaj Mimarlığı Bölüm Başkanı değerli jüri üyesi Sayın Doç. Dr. Şevket ALP'e

Laboratuar çalışmam için gerekli olan finansal kaynağın temin edilmesini sağlayan İstanbul Ağaç ve Peyzaj A.Ş. Kurumu Genel Müdürü ve Peyzaj Mimarları Odası İstanbul Şube Başkanı Peyzaj Yüksek Mimarı Sayın Murat ERMEYDAN 'a teşekkür ederim.

Teşekkürlerin en büyüğünü de hayatım boyunca eğitimimde destek olan ailem, özellikle de Annem Vahide DENİZER ve Merhum Babam Ali DENİZER hak etmektedirler.

Ekim 2014 Serkan DENİZER

Ziraat Mühendisi

ÖZGEÇMİŞ

03.12 1976 tarihinde Bitlis İli Tatvan İlçesinde doğdu. 1989 yılında İlkokulu, Tatvan Mehmetçik ilkokulunda, Orta ve Lise eğitimini 1996 yılında Tatvan Anadolu Lisesinde tamamladı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümündeki 1997 yılında başladığı Lisans eğitimini 2001 yılında bitirdi. Ağrı 12. Mekanize Piyade Tugayında Ağustos 2003 ile Şubat 2004 yılları arasında 293. Kısa Dönem Erbaş olarak askerliğini yaptı. Halen Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dal'ında Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir. "İSTANBUL İL'İNDE DİKİMİ YAPILAN LALELERDEKİ VİRÜS HASTALIKLARININ SAPTANMASI VE TANILANMASI ÜZERiNE ARAŞTIRMALAR" adlı tezini başarı ile savunduğu takdirde Namık Kemal Üniversitesi'nden Yüksek Lisans Derecesine hak kazanacaktır.

Ziraat Mühendisi Serkan DENİZER

9. EK 1

DAS-ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Fosfat tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline) (PBS) pH:7,2-7.4

Nacl…… 8,0 gr
KH_2PO_4…….. 0,2 gr
$Na_2HPO_4.7H_2O$…….. 2,9 gr
KCI……. 0,2 gr
NaN_3……...…… 0,2 gr
Tween-20…… 0,5 mI

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCI ile ayarlanmış ve +4 C de saklanmıştır.

2. Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating Buffer) pH: 9.6

Na_2CO_3……1,59 gr
$NaHCO_3$……...2,93 gr
NaN_3…….0,2 gr
Bromocresol purple…….. 5 mg

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre suda eritilip pH ayarlanmış ve +4 ºC' de saklanmıştır.

3. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer) (PBST) pH: 7.4

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)…… 1 litre
Tween-20…….. 0,5 mI

1 litre PBS tampon çözeltisi içerisine 0,5 mI Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır. Kullanım süresince +4 C ' de saklanmıştır.

4. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (Sample Extration Buffer) pH:7.2-7.4

1 litre yıkama tampon çözeltisi içerisine 10 gr Polyvinylpyrolione (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır. 39

5. Konjugat Tampon Çözeltisi (Enzyme Conjugate Buffer) pH: 7.4

PBST…….. 1 litre
BSA…… 2 gr
Congo Red……. 40 mg

1 litre PBST içerisine 2 gr BSA ve 40 mg Congo Red ilave edilerek pH ayarlanıp + 4 ºC 'de saklanmıştır.

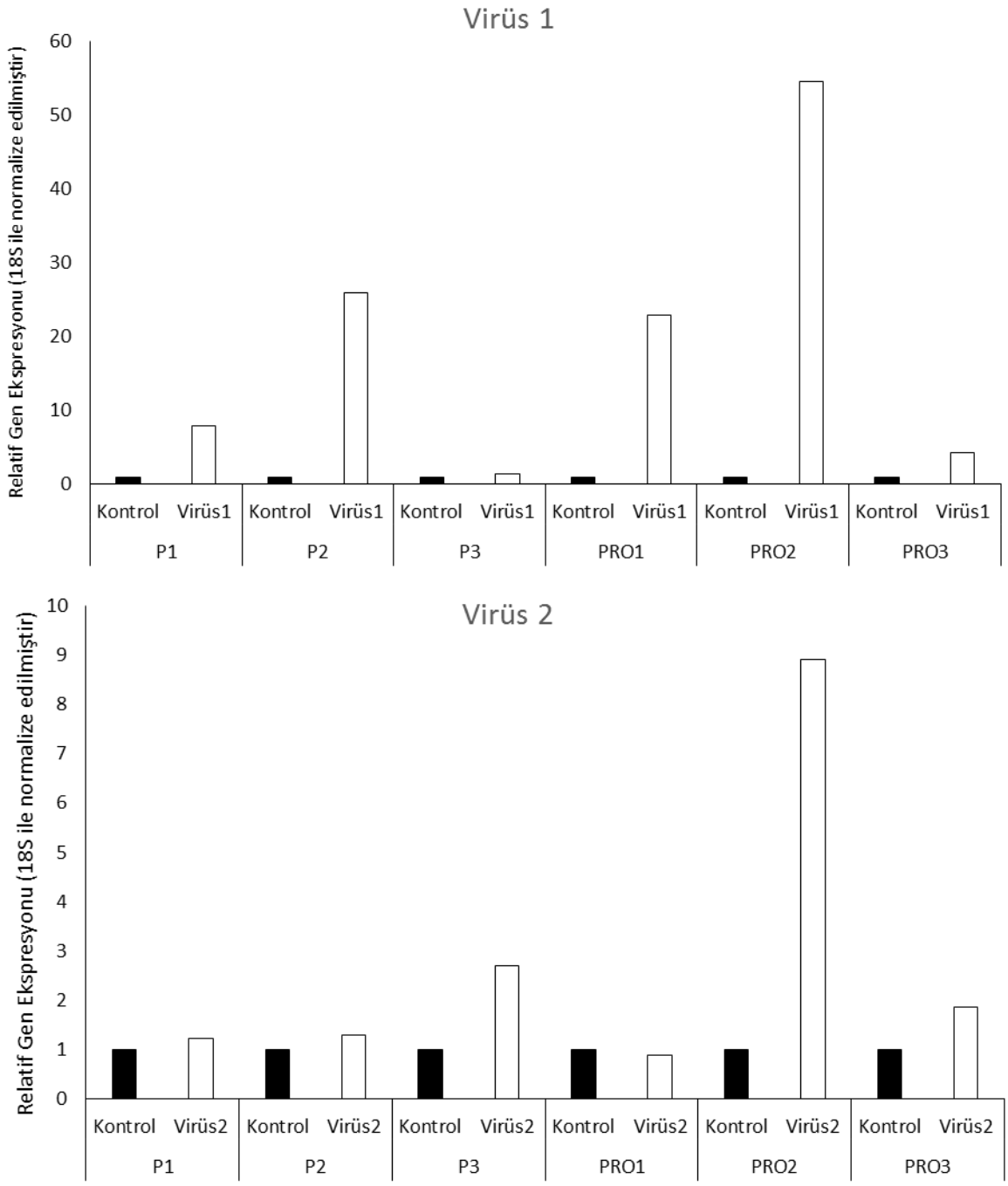
6. Substrat Tampon Çözeltisi (Substrat Buffer) pH:9.8

Diethanolamine……. 97 ml
NaN_3…….. 0,2 gr

97 ml Diethanolamine 1 litre saf su içerine ilave edildikten sonra 0,2 gr NaN_3 eklenmiş ve pH: 9.8'e ayarlanmıştır. Çözelti +4 ºC' de saklanmış ve kullanılmadan önce pH kontrol edilmiştir.

EK. 2

Virüs izolatlarının toplam RNA ve RNA'da taşıdığı spesifik proteini kodlayan kod protein (CP) kısmına ait dizayn edilen primer çiftleri ile yapılan gen ekspresyon çalışmasının relatif ekspresyon oranları, CT değerleri ve bu değerlere dair istatistiksel analizler Şekil 1, Çizelge 1 ve Çizelge 2' de verilmiştir.



Şekil 1. Kontrol ve virüs izolatını içeren iki farklı lale yaprak örneğinden dizayn edilen primerlere ait relatif gen ekspresyon değerleri.

Çizelge 1. Kontrol ve 2 adet virüs taşıdığı bilinen lale bitkisinden elde edilen yaprakların mRNA'lara ait CT değerlerinin, ortalama, standart hata ve % 95 güven aralığı değerleri.

		Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	% 95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
					Alt sınır	Üst Sınır		
P1	**Kontrol**	35.41	0.41	0.24	34.38	36.43	35.00	35.83
	Virüs1	33.24	0.60	0.35	31.75	34.72	32.84	33.92
P2	**Kontrol**	36.62	0.58	0.34	35.18	38.07	35.97	37.09
	Virüs	32.73	0.26	0.15	32.08	33.39	32.45	32.97
P3	**Kontrol**	34.95	0.34	0.19	34.12	35.79	34.58	35.24
	Virüs1	35.28	2.35	1.36	29.45	41.12	33.39	37.91
Pro1	**Kontrol**	41.69	2.38	1.38	35.78	47.61	39.36	44.12
	Virüs1	37.32	1.07	0.62	34.67	39.97	36.51	38.53
Pro2	**Kontrol**	41.69	0.44	0.25	40.60	42.78	41.23	42.10
	Virüs1	36.73	0.37	0.21	35.82	37.64	36.31	36.99
Pro3	**Kontrol**	37.44	0.22	0.13	36.89	38.00	37.19	37.60
	Virüs1	36.17	1.54	0.89	32.36	39.99	35.27	37.95
P1	**Kontrol**	36.00	0.41	0.23	35.00	37.01	35.61	36.42
	Virüs2	36.11	0.23	0.13	35.53	36.70	35.94	36.38
P2	**Kontrol**	37.20	0.62	0.36	35.67	38.74	36.53	37.73
	Virüs2	37.23	0.72	0.41	35.45	39.01	36.69	38.05
P3	**Kontrol**	36.25	0.31	0.18	35.47	37.02	35.90	36.50
	Virüs2	35.21	0.51	0.30	33.94	36.49	34.67	35.69
Pro1	**Kontrol**	40.95	3.42	1.97	32.46	49.44	37.29	44.05
	Virüs2	41.53	1.81	1.05	37.02	46.03	39.96	43.51
Pro2	**Kontrol**	41.22	0.46	0.27	40.07	42.37	40.72	41.64
	Virüs2	38.46	0.47	0.27	37.29	39.64	37.99	38.94
Pro3	**Kontrol**	38.78	0.23	0.13	38.21	39.36	38.53	38.98
	Virüs2	38.28	1.76	1.02	33.90	42.66	36.87	40.26

Çizelge 2. Kontrol ve lale yaprak örneklerinden elde edilen virüs izolatının sahip olduğu 6 adet primer çifti ile yapılan ekspresyon denemesinde Ct değerlerine ait varyans analiz çizelgesi.

		Virüs 1					Virüs 2				
		K.T	SD	KO	F	Sig.	K.T	SD	KO	F	Sig.
P1	Gruplar Arası	7.068	1	7.068	26.716	.007	.019	1	.019	.172	.699
	Grup İçi	1.058	4	.265			.437	4	.109		
	Toplam	8.126	5				.456	5			
P2	Gruplar Arası	22.668	1	22.668	111.140	.000	.001	1	.001	.003	.962
	Grup İçi	.816	4	.204			1.789	4	.447		
	Toplam	23.484	5				1.790	5			
P3	Gruplar Arası	.163	1	.163	.058	.822	1.602	1	1.602	8.876	.041
	Grup İçi	11.258	4	2.814			.722	4	.180		
	Toplam	11.421	5				2.324	5			
Pro1	Gruplar Arası	28.691	1	28.691	8.421	.044	.500	1	.500	.067	.809
	Grup İçi	13.628	4	3.407			29.936	4	7.484		
	Toplam	42.319	5				30.436	5			
Pro2	Gruplar Arası	36.944	1	36.944	226.904	.000	11.395	1	11.395	52.036	.002
	Grup İçi	.651	4	.163			.876	4	.219		
	Toplam	37.596	5				12.271	5			
Pro3	Gruplar Arası	2.421	1	2.421	2.008	.229	.378	1	.378	.239	.650
	Grup İçi	4.822	4	1.206			6.322	4	1.580		
	Toplam	7.243	5				6.700	5			