

**TÜRKİYE'DE YAYGIN OLARAK YETİŞTİRİLEN
FASULYE (*PHASEOLUS VULGARIS* L) ÇEŞİTLERİNİN
BAKTERİYEL ADI YAPRAK YANIKLIĞI
(*XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PHASEOLI*)
HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞININ MOLEKÜLER
İŞARETLEYİCİLER VE PATOJENİTE TESTLERİ
KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Özüm CANDEMİR



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE YAYGIN OLARAK YETİŞTİRİLEN FASULYE (*PHASEOLUS VULGARIS L*) ÇEŞİTLERİNİN BAKTERİYEL ADI YAPRAK YANIKLIĞI (*XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. PHASEOLI*) HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞININ MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLER VE PATOJENİTE TESTLERİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Özüm CANDEMİR
0000-0002-8630-7729

Prof. Dr. Ahmet İPEK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Özüm CANDEMİR tarafından hazırlanan “Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) çeşitlerinin bakteriyel adi yaprak yanıklığı (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) hastalığına dayanıklılığının moleküler işaretleyiciler ve patojenite testleri kullanılarak belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ahmet İPEK

Başkan: Prof. Dr. Ahmet İPEK
000-0002-9136-3186,
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye : Doç. Dr. Nuray AKBUDAK
0000-0003-2669-5667,
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Kenan SÖNMEZ
0000-0003-4040-4555,
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

.././....

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

10/01/2022

Özüm CANDEMİR

TEZ YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Danışman Adı-Soyadı

Tarih

Öğrencinin Adı-Soyadı

Tarih

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum anladım
yazmalı ve imzalanmalıdır.

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE'DE YAYGIN OLARAK YETİŞTİRİLEN FASULYE (*PHASEOLUS VULGARIS* L) ÇEŞİTLERİNİN BAKTERİYEL ADI YAPRAK YANIKLIĞI (*XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PHASEOLI*) HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞININ MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLER VE PATOJENİTE TESTLERİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Özüm CANDEMİR

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet İPEK

Dünya genelinde önemli bir besin ve vitamin kaynağı olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) bitkisi, farklı kültürlerde farklı yemek formları olarak tercih edilmektedir. Fasulyede bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına neden olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, fasulye üretiminde önemli kayıplara sebep olarak ekonomiyi ve insan beslenmesini tehdit etmektedir. Bu çalışmada Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen taze fasulye çeşitlerinden Volare, Gina, Asya, Leziz, Olivin, Sarıkız, Magnum, Bourgondia ve Balkız’ın bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı dayanıklılığı, moleküler işaretleyiciler ve patojenite testleri kullanılarak belirlenmiştir. Patojenite testlerinin sonucuna göre kullanılan çeşitlerin, bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı hassas oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklılık sağladığı belirlenen iki gen bölgesi SU91 ve BC420 moleküler işaretleyicileri kullanılarak bu çeşitlerin dayanıklılık genlerini taşıyıp taşımadığı araştırılmıştır. Moleküler işaretleyiciler analizi sonucuna göre tez çalışmasında kullanılan çeşitlerin hiçbirinin dayanıklılık genlerini taşımadığı belirlenmiştir. Hem patojenite hem de moleküler işaretleyiciler analizleri Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen taze fasulye çeşitlerinin bakteriyel adi yaprak yanıklığına karşı hassas olduğunu göstermiştir. Ancak dayanıklılık genlerinin dayanıklı gen kaynaklarından moleküler işaretleyiciler yardımıyla aktarılabilceği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fasulye, bakteriyel yanıklık, patojenite testleri

2021, vii +50 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF COMMON BACTERIAL BLIGHT (*XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. PHASEOLI*) RESISTANT ON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS L*) VARIETIES WHICH ARE WIDELY GROWN IN TURKEY BY USING MOLECULAR MARKERS AND PATHOGENICITY TESTS

Özüm CANDEMİR

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet İpek

Bean (*Phaseolus vulgaris L.*), which is acclaimed as significant food and vitamin source globally, is preferred as different types of food in variety of cultures. *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*, which causes common bacterial blight disease on bean, threatens human nutrition and economy by inclining serious amount of losses in bean production. In this study, resistance to common bacterial blight of some species of bean (Volare, Gina, Asya, Leziz, Olivin, Sarıkız, Magnum, Bourgondia and Balkız which widely grown in Turkey) are determined by using molecular markers and pathogenic tests. According to results of pathogenic tests, it is observed that chosen varieties are weak against common bacterial blight disease. In the meantime, determined two gene zones which are resistant to common bacterial blight disease, examined whether possessing resistance gene of aforesaid varieties by using SU91 and BC420 molecular markers. As results of molecular marker analyses, it is observed none of the species in this thesis study posses resistance gene. Both parhogenic and molecular marker analysis signified that bean varieties which are widely grown in Turkey are weak against to common bacterial blight disease. Nevertheless, means of transplanting resistance genes from resistant gene sources by the help of molecular markers is determined.

Key words: Common bacterial blight, Green bean, pathogeny tests

2021, vii +50 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana özveri ile destek olan ve bilgilerini aktaran danışmanım Prof. Dr. Ahmet İPEK'e teşekkürlerimi sunarım,

Yüksek lisansa başlamanın konusunda beni yüreklendiren ve süreçte desteğini esirgemeyen müdürüm DR. Hasan Özgür Şıgva'ya, laboratuvar analizlerinde ve bitki yetiştirmede bana yardım eden çok sevdiğim çalışma arkadaşlarım Zir. Müh. Şule Güre, Zir. Müh. Elif Zırh, Genetik Müh. Buse Şen'e, fasulye konusundakiengin bilgilerini benimle her daim paylaşan Yüksek Zir. Müh. Ömer Avican'a ve 7 yıldır içerisinde olmaktan gurur duyduğum MAY TOHUM ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca hep yanımda olan, beni her koşulda destekleyen ve rol modelim olan annem Ayşem Özbek'e, beni her daim motive eden ve bana ışık olan kardeşim Albina Özbek'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her evresinde zorlukları benimle göğüsleyen, tez çalışmamda emeği olan hayat arkadaşım Erkan Candemir'e ve tez yazım sürecinde bana varlığını hep hatırlatan 2 ay sonra doğacak olan kızıma teşekkürlerimi sunarım.

Özüm CANDEMİR
10/01/2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Fasulyenin Üretim Miktarları ve Gen Kaynakları	3
2.2. Baklagiller Familyası ve Fasulye Hakkında Genel Bilgiler	5
2.3. <i>Xanthomonas Axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	8
2.4. Bakteriyel Adi Yaprak Yanıklığı Hastalığının Dayanıklılık Kaynakları	10
2.5. Fasulye Adi Yaprak Yanıklığı Hastalığı Üzerine Yapılan Çalışmalar	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. Kullanılan Bitki Materyali	15
3.2. Bitki Yetiştirmede Kullanılan İklim Koşulları	18
3.3. Tohum Ekimi	18
3.4. Patojenite Analizleri	19
3.4.1. Çoklu iğne yöntemi ile yaprağa bakteri inokülasyonu metodu	19
3.4.2. Kürdan yöntemi ile baklaya bakteri inokülasyonu metodu	22
3.5. DNA İzolasyonu	24
3.5.1. Roche marka DNA izolasyon kiti içerisindeki kimyasallar	24
3.5.2. DNA izolasyonunda kullanılan diğer kimyasallar	25
3.5.3. DNA izolasyonunda kullanılan sarf malzemeler	25
3.5.4. Ön hazırlık aşamaları.....	25
3.6. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile DNA'nın Çoğaltılması	27
3.7. Elektroforez Jel Görüntüleme Sistemi	30
4. BULGULAR.....	32
4.1. Patojenite Analizi Sonuçları	32
4.1.1. Bakla inokülasyonu analizi sonuçları.....	32
4.1.2. Yaprak inokülasyonu sonuçları.....	34
4.2. DNA Kalite ve Miktar Tayini.....	36
4.3. Moleküler İşaretleyicileri Analiz Sonuçları.....	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
g	Gravite (Santrifüj)
kg	Kilogram
l	Litre
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
ng	Nanogram
sn	Saniye
Volt	Voltaj
µl	Mikrolitre
%	Yüzde
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

Açıklama

bç	Base Pair (Baz çifti)
dH ₂ O	Distile Su
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
Mbp	Mega Base Pair (Mega Baz Çifti)
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
PCR	Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<i>P. acutifolius</i>	<i>Phaseolus acutifolius</i>
<i>P. coccineus</i>	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
SCAR	Sequence Characterized Amplified Regions Belirli Dizileri Çoğaltılan Bölgeler
Taq	Termo Stabil Polimeraz Enzimi
TSA	Tryptone Soy Agar (Triptikaz Soya Agar)
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole Işık
vb	Ve benzeri
QTL	Quantitative Trait Loci (Çok Genle Kontrol Edilen Karakterler)
Xap	<i>Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Ükelere göre taze fasulye üretim miktarları	3
Şekil 2.2. Dünyada taze fasulye üretiminin bölgelere göre dağılımı.....	4
Şekil 2.3. Bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığının yaprak üzerindeki belirtisi (Schwartz, 2008)	9
Şekil 2.4. Fasulye tohumlarında görülen bakteriyel adi yaprak yanıklığı belirtileri (Solda sağlıklı tohum, sağda enfekte olmuş tohum görselleri) (Wallen, 2004).....	9
Şekil 3.1. A) Gina, B) Leziz ve C) Balkız çeşitlerinin bakla görselleri	17
Şekil 3.2. A) Olivin, B) Sarıkız ve C) Bourgondia çeşitlerinin bakla görselleri	17
Şekil 3.3. A) Asya, B) Volare ve C) Magnum çeşitlerinin bakla görselleri	17
Şekil 3.4. Viyoldeki fasulye bitkilerinin genel görüntüsü	18
Şekil 3.5. TSA ortamında çoğaltılan bakteri kültürü	20
Şekil 3.6. Bakteri solüsyonu hazırlama aşamasından görüntüler A) TSA besi ortamı üzerinde çoğaltılan bakterilerin öze yardımıyla ortamdan alınması B) Xap bakterilerinin distile su içerisinde karıştırılarak homojen hale getirilmesi C) Bakteri konsantrasyonunun spektrofotometre ile ölçülmesi	21
Şekil 3.7. Çoklu iğne yöntemi ile yaprağa inokülasyon uygulaması A) Canlı ve taze yaprağın seçilmesi B) Bakteri solüsyonuna batırılan iğnelerin yaprağa uygulanması C) Sprey ile yapraklara su püskürtülerek nemli bir ortam oluşturulması	22
Şekil 3.8. Kürdan ile bakla inokülasyonu aşamaları A) TSA ortamında bakterinin çoğaltılması B) Kürdan yardımıyla baklaların üzerinde açılan delikler C) İnokule edilen kürdanların baklada açılan deliklere bulaştırılması.....	24
Şekil 3.9. Yaprak numunesi toplama (A) ve DNA izolasyonu (B) (C) aşamasından bazı görüntüler	27
Şekil 3.10. PCR cihazı görüntüsü	29
Şekil 4.1. Bakteri kültürü uygulanan baklaların 7. gün görüntüsü A) Leziz B) Balkız C) Volare D) Sarıkız E) Gina F) Asya G) Olivin H) Bourgondia J) Magnum K) Dayanıklı Kontrol L) Hassas kontrol	33
Şekil 4.2. Referans çeşitlerinin semptom görüntüleri A) Dayanıklı kontrol çeşit (HR45) B) Hassas Kontrol Çeşit (Phantom)	36
Şekil 4.3. Çoklu iğne yöntemiyle bakteri inokülasyonu sonrasında semptom gösteren bazı yapraklar A) Volare B) Asya C) Sarıkız D) Leziz	36
Şekil 4.4. SU91 moleküler işaretleyicisinin UV ışık altında elektroforez jel görüntüsü...	39
Şekil 4.5. BC420 moleküler işaretleyicisinin UV ışık altında elektroforez jel görüntüsü.	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Fasulye bitkisi taksonomisi (Anonim, 2021)	6
Çizelge 2.2. <i>Phaseolus</i> türlerinde tespit edilen önemli bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklılık genleri ve moleküler işaretleyicileri.....	12
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan çeşitlerin fenolojik özellikleri	16
Çizelge 3.2. Kullanılan moleküler işaretleyicilere ilişkin bilgiler	28
Çizelge 3.3. PCR ürünü hazırlama protokolü	28
Çizelge 3.4. BC420 moleküler işaretleyicisi için PCR sıcaklık döngüleri	30
Çizelge 3.5. SU91 moleküler işaretleyicisi için PCR sıcaklık döngüleri	30
Çizelge 4.1. Hastalık reaksiyonlarındaki skalaların açıklaması	32
Çizelge 4.2. Bakteri inokülasyonu sonrası gözlem sonuçları	33
Çizelge 4.3. Hastalık reaksiyonlarındaki skalaların açıklaması	34
Çizelge 4.4. Yaprak inokülasyonu sonrası gözlem sonuçları	35
Çizelge 4.5. DNA kalite ve miktarları	37
Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan 9 fasulye çeşidinin adi yaprak yanıklığı hastalığının SU91 moleküler işaretleyicisine karşı dayanıklılık durumu....	40
Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan 9 fasulye çeşidinin adi yaprak yanıklığı (<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>) hastalığının BC420 moleküler işaretleyicisine karşı dayanıklılık durumu	42

1. GİRİŞ

Leguminosae (Baklagiller) familyasının *Phaseolus* cinsine ait olan fasulye bitkisi Türkiye’de yetiştirilen baklagiller içerisinde önemli bir yere sahiptir. Fasulye C vitamini ve karoten açısından zengin olmakla birlikte taze meyve ve danelerinin yaklaşık olarak %90’ı sudan oluşmaktadır. Fasulyenin besin değerinin yüksek olması, farklı şekillerde tüketime uygun olması (taze, kuru, konserve, turşu vs.) tercih edilmesinin en önemli nedenlerindendir. Ayrıca mangan, demir, kalsiyum, potasyum, fosfor, kükürt ve magnezyumca zengin olması sebebiyle insan vücudunun mineral madde ihtiyacını karşılamakta önemli bir gıda maddesidir. A, D, E ve K gibi önemli vitaminleri içermesinden dolayı önemli bir bitkisel besin kaynağıdır (Akçın, 1973).

Phaseolus vulgaris, kromozom sayısı $2n=2x=22$ olan diploid bir sebze türüdür. Fasulye büyüklüğü 633 milyon baz çiftinden oluşur ve küçük bir genoma sahiptir (Vellejos ve diğerleri, 1992). Fasulye kendine tozlanan bir bitki türüdür fakat %1’den daha az oranda yabancı döllenme görülebilmektedir.

Yer (bodur) fasulyesi (*Phaseolus vulgaris* var. *nanus*) ve sırık fasulyesi (*Phaseolus vulgaris* var. *comminus*) olarak adlandırılan bu iki grup dünyada en fazla yetiştirilen fasulye formlarıdır. Bu gruplar taze, kuru hem taze hem de kuru olarak tüketilebilmektedir. Ayrıca kültüre alınan fasulyelerin yenilebilir bölümleri iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar; rehidrasyon sonrası olgun kuru tohum olarak tüketilen fasulyeler (kuru yenilebilir fasulye) ve kabuğu olgunlaşmadan taze olarak tüketilen taze fasulyelerdir (Myers ve Baggett, 1999).

Günümüzde fasulye bitkisinin; Orta Amerika (Mesoamerica) ve Güney Amerika (Andean) bölgeleri olmak üzere iki gen havuzuna sahip olduğu bilinmektedir (Bitocchi ve Bellucci, 2013). Orta Amerika (Mesoamerica) gen havuzu, Meksika’dan Kolombiya’ya, Güney Amerika (Andean) gen havuzu ise, Güney Peru’dan Kuzeybatı Arjantin’e kadar uzanmaktadır (Kwak, 2009). Durango, Jalisco ve Mesoamerica Orta Amerika gen havuzunda yer almaktadır. Peru, Nueva Granada ve Şili ise Güney Amerika gen havuzunda yer almaktadır (Nadeem ve diğerleri, 2018). Yapılan çalışmalar

doğrultusunda kültüre alınan fasulye çeşit veya genotiplerinin atalarına göre genetik çeşitlilik düzeylerinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Bununla bağlantılı olarak fasulye ıslahındaki gelişmelerin yavaş olmasının sebebi, aynı gen havuzundan ebeveyn olarak seçilen genotiplerin genetik farklılıklarının düşük seviyede olmasıdır (Nadeem ve diğerleri, 2018).

Yabani atalarından ıslah edilmiş fasulye çeşitleri arasında en fazla farklılaşma tohum ve kabuklarda gerçekleşmiştir. Küçük tohumlara göre genellikle büyük tohumlar ıslah çalışmalarında tercih edilmektedir. Bununla birlikte fiber içeriği az olan açılır kabuklular kullanılmaktadır. Islah çalışmalarında genellikle tohum rengi ve şekilleri bölgesel isteklere göre oluşturulmaktadır. Venezuela ve Guetamala’da siyah tohum rengi, Kolombiya ve Honduras’ta kırmızı tohum rengi, Peru ve Meksika’da krem rengi, bronz ve siyah, Brezilya’da ise siyah ve bronz tohum renkleri tercih edilmiştir (Koinange ve diğerleri, 1996).

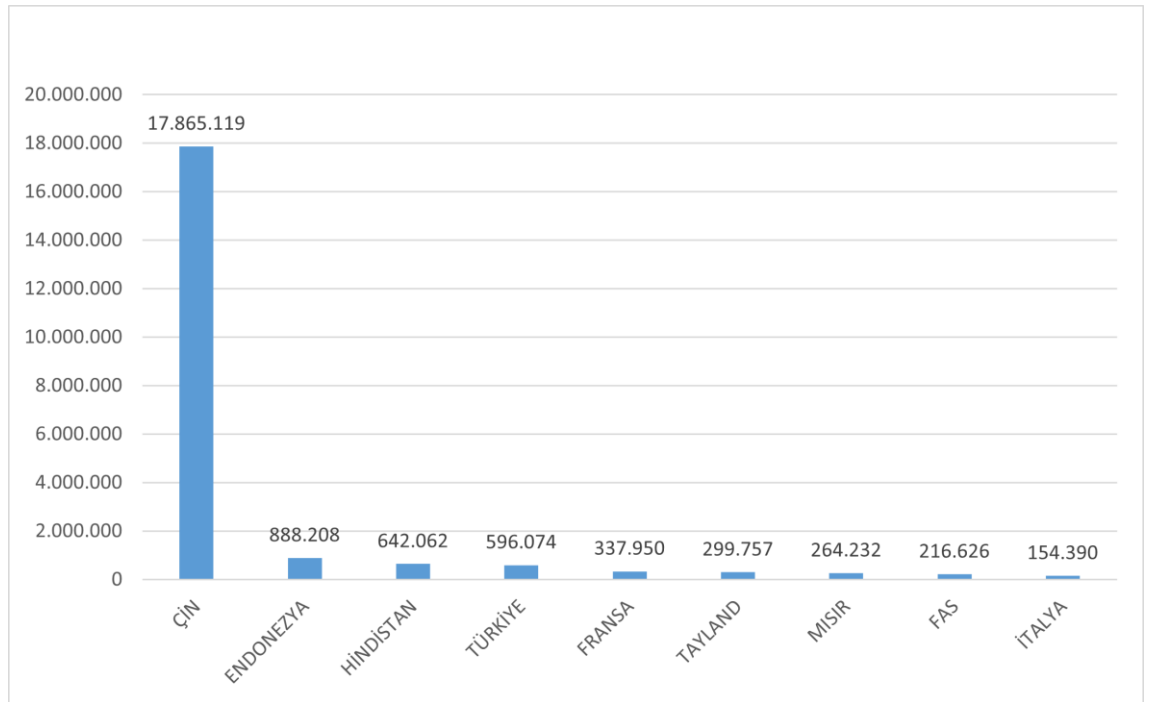
Fasulye bakteriyel adi yaprak yanıklığı (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*), dünya çapında tropik bölgelerden ılıman bölgelere kadar bakla üretimini olumsuz yönde etkileyen ve yaygın olarak görülen bakteriyel bir hastalıktır (Saettler, 1989). Bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığı, arazideki verimi düşürme kapasitesi ve tohum kaynaklı olması sebebiyle, dünya çapında ekonomik açıdan fasulyeyi olumsuz yönde etkileyen en önemli hastalıklardan biridir. Ayrıca tropikal ve subtropikal iklimlerde taze fasulyede önemli kayıplara neden olabilir (Irigoyen ve Garbagnoli, 1997).

Bu çalışmada, Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen bazı ticari taze fasulye çeşitlerinin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı dayanıklılığı, moleküler işaretleyiciler ve patojenite testleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece ülkemizde üretimi yaygın olan fasulye çeşitlerinin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklılık durumu belirlenecek ve elde edilen sonuçlar ıslah çalışmalarında kullanılabilecektir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

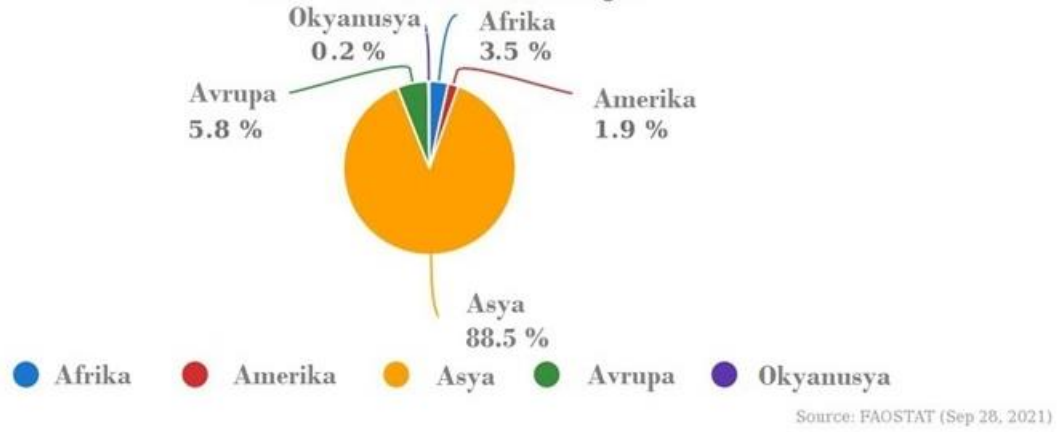
2.1. Fasulyenin Üretim Miktarları ve Gen Kaynakları

Anavatanı Orta Amerika olan fasulye dünyada da tüketimi fazla olan sebze türlerinin içerisinde yer almaktadır. Dünyada 2019 yılı itibarıyla taze fasulye üretimi 26 981 784 tondur. En fazla taze fasulye üreticisi ülke olan Çin'in üretimi 17 865 119 ton 'dur. Türkiye ise 596,074 ton üretim ile 4. sırada yer almaktadır (Şekil 2.1; Anonim, 2021).



Şekil 2.1. Ülkelere göre 2019 yılı taze fasulye üretim miktarları

Dünyada en fazla taze fasulye üretimi yapılan bölge %88,5 ile Asya kıtasıdır. Avrupa kıtası %5,8 ile ikinci, Afrika kıtası %3,5 ile üçüncü, Amerika kıtası %1,9 ile dördüncü, Okyanusya kıtası ise %0,2 yüzdelik dilim ile son sırada yer almaktadır (Şekil 2.2; Anonim, 2021).



Şekil 2.2. Dünyada taze fasulye üretiminin bölgelere göre dağılımı

Ülkemiz pek çok bitki türünün gen merkezi konumundadır. Sebze türlerine bakıldığında ise Türkiye bazı sebze türlerinin anavatanı ve birçoğunun mikro gen merkezidir (Harlan, 1951). Ayrıca ülkemiz yüksek oranda genetik varyasyonlara ev sahipliği yapmaktadır. Anadolu’da, sebze türlerinin ıslahında kullanılabilecek geniş bir genetik varyasyon söz konusudur. Bu varyasyonun bazı durumlarda, yabani popülasyonlara göre kültürü yapılan çeşitlerde daha yüksek olabileceği bildirilmektedir (Tan ve Açıkgöz, 2002). Leguminosae familyası türleri bu duruma iyi bir örnek teşkil etmektedir (Tan ve Açıkgöz, 2002). Bununla alakalı olarak, Leguminosae familyasına dahil olan muhafaza altındaki tohumların (fasulye tohumları da dahil) değerlendirilmesi ve belgelenmesi çalışmalarına, Türkiye gibi ülkelerde gereklilik duyulduğu belirtilmektedir. (Muehlbauer, 2002). Bu familyanın nohut, bezelye, bakla, börülce gibi üyeleri arasında özellikle fasulye köy popülasyonlarına, Anadolu’nun hemen hemen her yerinde rastlamak mümkündür (Tan ve Açıkgöz, 2002).

Ülkemizde fasulye gen kaynaklarına ait koleksiyon, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Ulusal Gen Kaynakları Bankası’nda ve Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nde muhafaza edilmektedir. Taze fasulye üretiminin en fazla yapıldığı bölge Orta Karadeniz Bölgesidir. Bu bölgede, en fazla taze fasulye üretimi yapılan il ise Samsun’dur ve bu bölge şartlarına uyum sağlamış çok sayıda yerel fasulye tipi bulunmaktadır. Ayrıca en önemli taze fasulye üretimi yapılan diğer iller ise Antalya, Hatay, Bursa ve Aydın illeridir (Madakbaşı ve diğerleri, 2007).

Taze fasulye yetiştiriciliğinde genel olarak bodur çeşitler tercih edilmektedir. Bu durumun sebebi işçilik ve sırık fasulye çeşitlerindeki sırık maliyetinin yüksek olmasıdır (Madakbaş ve diğerleri, 2007).

2.2. Baklagiller Familyası ve Fasulye Hakkında Genel Bilgiler

Dünya üzerinde 3. sırada yer alan en geniş familyalardan birisi baklagiller (Leguminosae) familyasıdır. Latince ‘Legumen’ kelimesinden türemiş olan baklagil kelimesi, kabuklu baklanın hasat edilen tohumları anlamındadır (Salunke ve Kadam, 1989). Eski çağlardan beri insan beslenmesinde önemli bir besin kaynağı olan baklagiller familyası yaklaşık sekiz yüz cins ve yirmi bin türden oluşmaktadır (Lewis ve diğerleri, 2005). Fasulye, nohut, mercimek, bezelye, börülce ve soya fasulyesi gibi yemeklik tane baklagiller günümüzde önemli gıda ve besin kaynaklarını oluşturmaktadır (Tan ve Serin, 2009). Baklagiller *Rhizobium* cinsi bakteriler ile ortak yaşam (simbiyosis) içinde bulunduklarından havadaki elementer azotu yüksek yapılı bitkilerin kullanabileceği organik azot formuna dönüştürebilmektedirler. Bu sayede sahip oldukları azotu bağlayabilme özelliklerinden dolayı diğer bitki türleri içinde önemli yere sahiptir. Ayrıca baklagillerin toprağa bağladıkları azot yeterli miktardadır. Bununla birlikte baklagiller diğer bitkilerle birlikte tarlada rotasyona tabi tutulmasının, ekilebilir alanlarda gübre ve enerji kullanımını azaltmada ve dolayısıyla sera gazı salınımını azaltmada önemli rolü bulunmaktadır. Baklagiller aynı zamanda toprağa yüksek kaliteli organik madde sağlamaktadırlar. Ayrıca topraktaki besin maddelerinin dolaşımını ve su tutma özelliğini kolaylaştırırlar. Bu gibi özelliklerinden dolayı baklagiller, kendilerinden sonra tarlaya ekilecek olan buğdaygiller için çok iyi bir ön bitkidir (Stagnari ve diğerleri, 2017).

Baklagiller (Leguminosae) familyası, 40 takım içinde bulunan 640 cins ile en yüksek ve en geniş üçüncü familya grubudur (Gebts ve diğerleri, 2005). Leguminosae familyası içinde yer alan Phaseolus cinsine ait 5 adet tür kültüre alınmıştır. Bu türler; *P. vulgaris* L. (fasulye), *P. coccineus* L. (çalı fasulyesi), *P. acutifolius* A. Gray (çay fasulyesi), *P. lunatus* L. (lima fasulyesi) ve *P. polyanthus* Greeman (yıllık fasulye)’dir (Singh, 1999). Ekonomik ve bilimsel amaçlı en çok tercih edilen fasulye türü ise *P. vulgaris* L.’dir. Bu

tür Dünya’da yetiştirilen baklagillerin %75’ini oluşturmaktadır. Gradinaroff 1939 yılında günümüzde halen geçerli olan sınıflandırmayı yapmıştır ve *Phaselous vulgaris* türünü tane şekli ve büyüklüğüne göre 5 alt türe ayırmıştır. Bunlardan birincisi *ssp. sphaericus mart.* alt türüdür. Tohumlar yuvarlağa yakın ve uzunluğu genişliğinden fazladır. Türkiye’de yetiştirilen şeker fasulyesi bu grup için örnek verilebilir. İkinci alt tür *ssp. ellipticus mart.* olarak adlandırılmıştır. Bu grubun tohumları elips şeklindedir. Çalı fasulyesi bu alt türe örnek verilebilir. Üçüncü alt tür *ssp. oblongus Savi*’dir. Uzun silindirik böbrek şeklindeki tohumlarının genişlikleri kalınlıkları kadardır. Horoz fasulyesi bu gruba girer. Dördüncü alt tür *ssp. subcompressus al.* alt türüdür. Tohumlar yarı yassı şekilde uzunlaşmış böbreğe benzemektedir. Selanik fasulyesi bu gruba örnek verilebilir. Beşinci grup ise *ssp. Compressus* alt türüdür. Tohumlar basık, geniş, tohum uzunluğu genişliğinin iki katı kadardır. Ayrıca fasulyeler bitkilerin büyüme şekline göre bodur fasulye (*var. nanus*) ve sırik fasulye (*var. valubilis*) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Bununla birlikte fasulyelerin bir diğer sınıflandırma şekli; tohum kabuğu renkleri ve kabuğun değişik renklenme durumlarına göredir. Taneler tek renkli (unicolor) ise form, çok renkli (versicolor) ise subform olarak adlandırılmaktadır (Gülümser ve diğerleri, 2013). Fasulye bitkisinin taksonomisi Çizelge 2.1’de belirtilmiştir (Anonim, 2021).

Çizelge 2.1. Fasulye bitkisi taksonomisi (Anonim, 2021)

ALEM	Plantae
BÖLÜM	Magnoliophyta
SINIF	Magnoliopsida
TAKIM	Fabales
FAMİLYA	Leguminosae
ALT FAMİLYA	Papilionaceae
CİNS	<i>Phaseolus</i> L
TÜR	<i>Phaseolus vulgaris</i> L

Fasulye, açık kahve renkli ve dallanmış yapıda olan kazık köklü bir bitki türüdür. Kökler hızlı bir şekilde çimlenmeden sonra gelişmeye başlar. Ana kök, engelle karşılaşmadığı sürece toprak derinliğince büyümeye devam etmektedir fakat engelle karşılaştığında

büyümesi durur. Bu durumda yan köklerin gelişimini teşvik eder. Kökler günde yaklaşık 3-3,5 cm uzayabilmektedir (Şehirli, 1988).

Fasulye gövde, boğum ve boğum aralarından meydana gelen tek yıllık otsu gövde yapısındadır. Kültürü yapılan fasulye çeşitleri boyanma durumlarına göre bodur ve sırik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bodur fasulyeler; yüksek bodur (dallanması az fakat boyu fazla), yayvan bodur (çok dallanıp gelişimi yayvan olan), uzun yaprak saplı bodur (yaprak sapları uzun olup dağınık büyüme gösteren) ve küre bodur (yaprak uçları aşağı doğru kıvrılıp toplu büyüyen) olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadır. Sırik fasulyeler ise az yüksek (yaklaşık 150 cm kadar boylan), orta yüksek (150-200 cm kadar boylan), yüksek (200-300 cm kadar boylan), çok yüksek (300 cm'den fazla boylan) olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadır (Gülümser ve diğerleri, 2013).

Tohumda kotiledonlar arasında bulunan ve plumulayı çevreleyen iki adet yaprakçık bulunur. Bu yaprakçıklar daha sonra kotiledon yaprağı olarak da adlandırılan basit yaprakları oluştururlar. Bunlar karşılıklı ve bir çift olup kalp şeklindedir ve çiçeklenmeden sonra kuruyarak ölürler. Asıl yapraklar ise birleşik yaprak olup, üç adet yaprakçığın bir yaprak sapı üzerine bağlanması ile oluşur. Gerçek yapraklar, karşılıklı olarak duran iki kotiledon yaprağı arasındaki büyüme noktasının gelişmesiyle meydana gelir. Fasulyenin tüm vejetatif organlarında olduğu gibi yaprakları da tüylüdür. Yaprakların alt yüzeylerindeki tüy sayısı üst yüzeylere oranla daha fazladır (Gülümser ve diğerleri, 2013).

Fasulyenin çiçeği salkım şeklinde olup yaprak koltuklarından çıkmaktadır. Tipik bir baklagil çiçeğinin tüm özelliklerini taşımaktadır. Fasulye çiçeklerinin rengi genellikle beyaz, mor, kirli beyaz ve açık mor rengindedir. Renkli çiçek özelliği beyaz çiçek özelliğine göre baskın karakterdedir. Çiçeklenme için ideal sıcaklık değeri 21 °C'dir. Bodur çeşitlerde çiçeklenme tohum ekiminden 43 gün sonra başlar ve yaklaşık 15 gün sürer. Sırik çeşitlerde ise çiçeklenme tohum ekiminden 46 gün sonra başlar ve yaklaşık 30 gün devam etmektedir (Akçın, 1988).

Fasulye bitkisi %99 oranında kendine döllenen bir bitkidir (Keleş, 2015). Fasulyede dölllenme gerçekleşikten sonra çiçeğin yumurtalığı gelişerek baklayı oluşturur. Oluşan bakla (legume) fasulye bitkisinin meyvesidir. Çeşit özelliğine ve çevre şartlarına bağlı olarak bitkide 4 ile 29 adet arasında bakla bulunabilmektedir (Çiftçi ve Şehirali, 1984). Bodur çeşitlerde ana saptaki bakla sayısı bitkideki toplam bakla sayısının %20'sinden daha az olmaktadır. Sırık çeşitlerde ise bu oran %70'inden fazladır. Çiçeklenmeden sonraki 5-6 gün içerisinde bitkideki toplam baklaların %90'ı oluşmaktadır (Chung ve diğerleri, 1991).

2.3. *Xanthomonas Axonopodis* pv. *Phaseoli* Hakkında Genel Bilgiler

Fasulyede verim ve kalite kayıplarına sebep olan ve Dünya'da yaygın görülen 4 adet bakteriyel hastalık vardır. Bunlar; *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*'dir (Hall, 1994; Howard ve diğerleri, 1994; Agrios, 1997). Bu patojenlerin içinde *X. axonopodis* pv. *phaseoli* tohum kökenli olup, nemli ve ılık koşullarda epidemi oluşturmaktadır. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* bakterisinin neden olduğu bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığı ilk olarak Halsted tarafından 1893 yılında tespit edilmiştir. Smith ise 1897 yılında bu bakteriyi izole edip isimlendirmiş ve tanımlamıştır (Zaumeyer, 1930). Patojen zararlı etkilerini daha çok tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde göstermektedir (Vandemark ve diğerleri, 2008). Gram negatif ve aerobik bir bakteri olan *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, fasulyenin birçok türünde enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir. Tohum, hastalığın yayılmasında çok önemli bir faktördür çünkü bu patojenin canlılığı, tohumda 30 yıla kadar muhafaza edilebilmektedir (Dursun ve diğerleri, 2002). Bu hastalık bitkinin tüm toprak üstü kısımlarında enfeksiyona sebep olabilir ancak bakla ve yapraktaki belirtileri daha fazladır. Hastalığın tipik belirtisi yaprak üzerindeki nekrotik lezyonlar ve bu lezyonları çevreleyen açık, sarı renkteki halelerdir. Yaprakların kenarlarında veya damarları arasında bulunan bu lezyonlar, büyüdükçe yanık bir görünüme dönüşmektedir (Şekil 2.3; Schwartz, 2008). Ayrıca bakterinin çoğalması için uygun olan iklim şartlarında, kapsüller üzerindeki lezyonlardan genellikle bakteriyel sızıntılar gözlenmektedir. Enfekte olmuş tohumlarda şekil bozuklukları görülebilmekte ve çimlenme yeteneklerini kaybetmektedirler (Hall,

1994). Tohumlarda görülen bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığı belirtileri Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Wallen, 2004).



Şekil 2.3. Bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığının yaprak üzerindeki belirtisi (Schwartz, 2008).



Şekil 2.4. Fasulye tohumlarında görülen bakteriyel adi yaprak yanıklığı belirtileri (Solda sağlıklı tohum, sağda enfekte olmuş tohum görselleri) (Wallen, 2004).

Bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığı, yüksek nem, sıcaklık ve yağıştan sonra havanın kuruması durumunda, fasulye popülasyonlarında %40'ın üzerinde verim kayıplarına yol açabilmektedir (Seattler, 1989). Bu nedenlerden dolayı hastalıkla mücadele etmek için temiz sertifikalı tohum kullanımı, tohumların antibiyotikle muamele edilmesi, uzun süreli ürün rotasyonları ve bakırlı preparatların kullanımı tavsiye edilmektedir (Mutlu, 2005).

2.4. Bakteriyel Adi Yaprak Yanıklığı Hastalığının Dayanıklılık Kaynakları

Fasulye üretiminde bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı en etkili ve çevreye duyarlı kontrol yöntemi, dayanıklı çeşit kullanımıdır. Fasulyede bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı genetik dayanıklılık kaynakları literatürde tanımlanmıştır. Dayanıklılığın çoğu çok genle kontrol edilen karakterler (QTL) olduğu tespit edilmiştir ve dayanıklılık düzeyleri farklılık göstermektedir. Ayrıca dayanıklılık çevresel koşullardan etkilenmektedir (Kelly ve diğerleri, 2003). Zapata ve diğerleri (2010), fasulyede bakteriyel adi yaprak yanıklığı dayanımının dominant genler tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir.

DNA tabanlı moleküler işaretleyiciler teknolojisi, bitki ıslah çalışmalarında fasulye ıslahçıları için alternatif bir yöntem olmuştur (Tanksley ve diğerleri, 1989). Moleküler işaretleyici, bir kromozom üzerinde bulunan ve referans noktası olarak kullanılabilen bir gen veya DNA parçası olarak tanımlanabilmektedir (Weber ve Wricke, 1994). DNA tabanlı moleküler işaretleyiciler, çevresel faktörlerden etkilenmezler ve laboratuvar ortamında doğru ve otomatik olarak analiz edilebilmektedirler. Son yıllarda moleküler işaretleyicilerin geliştirilmesi ve uygulanması konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Kangfu ve diğerleri, 2012).

Bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklı fasulye bitkileri, yapraklarda bakteri popülasyonunun birikmesini azaltabilmekte veya tohum içi enfeksiyonu engelleyerek *X. axonopodis* pv. *phaseoli* patojeninin vasküler dokular yoluyla hareketini bir şekilde azaltabilmekte veya durdurabilmektedir (Goodwin ve diğerleri, 1995).

Fasulyede bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı genetik dayanıklılık, çalı fasulyesi (*P. coccineus*) ve çay fasulyesi (*P. acutifolius*) ile kıyaslandığında çalı fasulyesinde nispeten daha düşüktür (Singh ve Munoz, 1999; Mohan, 1982). *P. coccineus*'taki adi yaprak yanıklığı hastalığı dayanıklılığının genetiği büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, *P. coccineus*'tan düşük ila orta düzeydeki dayanıklılık, fasulyeye aktarılmıştır (Miklas ve diğerleri, 1994).

Freytag ve diğerleri (1982) tarafından piyasaya sürülen XR-235-1-1 fasulye hattı için bakteriyel adi yaprak yanıklığı dayanıklılık kaynağı, çalı fasulyesinin (*P. coccineus*) PI273667 genotipidir. PI273667'den türetilen iki QTL *X. axonopodis* pv. *phaseoli* direnci, XR-235-1-1 fasulye hattında tanımlanmıştır ve birlikte bakteriyel adi yaprak yanıklığı dayanımı için fenotipik varyasyonun yaklaşık %27'sini oluşturduğu belirtilmiştir (Yu ve diğerleri, 1998).

C1, C2, C3 ve C4 olarak adlandırılan 4 adet bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklı hat, fasulye ve *P. coccineus* arasındaki spesifik çaprazlamalarla geliştirilmiştir (Park ve Dhanvantari, 1987). Miklas ve diğerlerine (1994) göre, TARS VCI-4B çoklu hastalık dayanıklılık hattı, PI311950 ve PI311977 genotiplerinden gelmektedir. Ayrıca Miklas ve diğerleri (1999), bakteriyel adi yaprak yanıklığı dayanımlarını ya *P. coccineus*'tan ya da Etiyopya fasulyesi çeşitlerinden alan 4 farklı *X. axonopodis* pv. *phaseoli* dayanıklılık genini (ICB-3, ICB-6, ICB-8 ve ICB-10) açıklamışlardır.

Singh ve Munoz (1999), 4 Phaseolous türünde 55 adet çalı (*P. coccineus*) fasulyesini de içeren 166 tane umut verici gen kaynağını taramışlardır ve *P. coccineus*'ta dayanıklılığın orta derecede bir dayanıklılık olduğunu bulmuşlardır. Çizelge 2.2'de, fasulye ıslahçıları tarafından yaygın olarak kullanılan başlıca *X. axonopodis* pv. *phaseoli* dayanıklılık kaynakları özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. *Phaseolus* türlerinde tespit edilen önemli bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklılık genleri ve moleküler işaretleyicileri

Gen Kaynağı	Hat	Gen/QTL Numarası	Moleküler İşaretleyici	Açıklanmış Fenotipik Varyasyon (R ²)
Montana No. 5	GN#1 GN#1Sel 27	-	SAP6	%35
BAC6	-	3	BC409	%12 (ilk üç yapraklı yapraklar); %13 (sonradan gelişen Üç yapraklı yapraklar) 17%(baklalar)
			K19	
BAT 93	-	4	-	%75 (tüm QTL'ler)
Belneb RR-1	-	4	W10	%44 (ilk üç yapraklı Yapraklar); %41 (baklalar)
	PR0313-58	1	SAP6	%55
PI 440795	OAC-88-1	2	R7313	%81 (tüm QTL'ler)
	OAC-Rex	3	PV-ccct-001	%42,2 (Bir QTL)
PI 319443	XAN 159	4	BC420 SU91	%28 (yapraklar); %11 (bakla); %18 (tohumlar)
	HR 45	2	BC420	%25-52
	HR 67	2	BC420	%70
G40001	VAX 1 VAX 2 VAX 3 VAX 4 VAX 5 VAX 6	-	--	-
PI 273667	XR235-1-1	2	-	%27
PI 311950 PI 311977	TARS VCI-4B	-	-	-
PI 165421	C1 C2 C3 C4	-	-	-

2.5. Fasulye Adi Yaprak Yanıklığı Hastalığı Üzerine Yapılan Çalışmalar

Dursun ve diğerleri (2002), fasulye genotiplerinde adi bakteriyel yanıklığı hastalığına karşı dayanıklılığı belirlemek üzere araştırma yapmışlardır. Türkiye'de yetiştirilen taze ve kuru fasulye çeşitlerini/hatlarını içeren yirmi iki fasulye genotipi, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmıştır ve *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 'nin MFD-11 ırkına karşı direnç açısından test edilmiştir. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ye dirençli bulunan AG-7117 hariç, test edilen tüm fasulye hatları/çeşitleri orta derecede duyarlı, duyarlı veya yüksek düzeyde duyarlı olarak sonuç vermiştir. Bu, bir fasulye hattında (AG-7117) *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 'ye karşı direnç kaynağının ilk raporudur.

Mutlu ve diğerleri (2008), bir donör ebeveynde adi yaprak yanıklığına direnç için kantitatif özellik lokusları (QTL) ile bağlantılı moleküler işaretleyicilerin yardımıyla geri melezleme yaklaşımının barbunyada adi yaprak yanıklığına karşı daha yüksek direnç seviyeleri elde etmek için kullanılıp kullanılamayacağını belirlemek için araştırma yapmışlardır. Donor ebeveyn olan XAN 159'dan gelen QTL adi yaprak yanıklığı direnci, klasik geri melezleme ve moleküler işaretleyicilere dayalı seçim kullanılarak tekrarlayan ebeveyn olan 'Chase'e dahil edilmiştir. 'Chase' pinto fasulyesi orta derecede dirençlidir ve XAN 159 hattı, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 'ye karşı oldukça dayanıklıdır. Moleküler işaretleyici analizleri, adi yaprak yanıklığı direncine sahip geri melezleme türevli barbunya hatlarında GN no. 1 Sel 27 ve XAN 159'dan bağımsız QTL'nin varlığını doğrulamıştır. Chase çeşidinin agronomik tüm karakterleri geri melezlemeyle elde edilmiş tüm hatlarda geri kazanılmıştır.

Poyraz ve diğerleri (2017), 12 yerel fasulye çeşidinde (Aslan, Elinda, İstanbul, Bursa, Flash, Belluga, White cordinal, Beryl, Yunus-90, Göynük-98, Önceler-98, Eskişehir-855), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *X. axonopodis* pv. *phaseoli* hastalıklarına karşı bazı dayanıklılık genlerinin belirlenmesini amaçlamışlardır. SR13, ST8, SH11 ve SB10 olan 4 adet dayanıklılık genini *P. syringae* pv. *phaseolicola* hastalığı için, SU91, BC420, BAC6, SAP6, R4864 ve R7313 olan 6 adet dayanıklılık genini *X.*

axonopodis pv. *phaseoli* hastalığı için taramışlardır. Özel SCAR moleküler işaretleyicileri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemini kullanarak her bir dayanıklılık genini test etmişlerdir. Aslan ve Beryl olan 2 fasulye çeşidinin *P. syringae* pv. *phaseolicola*'ya karşı 4 dayanıklılık genini de içerdiğini ayrıca bu iki çeşidin tarlada bu hastalığa karşı daha dayanıklı olduğunu gözlemlemişlerdir. 12 fasulye çeşidinde de tüm dayanıklılık genleri için analizler yapılmış, tarladaki dayanıklılık oranları ile karşılaştırılarak sonuçlar elde edilmiştir.

Jung ve diğerleri (1997), amplifiye polimorfik DNA (RAPD) moleküler işaretleyicileri, bakteriyel hastalık direncinin genetiğini incelemek üzere rekombinant inbred populasyonları PC-50 x XAN-159 melezinden genetik bağlantı haritası oluşturmak için kullanmışlardır. Kendi içinde melezlenmiş 70 adet rekombinant hat, bakteriyel adi yaprak yanıklığının iki ırkına karşı dayanıklılık açısından değerlendirilmiştir. Bir ila dört kantitatif karakter lokusu (QTL), ırklar için fenotipik varyasyonun %18 ila %53'ünü kapsamaktadır. Adi yaprak yanıklığı direnci için en önemli etkiler, kısmi bağlantı haritasının bağlantı grubu 5 üzerindeki bir kromozomal bölge ve bağlantı grubu 1 üzerindeki iki bölge ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca V lokusunun, adi yaprak yanıklığı direnci üzerinde büyük bir etkisi olan bir QTL ile bağlantılı olduğu tespit etmişlerdir.

Chirwa ve diğerleri (2011), Malavi'de baklada bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığının direnç kalıtımını belirlemek için çalışma yapmışlardır. Malavi'deki yerel türlerden (Chimbamba ve Nasaka) iki fasulye çeşidi, hassas ebeveynler olarak kullanılmıştır. Vax 6 ise donör (dirençli) hat olarak kullanılmıştır. Serada F2 polülasyonları oluşturulup, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* hastalığı direnci açısından değerlendirilmiştir. Üç hassas ebeveynden gelen popülasyonlardan elde edilen verileri kullanan Ki-kare testi, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* direnç kalıtımının, olası minör gen kalıtımı olan iki büyük gen tarafından kontrol edildiğini göstermiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Bitki Materyali

Bu çalışmada Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen taze fasulye çeşitlerinden Volare, Gina (May), Asya, Leziz, Olivin, Sarıkız, Magnum, Bourgondia ve Balkız olmak üzere toplamda 9 ticari çeşit kullanılmıştır. Bu çeşitlerden Asya, Olivin, Gina, Volare, Magnum, Leziz çeşitleri May Agro Tohumculuk San ve Tic. A.Ş. firmasından, Bourgondia çeşidi Monsanto Gıda ve Tarım Tic. Ltd. Şti firmasından, Sarıkız çeşidi İstanbul Tohumculuk San. Tic. Ltd. Şti firmasından, Balkız çeşidi ise Bursa Tohumculuk Ziraat ve Ticaret A.Ş. firmasından tedarik edilmiştir. Asya, Olivin, Gina ve Bourgondia çeşitlerinin tohum rengi beyaz, diğer çeşitlerin tohum rengi ise kahverengidir.

Çalışmada kullanılan 9 ticari çeşidin hepsi bodur büyüme tipine sahiptir ve taze tüketime uygundur. Asya ve Olivin çeşitleri taze tüketime ek olarak sanayi tüketimi için de yetiştirilmektedir. Asya ve Olivin çeşitleri hem makineli hasada hem de elle hasada uygundur. Diğer çeşitler ise elle hasada uygun olarak geliştirilmiş çeşitlerdir.

Çeşitlerin bakla tipi, bitkideki bakla sayısı bakla uzunluğu, bakla eni, bakla parlaklığı ve bakla rengi Çizelge 3.1’de verilmiştir. Olivin hariç tüm çeşitler yassı bakla tipine sahiptir. Olivin ise yuvarlak bakla tipine sahiptir. Olivin, Volare, Bourgondia, Sarıkız ve Balkız çeşitlerinin baklası parlak görünümlüdür. Asya, Gina ve Magnum çeşitlerinin baklası hafif mattır. Leziz çeşidi ise çok parlak bakla yapısına sahiptir (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan çeşitlerin fenolojik özellikleri

ÇEŞİT	BAKLA TİPİ	BİTKİDEKİ BAKLA SAYISI	BAKLA UZUNLUĞU (cm)	BAKLA ENİ (mm)	BAKLA PARLAKLIĞI	BAKLA RENGİ
Asya	Yassı	17-18	17-18	16-17	Hafif Mat	Açık Yeşil
Olivin	Yuvarlak	20-21	14-15	9-11	Parlak	Orta Yeşil
Gina	Yassı	15-16	16-17	17-18	Hafif Mat	Orta Yeşil
Volare	Yassı	18-19	16-17	16-17	Parlak	Koyu Yeşil
Magnum	Yassı	19-20	20-21	14-15	Hafif Mat	Açık Yeşil
Leziz	Yassı	17-18	17-18	18-19	Çok Parlak	Çok Koyu Yeşil
Bourgondia	Yassı	17-18	19-20	19-20	Parlak	Koyu Yeşil
Sarıköz	Yassı	18-19	17-18	16-17	Parlak	Koyu Yeşil
Balkız	Yassı	17-18	16-17	16-17	Parlak	Koyu Yeşil

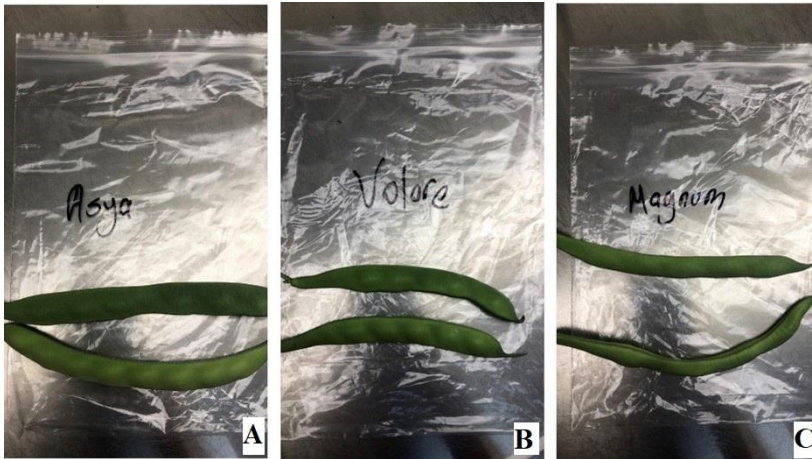
Ayrıca araştırmada kullanılan 9 çeşitten Gina, Leziz ve Balkız'ın bakla görselleri Şekil 3.1'de, Olivin, Sarıköz ve Bourgondia'nın bakla görselleri Şekil 3.2'de, Asya, Volare ve Magnum'un bakla görselleri ise Şekil 3.3 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. A) Gina, B) Leziz ve C) Balkız çeşitlerinin bakla görselleri



Şekil 3.2. A) Olivin, B) Sarıkız ve C) Bourgondia çeşitlerinin bakla görselleri



Şekil 3.3. A) Asya, B) Volare ve C) Magnum çeşitlerinin bakla görselleri

3.2. Bitki Yetiştirmede Kullanılan İklim Koşulları

Bu çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerine ait bitkileri yetiştirmek için Bursa May Tohum A.ř. firmasının Yıldırım/Samanlı'daki merkez bitki yetiştirme seraları kullanılmıştır. İklimlendirme, seralarda tam otomatik kontrollü sistem ile yapılmaktadır. Işıklandırma için bitki büyümesini destekleyen 370 – 420 nm dalga boyundaki led ışıklar kullanılmıştır. Sulama, bitkiler viyoldeyken sabah saatlerinde her gün, bitkiler saksıda iken haftada 2 gün 45'er dakika damlama sulama sistemi ile uygulanmıştır.

3.3.Tohum Ekimi

Tohumlar firmalardan temin edildikten sonra her bir çeşitten 10 adet olacak şekilde 2 birim torf (QTS Substrate Professional) 2 birim kokopit, 1 birim perlit ve 1 birim akıllı gübre (osmocote) karışımı olan viyollere ekilmiştir. Yaklaşık 2 hafta, gerçek yaprak gelişinceye kadar viyollerde büyütlümüştür. Bitkilerin viyoldeki görüntüsü şekil 3.4'te verilmiştir.



şekil 3.4. Viyoldeki fasulye bitkilerinin genel görüntüsü

3.4. Patojenite Analizleri

Çalışmada hem fasulye baklasında hem de yaprağında olmak üzere 2 farklı inokülasyon yöntemi kullanılmıştır.

3.4.1. Çoklu iğne yöntemi ile yaprağa bakteri inokülasyonu metodu

Çoklu iğne yöntemi ile yaprağa bakteri inokülasyonu metodu için kullanılan malzemeler;

- Torf ve cocopeat karışımı yetiştirme ortamı
- Test edilecek fasulye tohumları
- Dayanıklı kontrol grubu tohumları
- Hassas kontrol grubu tohumları
- *X. axonopodis pv. phaseoli* bakteri kültürü
- TSA katı besiyeri
- Steril petri
- 28'lik viyol
- İğne
- 50 ml' lik tüp
- 100 ml' lik şişe veya beher
- Öze

Çoklu iğne yöntemi ile yaprağa bakteri inokülasyonu metodu için kullanılan cihazlar;

- Sterilizatör
- Vorteks
- Otoklav
- Steril kabin
- Etüv
- Spektrofotometre

Bu test, fasulye bitkisinin, fasulyede adi yaprak yanıklığı hastalığına neden olan *X. axonopodis pv. phaseoli* bakterisine dayanıklılığının tespiti için yapılmıştır. İlk aşamada bakteri kültür çoğaltımı ve solüsyon hazırlanmıştır.

Ön hazırlık aşamasında TSA (Tryptone Soy Agar) – katı ortamı aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

1. 1 litre distile su içerisine 40 g hazır toz halindeki TSA (MERCK®) eklenmiştir.
2. Şişenin kapakları kapatılarak tozun su içinde çözünmesi için iyice çalkalanmıştır.
3. Şişe kapağı biraz gevşetilerek 121 °C 'de otoklavın sıvı programında steril edilmiştir.
4. Steril kabin içerisinde, her bir steril petri kutusuna 20-25 ml dökülmüştür.
5. Besi yeri ortamı katılaştıktan sonra petri kutularının kapakları kapatılmıştır.
6. Bakteri ekiminde kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklanmıştır.

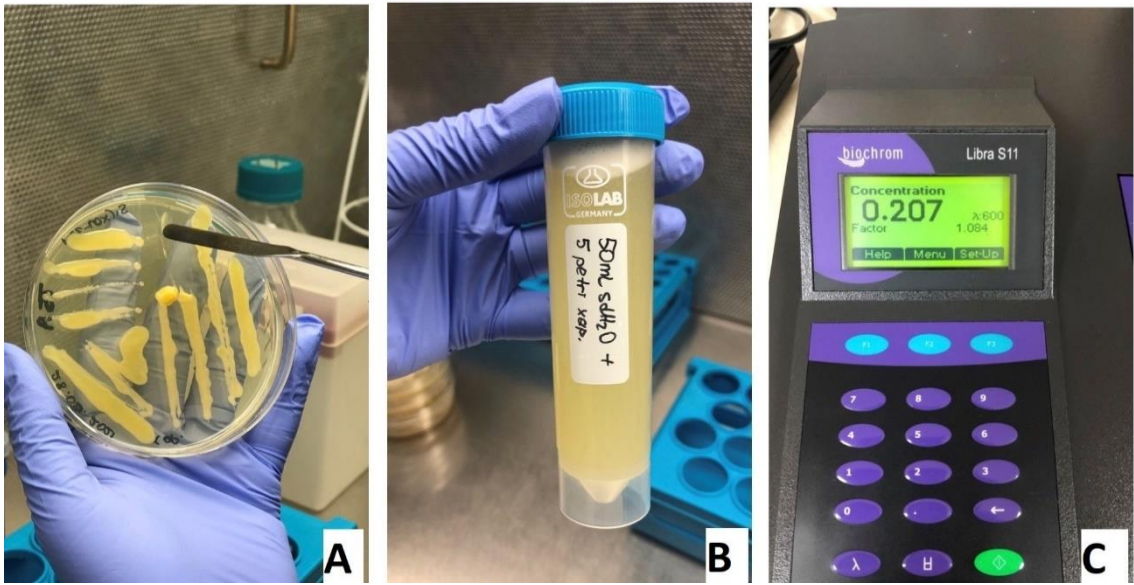
Bakteri ekimi için *X. axonopodis pv. phaseoli* (Xap) stok kültürü, steril kabinde, steril bir öze kullanılarak yeni TSA besiyerlerine aktarılmıştır. 27-28 °C'deki etüvde bekleyen bakteri kültürleri yaklaşık 2 gün içerisinde gelişimini tamamlamıştır. Çoğaltılan bakteri kültürü Şekil 3.5'te gösterilmektedir.



Şekil 3.5. TSA ortamında çoğaltılan bakteri kültürü

Bakteri solüsyonu hazırlığı için, taze bakteri kültürleri besiyerlerinden kazınarak alınmış ve bir beher içinde steril distile suya eklenmiştir. Solüsyon homojen oluncaya kadar

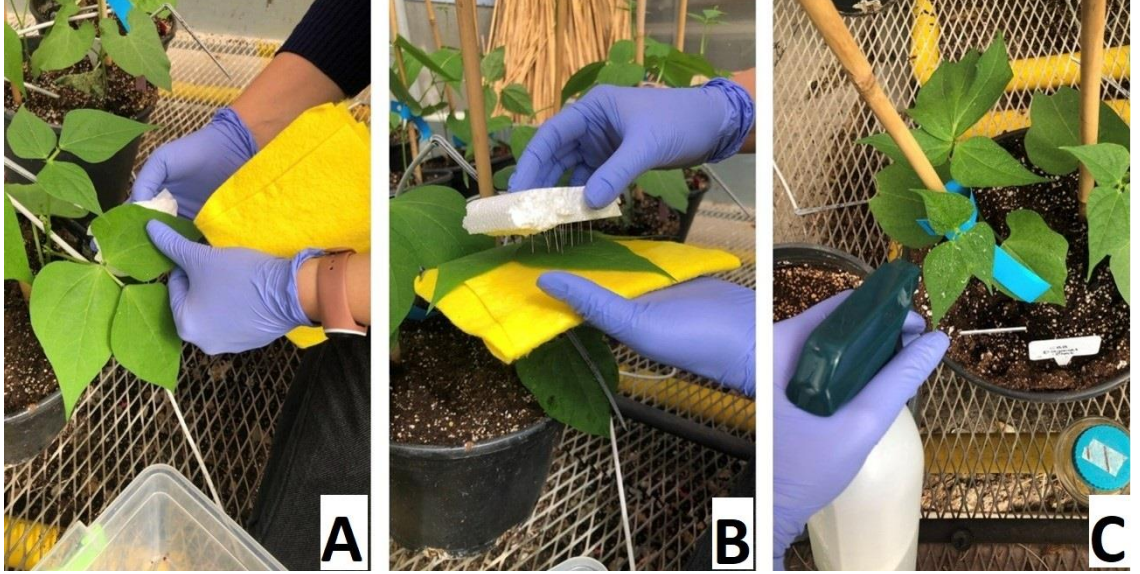
karıştırılmıştır. Hazırlanan solüsyonun konsantrasyon ölçümü, spektrofotometre cihazında yapılmıştır. Solüsyon, cihazın küvetine koyulup, küvet cihaza yerleştirilmiştir. 600 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak alınan sonucun 0,2 değerinde olması sağlanmıştır. Bu değer, bakteri konsantrasyon 10^8 bakteri/ml olduğunu belirtmektedir. İnokülasyon için hazırlanması gereken bakteri yoğunluğu 10^8 bakteri/ml'dir. Hazırlanan solüsyonun konsantrasyon değeri uygun değilse, solüsyon daha derişik veya seyreltik bir hale getirilerek istenilen değere ulaştırılmıştır. Şekil 3.6'da bu aşamalar gösterilmektedir.



Şekil 3.6. Bakteri solüsyonu hazırlama aşamasından görüntüler. **A)** TSA besi ortamı üzerinde çoğaltılan bakterilerin öze yardımıyla ortamdan alınması **B)** Xap bakterilerinin distile su içerisinde karıştırılarak homojen hale getirilmesi **C)** Bakteri konsantrasyonun spektrofotometre ile ölçülmesi

İkinci aşama inokülasyon aşamasıdır. Yaprak inokülasyonu için çoklu iğne metodu kullanılmıştır. Viyollerde büyütülen fasulyeler fide boyutuna geldiğinde saksılara şaşırtılmıştır. Bitkiler 4-6 yaprak aşamasında iken canlı sağlıklı olan yaprak seçilerek uygulama yapılmıştır. Çoklu iğne metodunda, 8-10 adet toplu iğne, strafor vb. bir malzemeye saplanarak kullanılmıştır. Bakteri solüsyonu, sıvıyı bünyesinde tutan steril bir beze dökülüp, bez yaprağın altında tutulurken, iğneler ile yaprağın üstünden hafifçe delik açılmıştır (Şekil 3.7). Böylece zedelenen yerden bakterilerin nüfuz etmesi hedeflenmiştir.

Enfekte edilen bitkilerin üzerleri plastik örtü ile kapanmıştır. Yaprak yüzeyinin nemli kalması için sprej yardımıyla düzenli olarak su püskürtülmüştür.



Şekil 3.7. Çoklu iğne yöntemi ile yaprağa inokülasyon uygulaması. **A)** Canlı ve taze yaprağın seçilmesi **B)** Bakteri solüsyonuna batırılan iğnelerin yaprağa uygulanması **C)** Sprey ile yapraklara su püskürtülerek nemli bir ortam oluşturulması

Üçüncü aşama ise gözlem ve değerlendirme aşamasıdır. İnokülasyondan sonraki 5 gün semptomların gelişmesi kontrol edilmiştir. 7. Gün ise gözlem sonuçları alınmıştır.

3.4.2. Kürdan yöntemi ile baklaya bakteri inokülasyonu metodu

Kürdan yöntemi ile baklaya bakteri inokülasyonu metodu uygulanırken kullanılan malzemeler;

- Torf ve cocopeat karışımı toprak
- Test edilecek fasulye tohumları
- Dayanıklı kontrol grubu tohumları
- Hassas kontrol grubu tohumları
- Bakteri kültürü
- TSA katı ortamı
- Steril petri

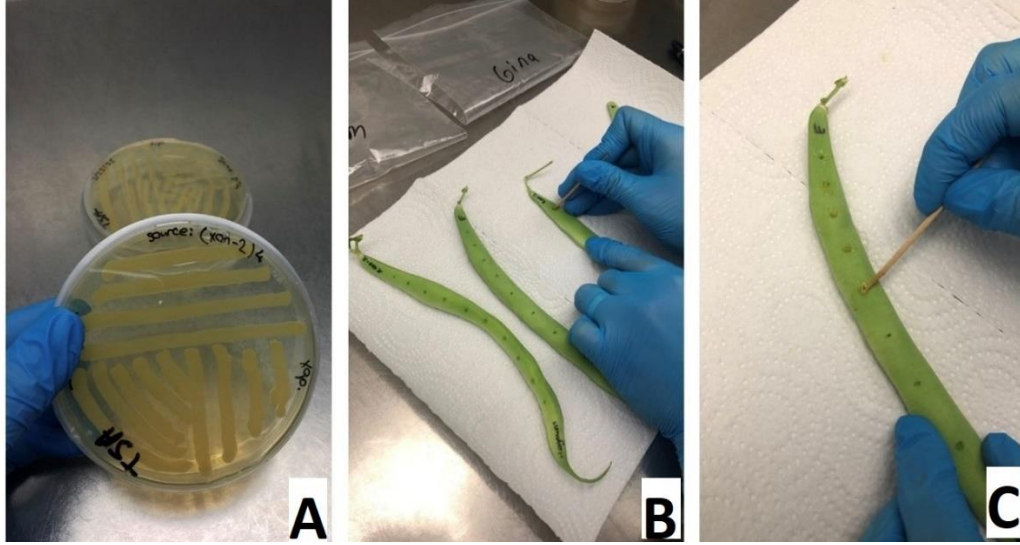
- 28'lik viyol
- 50 ml' lik tüp
- 100 ml' lik Şişe veya beher
- Steril  ze

K rdan yöntemi ile baklaya bakteri inokülasyonu metodu uygulanırken kullanılan cihazlar;

- Boncuk sterilizatör
- Vorteks
- Otoklav
- Steril kabin
- Etüv
- Spektrofotometre

İlk aşamada bakteri kültür çoğaltımı ve solüsyon hazırlanmıştır. Bunun için *X. axonopodis pv. phaseoli* stok kültürü steril kabinde, steril bir  ze kullanılarak yeni TSA besi yerlerine aktarılmıştır. 27-28  C sıcaklıkta, etüvde bekleyen bakteri kültürleri, 2 gün içerisinde gelişimini tamamlamıştır.

İkinci aşama ise bakla inokülasyonu aşamasıdır. Viyollere ekilen fasulyeler fide dönemindeyken saksılara ŐaŐırtılıp bakla meyve dolum dönemine gelene kadar b y t lm Őtır. İnokülasyon için meyve dolum dönemi geçmeyen yeşil baklalar henüz sulu dönemde iken toplanılıp kullanılmıştır. Baklaların dıŐ yüzeyleri %70 oranındaki etanol ile silinip temizlenmiŐtır. DıŐ yüzeyleri temizlenen baklaların üzerine ortalama 5 mm aralıklarla k rdan yardımı ile delikler açılmıştır. Petrilerde büyümüŐ olan bakteriler, k rdan ile kazınarak açılan deliklere koyulmuştur. Şekil 3.8'de aşamalar g sterilmiŐtır.



Şekil 3.8. Kürdan ile bakla inokülasyonu aşamaları. **A)** TSA ortamında bakterinin çoğaltılması **B)** Kürdan yardımıyla baklaların üzerinde açılan delikler **C)** İnokule edilen kürdanların baklada açılan deliklere bulaştırılması

İnokule edilen baklalar plastik kaplara konulup üstleri kapatılmıştır. 25-26°C’de ve karanlık bir ortamda inkube edilmiştir. İnokülasyondan sonraki 5 gün semptomların gelişmesi kontrol edilmiştir. 7. Gün ise gözlem sonuçları alınmıştır.

3.5. DNA İzolasyonu

Bitkilerin kotiledon yapraktan sonra çıkan ilk gerçek yaprakları yaklaşık 20-50 mg olacak şekilde collection plate’e yerleştirilmiştir. -80 °C olan derin dondurucuda minimum 30 dakika bekletilerek donma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada Roche marka manuel DNA izolasyon Kiti (Roche® High Pure Nucleic Acid Kit) kullanılmıştır.

Bu kitin izolasyon aşamaları şu şekildedir;

3.5.1. Roche marka DNA izolasyon kiti içerisindeki kimyasallar

- Tissue lysis buffer
- Proteinase K
- Binding buffer

- Inhibitor removal buffer
- Washing buffer
- Elution buffer

3.5.2. DNA izolasyonunda kullanılan diğer kimyasallar

- Etanol
- Izopropanol

3.5.3. DNA izolasyonunda kullanılan sarf malzemeler

- Collection microtube plate
- Collection microtube caps
- 1,5 ml mikrosantrifüj kapaklı tüp
- Pipet ve pipet uçları

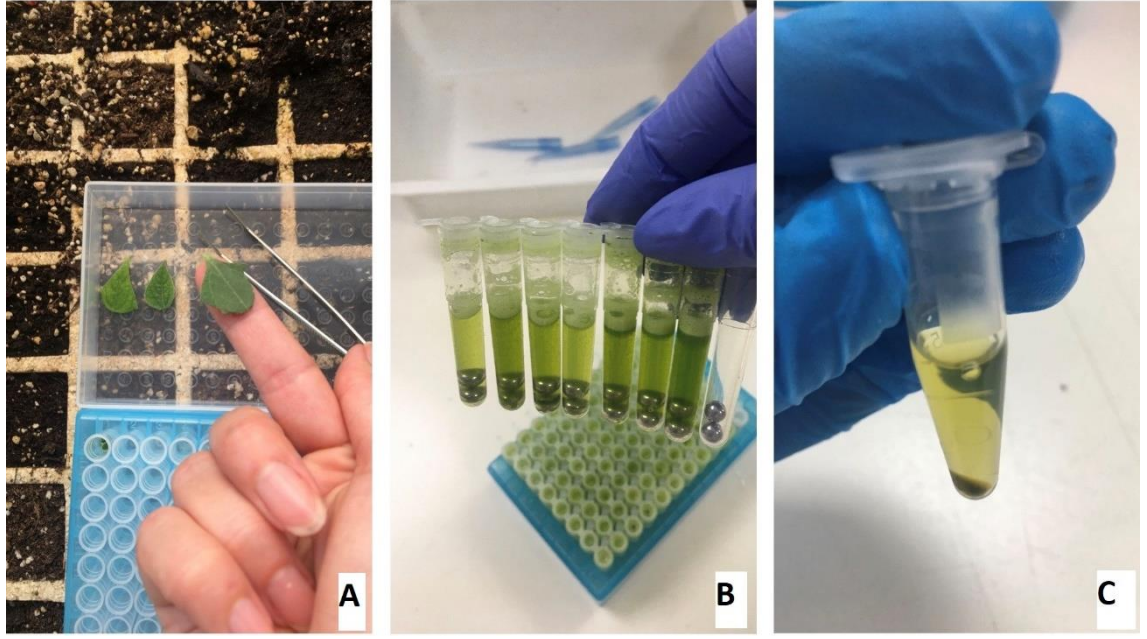
3.5.4. Ön hazırlık aşamaları

-80 °C derin dondurucudan çıkarılan yapraklar tissue lyser II cihazında, yapraklar un haline gelene kadar (yaklaşık 2 dakika) parçalanmıştır. Daha sonra aşağıdaki adımlar izlenmiştir;

1. Parçalanmış yaprakların üzerine 200 µl tissue lysis buffer ve 50 µl proteinase K eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
2. 56 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir.
3. 80 °C’ olan etüve alınarak 20 dakika boyunca burada inkübasyona bırakılmıştır.
4. Üzerlerine 200 µl binding buffer eklenerek vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
5. 72 °C olan etüvde 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. Çıkarılan numuneler 1,5 ml mikrosantrifüj kapaklı tüplere aktarılmıştır.
7. Her tüpe 150 µl izopropanol eklenerek pipet ile karıştırılmıştır.
8. Örnek sayısı kadar collection tube çıkarılıp her birine filtreli tüp yerleştirilmiştir. Hazırlanan bu karışımın sıvı kısmı toplama tüpündeki filtreli tüplere aktarılmıştır.
9. 8000 x g ‘de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

10. Toplama tüpü atılarak filtreli tüpler daha önceden hazırlanan yeni toplama tüpüne alınmıştır.
11. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklenmiştir.
12. 8000 x g 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Toplama tüpü atılıp, filtreli tüpler daha önceden hazırlanan yeni toplama tüpüne alınmıştır.
14. Her tüpe 500 µl wash buffer eklenmiştir.
15. 8000 x g 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
16. Toplama tüpü atılıp, filtreli tüpler daha önceden hazırlanan yeni toplama tüpüne alınmıştır.
17. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklenerek 8000 x g 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
18. Toplama tüpünde kalan sıvı dökülüp, filtreli tüp yeniden aynı toplama tüpüne konulmuştur.
19. Kimyasal koymadan 13000 x g'de 10-15 saniye santrifüj edilmiştir.
20. Filtreli tüpün altındaki toplama tüpünde kalan sıvı, tüple birlikte atılıp, filtreli tüp daha önceden hazırlanan temiz toplama tüpüne konulmuştur.
21. Üzerine 72 °C olan etüvden alınan elution buffer'dan 200 µl konulmuştur. (Çalışmaya başlamadan önce elution buffer 72 °C'de bekletilmiştir).
22. Filtreli tüplerin kapakları açık olacak şekilde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
23. Kapakları kapanan filtreli tüpler 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Bu aşamalar tamamlanarak DNA elde edilmiştir. DNA izolasyonuna ait bazı aşamalar Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Yaprak numunesi toplanması (A) ve DNA izolasyonu (B, C) aşamasından bazı görüntüler

3.6. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile DNA'nın Çoğaltılması

Bu çalışmada ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 9 taze fasulye çeşidinin adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklılıkları SU91 ve BC420 SCAR moleküler işaretleyicileri kullanılarak moleküler olarak belirlenmiştir (Shi ve diğerleri, 2012). Çizelge 3.2'de bu moleküler işaretleyicilerin primer dizileri, uzunlukları ve kromozom konumları ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan moleküler işaretleyicilere ilişkin bilgiler

Moleküler İşaretleyici	Kromozomun Konumu	Primer Dizileri (Sekansları)	Uzunluk (bp)	Kaynak
BC420-CG14 SCAR	6	F- cgagactcgtgtgctctctg R- acgaaggttgattcccagtg	519/425	Shi ve diğerleri, 2012
SU91-CG11 SCAR	8	F- atggtggagacgagatgacc R- tccgacattgaaaccagttg	464/425	Shi ve diğerleri, 2012

Her bir PCR reaksiyonu 2.5 µl PCR tamponu, 0.2 µl Taq DNA Polimeraz, 0.3 µl dNTP, 0.5 µl ileri primer, 0.5 µl geri primer, 1.5 µl MgCl₂, 16.5 µl distile edilmiş H₂O ve 3.0 µl DNA içermektedir. Her bir numune için toplam PCR reaksiyonu miktarı 25 µl'dir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. PCR ürünü hazırlama protokolü

Bileşenler	Miktar
10X PCR tamponu	2.5 µl
Taq DNA Polimeraz (5 U)	0.2 µl
dNTP (10 mM)	0.3 µl
F Primer (20 µM)	0.5 µl
R Primer (20 µM)	0.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dH ₂ O	16.5 µl
DNA (50-150 ng)	3.0 µl
TOPLAM	25.0 µl

Her bir taze fasulye çeşidinden 4'er numune olmak üzere toplam 36 numune ile çalışma yapılmıştır. Ek olarak, 4 adet homozigot dayanıklı kontrol çeşit olarak HR45-1445 (Shi ve diğerleri, 2011), 4 adet homozigot hassas kontrol çeşit olarak Phantom (PI 6106699) kullanılmıştır (Grin Global-US, 2021).

Ayrıca 2 adet homozigot dayanıklı kontrol çeşit olan XAN159 (McElroy, 1985), 2 adet homozigot hassas kontrol çeşit olan Phantom kullanılarak nihai toplamda 48 numune üzerinden PCR karışımları hazırlanmıştır.

Hazırlanan reaksiyonlar, PCR cihazına (Thermal Cycler) yerleştirilmiştir. Bu çalışmada Applied Biosystems marka konvansiyonel PCR cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. PCR cihazı görüntüsü

BC420 ve SU91 moleküler işaretleyicileri için Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te gösterilen PCR sıcaklık döngüleri dikkate alınarak DNA çoğaltımı tamamlanmıştır (Shi ve diğerleri, 2012).

Çizelge 3.4. BC420 moleküler işaretleyicisi için PCR sıcaklık döngüleri

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
1	94	180	1
2	94	30	35
	58	45	
	72	60	
3	72	300	1
4	4	∞	-

Çizelge 3.5. SU91 moleküler işaretleyicisi için PCR sıcaklık döngüleri

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
1	94	180	1
2	94	30	35
	60	45	
	72	60	
3	72	300	1
4	4	∞	-

3.7. Elektroforez Jel Görüntüleme Sistemi

Agaroz jel materyalini hazırlamak için önce içerisinde çözüneceği TBE (Tris/Borat/EDTA) tampon çözeltisi hazırlanmıştır. TBE; Tris bazı, borik asit ve EDTA'nın bir karışımını içeren bir tampon çözeltidir. (25 l için; 270 g Tris, 138 g Borik asit 46 g EDTA). Daha sonra %3'lük agaroz jel hazırlamak için cam behere 300 ml TBE tampon çözeltisi ve 9 gram toz agaroz kimyasalı eklenmiştir. Isıtıcıly manyetik karıştırıcıda karıştırılarak agarozun tampon çözeltide çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan

karışım katılaşmadan önce, jel elektroforez sisteminin tanklarına dökülmüştür. Agaroz jeli, yarım saat içinde soğuyup katılaşmış ve kullanıma hazır hale gelmiştir. Elde edilen PCR ürünleri hazırlanan %3'lük agaroz jellere yüklenmiştir. DNA'lar 120 volt ile elektroforez sisteminde 2 saat yürütülmüştür. Jeller yürütüldükten sonra ultraviyole ışık kullanılarak Jel Dokümantasyon (Bio-Rad®) cihazında görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.Patojenite Analizi Sonuçları

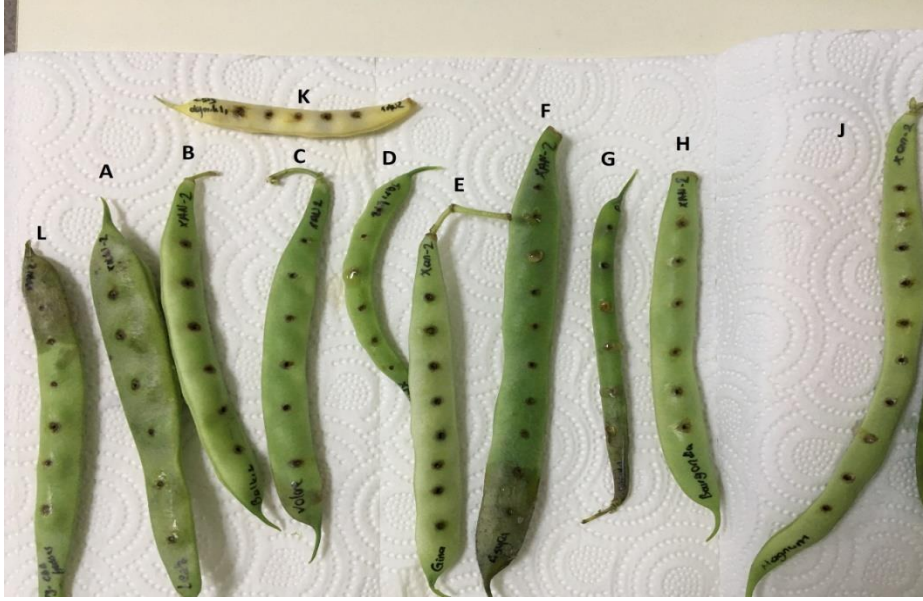
4.1.1. Bakla inokülasyonu analizi sonuçları

Kürdan ile bakla inokülasyondan sonraki 7. gün gözlemler alınmıştır. Gözlemler alınırken Çizelge 4.1’de bulunan 0-5 skalası uygulanmıştır (Dursun ve diğerleri, 2002; Lak ve diğerleri, 2002). Bu skalada 0; semptomsuz, çok dayanıklı, 1; dayanıklı, 2; az dayanıklı, 3: orta dayanıklı, 4; hassas, 5; çok hassas olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1. Hastalık reaksiyonlarındaki skalaların açıklaması

HASTALIK REAKSİYONLARI	
0	Görünen hiçbir semptomun olmaması durumu
1	Hafif göz ardı edilebilir nekrozların görülmesi durumu
2	İnokülasyon alanının %25'inin azında; ıslaklık, kloroz veya nekroz görülmesi durumu
3	İnokülasyon noktasının merkezinde ıslaklık oluşumu, kenarlarında daha sonra ortaya çıkan kahverengileşme ve %25-50 oranında nekroz görülmesi durumu
4	%50-75 oranında nekroz görülmesi durumu
5	Baklaların yeşil fakat inokülasyon bölgesinin tamamen kahverengileşmesi, ıslaklık oluşumu ve tam nekroz görülmesi durumu

İnokülasyonun 7. günündeki baklaların durumu Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Şekil 4.1’deki harflere karşılık gelen baklaların bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonraki gözlem sonuçlarının skalası Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, Gina ve Magnum skala 4, diğer çeşitlerin baklaları skala 5’e göre semptom vermiştir. Dolayısıyla, bakla inokülasyonu analizi sonuçlarına göre kullanılan tüm çeşitlerin bakteriyel yaprak yanıklığı hastalığına karşı hassas olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.1. Bakteri kültürü uygulanan baklaların 7. gün görüntüsü. **A)** Leziz **B)** Balkız **C)** Volare **D)** Sarıkız **E)** Gina **F)** Asya **G)** Olivin **H)** Bourgondia **J)** Magnum **K)** Dayanıklı Kontrol **L)** Hassas kontrol

Çizelge 4.2. Bakteri inokülasyonu sonrası gözlem sonuçları

HARF KODLAMASI	ÇEŞİT	GÖZLEM SONUCU SKALASI
A	LEZİZ	5
B	BALKIZ	5
C	VOLARE	5
D	SARIKIZ	5
E	GİNA	4
G	ASYA	5
F	OLİVİN	5
H	BOURGONDİA	5
J	MAGNUM	4
K	HR45-1445 (DAYANIKLI KONTROL)	1
L	PHANTOM (HASSAS KONTROL)	5

Bakla inokülasyonu sonunda dayanıklı kontrol çeşit olarak kullanılan HR45-1445 çeşidinde ıslaklık veya nekroz gibi semptomlar görülmemiştir. Baklalarda sadece kürdanın deldiği yerlerde ufak doku ölümleri oluşmuştur. Bakteri, dayanıklı çeşitte çoğalamamıştır (Şekil 4.1; K). Bakla inokülasyonu sonunda hassas kontrol çeşit olarak kullanılan Phantom çeşidinde ise baklaların yeşil olduğu fakat inokülasyon bölgesinin tamamen kahverengileşmesi, ıslaklık oluşumu ve tam nekroz oluşumu görülmüştür (Şekil 4.1; L).

4.1.2. Yaprak inokülasyonu sonuçları

Bakla inokülasyonu analizinde olduğu gibi bakteri inokülasyonundan sonraki 7. günde gözlem sonuçları alınmıştır. Yaprakta deliklerin açıldığı bölgelerde kahverengi kurumalar ve etrafında sarı renkli halkalar veya yaprak renginde açılmalar görünüyorsa bitki hassas, görünmüyorsa dayanıklı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca gözlemler alınırken Çizelge 4.3'te bulunan 1-5 skalası uygulanmıştır (Dursun ve diğerleri, 2002; Lak ve diğerleri, 2002). Bu skalada 0; semptomsuz, çok dayanıklı, 1; dayanıklı, 2; az dayanıklı, 3: orta dayanıklı, 4; hassas, 5; çok hassas olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.3. Hastalık reaksiyonlarındaki skalaların açıklaması

HASTALIK REAKSİYONLARI	
0	Görünen hiçbir semptomun olmaması durumu
1	Hafif göz ardı edilebilir nekroz görülmesi durumu
2	İnokulasyon alanının %25'inin azında; ıslaklık, kloroz veya nekroz görülmesi durumu
3	İnokulasyon noktasının merkezinde ıslaklık oluşumu, kenarlarında daha sonra ortaya çıkan kahverengileşme ve %25-50 oranında nekroz görülmesi durumu
4	%50-75 oranında nekroz görülmesi durumu
5	Lezyonlar birleşerek yaprak yüzeyinin %60-100'ünü kaplaması ve nekroz ile yaprak solması ve yaprak dökümü görülmesi durumu

Çizelge 4.3'teki gözlem skalası dikkate alınarak Çizelge 4.4'te verilen sonuçlara ulaşılmıştır. Buna göre Leziz, Balkız, Gina ve Asya çeşitleri skala 4, diğer çeşitler skala 5'e göre semptom vermiştir. Sonuç olarak kullanılan tüm ticari çeşitlerin bakteriyel adi yaprak yanıklığına hassas olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.4. Yaprak inokülasyonu sonrası gözlem sonuçları

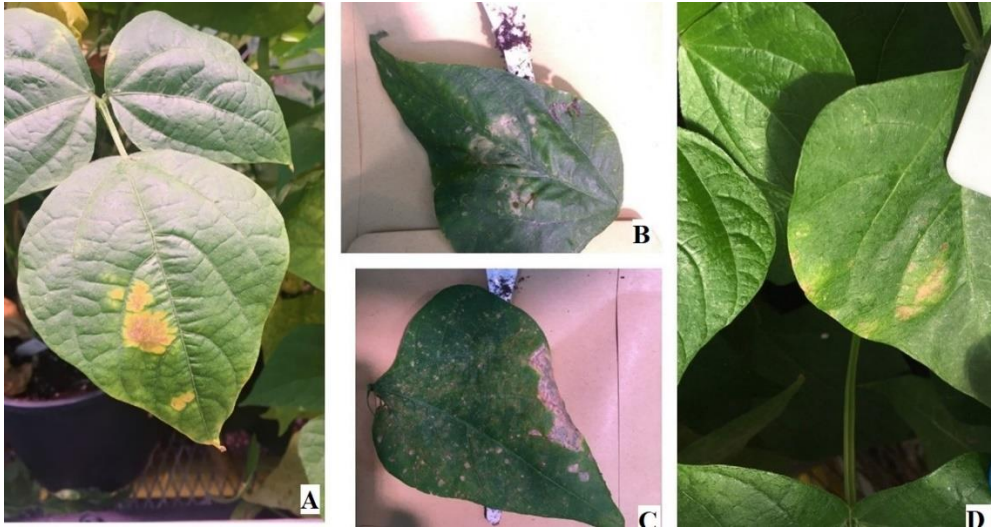
GENOTİP	GÖZLEM SONUCU SKALASI
LEZİZ	4
BALKIZ	4
VOLARE	5
SARIKIZ	5
GİNA	4
ASYA	4
OLİVİN	5
BOURGONDİA	5
MAGNUM	5
HR45-1445 (DAYANIKLI KONTROL)	1
PHANTOM (HASSAS KONTROL)	5

Yaprak inokülasyonu sonunda dayanıklı kontrol çeşit olarak kullanılan HR45-1445 çeşidinde ıslaklık, kuruma veya nekroz gibi semptomlar görülmemiştir. Yapraklarda sadece iğnenin deldiği yerlerde ufak doku ölümleri oluşmuştur. Bakteri, dayanıklı çeşitte çoğalamamıştır (Şekil 4.2; A). Yaprak inokülasyonu sonunda hassas kontrol çeşit olarak kullanılan Phantom çeşidinde ise enfekte olmuş bölgelerde kurumalar ve yanıklık gözlenmiştir (Şekil 4.2; B).



Şekil 4.2. Referans çeşitlerinin semptom görüntüleri. A) Dayanıklı kontrol çeşit (HR45) B) Hassas kontrol çeşit (Phantom)

Bununla birlikte Şekil 4.3'te, uygulanan bakteri inokülasyonu sonrasında görülen semptomların bazıları gösterilmiştir. Bakteri ile enfekte olan yapraklarda kurumalar, nekroz oluşumları ve ilerleyen safhalarda yaprak dökülmeleri gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Çoklu iğne yöntemiyle bakteri inokülasyonu sonrasında semptom gösteren bazı yapraklar. A) Volare B) Asya C) Sarıkız D) Leziz

4.2. DNA Kalite ve Miktar Tayini

Moleküler analizlerde kullanılmak üzere izole edilen genomik DNA'ların kalite ve miktar tayini nanodrop cihazı ile ölçülmüş ve ölçüm sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir. İzole

edilen fasulye genomik DNA miktarları yaklaşık 28 ng/μL ile 58 ng/μL arasında, DNA saflığı ise ortalama 1,547 olarak hesaplanmıştır.

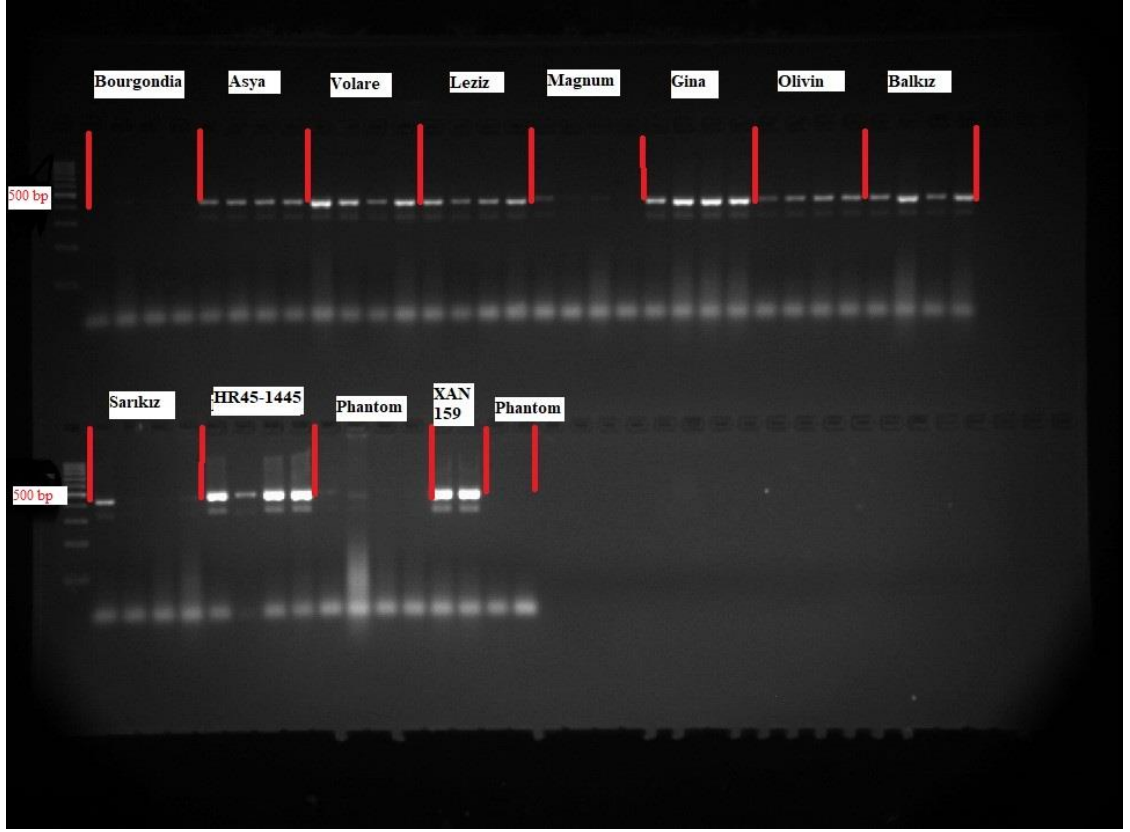
Çizelge 4.5. DNA kalite ve miktarları

Çeşit İsimleri	DNA Miktarı (ng/uL)	A260/ A280
BOURGONDİA-1	54.349	2.054
BOURGONDİA-2	47.645	2.079
BOURGONDİA-3	40.628	1.974
BOURGONDİA-4	33.604	2.036
ASYA-1	36.072	1.992
ASYA-2	37.426	2.029
ASYA-3	54.975	2.107
ASYA-4	44.265	2.109
VOLARE-1	28.561	2.050
VOLARE-2	36.928	2.100
VOLARE-3	37.608	2.038
VOLARE-4	39.682	2.194
LEZİZ-1	47.807	1.928
LEZİZ-2	38.521	2.026
LEZİZ-3	36.346	2.070
LEZİZ-4	42.170	2.156
MAGNUM-1	36.470	2.206
MAGNUM-2	35.678	2.138
MAGNUM-3	46.409	2.114
MAGNUM-4	48.834	2.076
GİNA-1	38.438	2.165
GİNA-2	48.926	2.136
GİNA-3	34.505	2.120
GİNA-4	47.143	2.046
OLİVİN-1	41.407	2.105
OLİVİN-2	43.424	2.034
OLİVİN-3	45.920	2.068
OLİVİN-4	42.585	2.075
BALKIZ-1	55.268	2.068
BALKIZ-2	55.224	2.045
BALKIZ-3	58.801	2.093
BALKIZ-4	38.355	2.003
SARIKIZ-1	46.105	1.966
SARIKIZ-2	47.944	2.095
SARIKIZ-3	49.674	1.914
SARIKIZ-4	36.147	2.001

4.3. Moleküler İşaretleyicileri Analiz Sonuçları

Tez çalışmasında, ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen taze fasulye çeşitlerinin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı dayanıklılığını belirlemek için SU91 ve BC420 moleküler işaretleyicileri kullanılmıştır. Bu hastalığa karşı dayanıklılık çok genle kontrol edilen bir karakter olduğu belirlenmiştir (Shi ve diğerleri 2012). SU91 gen bölgesinde tespit edilen dayanıklılık toplam dayanıklılığın %17'sini ve BC420 gen bölgesinde tespit edilen dayanıklılık ise %63'ünü temsil etmektedir (Shi ve diğerleri 2012). Dolayısıyla, bu iki moleküler işaretleyicisinin bulunduğu DNA bölgesindeki dayanıklılık allelleri toplam dayanıklılığın %80'ine karşılık gelmektedir. Bu iki dayanıklılık genini taşıyan fasulye çeşitlerinin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığından kaynaklanan önemli bir verim kaybı olmadan yetiştirilmesine imkan vermesi beklenmektedir.

Çalışmada kullanılan çeşitlerin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığının dayanımını belirlemek için kullanılan moleküler işaretleyicilerden biri SU91 moleküler işaretleyicidir. SU91 moleküler işaretleyicinin elektroforez jel görüntüsü sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. PCR ürünlerinin büyüklükleri GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific) kullanılarak tespit edilmiştir. Shi ve diğerlerine (2012) göre SU91 eş baskın bir moleküler işaretleyicidir. Dayanıklı geninin varlığında 464 baz çifti uzunluğunda bir DNA parçası çoğalmaktadır. Buna karşın bakteriyel adi yaprak yanıklığına hassas olan genin varlığında ise 425 baz çifti uzunluğunda bir DNA parçasının çoğaltılması beklenmektedir. Dayanıklı olduğu bilinen HR45-1445 ve XAN-159 genotiplerinde SU91 moleküler işaretleyicisinin 464 baz çifti uzunluğundaki dayanıklılık geni ile bağlantılı olan alleli çoğalmıştır (Şekil 4.4). Buna karşın Bourgondia çeşidi hariç tüm çeşitlerde SU91 moleküler işaretleyicisinin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığının karşı hassaslık geni ile bağlantılı olan 425 baz çifti büyüklüğündeki alleli çoğalmıştır (Şekil 4.4; Çizelge 4.6). Bu sonuç ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen taze fasulye çeşitlerinin adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklılık sağlayan SU91 DNA bölgesindeki genin hastalığa hassas olan genini taşıdığına işaret etmektedir.

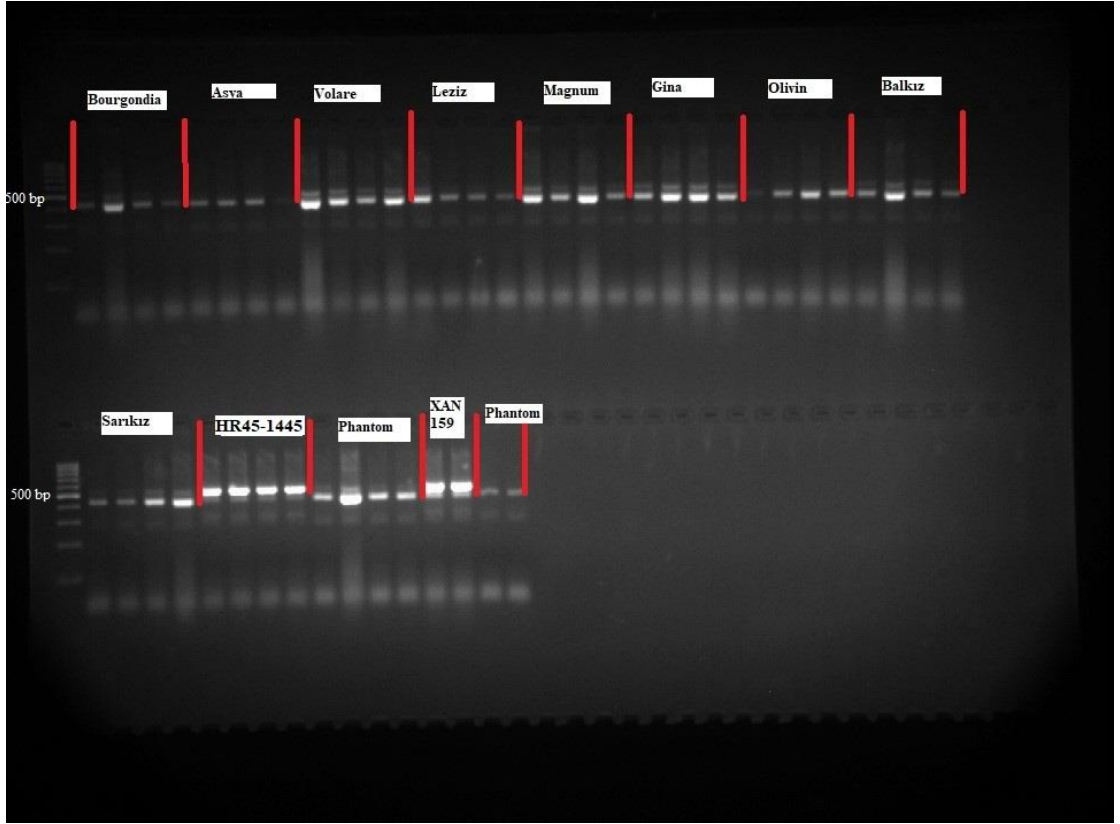


Şekil 4.4. SU91 moleküler işaretleyicisinin UV ışık altında elektroforez jel görüntüsü

Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan 9 fasulye çeşidinin adi yaprak yanıklığı hastalığının SU91 moleküler işaretleyicisine karşı dayanıklılık durumu

Plate Dizilimi	Sıra	Genotip	SU91
A1	1	BOURGONDİA-1	Reaksiyon yok
A2	2	BOURGONDİA-2	Reaksiyon yok
A3	3	BOURGONDİA-3	Reaksiyon yok
A4	4	BOURGONDİA-4	Reaksiyon yok
A5	5	ASYA-1	-
A6	6	ASYA-2	-
A7	7	ASYA-3	-
A8	8	ASYA-4	-
A9	9	VOLARE-1	-
A10	10	VOLARE-2	-
A11	11	VOLARE-3	-
A12	12	VOLARE-4	-
B1	13	LEZİZ-1	-
B2	14	LEZİZ-2	-
B3	15	LEZİZ-3	-
B4	16	LEZİZ-4	-
B5	17	MAGNUM-1	-
B6	18	MAGNUM-2	Reaksiyon yok
B7	19	MAGNUM-3	-
B8	20	MAGNUM-4	Reaksiyon yok
B9	21	GİNA-1	-
B10	22	GİNA-2	-
B11	23	GİNA-3	-
B12	24	GİNA-4	-
C1	25	OLİVİN-1	-
C2	26	OLİVİN-2	-
C3	27	OLİVİN-3	-
C4	28	OLİVİN-4	-
C5	29	BALKIZ-1	-
C6	30	BALKIZ-2	-
C7	31	BALKIZ-3	-
C8	32	BALKIZ-4	-
C9	33	SARIKIZ-1	-
C10	34	SARIKIZ-2	Reaksiyon yok
C11	35	SARIKIZ-3	Reaksiyon yok
C12	36	SARIKIZ-4	Reaksiyon yok
D1	37	HR45-1545 (RR)	+
D2	38	HR45-1545 (RR)	+
D3	39	HR45-1545 (RR)	+
D4	40	HR45-1545 (RR)	+
D5	41	PHANTOM (rr)	-
D6	42	PHANTOM (rr)	-
D7	43	PHANTOM (rr)	Reaksiyon yok
D8	44	PHANTOM (rr)	Reaksiyon yok
D9	45	XAN-159-RR	+
D10	46	XAN-159-RR	+
D11	47	PHANTOM-rr	Reaksiyon yok
D12	48	PHANTOM-rr	Reaksiyon yok

Tez çalışmasında kullanılan çeşitlerin adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanımını belirlemek için kullanılan diğer moleküler işaretleyici BC420 moleküler işaretleyicisidir. Bu moleküler işaretleyicisine ait elektroforez jel görüntüsü sonucu Şekil 4.5'te verilmiştir. PCR ürünlerinin büyüklükleri GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific) kullanılarak tespit edilmiştir. Shi ve diğerlerinin (2012) araştırmasına göre BC420 moleküler işaretleyicisi dayanıklı geninin varlığında 519 baz çifti uzunluğunda, hassas genin varlığında ise 425 baz çifti uzunluğunda DNA parçası çoğaltmaktadır. Bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklı olduğu bilinen HR45-1545 ve Xan-159 çeşitlerinde BC420 moleküler işaretleyicisi 519 baz çifti büyüklüğünde bir DNA parçası çoğaltmıştır (Şekil 4.5). Buna karşın hassas olduğu bilenen 'Phantom' çeşidinde ve tez çalışmasında kullanılan ticari çeşitlerde 425 baz çifti uzunluğunda bir DNA parçası çoğaltmıştır. Bu sonuca göre çalışmada kullanılan 9 çeşidin hepsinin BC420 geninin hassas allelini taşıdığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).



Şekil 4.5. BC420 moleküler işaretleyicisinin UV ışık altında elektroforez jel görüntüsü

Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan 9 fasulye çeşidinin adi yaprak yanıklığı (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) hastalığının BC420 moleküler işaretleyicisine karşı dayanıklılık durumu

Plate Dizilimi	Sıra	Genotip	BC420
A1	1	BOURGONDIA-1	-
A2	2	BOURGONDIA-2	-
A3	3	BOURGONDIA-3	-
A4	4	BOURGONDIA-4	-
A5	5	ASYA-1	-
A6	6	ASYA-2	-
A7	7	ASYA-3	-
A8	8	ASYA-4	-
A9	9	VOLARE-1	-
A10	10	VOLARE-2	-
A11	11	VOLARE-3	-
A12	12	VOLARE-4	-
B1	13	LEZİZ-1	-
B2	14	LEZİZ-2	-
B3	15	LEZİZ-3	-
B4	16	LEZİZ-4	-
B5	17	MAGNUM-1	-
B6	18	MAGNUM-2	-
B7	19	MAGNUM-3	-
B8	20	MAGNUM-4	-
B9	21	GİNA-1	-
B10	22	GİNA-2	-
B11	23	GİNA-3	-
B12	24	GİNA-4	-
C1	25	OLİVİN-1	-
C2	26	OLİVİN-2	-
C3	27	OLİVİN-3	-
C4	28	OLİVİN-4	-
C5	29	BALKIZ-1	-
C6	30	BALKIZ-2	-
C7	31	BALKIZ-3	-
C8	32	BALKIZ-4	-
C9	33	SARIKIZ-1	-
C10	34	SARIKIZ-2	-
C11	35	SARIKIZ-3	-
C12	36	SARIKIZ-4	-
D1	37	HR45-1545 (RR)	+
D2	38	HR45-1545 (RR)	+
D3	39	HR45-1545 (RR)	+
D4	40	HR45-1545 (RR)	+
D5	41	PHANTOM (rr)	-
D6	42	PHANTOM (rr)	-
D7	43	PHANTOM (rr)	-
D8	44	PHANTOM (rr)	-
D9	45	XAN-159-RR	+
D10	46	XAN-159-RR	+
D11	47	PHANTOM-rr	-
D12	48	PHANTOM-rr	-

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fasulye bitkisinde bakteriyel etmenler arasında *X. axonopodis* pv. *phaseoli* fasulye üretim alanlarında en fazla görülen hastalık etmenlerinden biridir ve mücadelesi oldukça sınırlıdır (Belete ve Bastas, 2017). Bu nedenle bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı mücadelede en etkili yöntem yetiştiricilikte dayanıklı fasulye çeşitlerinin kullanılmasıdır. Bu bağlamda söz konusu hastalığa karşı dayanıklılık genlerinin belirlenmesi ve bu hastalığa dayanıklı taze fasulye çeşitlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışma kapsamında ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 9 fasulye çeşidinin yine ülkemizde oldukça önemli ekonomik kayıplara yol açan *X. axonopodis* pv. *phaseoli* bakterisinin neden olduğu adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı dayanıklılıkları hem patojenite analizleriyle hem de moleküler işaretleyiciler kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan patojenite analizi sonuçlarına göre tüm ticari çeşitlerin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı hassas olduğu tespit edilmiştir. Moleküler işaretleyiciler analizlerine göre de Asya, Volare, Leziz, Gina Olivin, Balkız, Borgondia, Magnum ve Sarıkız çeşitlerinin BC420 ve SU91 gen bölgelerinde bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı hassaslık veren genleri taşıdığı tespit edilmiştir. Moleküler işaretleyiciler ile yapılan moleküler analizler patojenite testlerinin sonuçlarını doğrulamıştır.

Benzer bir çalışmada, Palacioğlu ve diğerleri (2021), Türkiye’de yetiştirilen 40 adet fasulye çeşidini, pas (*Uromyces appendiculatus*) ve adi yaprak yanıklığı (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*) hastalıklarına karşı direnç durumları açısından değerlendirmişlerdir. Çalışma kapsamında ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 40 adet fasulye çeşidini pas ve adi yaprak yanıklığı hastalıklarına karşı taşıdıkları direnç durumları açısından SCAR moleküler işaretleyicileri (SAE19, SI19, SA14, SBC6, SAP6, SU91, BC420) ile incelemişlerdir. Pas hastalığına karşı dayanıklılıkla ilişkili Ur-11 ve Ur-4 lokuslarının çeşitler arasında oldukça yaygın olduğu görülürken, adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı sadece Boncuk, Belinay Sırık, Sırık barbunya, Zülbiye ve Bulduk çeşitlerinin B10 lokusu taşıdığını gözlemlemişlerdir.

Diğer bir çalışmada, Poyraz ve diğerleri (2017), SCAR moleküler işaretleyicilerini kullanarak 12 yerel fasulye çeşidinde (Aslan, Elinda, İstanbul, Bursa, Flash, Belluga, White cordinal, Beryl, Yunus-90, Göynük-98, Önceler-98, Eskişehir-855) *X. axonopodis* pv. *phaseoli* 'ye karşı direnç genlerini tespit etmişlerdir. Bu çalışma için SAP6, BAC6, SU91, BC420, R7313 ve R4864 olmak üzere toplamda 6 direnç genini taramışlardır. Her bir direnç geni için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)-çoğaltımları spesifik SCAR belirteçler ile gerçekleştirmişlerdir. Direnç genlerinin tespiti için elde edilen DNA bantları, var veya yok olarak kaydetmişlerdir. Karşılaştırma yapmak için, iki bitki hastalığına karşı hastalık yapma oranları tarla verilerinden elde etmişlerdir. Bu araştırmanın sonucunda Berly ve Yunus-90 çeşitlerinin SAP6 markörü ile ilişkili B10 lokusunu taşıdığını bildirmişlerdir.

Mutlu ve diğerleri (2005), moleküler işaretleyiciler yardımıyla geri melezleme yaparak elde ettikleri bireylerde adi yaprak yanıklığına karşı dayanıklılık durumlarını belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada dayanıklı olan NE-01-8, NE-01-15 ve NE-01-17 hatlarının SU91 ile ilişkili B8 lokusuna sahip olduğunu ayrıca SAP6 ile ilişkili B10 lokusuna sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, aynı zamanda SAP6 ve SU91 dayanıklılık moleküler işaretleyicilerini kullanarak dayanıklı Chase ve hassas Othello çeşitlerinin çaprazlanmasıyla adi yaprak yanıklığına karşı daha fazla dayanıklılık gösteren ABCP-8 genotipini geliştirmiştir.

Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ve tüketiciler tarafından kabul görmüş olan taze fasulye çeşitlerinin bu hastalığa karşı dayanıklı hale getirilmesi ülkemizde sürdürülebilir fasulye yetiştiriciliği yönünden önemlidir. Bu tez çalışmasında kullanılan tüm taze fasulye çeşitleri BC420 ve SU91 moleküler işaretleyicilerinin hassas allellerini taşıdığı fakat dayanıklı allelini taşımadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç BC420 ve SU91 moleküler işaretleyicilerinin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı dayanıklılığın ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen taze fasulye çeşitlerine aktarılmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

Türkiye'de yetiştirilen taze fasulye çeşitlerinin bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı hem moleküler hem de patojenite testleriyle analiz edilen çalışmalar literatürde

sınırlı sayıdadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlarla Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen taze fasulye çeşitlerinin adi yaprak yanıklığı dayanımını moleküler ve patojenite testleriyle ortaya koyulmuştur. Sonuç olarak, bu tez çalışmasından elde edilen veriler bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına dayanıklı taze fasulye ıslahında sebze ıslahçıları tarafından kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agrios, M. (1997). Plant Pathology. Academic Pres, 635.
- Akçın, A. (1973). Erzurum Şartlarında Yetiştirilen Kuru Fasulye Çeşitlerinde Gübreleme, Ekim Zamanı ve Sıra Aralığının Tane Verimine Etkisi . Dergipark, 65-76.
- Akçın, A. (1988). Yemeklik Tane Baklagiller. s. 41-189. İçinde. Konya: Selçuk Ü. Yayınları: 43, Zir. Fak. Yayın No: 8.
- Anonim, (2021). USDA Natural Resources Conservation Service. <https://plants.usda.gov> (Erişim tarihi: 10.10.2021).
- Anonim, (2021). food and agriculture organization of the united nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim tarihi: 20.03.2021).
- Anonim, (2021). Türkiye İstatistik Kurumu: <https://www.tuik.gov.tr/> (Erişim tarihi: 20.03.2021).
- Belete, T. ve Bastas, K. K. (2017). Common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of beans with special focus on Ethiopian condition. . *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, vol: 8-2, 1000403.
- Bitocchi, E. ve Bellucci, E. (2013). Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol*, 197(1):300-313.
- Chirwa, R.M., Chataika, B.Y.E., Bokosi, J.M., (2011). Inheritance of Resistance to Common Bacterial Blight In Common Bean, African Crop Science Journal, Vol. 19, No. 4, s. 313- 323.
- Chung, W.J., Baggett, J. ve Rowe, K. (1991). Inheritance of pod cross-section in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica volume* 53, 159–164.
- Çiftçi, C., Şehirali, S. (1984). Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşitlerinde değişik özelliklerin fenotipik farklılıklarının saptanması. Ankara: Ankara Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Yayın No.TB. 4.
- Dursun, A., Dönmez, M.F., Şahin, F. (2002). Identification of resistance to common bacterial blight disease on bean genotypes grown in Turkey. *European Journal of Plant Pathology* 108:, 811-813.
- Gebts, P., Beavis, W., Brummer, E. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol*, 137(4):1228-35.
- Goodwin, P.H., Sopher, C.R., & Michaels, T.E. (1995). Multiplication of *Xanthomonas* pv.v *phaseoli* and intercellular enzyme activities in resistant and susceptible beans. *Phytopathology*, 143,, pp. 11–15.
- Gradinaroff, L. (1939). Moiphologische und agrobotanische Untersuchungen über den Sortenbestand der feid- und gartenbohnen in bulgarien. Sofia.
- GRIN GLOBAL-U.S. National Plant Germplasm System. (2021). United States Department of Agriculture: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/accessiondetail?id=1580455> (Erişim tarihi:20.11.2021).
- Gülümser, A., Bozoğlu, H., Peksen, E. (2013). FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.). Samsun: Omu.edu.
- Hall, R. (1994). Compendium Of Bean Diseases. APS Press, 73.
- Harlan, J. R. (1951). Anatomy of Gene Centers. *The American Naturalist*, Volume 85, Number 821.

- Howard, R.J., Garland, J.A., Seamen, W.L. (1994). Diseases and pests of vegetable crops in Canada. *The Canadian Phytopathological Society*, 554.
- Irigoyen ED., Garbagnoli C. (1997) Common bacteriosis in common bean (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (E.F. Smith) Dowson): Detection, infection and transmission through seeds. *Fitopatologia* 32: 166-172.
- Jung, G., Skroch, P., Coyne, D., Nienhuis J., Santana, E., Ariyaratne, H.M., Kaeppler S., Bassett M.J. (1997). Molecular-markers-based genetic analysis of tepary bean derived common bacterial blight resistance in different developmental stage of common bean. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 122, pp. 329–337.
- Kangfu, Y., Shi, C., Zhang, B. (2012). Development and Application of Molecular Markers to Breed Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for Resistance to Common Bacterial Blight (CBB) Current Status and Future Directions. Kanada: Agriculture and Agri-Food .
- Keleş, D. D. (2015). Fasulye Yetiştiriciliği. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, 2.
- Kelly, J., Gepts, P., Miklas, P., Coyne, D. (2003). Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Res.*, 82, 135–154.
- Koinange, E.M.K., Singh, S.P., Gepts, P. (1996). Genetic Control of the Domestication Syndrome in Common Bean. *Crop Science*, 1037-1045.
- Kwak, M. (2009). Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., *Fabaceae*). *Theor Appl Genet.* :979-92.
- Lak, M.R., Shams-Bakhsh, M., ve Bahar, M. (2002). Identification of the bacterial agent of bean leaf and pod blight in Markazi province. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resource* 6(1), 231–243.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. ve Lock, M. (2005). Legumes of the World. Edinburgh: Kew: Royal Botanic Gardens.
- Madakbaş, S., Ergin, M., Özçelik, H., Küçükumuzlu, B. (2007). Orta Karadeniz Bölgesinde Yetiştirilen Bazı Bodur Taze Fasulye Populasyonlarından Seçilen Bodur Ayşe Kadın Özelliğinde Saf Hatların Bazı Morfolojik ve Tarımsal Özelliklerinin Belirlenmesi. *S.Ü.Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (41). 68-73.
- McElroy, J.B. (1985). Breeding for dry beans, *P. vulgaris* L., for common bacterial blight resistance derived from *Phaseolus acutifolius*. New York: Cornell Univ.
- Miklas, P.N., Beaver, J.S., Grafton, K.F. ve Freytag, G.F. (1994). Registration of TARS VCI-4B multiple disease resistant dry bean germplasm. *Crop Sci.*, 34, 1415.
- Miklas, P.N., Zapata, M., Beaver, J.S. ve Grafton, K.F. (1999). Registration of four dry bean germplasm resistant to common bacterial blight: ICB-3, ICB-6, ICB-8, and ICB-10. *Crop Sci.*, 39,, 594.
- Mohan, S.T. (1982). Evaluation of *Phaseolus coccineus* Lam. Germplasm for resistance to common bacterial blight of bean. *Turrialba*, 32, s. 489–490.
- Muehlbauer, F. 2002. Plant genetic resources of Legumes in the Mediterranean. *Kluwer Academic Publishers* (s. pp. 378). Netherlands.
- Mutlu, N., Miklas, P., Reiser, J. ve Coyne, D. (2005). Backcross breeding for improved resistance to common bacterial blight in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Breeding*. Vol:124, s. 282-287.
- Mutlu, N., Vidaver, A.K., Coyne, D.P., Steadman, J.R., Lambrecht, P.A., Reiser, J. (2008). Differential Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X.*

fuscans subsp. *fuscans* Strains on Bean Genotypes with Common Blight Resistance. Plant disease vol:92, 546-554.

Myers, J., Baggett, J. (1999). E. S. Singh, Improvement of Snap Beans. Common Bean Improvement for the 21st Century (s. 289-329). Boston: Kluwer Academic Publishers.

Nadeem, M., Habyarimana, E., Çiftçi, V., Nawaz, M., Karaköy, T., Cömertpay, G., Shadid, M., Hatipoğlu, R., Yeken, M., Ali, F., Ercişli, S., Chung, G., Baloch, F. (2018). Characterization of genetic diversity in Turkish common bean gene pool using phenotypic and whole-genome DArTseq-generated silicoDArT marker information. *Plos One*, s. 13(10).

Palacioğlu, G., Tombul, S., Bayraktar, H. ve Özer, G. (2021). Ülkemizde Yetiştirilen Önemli Fasulye Çeşitlerinin Pas (*Uromyces appendiculatus*) ve Adi Yaprak Yanıklığı (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) Hastalıklarına Karşı Dayanıklılık Kaynakları Açısından Değerlendirilmesi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 7(2), 222 - 230.

Park, S.J., Dhanvantari, B.N. (1987). Transfer of common blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) resistance from *Phaseolus coccineus* Lam. to *P. vulgaris* L. through interspecific hybridization. *Can. J. Plant Sci.*, 67,, 685–695.

Poyraz, İ., Şahin, B., Atmaca, E. (2017). Detection of Ten Resistance Genes Against *P. syringae* pv. *phaseolicola* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* in Twelve Local Bean Varieties Using SCAR Markers. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 241-248.

Salunke, D., Kadam, S. (1989). CRC Handbook of World Food Legumes, Vol I. FL.: CRC Pres:Boca Raton.

Seattler, A. (1989). The need for detection assay. Detection of bacteria in seed and other planting material, 54 (3), 1-2.

Schwartz, H. F. (2008). Common bacterial blight of beans, fuscous blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) . Colorado State University, Colorado.

Shi C., Chaudhary, S., Yu, K., Park, S.J., Navabi, A., McClean, P.E. (2011). Identification of candidate genes associated with CBB resistance in common bean HR45 (*Phaseolus vulgaris* L.) using cDNA-AFLP,. *Mol. Biol. Rep.* 38, 75-81.

Shi, C., Yu, K., Xie, W., Perry, G., Navabi, A., Pauls, K.P., Miklas P.N. ve Deidre, F. (2012). Development of candidate gene markers associated to common bacterial blight resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 125, 1525—1537.

Singh, S. (1999). Common Bean Improvement in the Twenty-First Century. Kimberly, USA: Springer-Science+ Business Media, B.V.

Singh, S.P. & Munoz, C.G. (1999). Resistance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvement. *Crop Sci.*, 39, s. 80-89.

Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., Pisante, M. (2017). Multiple Benefits of Legumes for Agriculture Sustainability. *An Overview. Chem. Biol. Technol. Agric*, 4: 2.

Şehirali, S. (1988). Yemeklik Dane Baklagiller. Ankara: A.Ü Ziraat Fakültesi yayın no:1089.

Tan, A. ve Açıkgöz, N. (2002). In situ and on-farm conservation of legume landraces in Turkey. *International Plant Genetic Resources Institute* (s. 117-120). Krakow, Poland

Tan, M., Serin, Y. (2009). Baklagil Yem Bitkilerinin Tarımsal Özellikleri, Ekonomik Önemleri Taksonomileri ve Genel Yapısal Özellikleri. *Yem Bitkileri* (Baklagil Yem Bitkileri) (s. 277-289). İzmir: Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü.

Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. & Bonierbale, M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology*, 7,, s. 257-264.

- Vallejos, C.E., Sakiyama, N.S., Chase, C.D. (1992). A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. /*genetics*, 131(3):733-40.
- Vandemark, G.J., Fourie D., Miklas P.N. (2008). Genotyping with real-time PCR reveals recessive epistasis between independent QTL conferring resistance to common bacterial blight in dry bean. *Theor Appl Genet* 117:, 513-522.
- Weber, W. E. ve Wricke, G. (1994). Genetic markers in plant breeding. Berlin: Plant Breeding Suppl. 16.
- Wallen, V. (2004). Common bacterial blight of beans, fuscous blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) . Agriculture and Agri-Food Canada.
- Yu, Z.H., Stall, R.E., Vallejos, C.E. (1998). Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans. *Crop Sci.*, 38, 1290–1296.
- Zabata, M., Beaver, J. ve Porch, T. (2010). Dominant gene for common bean resistance to common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* *euphytica*, 179, pp. 373–382.
- Zaumeyer, W. (1930). The bacterial blight of beans caused by *Bacterium phaseoli*. Technical Bulletin, 1-36.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özüm CANDEMİR
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul 05.05.1990
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu
Lise : Çorum Cumhuriyet Anadolu Lisesi-2008
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi-2014
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi-2022

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : May Tohum A.Ş.-2014

İletişim (e-posta) : ozumcetinel@gmail.com