



Araştırma Makalesi

## Ülkemizde Yetiştirilen Bazı Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Çeşitlerinin BCMV ve BCMNV'e Karşı Dayanıklılık Kaynaklarının Belirlenmesi

Gülsüm Palacıoğlu<sup>1</sup>, İzel Şanlı<sup>1</sup>, Harun Bayraktar<sup>1\*</sup>, Göksele Özer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara

<sup>2</sup>Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bolu

Geliş tarihi (Received): 08.06.2020

Kabul tarihi (Accepted): 11.08.2020

### Anahtar kelimeler:

BCMV, BCMNV, dayanıklılık, fasulye üretim alanlarında yaygın olarak görülen ve önemli verim kayıplarına neden olan hastalık etmenleridir. Bu hastalık etmenlerine karşı en etkili ve pratik mücadele yöntemi ise dayanıklı çeşit kullanılmasıdır. Bu kapsamda dünyada bu etmenlere karşı dayanıklılıkla ilişkili çok sayıda gen ve bunlarla ilişkili moleküler markör tespit edilmiş olup ıslah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 39 adet fasulye çeşidinin BCMV ve BCMNV hastalıklarına karşı dayanıklılık kaynakları farklı moleküler markörler (SW-13, SBD-5, ROC11, eIFE4) kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar test edilen fasulye genotiplerinden 11 adedinin tek bir dayanıklılık geni içerdiğini göstermiştir. Ayrıca farklı dayanıklılık gen kombinasyonları bakımından 25 fasulye çeşidinde  $I+bc-1^2$  genlerinin bulunduğu görülmüştür. Fransız, Karabacak ve 40 Günlük fasulye çeşitlerinde ise dayanıklılığın  $bc-1^2$  ve  $bc-3$  genleri ile kontrol edildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışma ile tespit edilen dayanıklılık genlerinin söz konusu hastalıklara karşı dayanıklı ıslah materyallerinin geliştirilmesinde önemli birer dayanıklılık kaynağı olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

**Özet.** *Bean common mosaic virus* (BCMV) ve *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) dünyada BCMV, BCMNV, dayanıklılık, fasulye üretim alanlarında yaygın olarak görülen ve önemli verim kayıplarına neden olan hastalık etmenleridir. Bu hastalık etmenlerine karşı en etkili ve pratik mücadele yöntemi ise dayanıklı çeşit kullanılmasıdır. Bu kapsamda dünyada bu etmenlere karşı dayanıklılıkla ilişkili çok sayıda gen ve bunlarla ilişkili moleküler markör tespit edilmiş olup ıslah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 39 adet fasulye çeşidinin BCMV ve BCMNV hastalıklarına karşı dayanıklılık kaynakları farklı moleküler markörler (SW-13, SBD-5, ROC11, eIFE4) kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar test edilen fasulye genotiplerinden 11 adedinin tek bir dayanıklılık geni içerdiğini göstermiştir. Ayrıca farklı dayanıklılık gen kombinasyonları bakımından 25 fasulye çeşidinde  $I+bc-1^2$  genlerinin bulunduğu görülmüştür. Fransız, Karabacak ve 40 Günlük fasulye çeşitlerinde ise dayanıklılığın  $bc-1^2$  ve  $bc-3$  genleri ile kontrol edildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışma ile tespit edilen dayanıklılık genlerinin söz konusu hastalıklara karşı dayanıklı ıslah materyallerinin geliştirilmesinde önemli birer dayanıklılık kaynağı olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

### \*Sorumlu yazar

bayrakta@agri.ankara.edu.tr

## Determination of Resistance Sources to BCMV and BCMNV in Some Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars Grown in Turkey

### Keywords:

BCMV, BCMNV, common bean, are the common plant pathogens that cause significant yield losses in bean growing areas worldwide. The most effective and practical control method is to use of resistant common bean cultivars to BCMV and BCMNV. Many genes and molecular markers associated with resistance to these pathogens have been identified and used widely in breeding studies in the world. This study evaluated the presence of resistance sources in 39 common bean cultivars, widely grown in Turkey to BCMV and BCMNV with different molecular markers (SW-13, SBD-5, ROC11, eIFE4). Eleven common bean cultivars contained only one resistance gene. Also, the cultivars were evaluated for resistance gene combinations to these pathogens; twenty-five cultivars possessed gene combination of  $I+bc-1^2$ . Resistance in Fransız, Karabacak and 40 Günlük cultivars was controlled by the  $bc-1^2$  and  $bc-3$  gene combination. These resistance genes identified in this study could be used as valuable resistance sources for developing breeding materials resistant to BCMV and BCMNV.

**Abstract.** *Bean common mosaic virus* (BCMV) and *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) are the common plant pathogens that cause significant yield losses in bean growing areas worldwide. The most effective and practical control method is to use of resistant common bean cultivars to BCMV and BCMNV. Many genes and molecular markers associated with resistance to these pathogens have been identified and used widely in breeding studies in the world. This study evaluated the presence of resistance sources in 39 common bean cultivars, widely grown in Turkey to BCMV and BCMNV with different molecular markers (SW-13, SBD-5, ROC11, eIFE4). Eleven common bean cultivars contained only one resistance gene. Also, the cultivars were evaluated for resistance gene combinations to these pathogens; twenty-five cultivars possessed gene combination of  $I+bc-1^2$ . Resistance in Fransız, Karabacak and 40 Günlük cultivars was controlled by the  $bc-1^2$  and  $bc-3$  gene combination. These resistance genes identified in this study could be used as valuable resistance sources for developing breeding materials resistant to BCMV and BCMNV.

## GİRİŞ

Leguminosae familyasında yer alan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisi insan beslenmesi açısından önemli bir protein kaynağıdır. Ülkemizde hemen hemen her bölgede fasulye yetiştiriciliği yapılmakta olup taze fasulye üretimi en fazla Karadeniz bölgesinde, kuru fasulye üretimi ise genelde İç Anadolu bölgesinde gerçekleştirilmektedir (TUİK, 2020). Dünyada yaygın olarak tüketilmesine rağmen baklagiller içerisinde önemli bir yere sahip olan fasulye üretimi çok sayıda fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerinden dolayı istenilen düzeyde gerçekleştirilememektedir (Hall, 1994). Fasulye bitkisinde sorun olan viral hastalık etmenleri arasında ise Bean common mosaic virus (BCMV) ve Bean common mosaic necrosis virus (BCMNV) tüm dünyada en yaygın olarak bulunan ve en önemli virüs hastalıkları olarak nitelendirilmektedir (Morales ve Bos, 1988).

Potyviriidae familyasında yer alan BCMV ve BCMNV fasulye üretim alanlarında enfekteli tohum, bitki özsuğu, polen ve yaprak bitleri ile taşınmakta ve fasulye bitkisinde verim ve kaliteyi düşürerek %80'e varan ürün kayıplarına neden olduğu bildirilmektedir (Hall, 1994; Chew ve ark., 2010). Her iki hastalık etmeni de enfekteli bitkilerde açık-koyu yeşil mozaik belirtilerine, yaprak kıvrılması, şekil bozukluğu ve kloroz gibi semptomlara neden olmaktadır. Aynı zamanda fasulye bitkilerinde dayanıklılık genine bağlı olarak sistemik nekroz, diğer adıyla tepe nekrozu (top necrosis) veya siyah kök (black root) belirtileri bu etmenler tarafından oluşturulabilmektedir. Sistemik nekroz yaprak bitlerinin yaprağı enfekte ettiği noktadan veya vasküler nekrozun ilerlemesi ile oluşmakta ve bitki ölümlerine sebep olabilmektedir (Hall, 1994).

BCMV ve BCMNV ile mücadelede hastalıktan arı tohum kullanılması ve yaprak bitleri ile mücadele edilmesi önerilmekle beraber dünyada en etkili ve pratik mücadele yöntemi olarak dayanıklı çeşitlerin kullanılması önerilmektedir (Drijfhout, 1978; Hall, 1994; Miklas ve ark., 2000). Bu kapsamda BCMV ve BCMNV'e karşı dayanıklılığın dominant *I* geni ve 6 farklı resesif gen (*bc-u*, *bc-1/bc-1<sup>2</sup>*, *bc-2/bc-2<sup>2</sup>* ve *bc-3*) ile yönetildiği belirtilmektedir (Drijfhout, 1978; Kelly ve ark., 1995). Dayanıklılık gen interaksiyonuna dayanarak bu etmenler 1'den 8'e kadar numaralandırılmış 8 patogrub içerisinde sınıflandırılmıştır (Drijfhout ve Morales, 2005; Feng ve ark., 2015). Fasulye genotipleri ise farklı dayanıklılık allel kombinasyonlarına göre 1'den 11'e kadar sınıflandırılan konukçu gruplarına ayrılmıştır (Drijfhout ve Morales, 2005). BCMNV sadece PG-3 ve PG-5 ile ilişkili iken, BCMV tüm patogruplarla ilişkili olabilmektedir (Drijfhout, 1978; Feng ve ark., 2015). Dominant *I* geni BCMV'nin tüm streynlerine karşı tek başına dayanıklılık sağlarken, BCMNV streynleri bitkilerdeki *I* genini kırarak ölümcül hipersensitif reaksiyona neden olabilmektedir. Bu kapsamda etmenlere karşı dayanıklılıkta *I* geninin farklı dayanıklılık mekanizmalarına sahip diğer resesif genlerle (*bc-u*, *bc-1/bc-1<sup>2</sup>*, *bc-2/bc-2<sup>2</sup>* ve *bc-3*) bir araya getirilerek dayanıklılık sağlanması hedeflenmektedir (Mukeshimana ve ark., 2005). Fasulye bitkisindeki farklı gen kombinasyonlarına göre etmenlerin farklı streynlerine karşı dayanıklılık sağlanmakta olup *bc-3* geninin BCMV-BCMNV'nin tüm streynlerine karşı dayanıklılık sağladığı belirtilmektedir (Drijfhout, 1978; Miklas ve ark., 1998).

Dünyada fasulye ıslah programlarında farklı dayanıklılık gen piramitlerinin oluşturulması amacıyla yoğun çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Pasev ve ark., 2013; Wani ve ark., 2017; Ruhimbana ve Mutlu 2019). Dayanıklılık genleri klasik yöntemler kullanılarak tespit edilebilmesine rağmen karşılaşılan zorluklar nedeniyle fasulyedeki dayanıklılık genleri ile ilişkili pek çok markör geliştirilmiş olup ıslah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Melotto ve ark., 1996; Johnson ve ark., 1997; Miklas ve ark., 2000; Naderpour ve ark., 2010). Önemli bir fasulye üreticisi konumunda olan ülkemizde ise BCMV ve BCMNV'nin durumu ve dayanıklılıkta rol oynayan genler hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır (Deligöz ve Sökmen 2013; Deligöz ve ark., 2015; Yeken ve ark., 2018). Bu çalışma kapsamında ise ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen fasulye çeşitlerinde BCMV ve BCMNV'e karşı dayanıklılıkta rol oynayan bazı genlerin SCAR ve CAPS markörler ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### **Bitkilerin Yetiştirilmesi**

BCMV ve BCMNV'e karşı dayanıklılık genlerinin belirlenmesi amacıyla ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 39 fasulye çeşidi kullanılmıştır (Çizelge 1). Ayrıca PCR reaksiyonlarını doğrulamak için dayanıklılık kaynakları bilinen ve USDA'dan (United States Department of Agriculture Research Service, ABD) elde edilen 6 adet fasulye genotipi (Perry Merrow, Cornell, Michigan Dark Red Kidney (MDRK), To) kontrol amacıyla çalışmaya dâhil edilmiştir. Tohumlar ekimden önce %1'lik sodyumhipoklorit' de (NaOCl) 2 dakika tutulmuş ve bunu takiben 3 seri steril saf sudan geçirilerek toprak, kum, gübre karışımı içeren (1:1:1 v/v) 16 cm çapındaki saksılara ekilmiştir. Tüm bitkiler 23°C sıcaklık ve 14/10 saat ışık periyodu içeren kontrollü koşullardaki bitki yetiştirme odasında 10 gün süreyle yetiştirilmiştir.

**Çizelge 1.** Çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerinin özellikleri ve BCMV ve BCMNV'e karşı sahip oldukları dayanıklılık kaynakları  
*Table 1. Characteristics of common bean cultivars and their resistance sources to BCMV and BCMNV.*

Fasulye Çeşitleri	Fasulye Tipi	Fasulye Tohumlarının Elde Edildiği Yerler	BCMV-BCMNV'e Karşı Dayanıklılık Kaynakları			
			I geni (SW-13)	bc-1 <sup>2</sup> (SBD-5)	bc-3 (ROC-11)	bc-3 (eIFE4)
Seher yıldızı	Taze	Karadeniz Tar. Arş. Enst.	-	+	-	-
Zeynebim	Taze	Karadeniz Tar. Arş. Enst.	-	+	-	-
Boncuk	Taze	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Fransız	Taze	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	-	+	+	+
40 Günlük	Taze	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	-	+	+	+
Karabacak	Taze	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	-	+	+	+
Sazova	Taze	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Gina	Taze	May Tohum	+	+	-	-
Magnum	Taze	May Tohum	+	+	-	-
Java	Taze	May Tohum	+	+	-	-
Asya	Taze	May Tohum	+	+	-	-
Sofia	Taze	May Tohum	-	+	-	-
Volare	Taze	May Tohum	+	+	-	-
Özayşe	Taze	Batı Akdeniz Tar. Arş. Enst.	-	+	-	-
Yalova 5	Taze	Atatürk Bahçe Kültürleri Arş. Enst.	-	+	-	-
Yalova 17	Taze	Atatürk Bahçe Kültürleri Arş. Enst.	-	+	-	-
Perolar	Taze	Makrogen Tohumculuk	-	+	-	-
Sarıköz	Taze	Makrogen Tohumculuk	+	+	-	-
Mina	Taze	Makrogen Tohumculuk	+	+	-	-
Gelincik	Taze	Makrogen Tohumculuk	+	+	-	-
Tavil	Taze	Makrogen Tohumculuk	-	+	-	-
Nazende	Taze	Makrogen Tohumculuk	+	+	-	-
Miray	Taze	Sim Arzuman Tarım Ürünleri	+	+	-	-
Hanımteni	Taze	Sim Arzuman Tarım Ürünleri	-	+	-	-
Selim	Barbunya	Sim Arzuman Tarım Ürünleri	+	+	-	-
Sırık barbunya	Barbunya	Poltar Tarım	+	+	-	-
Klas barbunya	Barbunya	Poltar Tarım	+	+	-	-
Buse Oturak	Barbunya	Makrogen Tohumculuk	+	+	-	-
Belinay Sırık	Barbunya	Makrogen Tohumculuk	-	+	-	-
Sembol	Barbunya	Makrogen Tohumculuk	+	+	-	-
Zülbiye	Kuru	Karadeniz Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Akın	Kuru	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Önceler	Kuru	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Karacaşehir90	Kuru	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Göynük 98	Kuru	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Bulduk	Kuru	Geçit Kuşağı Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Mecidiye	Kuru	Doğu Anadolu Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Aras	Kuru	Doğu Anadolu Tar. Arş. Enst.	+	+	-	-
Yakutiye	Kuru	Doğu Anadolu Tar. Arş. Enst.	+	-	-	-

### DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Diversity Arrays Technology (DArT) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (<http://www.diversityarrays.com>). Her fasulye çeşidinin yapraklarından yaklaşık 100 mg bitki dokusu alınarak 1 ml ekstraksiyon bufferi (125 mM Tris-HCl pH:8, 25 mM EDTA pH:8, 0.8 M NaCl, %1 CTAB, %1 sarcosyl, %2 PVP-40 (K29-32), %0.5 sodium disulphite) içerisinde homojenize edilmiş ve 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her bir örneğe eşit hacim kloroform-isoamilalkol (24:1 v/v) eklenerek iyice karıştırılmış ve 10.000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı temiz eppendorf tüplere alınarak eşit hacimde soğuk isopropanol eklenmiş ve 1 saat -20°C'de bekletilmiştir. DNA'yı çöktürmek için örnekler 10.000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı dökülmüş ve DNA pelleti 500 µl %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır. Oda koşullarında kurutulduktan sonra pellet 100 µl steril ddH<sub>2</sub>O ile çözülmüştür. DNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak (NanoDrop-1000

spectrophotometer, Thermo Scientific) 260/280 nm'de ölçüm yapılarak belirlenmiş ve tüm DNA örnekleri 20 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  olacak şekilde seyreltilerek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### Fasulye Çeşitlerindeki Dayanıklılık Kaynaklarının Moleküler Markörler ile Tespiti

Fasulye bitkisinde BCMV ve BCMNV'e karşı dayanıklılık genleri ile ilişkili olduğu bildirilen 3 SCAR markör ve 1 adet CAPS markör çalışma kapsamında kullanılmıştır (Çizelge 2). PCR reaksiyonları 0.2  $\mu\text{M}$  dNTPs, 0.3  $\mu\text{M}$  primer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10x PCR buffer, 20-30 ng DNA, 1U *Taq* DNA polimeraz içeren 25  $\mu\text{l}$ 'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonları ise her primer için Çizelge 2'de belirtilen koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %1.2'lik agaroz jelde, 1xTAE buffer içerisinde 100 V'da elektroforetik olarak ayrılarak gözlenmiş ve beklenen PCR ürünlerinin büyüklükleri Gene Ruler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific) kullanılarak tespit edilmiştir. Dayanıklılık genleri ile ilişkili amplifikasyon ürünlerinin varlığı, referans çeşitler ile kıyaslanarak var (+), yok (-) olarak belirlenmiştir. Ayrıca *bc-3* dayanıklılık genini belirlemek için eIFE4 markörü ile elde edilen PCR ürünlerinin 10  $\mu\text{l}$ 'si, üretici firma protokolüne göre *RsaI* (Thermo Scientific) enzimi ile kesilmiş ve % 1.2'lik agaroz jelde 100 V'da elektroforetik olarak ayrılarak kaydedilmiştir.

**Çizelge 2.** Çalışmada kullanılan dayanıklılık genleri ile ilişkili primerlerin özellikleri ve PCR koşulları.

Tablo 2. Characteristics of the primers linked to resistance genes and PCR conditions used in the study.

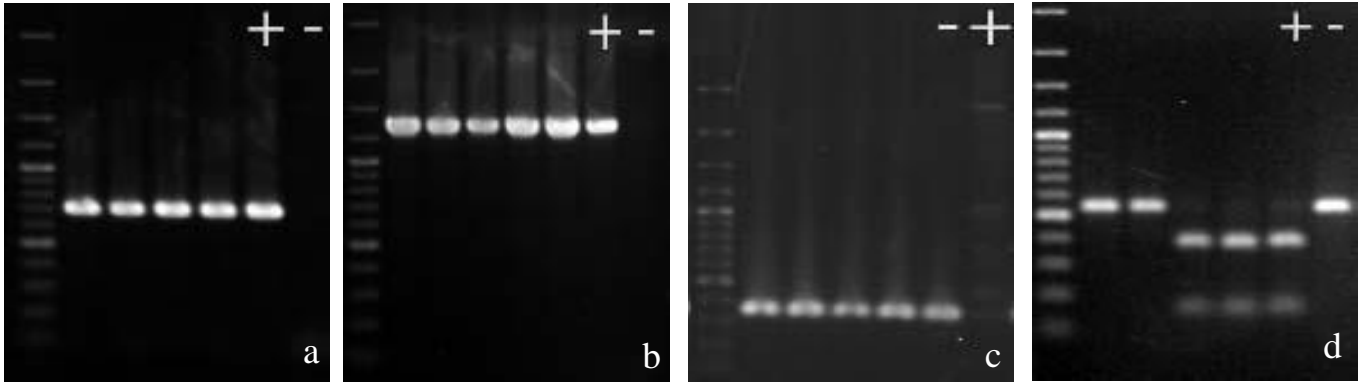
Primer	Gen Lokusu	Baz çifti	PCR Ürünü (bp)	PCR koşulları	Kaynak
SW-13	<i>I</i>	5'-CACAGCGACATTAATTTTCCTTC-3' 5'-CACAGCGACAGGAGGAGCTTATTA-3'	690	95°C 4 dk 94°C 10 s, 60°C 40 s, 72°C 2 dk 35 döngü 72°C 5 dk	Melotto ve ark. (1996)
SBD-5	<i>bc-1<sup>2</sup></i>	5'-GTGCGGAGAGGCCATCCATTGGTG-3' 5'-GTGCGGAGAGTTTCAGTGTGACA-3'	1250	95°C 4 dk 94°C 10 s, 65°C 40 s, 72°C 2 dk, 35 döngü 72°C 5 dk	Miklas ve ark. (2000)
ROC11	<i>bc-3</i>	5'-CCAATTCTTTCACTTGTAAACC-3' 5'-GCATGTTCCAGCAAACC-3'	420/350	95°C 4 dk 94°C 10 s, 65°C 10 s, 72°C 30 s 35 döngü 72°C 5 dk	Johnson ve ark. (1997)
eIFE4	<i>bc-3</i>	5'-ACCGATGAGCAAACCCTA-3' 5'-CAACCAACTGGTATCGGATT-3'	541/ <i>RsaI</i> (381+160)	95°C 3 dk 94°C 20 s, 58°C 20 s, 72°C 20 s, 40 döngü 72°C 5 dk	Naderpour ve ark. (2010)

## BULGULAR VE TARTIŞMA

BCMV ve BCMNV ülkemizde ve dünyada fasulye üretim alanlarında yaygın olarak görülen ve mozaik belirtisi, yaprak kıvrılması ve sistemik nekroza neden olarak önemli ekonomik kayıplar oluşturan hastalık etmenleridir. Bu etmenlere karşı konukçu bitki dayanıklılığının kullanımı ise en etkili mücadele yöntemi olarak belirtilmektedir (Drijfhout, 1978; Hall, 1994; Miklas ve ark., 2000). Bu kapsamda BCMV ve BCMNV'e karşı bazı dayanıklılık genleri belirlenmiş olup bu dayanıklılık kaynakları ile ilişkili moleküler markörler ıslah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Haley ve ark. 1994; Melotto ve ark., 1996; Johnson ve ark., 1997; Strausbaugh ve ark., 1999; Miklas ve ark., 2000; Naderpour ve ark., 2010). Ülkemizde ise fasulye üretim alanlarında söz konusu etmenlerin tespiti ve yaygınlığı ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmesine rağmen dayanıklılık kaynakları hakkında oldukça az çalışma bulunmaktadır (Deligöz ve Sökmen, 2013; Deligöz ve ark., 2015). Bu çalışma kapsamında ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 39 fasulye çeşidindeki BCMV ve BCMNV'e karşı dayanıklılık kaynaklarının (*bc-1<sup>2</sup>*, *I*, *bc-3*) farklı SCAR ve CAPS markörler ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda tüm primerlerin bitki örneklerinden beklenen büyüklükte PCR ürünlerinin amplifikasyonunu sağladığı görülmüştür (Şekil 1).

Fasulye bitkisinde BCMV ve BCMNV'e karşı hipersensitif reaksiyona neden olan dominat *I* geninin belirlenmesi için kullanılan SCAR markör SW-13 test edilen örneklerden 690 bp büyüklüğünde bir amplifikasyon ürününün çoğalmasını sağlamıştır (Şekil 1). Elde edilen sonuçlar referans fasulye genotipi TO'nun yanı sıra ülkemizde yetiştirilen 26 fasulye çeşidinde bu dayanıklılık geninin bulunduğunu göstermiştir (Çizelge 1). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak SW13 markörü Andean ve Mesoamerikan gen havuzuna ait fasulye genotiplerindeki *I* geninin varlığını belirlemek için ıslah çalışmalarında geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Melotto

ve ark., 1996; Pasev ve ark., 2013). Fasulye bitkisinde *bc-1<sup>2</sup>* dayanıklılık geni ile ilişkili olan SCAR markör SBD-5 ise test edilen örneklerden 1250 bp büyüklüğünde spesifik bir PCR ürününün çoğalmasını sağlamıştır (Şekil 1). Bu kapsamda ülkemizde yetiştirilen fasulye çeşitlerinden Yakutiye hariç tüm fasulye çeşitlerinin bu dayanıklılık genini taşıdıkları gözlemlenmiştir (Çizelge 1). Ayrıca kontrol olarak Perry Marrow fasulye genotipinde 1250 bp'lik bir ürün elde edilirken Cornell genotipinde herhangi bir amplifikasyon gözlemlenmemiştir. SW-13 ve SBD-5 markörleri ile multipleks-PCR yöntemini kullanarak 5 fasulye çeşidi ve bir ıslah hattında dominant *I* geni ve resesif *bc-1<sup>2</sup>* genini araştıran Deligöz ve Sökmen (2013) ise tüm örneklerin *bc-1<sup>2</sup>* genine sahip olduğunu ayrıca bu çalışmada da kullanılan Zülbiye çeşidi ile diğer iki çeşitte dominant *I* geninin bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ülkemizde tescilli ticari ve yerel fasulye çeşitlerinde BCMV ve BCMNV'ye karşı dayanıklılığı sağlayan genlerin belirlenmesinin gerekli olduğunu ifade etmişlerdir. BCMV-NL-4 ırkı ile yerel fasulye çeşitlerinin inoküle edildiği bir diğer çalışmada ise Deligöz ve ark. (2015) ülkemizde yetiştirilen 31 ticari çeşidin 24 adedini BCMV'ye karşı dayanıklı 7 tanesini ise hassas olarak belirlemiştir. Benzer şekilde ülkemizdeki bazı fasulye çeşitlerinde dominant *I* ve *bc-1<sup>2</sup>* genini araştıran Yeken ve ark. (2018) test edilen fasulye çeşitlerinde bu genlerin yaygın olarak bulunduğunu belirtmişlerdir.



**Şekil 1.** Fasulye bitkisinde BCMV ve BCMNV'e karşı dayanıklılıkta rol oynayan genlerin spesifik primerlerle amplifikasyonu sonucu elde edilen bant profilleri.(a: dominant *I* geninin SW-13 markörü ile amplifikasyonu sonucu elde edilen spesifik PCR ürünü, To (+), MDRK (-), b: *bc-1<sup>2</sup>* geninin SBD-5 markörü ile amplifikasyonu sonucu elde edilen spesifik PCR ürünü, Perry Marrow (+), Cornell (-), c: *bc-3* geninin Roc-11 markörü ile amplifikasyonu sonucu elde edilen spesifik PCR ürünü, Perry Marrow (-), Cornell (+), d: eIFE4 primeri ile amplifiye edilen ve *RsaI* ile kesilen *bc-3* geninin enzim profili, Fransız (+), Sazova (-). Markör: GeneRuler 100 bp DNA ladders, Thermo Scientific).

*Figure 1. Band profiles showing amplification of genes associated with resistance to BCMV and BCMNV in common bean (a: PCR product of dominant I gene amplified with specific-primer SW-13, To (+), MDRK (-), b: PCR product of bc-1<sup>2</sup> gene amplified with specific-primer SBD-5, Perry Marrow (+), Cornell (-), c: PCR product of bc-3 gene amplified with specific-primer Roc-11, Perry Marrow (-), Cornell (+), d: restriction profiles of bc-3 gene amplified with eIFE4 primer and digested with RsaI enzyme, Fransız (+), Sazova (-). Marker: GeneRuler 100 bp DNA ladders, Thermo Scientific)*

Fasulye bitkilerindeki *bc-3* geninin tespiti için ROC-11 ve eIFE4 markörleri kullanılmıştır. ROC-11 markörü ile 420 bp büyüklüğünde bir bandın elde edilmemesi bu çeşitlerde *bc-3* geninin bulunmadığı şeklinde değerlendirilmiştir (Şekil 1). Bu kapsamda test edilen fasulye çeşitlerinden sadece Fransız, Karabacak ve 40 Günlük çeşitlerinde *bc-3* geninin bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 1). Ancak diğer çeşitlerde 350 bp büyüklüğünde bir PCR ürünü elde edilmiş olup benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da gözlemlenmiştir. Blair ve ark. (2004) ROC-11 primerinin Andean gen havuzuna ait hassas genotiplerin çoğunda bu amplifikasyon ürününü çoğalttığını ancak dayanıklı Andean genotiplerinde bu PCR ürününün bulunmadığını belirtmiştir. Pasev ve ark. (2013) *bc-3* genine sahip genotiplerde bu bandın bulunmadığını diğer tüm genotiplerde ise 350 bp büyüklüğündeki amplifikasyon ürününün oluştuğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu durum bağlanma bölgelerindeki insertion/deletionlar veya ROC11/350 ve ROC11/420 sekansları arasındaki benzerlikten kaynaklanmasının da olası olduğu düşünülmektedir (Johnson ve ark., 1997; Pasev ve ark., 2013). Yapılan çalışmada fasulye çeşitlerinden eIFE4 markörü ile elde edilen PCR ürününün *RsaI* enzim kesimi ile bu örneklerde *bc-3* geninin varlığı ayrıca doğrulanmıştır (Çizelge 1). Enzim kesimi sonucunda *bc-3* geninin bulunmadığı çeşitlerde 541 bp büyüklüğünde tek bir ürün elde edilir iken *bc-3* geninin bulunduğu çeşitlerde 381 ve 160 bp büyüklüğünde iki PCR-RFLP ürünü elde edilmiştir (Şekil 1). Bu kapsamda sadece Fransız, Karabacak ve 40 Günlük çeşitlerinde *bc-3* geninin bulunduğu eIFE4 markörü ile de doğrulanmıştır. Ayrıca test edilen fasulye çeşitlerinden Bulduk fasulye çeşidi 350 bp'lik bir ürün vermemiş ancak her iki markörle de negatif sonuç vermiştir. Johnson ve ark. (1997) ROC-11 markörü ile *bc-3* geninin tespitinin Andean kökenli fasulye genotiplerinde yararlı iken, Mesoamerikan kökenli bazı fasulye genotiplerinde farklı sonuçlar verebileceğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde *bc-3* geni ile ilişkili markörleri kullanan

Naderpour ve ark. (2010) bu markörlerin *bc-3* geni bulunan USCR8 ve bulunmayan DW fasulye genotiplerini ayırmadığını belirtmiştir.

Farklı dayanıklılık genlerini kombine olarak içeren fasulye çeşitleri BCMV ve BCMNV'nin tüm streynlerine ve patogruplarına karşı daha stabil ve geniş spektrumlu bir dayanıklılık sağlanması nedeniyle ıslah programlarında öncelikli olarak değerlendirilmektedir (Drijfhout, 1978; Kelly ve ark., 1995; Miklas ve ark., 2000). Islah çalışmalarında farklı gen kombinasyonlarının oluşturulması fasulye çeşitlerine uzun süreli dayanıklılık kazandırılması açısından oldukça önemli olup en etkili dayanıklılığın  $I+bc-u+bc-2^2+bc-3$  gen kombinasyonu olduğu belirtilmiştir (Drijfhout, 1978). Ancak bu genlerin hepsinin tek bir fasulye genotipinde bir araya gelmesinin zor olması nedeniyle günümüzde BCMV ve BCMNV'nin tüm streynlerine karşı en geniş spektrumlu ve uzun süreli dayanıklılığın  $I+bc-3$  ve  $I+bc-2^2$  gen kombinasyonları ile sağlandığı bildirilmektedir (Kelly 1997; Miklas ve ark., 1998; Mukeshimana ve ark., 2005). Ülkemizde yaygın olarak kullanılan fasulye çeşitlerindeki *I*,  $bc-1^2$  ve  $bc-3$  dayanıklılık genlerini araştırdığımız bu çalışmada da farklı gen kombinasyonlarının bulunduğu belirlenmiştir. Yakutiye çeşidi sadece *I* dayanıklılık genini içerir iken 10 fasulye çeşidinin sadece  $bc-1^2$  genini içerdiği görülmüştür. Fasulye bitkilerinde tek başına  $bc-1^2$  geninin bulunması ise BCMV'nin NL1, NL7, US2, NL2 ve BCMNV'nin NL8 streynlerine karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Drijfhout, 1978). Gen kombinasyonları bakımından ise test edilen çeşitlerin 25 tanesinde  $I+bc-1^2$  ve 3 adedinde  $bc-1^2+bc-3$  genlerinin bulunduğu görülmüştür. Her üç dayanıklılık genini de içeren bir fasulye çeşidinin ise bulunmadığı gözlemlenmiştir. Fasulye bitkilerindeki  $I+bc-1^2$  gen kombinasyonunun BCMV ve BCMNV'nin NL-3, NL-5 ve NL-6 hariç tüm streynlerine karşı dayanıklılığı sağladığı düşünülmektedir. Miklas ve ark. (2000) ise *I* geni ile  $bc-1^2$  bir arada bulunmasının tepe nekrozuna karşı dayanıklılık sağladığını belirtmiştir. Test edilen çeşitler arasında  $bc-3$  genini taşıyan çeşitlerin ise her iki virüsün bütün streynlerine karşı resesif dayanıklılığa sahip olduğu görülmektedir. Ancak her iki virüse karşı bağışıklık sağladığı belirtilen  $I+bc-3$  dayanıklılığı ülkemizdeki fasulye çeşitlerinde tespit edilememiştir. Bununla birlikte  $bc-3$  geni fasulye bitkisinde BCMV'e karşı koruma sağlamak amacıyla ıslah çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen bir gen olmuştur (Drijfhout, 1978; Kelly ve ark., 1995; Hart ve Griffiths, 2013). Feng ve ark., (2015) BCMV'nin fasulyedeki farklı dayanıklılık genlerini yenebilecek mekanizmalar geliştirdiğini ve yeni bir virüs streyninin  $bc-2$  ve  $bc-3$  dayanıklılık genlerini yenebildiğini bildirmiştir. Dominant *I* ve resesif  $bc-3$  genlerini marker destekli geri melezleme ıslahı yoluyla hassas Ruanda fasulyelerine transfer etmeyi amaçlayan Ruhimbana ve Mutlu (2019) CAPS markörlerinin elde edilen fasulye progenlerinin seçimde başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde farklı araştırmalar farklı gen kombinasyonlarını içeren fasulye genotiplerinin belirlenmesi amacıyla dayanıklılık markörlerini etkin şekilde kullanmışlardır (Mukeshimana ve ark., 2005; Bello ve ark., 2014; Boersma ve ark., 2014).

## SONUÇ

Çalışma kapsamında ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen bazı fasulye çeşitlerindeki BCMV ve BCMNV'e karşı dayanıklılık kaynakları moleküler markörler kullanılarak detaylı şekilde ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar  $I+bc-1^2$  ve  $I+bc-3$  gen kombinasyonlarının yaygın olarak bu çeşitlerdeki dayanıklılıkta rol oynadığını göstermiştir. Yapılacak ıslah çalışmalarında dominant *I* ve resesif  $bc-3$  genlerini taşıyan çeşitlere öncelik verilmesi gerektiği düşünülmektedir. BCMV ve BCMNV'nin tüm streynlerine karşı dayanıklılık sağladığı belirtilen  $I+bc-3$  gen kombinasyonu ise test edilen çeşitler arasında bulunamamıştır. Bu kapsamda ülkemizdeki yerel çeşit ve genotiplerdeki farklı dayanıklılık kaynaklarının araştırılması ve değişik gen kombinasyonlarını taşıyan fasulye çeşitlerinin geliştirilmesi bu etmene karşı mücadelede daha başarılı sonuçlar sağlayacaktır. Ayrıca markör destekli seleksiyon yöntemi üzerine yapılacak ilave çalışmaların fasulye bitkisindeki diğer etmenlere karşı da ıslah çalışmalarının etkinliğinin artmasında önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## YAZAR KATKI BEYANI

Yazarlar olarak makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazımı tarafımızca eşit olarak yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Bello, M. H., Moghaddam, S. M., Massoudi, M., McClean, P. E., Cregan, P. B., & Miklas, P. N. (2014). Application of in silico bulked segregant analysis for rapid development of markers linked to Bean common mosaic virus resistance in common bean. *BMC Genomics*, 15(1), 903.
- Blair, M. W., Buendia, H. F., Castano, M., Santana, G. E., & Morales, F. (2004). *Adaptation and use of SCAR markers for BCMNV resistance (bc-3 and dominant/genes) in an Andean bean breeding program*. South African Plant Breeding Conference, Durban, South Africa.
- Boersma, J. G., Conner, R. L., Balasubramanian, P. M., Navabi, A., Yu, K., & Hou, A. (2014). Combining resistance to common bacterial blight, anthracnose, and bean common mosaic virus into Manitoba-adapted dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(2), 405-415.
- Chew, M. Y. I., Velásquez, V. R., Mena, C. J., & Gaytán, M. A. (2010). Virus de frijol en la Comarca Lagunera y Zacatecas. *Folleto Técnico Campo Experimental Zacatecas CIRNOC-INIFAP, Zacatecas*, 41.
- Deligöz, İ., & Sökmen, M. A. (2013). Bazı fasulye genotiplerinin Bean common mosaic virus (BCMV) ve Bean common mosaic necrosis virus (BCMNV)'a dayanıklılık durumlarının kalitatif, kantitatif ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 53(2), 101-113.
- Deligöz, İ., Sarı, S., & Karaağaç, O. (2015). Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen taze fasulye ıslah hatları ve bazı ticari çeşitlerin Bean common mosaic virus (BCMV)'a dayanıklılık durumlarının araştırılması. *Derim*, 32(1), 1-10.
- Drijfhout, E. (1978). *Genetic Interaction Between Phaseolus vulgaris and Bean Common Mosaic Virus with Implications for Strain Identification and Breeding for Resistance*. Centre for Agricultural Publication and Documents, Wageningen, the Netherlands.
- Drijfhout, E., & Morales, F. (2005). Bean common mosaic. In: H. F. Schwartz, J. R. Steadman, R. Hall, & R. L. Forster (Eds.), *Compendium of Bean Diseases*, 2nd ed. (Pp: 60-62). APS press, St. Paul, MN.
- Feng, X., Myers, J. R., & Karasev, A. V. (2015). Bean common mosaic virus isolate exhibits a novel pathogenicity profile in common bean, overcoming the bc-3 resistance allele coding for the mutated EIF4E translation initiation factor. *Phytopathology* 105, 1487-1495.
- Haley, S. D., Afanador, L., & Kelly, J. D. (1994). Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for the I gene (potyvirus resistance) in common bean. *Phytopathology*, 84(2), 157-160.
- Hall, R. (1994). *Bean Diseases, Bean Pathogens, Bean Disease Control*. Compendium of Bean Diseases, APS press, Minnesota, USA.
- Hart, J. P., & Griffiths, P. D. (2013). A series of eIF4E alleles at the Bc-3 locus are associated with recessive resistance to Clover yellow vein virus in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(11), 2849-2863.
- Johnson, W. C., Guzmán, P., Mandala, D., Mkandawire, A. B. C., Temple, S., Gilbertson, R. L., & Gepts, P. (1997). Molecular tagging of the BC-3 gene for introgression into Andean common bean. *Crop Science*, 37(1), 248-254.
- Kelly, J. D., Afanador, L., & Haley, S. D. (1995). Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus. *Euphytica*, 82(3), 207-212.
- Kelly, J. D. (1997). A review of varietal response to bean common mosaic potyvirus in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Varieties and Seeds*, 10(1), 1-6.
- Melotto, M., Afanador, L., & Kelly, J. D. (1996). Development of a SCAR marker linked to the I gene in common bean. *Genome*, 39(6), 1216-1219.
- Miklas, P., Larsen, R., & Kelly, J. (1998). *Localized Vein Necrosis to BCMNV in Pinto P94207 is Conditioned by a Dominant Gene*. Bean Improvement Cooperative, USA.
- Miklas, P. N., Larsen, R. C., Riley, R., & Kelly, J. D. (2000). Potential marker-assisted selection for bc-1 2 resistance to bean common mosaic potyvirus in common bean. *Euphytica*, 116(3), 211-219.
- Morales, F. J., & Bos, L. (1988). Bean common mosaic virus. Online publication. Descriptions of Plant Viruses No. 337. <http://www.dpvweb.net7dpv/showdpv.php?dpvno=337>. Access date: April 15, 2020.
- Mukeshimana, G., Paneda, A., Rodríguez-Suárez, C., Ferreira, J. J., Giraldez, R., & Kelly, J. D. (2005). Markers linked to the bc-3 gene conditioning resistance to bean common mosaic potyviruses in common bean. *Euphytica*, 144(3), 291-299.
- 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(2), 255-263.

- Pasev, G., Kostova, D., & Sofkova, S. (2013). Identification of genes for resistance to Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) breeding lines using conventional and molecular methods. *Journal of Phytopathology*, 162(1), 19-25.
- Ruhimbana, C., & Mutlu, N. (2019). Marker-assisted pyramiding potyvirus resistance genes into Rwandan common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 32(3), 1-1.
- Strausbaugh, C. A., Myers, J. R., Forster, R. L., & McClean, P. E. (1999). bc-1 and bc-u—two loci controlling bean common mosaic virus resistance in common bean are linked. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6), 644-648.
- TÜİK. (2020). Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim tarihi 20 Mayıs 2020.
- Yeken, M. Z., Özer, G., Çelik, A., & Çiftçi, V. (2018). Türkiye'de ticari fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşitlerinde bean common mosaic virus ve bean common mosaic necrosis virus etmenlerine dayanıklılıkla ilişkili genlerin karakterizasyonu. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(4), 613-619.
- Wani, A. B., Bhat, M. A., Husaini, A. M., & Sidiqi, I. (2017). Screening of important bean genotypes/collections for resistance against Common Bean Mosaic Virus using molecular markers. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 343-347.