

Bazı fasulye genotiplerinin *Bean common mosaic virus* (BCMV) ve *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV)'a dayanıklılık durumlarının kalitatif, kantitatif ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi

İlyas DELİGÖZ¹

Miray ARLI SÖKMEN²

SUMMARY

Determination of resistance to *Bean common mosaic virus* (BCMV) and *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) in some common bean genotypes using qualitative, quantitative and molecular methods

In 2007, a total of five bean cultivars, two of which are commercial cultivars, and one breeding line were evaluated for presence of known resistance genes and resistance levels to BCMV and BCMNV using qualitative, quantitative and molecular methods. Five plants of each cultivars and breeding line were inoculated with NL-3 strain of BCMNV and NL-4 strain of BCMV, and all plants were evaluated for virus symptoms and vigor. Additionally, plants were tested by DAS-ELISA to evaluate the virus titer on non-inoculated trifoliolate leaves quantitatively. Also, two SCAR markers, SW-13 linked to the dominant *I* gene and SBD-5 for the recessive gene *bc-1*² were used to screen these genes in those cultivars by PCR. Results showed that cultivars Zulbiye and Ozeren Seker and 4F-3260 breeding line posses the dominant *I* gene which is responsible for resistance to BCMV, and Akdag has the recessive gene *bc-2*² which confers resistance to all known strains of BCMNV and BCMV except NL-4. Cultivars Ozeren Seker and Ozeren Barbunya occurred to possess the recessive gene *bc-1*² which is responsible for resistance to four strains of BCMV (NL-1, NL-7, US-2, NL-2) and NL-8 strain of BCMNV.

Key words: Common bean, BCMV, BCMNV, Resistance

ÖZET

2007 yılında ikisi tescilli olmak üzere beş fasulye çeşidi ve bir ıslah hattının BCMV ve BCMNV'ye karşı dayanıklılık düzeylerinin ve sahip oldukları dayanıklılık genlerinin

¹ Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun

² Ondokuzmayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Samsun
Sorumlu Yazar (Corresponding author) e-mail: ilyasdeligoz@yahoo.com
Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received): 16.04.2013

kalitatif, kantitatif ve genetik olarak belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla her çeşitten beş bitki, BCMNV NL-3 ırkı ve BCMV NL-4 ırkı ile inokule edilerek çeşitlerin dayanıklılık düzeyleri simptomatolojik olarak incelenmiştir. Buna ilave olarak, DAS-ELISA yöntemi ile çeşitlerdeki virüs enfeksiyon düzeyi kantitatif olarak da ortaya konmuştur. Ayrıca, dominant *I* genine spesifik SW-13 ve resesif *bc-1²* genine spesifik SBD-5 SCAR markörleri ile PCR yöntemi uygulanarak çeşitlerin söz konusu genleri bulundurma durumu moleküler olarak belirlenmiştir. Zülbiye ve Özeren Şeker çeşitlerinin ve 4F-3260 ıslah hattının BCMV'ye karşı dayanıklılıkta rol oynayan dominant *I* genine, Akdağ çeşidinin NL-4 hariç BCMV ve BCMNV'nin bilinen bütün ırklarına karşı dayanıklılığı sağlayan resesif *bc-2²* genine, Özeren Şeker ve Özeren Barbunya çeşitlerinin ise BCMV'nin dört (NL-1, NL-7, US-2, NL-2) ve BCMNV'nin NL-8 ırkına karşı dayanıklılığı sağlayan *bc-1²* genine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fasulye, BCMV, BCMNV, Dayanıklılık

GİRİŞ

Bean common mosaic potyvirus (BCMV) ve *Bean common mosaic necrosis potyvirus* (BCMNV) fasulye alanlarında yaygın olarak enfeksiyona neden olan ve % 80'e varan ürün kayıpları oluşturabilen önemli iki virüsdür. *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora*, *A. fabae* ve *Myzus persicae* gibi birçok yaprak biti türü ile non-persistent yolla, mekanik olarak bitki öz suyu ile, tarımsal ekipmanlarla, tohumla ve polenle taşınabilen bu virüsler aynı bölgede bulunabilmekte ve bazen de aynı bitkiyi enfekte edebilmektedir (Silbernagel et al. 2001).

BCMV ve BCMNV, fasulyede birbirine çok benzer simptomlar oluştururlar. Bu simptomlar mozayik, cüceleşme, yaprak kıvrıcılığı ve kloroz şeklindedir. Diğer bir simptom ise sistemik nekrozdur. Bu simptom *tepe nekrozu* (top necrosis) veya *siyah kök* (black root) olarak da adlandırılmaktadır (Cooper and Jones 1983). Tepe nekrozu hipersensitif reaksiyon sonucu vasküler nekrozun ilerlemesi ile oluşmakta ve bazen bitkinin ölümüne sebep olmaktadır. Eğer fasulye çeşidi dominant *I* genine sahipse bitkide *tepe nekrozu* simptomu oluşmaktadır. Dominant *I* genine sahip bitkiler BCMV ile enfekteli ise sistemik nekroz 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, BCMNV ile enfekteli ise bütün sıcaklıklarda oluşmaktadır (Kelly 1997). Bu yüzden *I* genine sahip bitkilerde 30°C sıcaklıkta BCMV ve BCMNV'nin simptomatolojik olarak ayrımı mümkün iken, *I* geni mevcut olmayan çeşitlerde iki virüsün ayrılması zor olmaktadır (Gilbertson et al. 2001).

Ali (1950) fasulyede BCMV'nin ırklarına karşı dayanıklılığı sağlayan dominant *I* genini belirlemiştir. Bu gen günümüzde BCMV ve BCMNV'ye karşı dayanıklılık ıslahında resesif *bc* genleri ile birlikte etkili olarak kullanılmaktadır. *I* geni dayanıklılık yanıtı oluşturmasının dışında BCMNV'nin tohumla taşınabilmesini de engelleme yeteneğine sahiptir (Kelly 1997). Ancak bitkide *I* geni tek başına, yani resesif *bc* genleri ile birlikte değilse BCMV'nin nekroza neden olan ırkları 30 °C üzerinde ve BCMNV'nin ırkları ise tüm sıcaklıklarda *I* geni dayanıklılığını kırarak bitkide hipersensitif reaksiyon sonucu sistemik öldürücü nekroza neden

olabilmektedir. Bu durum Korunmamış *I* Geni Dayanıklılığı olarak bilinmektedir (Drijfhout 1994).

Fasulyede, BCMV ve BCMNV dayanıklılığı ile ilgili diğer genler resesif *bc* genleridir ve bunlar ırka spesifik (strain specific) ve ırka spesifik olmayan (non-strain specific) şeklinde ayrılmaktadır (Coyne et al. 2003). Drijfhout (1978) fasulyede BCMV ve BCMNV'ye karşı dayanıklılıkta rol oynayan 6 resesif *bc* genini 4 ayrı lokusta tespit etmişlerdir. Bu lokuslardan *bc-1* ve *bc-2* lokusu çoklu allellere sahiptir. Resesif *bc* genleri içerisinde *bc-1*, *bc-1²*, *bc-2*, *bc-2²* ve *bc-3* virüs ırkına spesifiktir. *bc-u* geni ise virüs ırkına spesifik olmayan gendir ve *I* geninin olmaması durumunda diğer *bc*-genleri tarafından oluşturulan dayanıklılığın ortaya çıkmasından sorumludur. Dominant *I* geninin varlığında *bc-1*, *bc-1²* ve *bc-3* genleri, *bc-u* genine ihtiyaç duymaksızın dayanıklılığı sağlayabilmektedirler. Buna karşın *bc-2²* geninin dayanıklılık yanıtı oluşturabilmesi için dominant *I* geninin varlığında da mutlaka *bc-u* geninin bulunması gerekmektedir (Kelly 1997, Miklas et al. 2000, Silbernagel 1995).

Eğer bir çeşitte dominant *I* geni ırka spesifik *bc* genleri (*bc-1²*, *bc-2²*, *bc-3*) ile kombine edilirse bu durum Korunmuş *I* Geni Dayanıklılığı olarak adlandırılır (Coyne et al. 2003) ve böyle bir çeşitte BCMV'nin nekrotik ırkları sistemik nekroza neden olmazken, BCMNV'nin ırkları tarafından oluşturulan sistemik nekroz ya bir bölgede sınırlandırılır, ya geciktirilir ya da tamamen engellenir. Örneğin, BCMNV NL-3 ırkı ile inokule edilen *I+bc-1²* gen kombinasyonuna sahip fasulye çeşidinde inokule edilen yaprakta ortaya çıkan nekroz damarlar ile sınırlandırılırken, *I+bc-2²* gen kombinasyonuna sahip fasulye çeşidinde inokule edilen yapraklarda virüs sadece küçük lekeler şeklinde sınırlı kalır. *I+bc-3* genlerine sahip çeşitlerde ise nekrotik belirtiler oluşmaz (Kelly 1997).

Markör yardımıyla seleksiyon yöntemi virüs inokule edilmeksizin dayanıklılık genlerinin bitkilerde belirlenebilmesine olanak sağlayabilmesi nedeniyle günümüzde yoğun olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem virüs testlemeleri ile kombine edilerek, özellikle BCMV ve BCMNV'ye karşı uzun süreli dayanıklılığı sağlamak için gen piramidi oluşturma programlarında kolaylıklar sağlamaktadır (Melotto et al. 1996, Johnson et al. 1997, Kelly 1997, Strausbaugh et al. 1999, Miklas et al. 2000). Fasulye dayanıklılık genlerine spesifik bazı markörler çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Bunlardan *I* (Haley et al. 1994a, Melotto et al. 1996), *bc-3* (Haley et al. 1994b; Johnson and Gepts 1994, Miklas et al. 1996, Mukeshimana et al. 2005, Naderpour et al. 2010) ve *bc-1²* (Myers et al. 1996, Miklas et al. 2000, Vandemark and Miklas 2005) dayanıklılık genlerine spesifik moleküler markörler günümüzde BCMV ve BCMNV'ye dayanıklılık ıslahı çalışmalarında kullanılmaktadır.

Ülkemizde bugüne kadar fasulyede BCMV ve BCMNV'nin yaygınlık durumu ile ilgili çalışmalar yapılmış olmasına rağmen çeşit ve ıslah hatlarının dayanıklılığı ve moleküler markörlerin bitki dayanıklılığını belirlemede kullanım olanakları ile ilgili çalışmalar yapılmamıştır. Bu çalışmada, bazı fasulye genotiplerinin BCMV

ve BCMNV'ye dayanıklılık durumlarının kalitatif, kantitatif ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesi ve kullanılan yöntemlerin fasulyede dayanıklılık ıslahı programlarında kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

BCMV ve BCMNV ırkları

Çalışmada fasulye çeşitlerinin dayanıklılık durumlarını ve sahip oldukları dayanıklılık genlerini belirlemek için BCMV'nin NL-4 ırkı ve BCMNV'nin NL-3 ırkı kullanılmıştır. Bu ırklarla enfekteli tohumlar USDA-ARS (United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, ABD)'den temin edilmiştir.

Fasulye çeşit ve ıslah hatları

Dayanıklılık çalışmasında Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş Zülbiye ve Akdağ tescilli çeşitleri, yerel olarak yetiştirilen Seyfe Şekeri, Özeren Şekeri ve Özeren Barbunya çeşitleri ve 4F-3260 ıslah hattı kullanılmıştır. Ayrıca kontrol olarak BCMV ve BCMNV'ye hassas Dubbele Witte ve her iki virüse dayanıklı IVT 7233 çeşitleri kullanılmıştır. Kontrol olarak kullanılan çeşitler USDA/ARS, ABD'den temin edilmiştir.

Fasulye çeşitlerinin yetiştirilmesi ve virüs inokulasyonu

NL-3 ve NL-4 ırkları ile enfekteli olan tohumlar ekildikten sonra çimlenen bitkiler 2-6 haftalık olunca, simptom gösteren yapraklar kopartılarak 1gr yaprak/10 ml buffer olacak şekilde steril havanda fosfat tampon çözeltisi (% 1 K₂HPO₄, % 0.1 Na₂SO₃, pH: 7.5) içerisinde ekstrakte edilmiştir (Sengooba et al. 1997). Daha sonra 10 cm çapındaki saksılarda steril torf içinde 5 tekerrürlü olarak yetiştirilen çeşitlerin primer yaprakları ½- ¾ arası büyüklüğe ulaştığında yapraklara 500 mesh'lik karborandum tozu püskürtülerek tek kullanımlık plastik eldiven ile ırklar çeşitlere bulaştırılmıştır. Her çeşit için birer adet kontrol bitki bırakılmış ve bu bitkilere sadece tampon çözeltisi inokule edilmiştir. İnokulasyon yapılan yapraklar çeşme suyu altında yıkanarak 22°C ±1 ve 12 saatlik fotoperiyoda ayarlı iklim odasına yerleştirilmiştir (Drijfhout et al. 1978).

Oluşan simptom tiplerine göre çeşitlerin dayanıklılık düzeylerinin ve dayanıklılık genlerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerine virüs inokulasyonu yapıldıktan sonra bitkilerin gösterdiği simptomlar günlük olarak 21 gün boyunca gözlemlenmiş ve oluşan simptom tipleri kayıt edilmiştir. İnokulasyon sonrası sistemik enfeksiyon gösteren çeşitler hassas (S), sistemik enfeksiyon göstermeyen çeşitler ise dayanıklı (R) olarak kabul edilmiştir. Ayrıca simptomlar Kelly (1997) ve Drijfhout et al. (1978)'a göre (Çizelge 1) değerlendirilerek çeşitlerin sahip olduğu dayanıklılık genleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 1. Farklı Fasulye Genotiplerinin BCMNV NL-3 ve BCMV NL-4 Irkları ile Inokulasyonu Sonrası Oluşturması Beklenen Reaksiyonları ve Belirtileri (Kelly 1997, Drijfhout et al. 1978)

Bitki Genotipi	BCMNV NL3	BCMV-NL-4
<i>i</i>	Hassas – sistemik mozayik	Hassas - Sistemik mozayik
<i>I</i>	Hassas - sistemik nekroz	Dayanıklı - reaksiyon yok
<i>i+ bc-u+bc-I²</i>	Hassas - hafif mozayik	Hassas - Sistemik mozayik
<i>I+bc-I²</i>	Dayanıklı - damar nekrozu	Dayanıklı - reaksiyon yok
<i>i+bc-u+bc-2²</i>	Dayanıklı - reaksiyon yok	Hassas - Sistemik mozayik
<i>I+ bc-u+ bc-2²</i>	Dayanıklı - nekrotik lokal lezyon	Dayanıklı - reaksiyon yok
<i>i+bc-u+ bc-3</i>	Dayanıklı - reaksiyon yok	Dayanıklı - reaksiyon yok
<i>I+ bc-3</i>	Dayanıklı - reaksiyon yok	Dayanıklı - reaksiyon yok

DAS-ELISA ile dayanıklılığın belirlenmesi

İnokule edilmiş ve kontrol olarak ayrılan bitkiler hem virüs ile sistemik olarak enfekteli olup olmadıklarının ortaya konulması, hem de bitkideki virüs konsantrasyonunun belirlenmesi için ELISA testine tabi tutulmuşlardır. DAS-ELISA testi için virüs inokule edilen yaprağın üst kısmındaki üçlü yapraklardan örnekler alınmıştır. ELISA testi BCMV ve BCMNV'ye spesifik antiserumlar kullanılarak Clark and Adams (1977)'a ve antiserumların temin edildiği firmaların önerilerine göre uygulanmıştır. Sonuçlar, ELISA mikropleyt okuyucusunda 405 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin alınmasıyla elde edilmiştir. Beş tekerrürlü olarak yürütülen çalışmada tekerrürler arasında en yüksek absorbans değeri veren bitki baz alınmış, 0.2 ve altında absorbans değeri veren çeşitler dayanıklı olarak kabul edilmiştir (Strausbaugh et al. 2003b).

Moleküler markörler yardımıyla çeşitlerdeki dayanıklılık genlerinin araştırılması

Çalışmada kullanılan fasulye çeşitleri dominant *I* geni ve resesif *bc-I²* geninin var olup olmadığının belirlenmesi amacıyla bu genlere spesifik markörler olan SCAR markör SW-13 ve SBD-5 kullanılarak PCR yöntemiyle analiz edilmiştir.

Fasulye çeşitlerinden DNA ekstraksiyonu

Fasulye çeşitlerinden DNA'lar DNeasy DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) protokolüne göre ekstrakte edilmiştir. DNA örnekleri PCR çalışması yapıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Fasulye çeşitlerinden elde edilen genomik DNA'larda *I* geninin varlığı SCAR markör SW-13 ve *bc-I²* geninin varlığı ise SCAR markör SBD-5 kullanılarak, PCR yöntemi ile tespit edilmeye çalışılmıştır.

Primerler SW-13: (Forward Primer: CACAGCGACATTAATTTTCCTTTC, Reverse Primer: CACAGCGACGAGGAGCTTATTA) (Melotto et al. 1996) ve

SBD-5: (Forward primer: GTGCGGGAGAGGCCATCCATTGGTG, Reverse Primer: GTGCGGAGAGTTTCAGTGTTGACA) (Miklas et al. 2000) Iontek (İstanbul) firması tarafından sentezlenmiştir.

PCR reaksiyonu 5 µl 5xPCR buffer colorless (Promega, ABD), 2µl 10mM dNTPs, her bir primerden (25 µM) 0.25 µl, 0.12µl Taq DNA polimeraz (Go Taq® DNA polimeraz enzimi 5u/µl), 5µl 25mM MgCl₂ ve 0.5 µl DNA (50ng toplam DNA)'dan oluşmuştur. Toplam reaksiyon hacmi RNase ve DNase içermeyen su ile Amplifikasyonlar Bio-Rad MJ Mini PCR Thermocyclers'de, 94°C'de 2dk., 34 döngü olacak şekilde 94°C'de 10s., 66°C'de 40s., 72°C'de 2dk. ve 1 döngü 72°C'de 5 dakika ile tamamlanmıştır (Strausbaugh et al. 2003a).

Agaroz jel elektroforez

PCR sonrası oluşan DNA fragmentlerinin analizi için 10µl PCR ürününe 2µl yükleme tamponu [%15 ficoll 400, %0.03 bromophenol blue, %0.03 xylene cyanol FF, % 0.4 orange G, 10 Mm Tris-HCl (pH: 7.5] ve 50mM EDTA) ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler TBE tampon çözeltisinde (89mM Tris, 89mM borik asit ve 2 mM EDTA) hazırlanan %1'lik agaroz jelde (0,5µg/ml etidium bromür içeren) 80mA sürekli akımda 2 saat süre ile elektroforeze tabi tutulmuştur. Jeldeki PCR fragmentlerinin analizi GelDoc 2000 (Biorad, ABD) jel görüntüleme sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve jelde oluşan bantların fotoğrafları çekilmiştir (Strausbaugh et al. 2003a).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5 fasulye çeşidi ve 1 ıslah hattı ile yürütülen çalışmada çeşitlerin dayanıklılık düzeyleri ve sahip olduğu genler simptomatolojik, ELISA ve PCR yöntemleri ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan çeşitler 5 tekerrürlü olacak şekilde dayanıklılık çalışmalarında yaygın olarak kullanılan BCMNV NL-3 ve BCMV NL-4 ırkları ile inokule edilmiştir. Oluşan reaksiyonlara göre çeşitlerin dayanıklılık durumları ve sahip olabilecekleri dayanıklılık genleri belirlenmiştir (Çizelge 2).

Ayrıca BCMNV NL-3 ırkı ve BCMV NL-4 ile inokule edilen fasulye çeşitlerine ait bitkiler inokulasyondan 21 gün sonra DAS-ELISA ile test edilmiştir. Test sonucunda çeşitlerde elde edilen maximum absorbans değerleri Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 2. BCMNV NL-3 ve BCMV NL-4 Irkı ile İnokule Edilen Fasulye Çeşitlerinin Reaksiyonları, Oluşturduğu Belirtiler ve Dayanıklılık Genleri

Çeşitler	BCMNV NL-3			BCMV NL-4			Genler
	Reaksiyon	Belirtiler		Reaksiyon	Belirtiler		
		İnokule Edilen Yaprak	Tüm Bitki		İnokule Edilen Yaprak	Tüm Bitki	
Zülbiye	S*	Dn, Nl	Sn	R	Sy	Sy	<i>I</i>
Özeren Şeker	S	Dn, Nl	Sn	R	Sy	Sy	<i>I</i>
4F3260	S	Dn, Nl	Sn	R	Sy	Sy	<i>I</i>
Akdağ	R	Sy	Sy	S	Sy	M, Nl, Kh	<i>bc-2</i> ²
Özeren Barbunya	S	Sy	Hm, Db	S	Sy	Hm, Db	<i>bc-1</i> ²
Seyfe Şekeri	S	Sy	Hm, Yk	S	Sy	M, Yk	<i>bc-1</i> ²
Dubbele Witte	S	Sy	Şm, Yk	S	Sy	Şm, Yk	-
IVT 7233	R	Sy	Sy	R	Sy	Sy	<i>I, bc3</i>

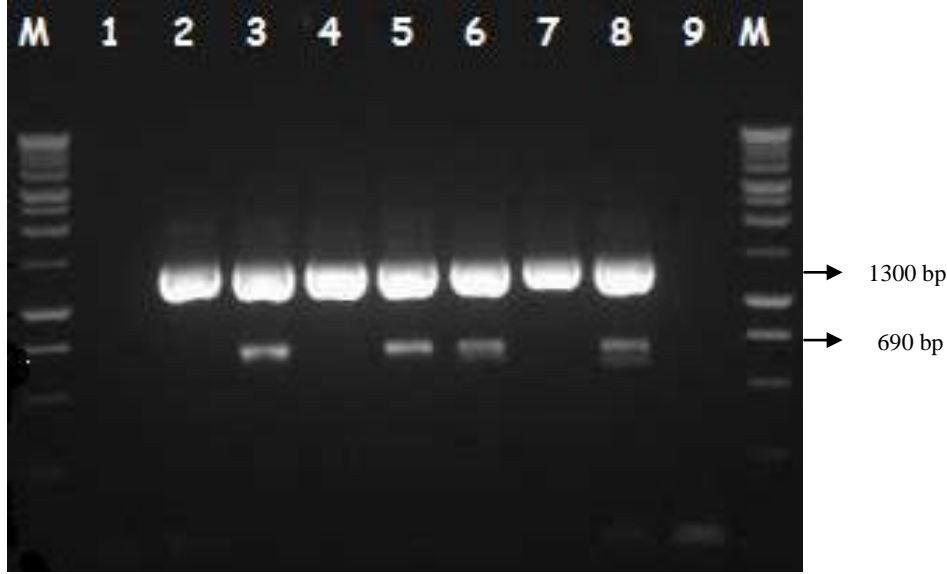
*S: Hassas, R: Dayanıklı, Sy: Simptom yok, Dn: damar nekrozu, Nl: nekrotik lekeler, M: mozaik, Hm: hafif derecede mozaik, Şm: şiddetli derecede mozaik, Db: damar bantlaşması, Yk: yaprak kıvrılması, Kh: Klorotik halkalı lekeler, Sn: sistemik nekroz

Çizelge 3. BCMNV NL-3 ve BCMV NL-4 Irkı ile İnokule Edilen Fasulye Çeşitlerinin DAS-ELISA Sonuçlarına Göre Dayanıklılık Durumları

Çeşitler	BCMNV NL-3		BCMV NL-4	
	*A405	Değerlendirme	A405	Değerlendirme
Zülbiye	0.4	S	0.13	R
Özeren Şeker	0.17	R	0.15	R
4F3260	-	-	0.18	R
Akdağ	0.11	R	1.75	S
Özeren Barbunya	1.68	S	2	S
Seyfe Şekeri	2.15	S	1.3	S
IVT 7233 (kontrol-dayanıklı)	0.12	R	0.12	R
Dubbele Witte (kontrol-hassas)	2.6	S	2.5	S

*A405: Absorbans değeri (405 nm), R: dayanıklı (absorbans değeri ≤ 0.2), S: hassas (absorbans değeri >0.2), -: Bitkilerin 21. günden önce ölmeleri nedeniyle ELISA ile test edilememiştir.

Son olarak çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerinde dominant *I* geni ve resesif *bc-1*² geninin var olup olmadığı bu genlere spesifik markörler (sırasıyla SCAR markör SW-13 ve SBD-5) kullanılarak multipleks PCR yöntemi ile araştırılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. *I* geni ile bağlı SCAR markör SW-13 (690 bp) ve *bc-I²* geni ile bağlı SCAR markör SBD-5 (1300 bp) kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri. M: markör, 1: DNA içermeyen örnek, 2: Özeren Barbunya, 3: Özeren Şeker, 4: Seyfe Şekeri, 5: 4F-3260, 6: Zülbiye, 7: Akdağ, 8: Amanda (Kontrol: *I+bc-I²*), 9: Dubbele Witte (Kontrol: dayanıklılık geni yok).

Zülbiye, Özeren Şeker çeşidi ve 4F-3260 ıslah hattına ait bitkiler BCMV NL-4 ırkına karşı herhangi bir simptom oluşturmamaları nedeniyle dayanıklı, BCMNV NL-3 ırkına karşı ise sistemik nekroz yanıtı oluşturarak ölmeleri nedeniyle hassas bulunmuşlardır. Bu reaksiyonlar Zülbiye, Özeren Şeker çeşidi ve 4F-3260 ıslah hattının dominant *I* genine sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 2). Drijfhout (1978) ve Kelly (1997) tek başına (resesif genlerle korunmamış) dominant *I* geni taşıyan fasulye çeşitlerinin NL-3 ırkına karşı sistemik nekroz reaksiyonu verdiğini, NL-4 ırkına karşı ise dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Ogliari and Castano (1992), 72 fasulye ıslah hattını NL-3 ve NL-4 ırkı ile test etmişler ve 67 hattın NL-3'e karşı sistemik nekroz reaksiyonu verdiğini ve bu hatların dominant *I* genine sahip olduğunu belirlemişlerdir. NL-4 ırkı ile inokule edilen Zülbiye, Özeren Şeker çeşidi ve 4F-3260 ıslah hattına ait bitkilere uygulanan ELISA testi sonucunda absorbans değeri 0.2'nin altında (sırasıyla 0.13, 0.15 ve 0.18) elde edilmiş ve bu iki çeşit ve ıslah hattının NL-4 ırkına dayanıklı olduğu serolojik olarak da teyid edilmiştir (Çizelge 3.). NL-3 ırkı ile inokule edilen Zülbiye çeşidine ait iki bitki ve Özeren Şeker çeşidine ait bitkilere 21. günün sonunda ELISA yapılmış ve absorbans değerleri Zülbiye çeşidinde 0.4 (hassas), Özeren Şeker çeşidinde ise 0.17 (dayanıklı) elde edilmiştir. NL-3 ırkı inokulasyonu sonrası Zülbiye çeşidinin fenotipik sonuçları ile ELISA testi sonuçları birbirine paralel olmasına rağmen, Özeren Şeker çeşidinin fenotipik sonuçları ile ELISA sonuçları birbirine paralellik göstermemiştir. Bu çeşit fenotipik olarak hassas, ELISA sonucunda ise dayanıklı

olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 2 ve 3). Özeren Şeker çeşidinin ELISA sonucunun eşğin hemen altında (0,17) dayanıklı olarak çıkmasına rağmen bitkilerin ölmesi çeşitteki *I* genin hipersensitif reaksiyonu tetikleyerek dayanıklılık yanıtını oluşturduğunu ve virüs çoğalmasını sınırladığını fakat hücre ölümlerinin devam ettiğini göstermektedir. Kelly (1997), Strausbaugh et al. (2003a) ve Larsen et al. (2005) benzer bir şekilde BCMNV NL-3 ırkının *I* geni içeren çeşitlerde sistemik nekroz nedeni ile ölümlere neden olduğunu kendi çalışmalarında ortaya koymuşlardır. Bir bitki genotipinde dominant genlerin eşlik ettiği dayanıklılık yanıtlarında bitkinin hipersensitif reaksiyonu sonucu nekrotik belirtiler ortaya çıkabilmekte ve bazen gen dozajının yetersizliği nedeni ile programlanmış hücre ölümlerinin önlenememesi dolayısıyla bitki ölümleri görülebilmektedir (Collmer et al. 2000).

Simptomatolojik olarak Zülbiye, Özeren Şeker çeşitleri ve 4F-3260 ıslah hattının korunmuş *I* genine (*I+bc-1²*) sahip olmadığı belirlenmesine rağmen (Çizelge 2), markör çalışması sonuçları Zülbiye, Özeren Şeker çeşidi ve 4F-3260 ıslah hattının dominant *I* geninin dışında *bc-1²* genini de taşıdığını göstermiştir (Şekil 1). Strausbaugh et al. (2003a) bu çalışma sonuçlarına benzer bir şekilde yaptıkları bir çalışmada, Brasil-2 çeşidinin markör sonuçlarına göre *I* ve *bc-1²* genini taşıdığını belirlemelerine rağmen, Brasil-2 çeşidinin fenotipik olarak NL-3 ırkına karşı tek başına *I* geni dayanıklılığı reaksiyonu (sistemik nekroz) verdiğini belirlemişlerdir. Benzer bir şekilde Miklas et al. (2000), markör sonuçlarının bazı böbrek (kidney) ve çalı (cranberry) tipi fasulye hatlarında *I* ve *bc-1²* genlerinin var olduğunu göstermelerine rağmen, bu hatların NL-3 ırkına karşı korunmamış *I* geni dayanıklılığı reaksiyonu (sistemik nekroz) verdiğini ve bu nedenle *bc-1²* genine spesifik SCAR markör SBD-5'in böbrek (kidney) ve çalı (cranberry) tipi fasulye çeşitlerinde kullanımının sınırlı olduğunu bildirmişlerdir.

Akdağ çeşidi diğer çeşitlerden farklı olarak BCMNV NL-3 ırkına karşı dayanıklılık reaksiyonu gösteren tek çeşit olarak belirlenmiş ve bu çeşitte NL-3 ırkı herhangi bir belirti oluşturmamıştır. Akdağ çeşidi BCMV NL-4 ırkına karşı ise hassas reaksiyon göstermiştir. Akdağ çeşidinin NL-3 ırkına karşı herhangi bir belirti göstermeyerek dayanıklı olması, NL-4 ırkına karşı ise hassas olması bu çeşidin resesif *bc-2²* genine sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 2). Drijfhout (1978) ve Kelly (1997), bir fasulye çeşidinin BCMNV'nin NL-3 ırkına karşı dayanıklı, BCMV'nin NL-4 ırkına karşı ise hassas reaksiyon göstermesi durumunda çeşitte resesif *bc-2²* geninin var olduğuna karar verilebileceğini bildirmişlerdir. NL-3 ırkı ile inokule edilen Akdağ çeşidine uygulanan ELISA sonucunda absorbans değeri 0.2'nin altında (0,11), NL-4 ırkı ile inokule edilen Akdağ çeşitlerine yapılan ELISA sonucunda absorbans değeri 0.2'nin üzerinde (1,75) elde edilmiş ve Akdağ çeşidinin NL-4 ırkına hassas, NL-3 ırkına karşı ise dayanıklı olduğu ELISA ile de teyid edilmiştir (Çizelge 3.). Markör sonuçları Akdağ çeşidinde *bc-2²* geninin haricinde *bc-1²* geninin de var olduğunu göstermiştir (Şekil 1.). Akdağ çeşidinde bulunan *bc-2²* geninin *bc-1²* genine epistatik etkisinin olması nedeni ile çeşidin *bc-1²* genine sahip olup olmadığı simptomatolojik olarak belirlenememiştir. Kelly

(1997), BCMNV NL-3 ırkı ile *bc-2²* geni taşıyan fasulye çeşitlerine inokulasyon yapıldığında, *bc-2²* genininin *bc-1²* genine epistatik etkisi olduğunu ve *bc-1²* geninin var olup olmadığının yalnızca moleküler markör yardımı ve test melezlemeleri yapılarak belirlenebileceğini bildirmiştir. Akdağ çeşidinin böbrek tipi fasulye olması ve Miklas et al. (2000) tarafından *bc-1²* genine spesifik SCAR markör SBD-5'in böbrek tipi fasulye çeşitlerinde kullanımının güvenilir sonuçlar vermediğinin bildirilmesi, moleküler markör sonuçlarına bakılarak Akdağ çeşidinin *bc-1²* genini taşıdığına karar verilemeyeceğini göstermiştir. Markör sonuçlarına göre Akdağ çeşidinde var olduğu düşünülen *bc-1²* geninin, gerçekten var olup olmadığının test melezlemeleri yapılarak araştırılması gerekmektedir.

Özeren Barbunya çeşidi BCMNV NL-3 ve BCMV NL-4 ırklarının her ikisine karşı hassas reaksiyon göstermiştir. Özeren Barbunya çeşidi her iki ırkla yapılan inokulasyonlarda da benzer bir şekilde yapraklarda hafif mozayik ve damar bantlaşması şeklinde belirtiler oluşturmuştur. Seyfe Şekeri çeşidi de Özeren Barbunya çeşidine benzer bir şekilde NL-3 ve NL-4 ırklarının her ikisine karşı hassas reaksiyon göstermiştir. Seyfe Şekeri çeşidi NL-3 ve NL-4 ırkı ile inokulasyon sonrası yapraklarda hafif mozayik ve kıvrılmalar şeklinde belirtiler oluşturmuştur (Çizelge 2). NL-3 ırkı ile inokule edilen Özeren Barbunya ve Seyfe Şekeri çeşitlerine yapılan ELISA sonucunda absorbans değerleri benzer bir şekilde 0.2'nin üzerinde (sırasıyla 1.68 ve 2.15) elde edilmiş ve bu çeşitlerin NL-3 ırkına karşı hassas oldukları ELISA ile de saptanmıştır. NL-4 ırkı ile inokule edilen Özeren Barbunya ve Seyfe Şekeri çeşitlerine yapılan ELISA sonucunda ise absorbans değerleri benzer bir şekilde 0.2'nin üzerinde (sırasıyla 2 ve 1,3) elde edilmiş ve her iki çeşidin de NL-4 ırkına karşı hassas oldukları ELISA ile de teyid edilmiştir (Çizelge 3). Özeren Barbunya ve Seyfe Şekeri çeşitlerinin NL-3 ırkına karşı yapraklarda hafif mozayik şeklinde belirtiler oluşturması bu çeşitlerin *bc-1²* genine sahip olabileceğini göstermektedir. Kelly (1997), NL-3 ırkının *bc-1²* genine sahip çeşitlerde yapraklarda hafif mozayik şeklinde belirtiler oluşturduğunu belirlemiştir. Markör sonuçlarına göre her iki çeşitte de *bc-1²* genine spesifik SBD-5 markörünün tespit edilmesi (Şekil 1), Özeren Barbunya ve Seyfe Şekeri çeşitlerinin *bc-1²* genine sahip olduğunu göstermiştir.

Çalışma sonucunda Kelly (1997) tarafından önerilen, BCMV'nin NL-4 ve BCMNV'nin NL-3 ırkları kullanılarak inokulasyon yapılan fasulye genotiplerindeki dayanıklılık genlerinin belirlenebildiği, özellikle sistemik nekroz belirtisi gösteren bitkilerde tek başına ELISA sonuçları kullanılarak dayanıklılığın değerlendirilmesinin yanıltıcı sonuçlar verebileceği ortaya konulmuştur. Çalışmada kullanılan moleküler markörlerden ise SCAR markör SBD-5'in *bc-1²* genini belirlemede fenotiple uyuşmayan hatalı sonuçlar verdiği, SCAR markör SW-13'ün ise dominant *I* genini belirlemede feneotiple uyumlu sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bu nedenle SW-13 markörü fasulye ıslah çalışmalarında *I* geninin seleksiyonu için güvenli bir şekilde kullanılabilir.

Ayrıca bu çalışmada kullanılan 5 fasulye çeşidi ve 1 ıslah hattının BCMV ve BCMNV'ye karşı dayanıklılıkta rol oynayan bazı genlere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar ülkemizde bulunan diğer kuru ve taze olarak tüketilen yerel fasulye populasyonlarında ve tescilli fasulye çeşitlerinde de dayanıklılık genlerinin var olabileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle ülkemizde tescil edilmiş ticari fasulye çeşitlerinde ve yerel fasulye çeşitlerinde BCMV ve BCMNV'ye dayanıklılığı sağlayan genlerin var olup olmadığının daha kapsamlı bir çalışma ile araştırılması gerekmektedir.

Bizim bilgilerimize göre bu çalışma Türkiye'de fasulye genotiplerinde BCMV ve BCMNV'ye karşı dayanıklılıktan sorumlu olan genlerin belirlendiği ilk çalışmadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü ve Ondokuzmayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ali M.A. 1950. Genetics of resistance to the common bean mosaic virus in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology* 40:69-79.
- Clark M.R. and Adams A. M. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J.General Virology*, 34:475-483.
- Collmer C.W. Marston M.F. Taylor J.C. Jahn M.M. 2000. The *I* gene of bean: a dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance, or spreading vascular necrosis in response to the potyvirus *Bean common mosaic virus*. *Molecular. Plant-Microbe Interactions*. 13:1266–1270.
- Cooper L.I. and Jones A.T. 1983. Responses of plants to viruses: Proposals for the use of terms. *Phytopathology* 73, 127-128.
- Coyne D.P. Steadman J.R. Godoy-Lutz G. Gilbertson R. Arnaud-Santana E. Beaver J.S. and Myers J.R. 2003. Contributions of the Bean/Cowpea CRSP to management of bean diseases. *Field Crops Research*, 82: 155-168.
- Drijfhout E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Doctoral thesis. Wageningen Agric. Res. Rep. 872.
- Drijfhout, E. Silbernagel M.J. and Burke D.W. 1978. Differentiation of strains of *Bean common mosaic virus*. *Neth. J. Plant Pathol.*, 84: 13-26.
- Drijfhout E. 1994. *Bean common mosaic virus* (In: compendium of bean diseases, Second Edition. Ed: R. Hall). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Gilbertson R.L. Guzman P. Rojas M. Crnov R. and Mkandawire A. 2001. Detection of bean-infecting viruses in California with an emphasis on the CRSP-facilitated work.

- Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program-East Africa Proceedings: Bean Seed Workshop Arusha, Tanzania. pp. 4.
- Haley S.D. Afanador L. and Kelly J.D. 1994a. Identification and application of random amplified polymorphic DNA marker for the *I* gene (potyvirus resistance) in common bean. *Phytopathology* 84, 157-160.
- Haley S.D. Afanador L.K. and Kelly J.D. 1994b. Selection for monogenic resistance traits with coupling and repulsion phase RAPD markers. *Crop Science* 34, 1061-1066.
- Johnson W.C. and Gepts P. 1994. Two molecular markers linked to *bc-3*. *Bean Improvement Cooperative Annual Report* 37, 206-207.
- Johnson W.C. Guzman P. Mandala D. Mkandawire A.B.C. Temple S. Gilbertson R.L. and Gepts P. 1997. Molecular tagging of the *bc-3* gene for introgression into Andean common bean. *Crop Sci.* 37: 248-254.
- Kelly J.D. 1997. A review of varietal response to *Bean common mosaic potyvirus* in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Var. Seeds*, 10: 1-6.
- Larsen R.C. Miklas P.N. Druffel K.L. and Wyatt S.D. 2005. NL3-K strain is a stable and naturally occurring interspecific recombinant derived from bean common mosaic necrosis virus and bean common mosaic virus. *Phytopathology*. Vol: 95. No. 9 1037-1042.
- Melotto M. Afanador L. and Kelly J.D. 1996. Development of SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. *Genome* 39, 1216-1219.
- Miklas P.N. Afanador L. and Kelly J.D. 1996. Recombination facilitated RAPD marker assisted selection for disease resistance in common bean. *Crop Science* 36, 86-90.
- Miklas P. N. Larsen R.C. Riley R. and Kelly J. D. 2000. Potential marker-assisted selection for *bc-1²* resistance to *Bean common mosaic potyvirus* in common bean. *Euphytica*, 116 (3): 211-219.
- Mukeshimana G. Paneda A. Rodriguez-Suarez C. Ferreria J.J. Giraldez R. and Kelly J.D. 2005. Markers linked to the *bc-3* gene conditioning resistance to bean common mosaic potyviruses in common bean. *Euphytica*. 144: 291-299.
- Myers J.R. Strausbaugh C.A. Forster R.L. and McClean P.E. 1996. Resistance and tolerance to bean common mosaic virus (BCMV) and bean common mosaic necrosis virus (BCMNV) in bean. *Bean Improvement Cooperative Annual Report* 39, 94-95.
- Naderpour M. Lund O.S. Larsen R. Johansen E. 2010. Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele. *Molecular Plant Pathology* 11:255-263.
- Ogliari J.B. and Castano M. 1992. Identification of Resistant Germplasm to the *Bean common mosaic virus*-BCMV. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 27(7) :1043-1047.
- Sengooba T.N. Spence N.F. Walket D.G.A. Allen D.J. and Femi-Lana A. 1997. The occurrence of bean common mosaic necrosis virus in wild and forage legumes in Uganda. *Plant Pathology*. 46, 95-103.
- Silbernagel M.J. 1995. Bean germplasm releases. *Annu.Rep. Bean Improv. Coop.* 38: 177.

- Silbernagel M.J. Mink G.I. Zhao R.L. and Zheng G.Y. 2001. Phenotypic recombination between *bean common mosaic* and *bean common mosaic necrosis* potyviruses in vivo. *Archives of Virology* 146: 1007-1020.
- Strausbaugh C.A. Myers J.R. Forster R.L. and McClean P.E. 1999. Bc-1 and bc-u two loci controlling bean common mosaic virus resistance in common bean are linked. *J.Am.Soc. Hortic. Sci.* 124: 644-648.
- Strausbaugh C.A. Miklas P.N. Singh S.P. Myers J.R. and Forster R.L. 2003a. Genetic charecterisation of differential reactions among host group 3 common bean cultivars to NL-3 K strain of *Bean common mosaic necrosis virus*. *Phytopathology*, 93: 683-690.
- Strausbaugh C.A. Myers J.R. Forster R.L. and McClean P.E. 2003b. A quantitative method to screen common bean plants for resistance to *Bean common mosaic necrosis virus*. *Phytopathology*, 93: 1430-1436.
- Vandemark G. J. Miklas P. N. 2005. Genotyping common bean for the potyvirus resistance alleles *I* and *bc-12* with a multiplex real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 95:499-505.