

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

FASULYE ANTRAKNOZU ETMENİ *Colletotrichum lindemuthianum*'un
GENETİK KARAKTERİZASYONU VE PATOJENE KARŞI DAYANIKLILIK
KAYNAKLARI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Gülsüm PALACIOĞLU

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

FASULYE ANTRAKNOZU ETMENİ *Colletotrichum lindemuthianum*'un GENETİK KARAKTERİZASYONU VE PATOJENE KARŞI DAYANIKLILIK KAYNAKLARI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Gülsüm PALACIOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR

Fasulye üretim alanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olan *Colletotrichum lindemuthianum*'un neden olduğu antraknoz hastalığına karşı mücadele yöntemlerine katkı sağlamak amacıyla gerçekleştirilen bu tez kapsamında ilk olarak ülkemizin 7 farklı ilinden elde edilen 91 patojen izolatı arasındaki genetik farklılıklar iPBS ve ISSR yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Her iki marker sisteminin structure ve cluster analizi sonucunda coğrafik dağılım ile ilişkili olarak patojen izolatları arasında %72 genetik benzerlikte iki ana grubun bulunduğu tespit edilmiştir. Moleküler varyans (AMOVA) analizinde bu genetik varyasyonun %58.7'nin izolatlar arasındaki genetik farklılıklardan, %41.29'luk kısmının ise populasyonlar arasındaki farklılıklardan ileri geldiğini ortaya koymuştur. Kantitatif PCR analizi ise patojen izolatlarına karşı fasulyede savunma ile ilişkili gen (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD*) ekspresyonlarında zamana bağlı olarak önemli farklılıkların oluştuğunu göstermiştir. Elde edilen 693 fasulye genotipi taşıdıkları dayanıklılık genleri için değerlendirildiğinde ise *Co-1*⁵, *Co-4*, *Co-6*, *Co-1*, *Co-11* ve *Co-1*⁴ dayanıklılık genlerinin test edilen genotiplerde yaygın olarak bulunduğu görülmüştür. Patojenisite testlerinde ise 7 çeşit ve 6 fasulye genotipinin bu etmene karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Hastalığa karşı dayanıklı genotiplerdeki en yaygın dayanıklılık geninin *Co-11* olduğu ve bunu *Co-6* ve *Co-1*⁵ genlerinin takip ettiği görülmüştür. Ayrıca bu genotiplerin *Co-1*, *Co-4*, *Co-10* ve *Co-13* genlerini taşıdığı belirlenmiş olup bu *Co* gen kombinasyonlarının hastalığa karşı daha yüksek bir dayanıklılık sağlayabileceği düşünülmektedir. Fasulye antraknozuna karşı mücadelede BTH (acibenzolar-S-methyl), silisyum ve jasmonik asitin (MeJA) etkisi incelendiğinde ise BTH uygulamasının en yüksek etkiye sahip olduğu ve *PR1* ve *PR2* gen ifadelerinin enfeksiyonun erken döneminde hızlı bir şekilde artmasını sağladığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların antraknoz hastalığına karşı mücadele yöntemlerinin ve ıslah programlarının etkinliğinin artmasına, konukçu savunma mekanizması ile ilişkili genlerin rolleri hakkında daha fazla bilgi edinmemize ve hastalığa karşı farklı kontrol stratejilerinin geliştirilmesine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Temmuz 2021, 123 sayfa

Anahtar Kelimeler: Fasulye antraknozu, genetik farklılık, *Co* dayanıklılık geni, gen ifadesi, bitki aktivatörü, uyarılmış dayanıklılık, qRT-PCR

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

GENETIC CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum lindemuthianum* CAUSING BEAN ANTHRACNOSE AND INVESTIGATION OF RESISTANCE SOURCES TO THE PATHOGEN

Gülsüm PALACIOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR

The present thesis aimed to contribute to disease management methods to anthracnose disease, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, leading to important economic losses in bean growing areas worldwide. For this purpose, genetic diversity of 91 isolates obtained from 7 provinces of Turkey was characterized by iPBS and ISSR analysis. The cluster and structure analysis of both marker systems classified the pathogen isolates into two main groups with a genetic similarity of 72%, which closely associated with the geographic distribution of the isolates. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 58.7% of total genetic variability resulted from genetic differences between the isolates within populations, while 41.29% was among populations. The quantitative PCR analysis showed significantly time-dependent differences in the expression of bean defense-related genes (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* and *POD*) depending on pathogen isolates. *Co-1*⁵, *Co-4*, *Co-6*, *Co-1*, *Co-11* and *Co-1*⁴ resistance genes were commonly found among common bean genotypes, when 693 bean genotypes from different provinces were evaluated for resistance genes. Pathogenicity test confirmed that 7 cultivars and 6 common bean genotypes were resistant against the pathogen. Resistant genotypes to the disease most commonly carried *Co-11* resistance gene, followed by *Co-6* and *Co-1*⁵ genes, respectively. They carried *Co-1*, *Co-4*, *Co-10* and *Co-13* genes, suggesting the combinations of these *Co* genes could provide more durable resistance to bean anthracnose. Also, the effects of BTH (acibenzolar-S-methyl), silicon and jasmonic acid (MeJA) were evaluated for controlling bean anthracnose in this study. BTH application was the most effective in disease control and induced more rapidly the transcript level of *PR1* and *PR2* in the early stages of infection. Results from this study could provide the improvement of disease management systems and breeding programmes, a better understanding of genes with related to host defence mechanism and the development of alternative control strategies to anthracnose disease.

July 2021, 123 pages

Key Words: Bean anthracnose, genetic diversity, *Co* resistance gene, gene expression, plant activators, induced resistance, qRT-PCR

TEŞEKKÜR

Fasulyede antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum lindemuthianum*'un genetik farklılıklarının ve mücadele yöntemlerinin araştırıldığı bu çalışmada her daim yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana yol gösteren ve bu alanda yetişmemi sağlayan başta değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR'a, gerek arazi çalışmalarında gerekse de laboratuvar koşullarında her türlü desteği sağlayan ve değerli bilgileriyle beni yönlendirerek çalışmamı yakından takip eden Doç. Dr. Göksel ÖZER'e, ilgi ve alakasını hep hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Fikret DEMİRCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım esnasında yardım ve desteklerinden dolayı Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Bitki Patolojisi laboratuvar ekibine, sunulan imkânlar ile birlikte bana kattığı kültür ve akademik hayat deneyimi için Ankara Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü öğretim üyelerine, her zaman desteklerini ve sevgilerini hep kalpten hissettiğim çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 18L0447010) ile TÜBİTAK 1001 (Proje no: 115R042) ve TÜBİTAK 1002 (Proje no: 218O248) projeleri tarafından sağlanan finansal kaynaklar ile desteklenmiştir.

Gülsüm PALACIOĞLU
Ankara, Temmuz 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
2.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> Populasyonlarındaki Patojenik ve Genetik Farklılıkların Araştırılması Üzerine Yapılan Çalışmalar	8
2.2 Marker Destekli Seleksiyon Amacıyla Yapılan Çalışmalar	13
2.3 Bitki Patojen İnteraksiyonunda Dayanıklılık Genlerinin Ekspresyonlarındaki Değişimler ve Dayanıklılık Mekanizmasının Uyarılmasında Farklı Kimyasal Uyarıcıların Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi Amacıyla Yapılan Çalışmalar	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> İzolatlarının Elde Edilmesi ve Saklanması.....	25
3.1.2 İzolatların geliştirilmesi ve teşhisi.....	29
3.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un Populasyon Yapısındaki Genetik Farklılıkların Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) ve Inter Primer Binding Site (iPBS) Yöntemleri ile İncelenmesi	29
3.2.1 Patojen izolatlarından DNA ekstraksiyonu	29
3.2.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların ISSR yöntemi ile incelenmesi.....	30
3.2.3 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların iPBS yöntemi ile incelenmesi	31
3.2.4 Veri analizi.....	33
3.3 Ülkemizdeki Bazı Önemli Fasulye Genotip Ve Çeşitlerinin Hastalık Etmenine Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi	34
3.3.1 Bitkilerin yetiştirilmesi	34

3.3.2 Patojen izolatının geliştirilmesi ve patojenisite çalışmaları	34
3.3.3 Hastalık reaksiyonlarının değerlendirilmesi	36
3.4 Ülkemizdeki Bazı Fasulye Genotiplerindeki Dayanıklılık Kaynaklarının Marker Destekli Seleksiyon (MAS) ile Belirlenmesi	37
3.4.1 Bitkilerin yetiştirilmesi ve DNA ekstraksiyonu.....	37
3.4.2 Marker destekli seleksiyon çalışmaları	37
3.4.3 Agaroz jel elektroforezi	38
3.5 Patojen Genotiplerine Bağlı Olarak Bitkideki Dayanıklılık Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin İncelenmesi	41
3.5.1 Bitkilerin yetiştirilmesi, inokulasyon yöntemi ve örnek alımı	41
3.5.2 Bitki dokularından RNA izolasyonu ve DNase uygulaması.....	41
3.5.3 Elde edilen bitki örneklerinden cDNA sentezi ve Real-time PCR analizi.....	42
3.6 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'a Karşı Dayanıklılık Mekanizmasının Uyarılmasında Farklı Kimyasal Uyarıcıların Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisinin Real Time PCR ile İncelenmesi.....	44
3.6.1 Bitki aktivatörlerinin uygulama dozu ve yöntemi.....	44
3.6.2 İnokulasyon yöntemi ve örnek alımı	45
3.6.3 Hastalık reaksiyonlarının değerlendirilmesi	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> izolatlarının elde edilmesi ve teşhisi	46
4.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un Populasyon Yapısındaki Genetik farklılıkların Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) ve Inter Primer Binding Site (iPBS) Yöntemleri ile İncelenmesi.....	47
4.2.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların ISSR yöntemi ile incelenmesi.....	47
4.2.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların iPBS yöntemi ile incelenmesi	53
4.2.3 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların iPBS ve ISSR yöntemlerinin birleştirilerek incelenmesi.....	56
4.3 Ülkemizdeki Bazı Önemli Fasulye Genotip ve Çeşitlerinin Hastalık Etkimine Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi	60
4.4 Ülkemizdeki Bazı Fasulye Genotiplerindeki Dayanıklılık Kaynaklarının Marker Destekli Seleksiyon (MAS) ile Belirlenmesi.....	64
4.5 Patojen Genotiplerine Bağlı Olarak Bitkideki Dayanıklılık Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin İncelenmesi	69

4.6 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>'a Karşı Dayanıklılık Mekanizmasının Uyarılmasında Farklı Kimyasal Uyarıcıların Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisinin Real Time PCR ile İncelenmesi	77
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	96
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ.....	120



SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz Çifti (base pair)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Calcium Nitrate Tetrahydrate
cm	Santimetre
Co	Co Geni
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Bakır-İl-Sülfat Pentahidrat
dk	Dakika
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxynucleotide 5' Triphosphate
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Demir Sülfat Heptahidrat
H_3BO_3	Borik Asit
ha	Hektar
hg	Hektogram
kb	Kilo Baz
KCl	Potasyum Klorür
KNO_3	Potasyum Nitrat
MgCl_2	Magnezyum Klorür
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Mangan Klorit
NaOCl	Sodyumhipoklorür
ng	Nanogram
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Ammonium Heptamolybdate Tetrahydrate
nm	Nanometre
RNA	Ribonucleic Acid
s	Saniye
Ta	Annealing Temperature
TAE	Tris-acetate-EDTA
U	Ünite
V	Volt
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Çinko Sülfat Heptahidrat
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece

Kısaltmalar

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Moleküler Varyans Analizi
BABA	β -aminobutyric Acid
BTH/ASM	Benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester

C.	<i>Colletotrichum</i>
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CTAB	Hexadecyl-Trimethyl-Ammonium Bromide
d ₂ H ₂ O	Bi-Destile Su
DArT	Diversity ARrays Technology
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ERIC-BOX	The Enterobacterial Repetitive İntergenic Consensus
G _{ST}	Genetik Farklılaşma
GST	Glutathione S-transferase
h	Nei'nin Gen Farklılığı
Heatmap	Isı Tablosu
H _S	Populasyonlar İçindeki Gen Farklılığı
H _T	Toplam Gen Farklılığı
I	Shannon Information Index
INA	2,6-Dichloroisonicotinic Acid
IRAP	Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
ITS	Internal Transcribed Spacer
iPBS	inter Primer Binding Site
JA	Jasmonik Asit
LOX	Lipoksigenaz
MAS	Marker Destekli Seleksiyon (Marker Assisted Selection)
MeJA	Metil Jasmonate
NaCl	Sodyum Klorür
N _M	Gen Akışı
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis
P.	<i>Phaseolus</i>
PAL	Phenylalanine Ammonia-lyase
PDA	Potato Dekstroz Agar
PIC	Polymorphism Information Content
POD	Peroxidase
PPB	Polimorfik Bandların Yüzdesi
RAMS	Random Amplified Microsatellite-Technique
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REMAP	Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
Rep-PCR	Repetitive Element PCR Fingerprinting
rpm	Dakikada Devir
SA	Salisilik Asit
SAR	Sistemik Kazandırılmış Dayanıklılık
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SIMQUAL	Similarity For Qualitative Data
Si	Silikon
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SSH	Suppression Subtractive Hibridizasyon
SSR	Simple Sequence Repeats
Tris-HCl	Tris-Hydroxymethyl Amino Methane
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un fasulye fidelerinin kotiledon yaprak, gövde (a), kapsül (b) ve tohumlarda (c) meydana getirdiği lezyonlar	2
Şekil 3.1 Enfekteli fasulye bitkilerinin toplanması amacıyla survey yapılan iller.....	25
Şekil 3.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un kapsül, yaprak ve saplarda oluşturduğu hastalık belirtileri	26
Şekil 3.3 Fasulye genotiplerinin elde edildikleri iller ve genotip sayıları.....	39
Şekil 4.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> izolatlarının kültür ortamlarındaki gelişimi (a), sporulasyonu (b), konidi ve seta oluşumu (c), türe spesifik CIF4/ITS4 primeri ile PCR amplifikasyonu (d).....	47
Şekil 4.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> izolatlarının (AC) ₈ YA (a); (GA) ₈ C (b); YHY(GT) ₇ G (c); DHB(CGA) ₅ (d); (GA) ₉ RY (e) primerleri ile PCR sonucu elde edilen ISSR profilleri	50
Şekil 4.3 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> izolatlarına ait ISSR verisinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendogramı	52
Şekil 4.4 <i>C. lindemuthianum</i> izolatlarının iPBS primerleri ile elde edilen jel görüntüleri (iPBS 2221 (a); iPBS 2399 (b); iPBS 2077 (c); iPBS 2219 (d) primeri	54
Şekil 4.5 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> izolatlarına ait iPBS verisinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendogramı	55
Şekil 4.6 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> izolatlarının iPBS ve ISSR verilerinin kombine edilmesiyle oluşturulan dendogramı ve structure analizi.....	57
Şekil 4.7 Nei'nin genetik uzaklığı kullanılarak <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> izolatlarının coğrafik popülasyonları için oluşturulan dendogramı	59
Şekil 4.8 Patojenisite sonucunda <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 'un fasulye bitkisinin yaprak üst yüzeyi, alt yüzeyi ve gövdesinde neden olduğu tipik antraknoz belirtileri	61
Şekil 4.9 Dayanıklı ve hassas fasulye çeşitleri arasındaki reaksiyon farkı	61
Şekil 4.10 Marker destekli seleksiyon yöntemiyle OPA18, SC08, SZ04 ve OPAZ04 primer amplifikasyonları sonucu elde edilen jel görüntüleri	65
Şekil 4.11 Marker destekli seleksiyon yöntemiyle OPF10, TGA1, SF10 ve OPV20 primer amplifikasyonları sonucu elde edilen jel görüntüleri.....	66
Şekil 4.12 Marker destekli seleksiyon yöntemiyle SBB14, SCAreoli, SB12 ve SAB3 primer amplifikasyonları sonucu elde edilen jel görüntüleri.....	67
Şekil 4.13 Farklı illerden elde edilen fasulye genotiplerinin taşıdığı Co dayanıklılık genlerinin dağılımı	69
Şekil 4.14 İzole edilen RNA'ların bleach agaroz jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.15 Fasulye bitkisindeki <i>actin</i> , <i>PR1</i> , <i>PR2</i> ve <i>PR3</i> genlerine ait erime eğrisi (melting curve) analizleri.....	71
Şekil 4.16 Fasulye bitkisindeki <i>GST</i> , <i>LOX</i> , <i>PAL</i> ve <i>POD</i> dayanıklılık genlerine ait erime eğrisi (melting curve) analizleri.....	72

Şekil 4.17 <i>C. lindemuthianum</i> 'un farklı genotip gruplarını temsil eden patojen izolatlarına karşı <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerindeki değişim	74
Şekil 4.18 <i>C. lindemuthianum</i> 'un farklı genotip gruplarını temsil eden patojen izolatlarına karşı <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerindeki zamansal değişimi gösteren ısı tablosu (heatmap)	76
Şekil 4.19 İnokulasyondan önce uygulanan farklı dayanıklılık uyarıcılarının <i>C. lindemuthianum</i> 'un neden olduğu hastalık gelişimi üzerine etkileri.....	77
Şekil 4.20 Silisyum uygulaması yapılan fasulye bitkilerinde <i>C. lindemuthianum</i> 'un neden olduğu hastalık gelişimi	78
Şekil 4.21 MeJA uygulamasının (soldan sağa doğru MeJA+patojen, sadece MeJA, sadece patojen) hastalık gelişimini engelleyici etkisi.....	78
Şekil 4.22 BTH uygulamasının (soldan sağa doğru BTH+patojen, sadece BTH, sadece patojen) hastalık gelişimini engelleyici etkisi.....	79
Şekil 4.23 Fasulye çeşitlerindeki farklı dayanıklılık genlerine ait melting curve analizleri ve amplifikasyon curve'leri	80
Şekil 4.24 BTH, Patojen+BTH ve sadece patojen (Kontrol) uygulanan bitkilerde <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerindeki değişim grafiği	83
Şekil 4.25 BTH uygulamasının <i>C. lindemuthianum</i> enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerindeki zamansal değişimine etkisini gösteren ısı tablosu (heatmap)	84
Şekil 4.26 Si, Patojen+Si ve sadece patojen (Kontrol) uygulanan bitkilerde <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerindeki değişim grafiği	87
Şekil 4.27 Silisyum uygulamasının <i>C. lindemuthianum</i> enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerindeki zamansal değişimine etkisini gösteren ısı tablosu (heatmap)..	88
Şekil 4.28 MeJA, Patojen+ MeJA ve sadece patojen (Kontrol) uygulanan bitkilerde <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerindeki değişim grafiği	90
Şekil 4.29 MeJA uygulamasının <i>C. lindemuthianum</i> enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerindeki zamansal değişimine etkisini gösteren ısı tablosu (heatmap)..	91
Şekil 4.30 Tüm uygulama yapılan bitkilerdeki <i>PR1</i> , <i>PR2</i> , <i>PR3</i> , <i>PAL</i> , <i>GST</i> , <i>LOX</i> ve <i>POD</i> gen ifadelerinin karşılaştırıldığı değişim grafiği	93
Şekil 4.31 Fasulye ile <i>C. lindemuthianum</i> arasındaki interaksyonu esnasında bitki gen aktivatörlerinin dayanıklılık genlerine etkisini gösteren ısı tablosu (heatmap)	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Survey yapılan iller ve izolat bilgileri.....	27
Çizelge 3.2 ISSR çalışmalarında ön denemeye alınan primerler ve özellikleri.....	30
Çizelge 3.3 iPBS analizinde ön denemeye alınan primerler ve özellikleri	32
Çizelge 3.4 Patojenisite çalışmalarında kullanılan fasulye çeşitleri ve özellikleri	35
Çizelge 3.5 Patojenisite çalışmalarında kullanılan bazı ümitvar fasulye genotipleri ve lokasyonları	36
Çizelge 3.6 Fasulye genotiplerindeki Co- dayanıklılık genlerinin belirlenmesi için kullanılan markerler ve PCR koşulları	40
Çizelge 3.7 Fasulye bitkisindeki savunma mekanizmaları ile ilişkili genlere ait primerler (Oliveira vd. 2015b)	43
Çizelge 4.1 Survey yapılan iller ve bu illerden elde edilen izolat miktarları.....	46
Çizelge 4.2 İzolatlar arasındaki genetik polimorfizmi belirlemek amacıyla kullanılan ISSR primerleri ve elde edilen veriler.....	48
Çizelge 4.3 İzolatlar arasındaki genetik polimorfizmi belirlemek amacıyla kullanılan iPBS primerleri ve elde edilen veriler	53
Çizelge 4.4 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> populasyonları arasındaki ve içerisindeki genetik farklılığın dağılımı	58
Çizelge 4.5 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> populasyonları arasındaki F_{ST} değerleri...	59
Çizelge 4.6 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> populasyonlarına ait moleküler varyans analizi (AMOVA)	60
Çizelge 4.7 Patojenisite çalışmalarına dâhil edilen fasulye çeşitlerinin patojen izolatına karşı reaksiyonları	62
Çizelge 4.8 Patojenisite çalışmalarına dâhil edilen fasulye genotiplerinin patojen izolatına reaksiyonları	63
Çizelge 4.9 Marker taramasında beklenen PCR ürünlerini veren fasulye genotiplerinin dağılımı	68

1. GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), *Fabaceae* (Baklagiller) familyasının *Phaseolus* (P.) cinsi içerisinde yer alan Orta Amerika kökenli bir kültür bitkisidir. Bu cinse ait 230 adet tür bulunmakta ancak bunlardan 20 kadarının ekonomik düzeyde yetiştiriciliği yapılmaktadır (Şehirli 1988). *Phaseolus vulgaris* ve *P. coccineus* dünyada en yaygın yetiştirilen türler arasındadır. Yemeklik baklagiller içerisinde bulunan fasulye, içerdiği mineral maddeler, vitaminler ve protein (%18-31,6) miktarı ile besin değeri açısından oldukça zengin bir sebze türüdür (Pekşen ve Artık 2005).

Dünyada yeşil fasulye olarak 1.649.711 hektar (ha) alanda, kuru fasulye olarak 33.066.183 ha alanda ekimi yapılan fasulye bitkisi en fazla üretilen yemeklik baklagil bitkisidir (Anonymous 2021). Çin, Hindistan, Endonezya ve Tayland gibi ülkeler yeşil fasulye üretiminde ilk sıralarda yer alır iken ülkemiz 43.702 ha alanda 596.074 ton üretim ile 5. sırada yer almaktadır. Kuru fasulye üretiminde ise 88.899 ha alanda 225.000 ton üretim ile 22. sırada yer almaktadır (Anonymous 2021). Ülkemizin hemen hemen tüm coğrafik bölgeleri fasulye üretimine uygun olmakla birlikte taze fasulye için en fazla üretim Batı Karadeniz bölgesinde; kuru fasulye için Batı Anadolu bölgesinde gerçekleştirilmektedir (Anonim 2021).

Fasulye bitkisi dünyada ve ülkemizde yaygın bir üretim alanına sahip olmasına rağmen elde edilen verim düzeyi istenilen miktarda değildir. Bunun başlıca nedenleri bölgesel çeşitlerin hastalıklara hassasiyeti, çevresel stres, kuraklık, hastalıklar, zararlılar ve hatalı ürün yönetimidir. Fasulyede sorun olan hastalık etmenleri arasında 31 fungus, 5 bakteri, 18 virus ve 2 fitoplazma benzeri olmak üzere toplam 56 adet patojenin fasulyede hastalığa sebep olduğu bildirilmiştir (Hall 1994). Fungal hastalıklar içerisinde hemibiyotrofik bir fungus olan *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cava'ın neden olduğu antraknoz hastalığı ise fasulyede en tahripkâr hastalık etmenlerinden bir tanesidir ve enfekteli tohum kullanılması durumunda % 100'e varan ürün kayıplarına neden olabilmektedir (Padder vd. 2017). Fungus Ascomycota bölümünde, Pezizomycotina alt bölümünde, Sordariomycetes sınıfında, Glomerellales

takımında, Glomerellaceae familyası altında yer almaktadır. Bitkinin tüm yetiştirme dönemi boyunca hastalık meydana gelebilmekte ve bitkinin yaprakları, sapları, baklaları ve tohumlarını kapsayan tüm toprak üstü kısımları etmen tarafından enfekte olabilmektedir. Enfeksiyon ilk olarak yeni çıkan fidelerin kotiledon yapraklarında ve gövdelerinde koyu kahverengi, ortası hafif çökük lekeler şeklinde gözlenmektedir (Şekil 1.1). Böyle fideler ya gelişmeden ölmekte ya da gelişmede gerilik meydana gelmektedir. Daha sonra bitkinin yapraklarında, saplarında ve kapsülde ortasında pembemsi spor yığınları olan kırmızımsı kahverengi halkayla sınırlandırılmış, farklı boyutlarda yuvarlak çökük lekeler meydana gelmektedir. Lezyonların merkezinde üretilen konidiler sekonder enfeksiyonları oluşturarak diğer bitkilere yayılımı sağlamaktadır. İleri enfeksiyonlarda yaprakların alt yüzeyindeki damarlarda uzun, kahverengi lezyonlar gözlenmektedir. Enfekteli tohumlarda ise sarımsı kahverengi içe çökük lezyonlar oluşmakta ve çimlenme yetenekleri kaybolmaktadır. Etmen kışı bu enfekteli tohumlarda veya hastalıklı bitki artıklarında geçirmektedir. Konidi çimlenmesi ve enfeksiyon oluşumu için en uygun koşullar 18-22°C arasında sıcaklık, % 92'nin üstünde nem ve 12 saat yaprak ıslaklık süresi gerekmektedir. Uygun iklim koşullarında, enfekteli tohum ve hassas çeşitler kullanıldığında tüm ürüne hasar verebilecek epidemiler oluşabilmektedir (Hall 1994).



Şekil 1.1 *Colletotrichum lindemuthianum*'un fasulye fidelerinin kotiledon yaprak, gövde (a), kapsül (b) ve tohumlarda (c) meydana getirdiği lezyonlar

Antraknoz hastalığına karşı mücadelede fungusit uygulamaları, ürün rotasyonu, temiz tohum kullanımı önerilmekle birlikte en etkili mücadele yönteminin dayanıklı çeşit ıslahı olduğu bilinmektedir (Gonçalves-Vidigal vd. 2009; Boersma vd. 2013). Ancak patojen populasyonlarındaki yüksek genetik farklılık ve buna bağlı olarak 247’den fazla ırkının bulunması bu etmene karşı dayanıklı çeşit ıslahı çalışmalarını güçleştirmekte ve sürekli yeni dayanıklılık kaynaklarının bulunmasını gerektirmektedir (Ishikawa vd. 2008; Martiniano-Souza vd. 2017).

Dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve etkili hastalık kontrol sistemlerinin oluşturulabilmesi için patojen populasyonlarında var olan genetik farklılığın ortaya konması gerekmektedir. Bu nedenle farklı organizmalardaki genetik farklılıkları ortaya koymak amacıyla birçok teknik geliştirilmiştir. Patojenlerin populasyon yapılarındaki farklılıkları ortaya koyan bu polimorfizmler biyolojik aktiviteleri ve patojenisitelerindeki farklılıkları ile ilişkili faydalı sonuçlar sağlayabilmektedir (Padder vd. 2017). Dünyada yapılan çalışmalarda *C. lindemuthianum* izolatları arasındaki genetik farklılıkları araştırmak için RAPD, IRAP ve AFLP gibi farklı teknikler kullanılmıştır (Gonzalez vd. 1998; Padder vd. 2007; Bardas vd. 2009; Barcelos vd. 2011; Gonzaga vd. 2015). Ülkemizde ise *C. lindemuthianum* populasyonu ve genetik polimorfizmi hakkında çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda Repetitive element PCR fingerprinting (Rep-PCR), Random amplified microsatellite-technique (RAMS) ve RAPD markerleri kullanılmıştır (Canseven 2011).

Moleküler markerler arasında ISSR yöntemi genel olarak genom üzerindeki microsatellit tekrarlanma bölgelerinin amplifikasyonuna dayanan bir PCR yöntemidir. Teknik karşıt iplikçiklerde bulunan iki aynı microsatellit tekrar bölgesi arasındaki DNA segmentinin amplifikasyonuna dayanmaktadır. Yöntem kullanılan primerlere bağlı olarak RAPD, AFLP ve microsatellit gibi yöntemlerin faydalarının çoğunu kombine etmektedir. Uygun maliyetli ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle farklı fungal patojenlerin tespiti ve genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında, genom haritalamasında, filogenetik araştırmalarda ve evrimsel biyoloji alanlarında yaygın kullanım alanı bulmuştur (Mahmodi vd. 2014; Özer vd. 2020; Palacioğlu vd. 2020).

Funguslardaki genetik farklılıkların araştırılmasında son zamanlarda yaygın bir kullanım alanı bulan transpozal elementler ise DNA dizisinde mevcut pozisyonunu değiştirebilen parçalar olarak tanımlanmaktadır. Transpozal elementin taşınma pozisyonuna göre genin yapısında veya gen ifadesinde değişikliklere sebep olabilmektedir. Kalendar vd. (2010) Universal Retrotransposon Markers sistemi olarak inter Primer Binding Site (iPBS) retrotransposons yöntemini geliştirmiş ve bu yöntemin bitkilerdeki genetik farklılıkları araştırmak için güçlü bir teknik olduğunu belirtmiştir. Son dönemlerde ise bu teknik farklı fungus türleri arasındaki intra ve interspesifik polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanılmıştır (Pourmahdi ve Tahari 2015; Özer vd. 2017; Erper vd. 2021). Bu çalışma kapsamında ülkemizin önemli fasulye üretim alanlarından elde edilen *C. lindemuthianum* izolatlarının genetik yapısındaki intra ve interspesifik polimorfizmlerinin ortaya konulması amacıyla ilk kez ISSR ve iPBS yöntemlerinin kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Anavatanı Orta Amerika olan fasulye bitkisinin Orta Amerika (Mesoamerican) ve Güney Amerika (Andean) bölgelerini kapsayan iki gen havuzu bulunmaktadır (Galvan vd. 2006; Angioi vd. 2010). Orta Amerika bölgesindeki patojen ırklarının hem Orta Amerika hem de Güney Amerika gen havuzlarındaki fasulye genotiplerinde virülent olduğu bildirilirken, Güney Amerika'daki ırkların daha spesifik ve daha çok Güney Amerika gen havuzuna ait fasulye genotiplerinde virülent olmaya eğilimli olduğu bildirilmiştir (Pastor-Corrales vd. 1995; Balardin ve Kelly 1998). Ülkemizdeki fasulye genotiplerinin ise çoğunlukla Güney Amerika kökenli olduğu farklı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Logozzo vd. 2007; Erdinç 2012; Ekincialp ve Şensoy 2013). Bu gen havuzlarına bağlı olarak hastalığa karşı dayanıklılık sağlayan çok sayıda gen kaynağı bulunmuş olup bu genler “Co” sembolü ile isimlendirilmektedir. Antraknoz hastalığına karşı dayanıklılıkta etkin rol oynayan bu genlerden dominant *Co-1* (*Co-1*², *Co-1*³, *Co-1*⁴, *Co-1*⁵), *Co-12*, *Co-13*, *Co-14* ve *Co-15* genlerinin Güney Amerika; *Co-2*, *Co-3*³, *Co-3*², *Co-4*, *Co-4*², *Co-4*³, *Co-5*, *Co-6*, *Co-7*, *Co-9*, *Co-10* ve *Co-11* dominant genleri ile *co-8* resesif geninin ise Orta Amerika gen havuzuna dâhil olduğu bildirilmektedir (Gonçalves-Vidigal vd. 2009; Gonçalves vd. 2010). Antraknoz hastalığına karşı *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-10*, *Co-11* ve *Co-13* dayanıklılık genleri ile ilişkili Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS),

Sequence Characterized Amplified Region (SCAR), RAPD, SSR markerleri farklı araştırıcılar tarafından tespit edilmiş olup dünyada ışlah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Geffroy vd. 1998; de Queiroz 2004; Gonçalves-Vidigal ve Kelly 2006; Awale vd. 2008; Lacanallo vd. 2010). Ülkemizde ise fasulye bitkisindeki dayanıklılık kaynaklarının moleküler markerlerle belirlenmesine yönelik oldukça sınırlı çalışma bulunmaktadır (Erdinç vd. 2017; Ekincialp ve şensoy 2018) . Bu çalışmada ise Türkiye'nin 35 ilinden elde edilen fasulye genotiplerindeki antraknoz hastalığına karşı dayanıklılık kaynaklarının marker destekli seleksiyon (MAS; Marker assisted selection) yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bitkiler evrim süreçleri boyunca patojen enfeksiyonlarına karşı kendilerini savunmak için farklı dayanıklılık mekanizmaları geliştirmiştir. Bu kapsamda bitkilerdeki morfolojik bariyerler, sekonder metabolitler ve PR proteinlerini kontrol eden sinyal mekanizmasında rol oynayan savunma genlerinin aktivasyonu, patojen gelişimi ve yayılımını sınırlandırmak için farklılıklar göstermektedir (Andersen vd. 2018). Bu savunma tepkilerinin patojen populasyonlarına karşı önemli farklılıklar göstermekte olduğu göz önüne alındığında, patojene bağlı olarak bu savunma genlerinin ekspresyon oranı ve zamanlaması arasındaki farklılıkların ortaya konulması kontrol yöntemlerinin etkinliğinin arttırılması açısından önemli bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir. Fasulyede yapılan konuk  patojen interaksyonu çalışmalarında patojen enfeksiyonları esnasında birçok farklı genin rol oynadığı ve bunların transkripsiyonlarında önemli farklılıkların bulunduğu farklı araştırıcılar tarafından tespit edilmiştir (Borges vd. 2012; Padder vd. 2016; Vasconcellos vd. 2016; Fontenelle vd. 2017; Todd vd. 2017). Bu çalışmanın amaçlarından biri de ülkemizdeki yaygın patojen genotipleri arasında dayanıklılığın uyarılmasında rol oynayan gen ekspresyonlarındaki farklılıkların ortaya konulması olarak belirlenmiştir. Konuk  patojen interaksyonu çalışmalarında savunma ile ilişkili genlerin tespiti ve miktar tayini için Northern blot, cDNA arrayleri, Suppression subtractive hybridisation (SSH), RNA-seq ve Real time PCR teknolojileri gibi pek çok farklı yöntem kullanılmaktadır (Mayo vd. 2016; Padder vd. 2016; Vasconcellos vd. 2016; Todd vd. 2017). Ancak bu yöntemler arasında yüksek miktarda RNA gerektirmesi, düşük doğruluk ve hassasiyetleri, maliyetleri açısından önemli farklılıklar bulunmakta ve bu nedenle kullanım alanları sınırlandırılmaktadır (Maios

2006). Real-time PCR metodu ise güvenilir ve kesin bir metot olması ve ayrıca diğer yöntemlerin doğrulanması amacıyla ekspresyon analizi çalışmalarında yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Xue vd. 2015; Oliveira vd. 2015a,b; Fontenelle vd. 2017). Real time PCR'ın en önemli özelliği kantitatif analiz yapmasıdır. Hedef DNA'nın zaman içerisinde miktarında meydana gelen değişimi kesin bir şekilde tespit etme imkânı sunmaktadır. Tespit için farklı kimyasallar bulunmasına rağmen bitki patojeni fungusların tespitinde daha çok SYBR green teknolojisi tercih edilmektedir (Okubara vd. 2005, Garrido vd. 2009).

Günümüzde bitki fungal hastalıklarının kontrolünde kullanılan en yaygın metot fungusit uygulamalarıdır. Bununla birlikte kanunsal sınırlamalar ile insan ve çevreye olumsuz etkileri fungusit kullanımında önemli engeller oluşturmaktadır. Ayrıca günümüzde organik ürün tüketimine yönelik eğilim giderek artmaktadır. Ülkemizde ise farklı illerde organik fasulye yetiştiriciliği konusunda farklı proje çalışmaları gerçekleştirilmektedir (Anonim 2017a,b). Bu kapsamda bitki hastalıklarının kontrolünde alternatif çevre dostu uygulamaların geliştirilmesi ve özellikle bitkilerdeki doğal savunma mekanizmalarının uyarılarak patojenlere karşı dayanıklılık sağlanması üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Polanco vd. 2012; 2014a; Arseneault vd. 2014; Rahman vd. 2015; Mayo vd. 2016). Bitkilerde genetik manipulasyon olmadan bitkinin doğal savunma mekanizmasının uyarılması veya artması uyarılmış dayanıklılık (induced resistance) olarak adlandırılmaktadır. Bitkilerdeki doğal savunma mekanizmaları patojen enfeksiyonu sırasında uyarılabildiği gibi dışarıdan farklı kimyasalların uygulanması ile de uyarılabilmekte ve hastalıklara karşı dayanıklılık sağlanabilmektedir (Oostendorp vd. 2001; Lopez ve Lucas 2002; Martínez-Aguilar vd. 2016). Dayanıklılığın uyarılmasında kullanılan bu bileşikler bitkilerdeki dayanıklılık mekanizmasında etkili olan salisilik asit, BTH (Benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester), INA (2,6-dichloroisonicotinic acid), BABA (DL-3-aminobutyric acid), jasmonik asit gibi kimyasallarla ilgili genlerin aktivasyonunda ve sinyal mekanizmalarında ikincil uyarıcılar olarak rol oynadıkları bilinmektedir (Kessmann vd. 1994; Lawton vd. 1996; Metraux 2001; Walters vd. 2007). Bu kapsamda farklı bitki aktivatörlerinin fasulye antraknozuna karşı dayanıklılık sağladığına dair bazı araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Polanco vd. 2012; 2014b; Rodrigues vd. 2015). Ancak bu çalışmalar sadece bitkideki

hastalık şiddetinin engellenmesi ve bazı enzim aktivitelerinin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilmiş olup bu patojene karşı elde edilen dayanıklılığın hangi genlerle ilişkili olduğu ve dayanıklılık mekanizmalarındaki rolü üzerine çalışmalar gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışmada ise fasulye antraknozuna karşı alternatif mücadele yöntemi olarak dayanıklılık mekanizmasının uyarılmasında BTH (acibenzolar-S-methyl), silisyum ve jasmonik asit etkisinin belirlenmesi ve dayanıklılıkta rol oynayan genlerin transkripsiyon seviyelerindeki zamana bağlı olarak farklılıkların real-time PCR yöntemi ile incelenmesi hedeflenmiştir.

Genel olarak bu tez kapsamında ülkemizde ve dünyada fasulye üretim alanlarında yaygın olarak görülen *C. lindemuthianum*'un genetik karakterizasyonunun yapılması, dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi ve alternatif mücadele yöntemlerinin etkinliğinin klasik ve gen ifadesi düzeyinde ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda:

- ✓ *Colletotrichum lindemuthianum*'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) ve Inter Primer Binding Site (iPBS) yöntemleri ile incelenmesi
- ✓ Ülkemizdeki bazı önemli fasulye genotip ve çeşitlerinin hastalık etmenine karşı reaksiyonlarının belirlenmesi
- ✓ Farklı illerden toplanan fasulye genotiplerindeki dayanıklılık kaynaklarının Marker Destekli Seleksiyon (MAS) ile belirlenmesi
- ✓ Patojen genotiplerine bağlı olarak bitkideki dayanıklılık gen ekspresyonlarındaki değişimlerin incelenmesi
- ✓ Patojene karşı alternatif mücadele yöntemi olarak dayanıklılık mekanizmasının uyarılmasında farklı kimyasal uyarıcıların gen ekspresyonları üzerindeki etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Colletotrichum lindemuthianum* Populasyonlarındaki Patojenik ve Genetik Farklılıklarının Araştırılması Üzerine Yapılan Çalışmalar

Fasulyede görülen hastalık etmenleri içerisinde *Colletotrichum lindemuthianum*'un neden olduğu antraknoz hastalığı fasulye yetiştiriciliği yapılan tüm alanlarda en yaygın görülen hastalık etmenidir. Yaygın bir patojen olması ve yüksek düzeyde genetik farklılık göstermesi nedeniyle bugüne kadar yapılan çalışmalarda 247'den fazla ırkı olduğu tespit edilmiştir (Martiniano-Souza vd. 2017). Ülkemizde ise Alam ve Rudolph (1993) tarafından yapılan ilk çalışmada farklı bölgelerden elde edilen izolatlar arasında 4 farklı ırkın [alfa (α), beta (β), gama (γ) ve delta (δ)] bulunduğu tespit edilmiştir.

Madakbaş vd. (2006) ise gerçekleştirdikleri ilk çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi'nden toplanan fungus izolatlarının alfa (α), beta (β) ve delta (δ) ırklarına ait olduğunu belirtirken, daha sonra binary isimlendirme ve uluslararası ayırıcı set ile yaptıkları diğer bir çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden toplanan 51 izolat arasında 35 ırkın bulunduğunu bildirmiştir (Madakbaş vd. 2013).

Ülkemizdeki patojen izolatlarının patojenik ve genetik farklılıklarının Canseven (2011) tarafından incelendiği diğer bir çalışmada Rep-PCR, RAMS ve RAPD markerları kullanılmıştır. Dört farklı bölgeden elde edilen 47 izolat arasında % 100 genetik çeşitlilik olduğu ve izolatlar arasında 37 ırk bulunduğu belirtilmiştir.

Dünyada da patojen izolatları arasındaki patojenik ve genetik farklılıkları incelemek amacıyla çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda Amerika kıtasında yer alan Brezilya, Dominik Cumhuriyeti, Honduras, Meksika ve Amerika Birleşik Devletlerinden elde ettikleri 138 *C. lindemuthianum* izolatının genetik farklılıklarını RAPD yöntemi ile araştıran Balardin vd. (1997), izolatların 15 gruba ayrıldığını bildirmiştir. Ayrıca izolatların ayırımında belirli bir coğrafi model olmadığı ve en büyük iki grubun ele alınan tüm ülkelerden izolatlar barındırdığı belirtilmiştir. Ayrıca

izolatların virölenslik özellikleri ile genetik dağılımları arasında da bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir.

Arjantin'in kuzeybatısındaki yabani fasulyelerden elde edilen 5 popülasyona ait 45 *C. lindemuthianum* izolatının genetik farklılıklarını inceleyen Sicard vd. (1997), RAPD yöntemi ile iki ana grup oluştuğunu ve izolatların bulunduğu coğrafi bölge ile gruplanmaları arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Ayrıca yapılan AMOVA analizinde toplam genetik varyasyonun çok büyük bir kısmının popülasyonlar içindeki farklılıktan kaynaklandığı ve popülasyonlar arasındaki farklılaşma önemli olmasına rağmen zayıf kaldığı bildirilmiştir.

Gonzalez vd. (1998) Meksika'nın farklı bölgelerinden elde ettikleri 59 *C. lindemuthianum* izolatının genetik varyasyonunu inceledikleri çalışmada, RAPD verisi ile tamamı polimorfik olan 62 band değerlendirirken, AFLP yöntemi ile 183'ü polimorfik olan 230 band değerlendirmiştir. Her iki yöntemle de izolatlar iki ana gruba ayrılmış ve bu gruplar içerisinde daha küçük alt grupların oluştuğu ancak izolatların dağılımları arasında farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Yöntemler ile oluşturulan dendogramları incelemek amacıyla yapılan korelasyon analizlerinde ise düşük r değerleri ile dendogramlar arasındaki ilişkinin zayıf olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte RAPD yöntemi ile elde edilen dendogramda izolatların dağılımı ile coğrafi bölge arasında ilişki bulunmazken AFLP yönteminde doğrudan bir ilişki olduğu belirtilmiştir.

Orta Amerika, Güney Amerika, Avrupa ve Afrika ülkelerinden toplanan *C. lindemuthianum* izolatlarının patojenik ve genetik farklılıklarını inceleyen Ansari vd. (2004), AFLP yöntemiyle 50 ile 350 bp arasında değişen büyüklüklerde 575 band değerlendirmiş ve bunların % 17'sinin polimorfik olduğu bildirilmiştir. Jaccard metoduna göre oluşturulan dendogramda izolatların 3 gruba ayrıldığı, elde edilen dendogramın benzerlik matrisi ile kofenetik matris ($r=0.82$) arasında güçlü bir ilişkiye sahip olmakla birlikte bu ayrımın coğrafi bölgelerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Güney ve Orta Amerika izolatlarının çoğunluğunun iki cluster arasında gruplandığı ve

Avrupa ile Afrika izolatlarının genetik olarak daha çok Orta Amerika izolatlarına benzediği bildirilmiştir.

Damasceno e Silva vd. (2007) Brezilya'nın Minas eyalatine ait 5 farklı bölgeden elde ettikleri 48 *C. lindemuthianum* izolatının patojenik ve genetik varyasyonu ile populasyon yapılarını araştırdıkları çalışmada, RAPD primerleri ile 64 polimorfik band elde edilmiş ve izolatların % 89.6 benzerlik ile beş gruba ayrıldığını bildirmiştir. Bölgeler arasındaki farklılaşmayı daha iyi değerlendirmek amacıyla yapılan AMOVA analizinde ise populasyonlar içindeki varyasyonun % 96.06 ile oldukça yüksek olduğu ve buna bölgeler arasındaki tohum değişiminin katkı sağlamış olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca izolatların genetik gruplanması ile coğrafi bölgeleri arasında ve genetik varyasyon ile patojenik karakterizasyon arasında herhangi bir korelasyon olmadığı belirtilmiştir.

Himalaya Pradesh bölgesindeki 5 farklı populasyona ait 76 *C. lindemuthianum* izolatının genetik varyasyonunu 6 RAPD primeri ile inceleyen Padder vd. (2007), 12 polimorfik lokus elde etmiş ve bunların 10 tanesinin populasyonlar arasında oldukça farklı olduğunu belirtmiştir. Populasyonlar içindeki gen farklılığını gösteren H_s değerlerinin ise 0.26 ile 0.31 aralığında değişerek oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu kapsamda populasyonlar içindeki genetik farklılıkların oldukça yüksek olmasına rağmen yakın mesafedeki iki populasyon arasındaki gen farklılığı haricinde diğer populasyonlar arasındaki varyasyonun düşük olduğu belirtilmiştir. Populasyonlar arasındaki gen akışının düşük olmasının nedeni ise çalışmanın gerçekleştirildiği Himalaya Pradesh bölgesinin topografik yapısı ve bölgelerde yerel fasulye çeşitlerinin yetiştirilmesi ile açıklanmıştır.

Sharma vd. (2007) Hindistan'ın kuzeybatı Himalaya eyaletinden elde ettikleri 90 *C. lindemuthianum* izolatını 9 RAPD primeri ile karakterize etmiş ve bu izolatlardan % 87.5'inin polimorfik olduğu, 0.2 ile 3.5 kilo baz (kb) arasında değişen büyüklüklerde 80 band değerlendirmiştir. RAPD verisiyle oluşturulan UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) analizinde izolatların % 57 benzerlikle iki ana gruba

ayrıldığı ve izolatlar ile coğrafi dağılım arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir.

Ishikawa vd. (2008) yaptıkları çalışmada Brezilya'nın farklı bölgelerinden, farklı zamanlarda ve farklı konukçuklardan elde ettikleri 65 nolu ırka ait 13 *C. lindemuthianum* izolatının genetik çeşitliliğini 24 RAPD primeri ile incelemiş ve 83 polimorfik band elde etmiştir. Dice'ın benzerlik matrisine göre oluşturulan dendogramda benzerlik katsayılarının 0.54 ile 0.82 arasında değiştiği ve izolatların 11 gruba ayrıldığı bildirilmiştir. Irk içerisindeki genetik farklılığın oldukça yüksek olmasıyla birlikte izolatların elde edildikleri coğrafik bölgelere göre ayrılmadığı belirtilmiştir.

Yunanistan'ın üç farklı bölgesinden elde edilen 35 *C. lindemuthianum* izolatının genetik farklılıkları 7 RAM primeri ve 3 ERİC-BOX (The enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence) primeri ile Bardas vd. (2009) tarafından incelenmiştir. RAM PCR ile primer başına 4 ile 11 arasında değişen sayıda band değerlendirilmiş ve bunların büyüklüklerinin 100 ile 1600 bp arasında değiştiği bildirilmiştir. UPGMA analizi ile oluşturulan dendogramda izolatların % 73 genetik benzerlikle iki ana gruba ayrıldığı ve birinci ana grupta coğrafi bölge ile ilişkili 33 izolat bulunurken diğerinde 3 izolat bulunduğu bildirilmiştir. ERİC ve BOX PCR çalışmalarında ise 200 ve 2500 bp arasında değişen büyüklüklerde PCR ürünleri değerlendirilmiş ve UPGMA ile elde edilen dendogramda % 68 genetik farklılık ile 3 grup olduğu bildirilmiştir. Her iki yöntemdeki clusterda alt gruplardaki izolat dağılımlarının coğrafi bölge ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca elde edilen dendogramlar ile kullanılan yöntemler arasındaki korelasyonu değerlendirmek amacıyla yapılan kofenetik matris değerlerinin ($r=0.58$) doğrusal olduğu bildirilmiştir.

Eşeyli üremenin *C. lindemuthianum*'un genetik varyasyonuna etkisini araştırmak amacıyla 5 popülasyona ait 200 izolatı 28 RAPD primeriyle inceleyen Souza vd. (2010), 128 polimorfik lokus elde etmiş ve izolatların popülasyon yapılarına göre beş gruba ayrıldığını bildirmiştir. Popülasyonlar arasındaki genetik farklılık ($G_{ST}=0.6455$)

oldukça önemli bulunmakla beraber, bu farklılığın % 69'unun bireysel populasyonlar arasından, % 31'inin populasyonlar içindeki varyasyondan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Brazilya'nın Pernambuco eyaletinden elde edilen 17 *C. lindemuthianum* izolatının genetik farklılıklarını ITS bölgesinin sekanslanması ile inceleyen Martiniano-Souza vd. (2017), 12 izolatı GenBank veritabanındaki izolatlar ile kıyaslamış ve 12 tanesinin 2047 nolu ırk ile % 100 benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca izolatlar arasındaki en büyük genetik farklılığın çok sayıda SNP içermesi nedeniyle ITS 2 bölgesinde görüldüğü belirtilmiştir.

Maibam vd. (2015), Hindistan'ın Meghalaya eyaletinde yaygın olarak yetiştirilen 20 Fransız fasulye genotipinin *C. lindemuthianum*'a karşı reaksiyonlarını araştırdıkları çalışmada, Rajma Gold, ML-D ve ML-F genotiplerinin (% 24.4-31.1 hastalık indeksi) kısmen dayanıklı, 10 genotipin (% 34.44-55.55 hastalık indeksi) kısmen hassas ve 7 genotipin % 56.66-77.77 hastalık şiddeti indeksleri ile hassas olduğunu bildirmiştir. Çalışma kapsamında test edilen genotiplerin hiçbirinin yüksek derecede dayanıklılık veya hassasiyet göstermediği belirtilmiştir.

Brezilya'nın Santa Catarina ve Paraná eyaletlerinden elde edilen 15 fasulye genotipinin *C. lindemuthianum*'a karşı reaksiyonlarının belirleyen Fioreze vd. (2018) ise yerel fasulye çeşitlerinin büyük çoğunluğunun kısmen dayanıklı olduğunu bildirmiş ve bu genotiplerin antraknoza karşı dayanıklılık kaynağı olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

Kiptoo vd. (2020), Kenya'da 15 fasulye genotipinin reaksiyonlarını değerlendirdikleri çalışmada, 3 genotipin dayanıklı, 3 adedinin hassas reaksiyon gösterdiğini tespit etmiştir. Antraknoza karşı hassas ve dayanıklı olarak tanımlanan bu genotiplerin, ıslah programlarında dayanıklılık materyali olarak kullanılmasının faydalı olacağı bildirilmiştir.

Otuz farklı Yunan fasulye genotipinin farklı *C. lindemuthianum* ırklarına karşı reaksiyonlarını inceleyen Bardas vd. (2007) testlenen genotipleri hastalık reaksiyonlarına göre 9 farklı gruba ayırmış ve iki adedinin (Ithomi FS60 ve Larisa) tüm patojen izolatlarına karşı dayanıklı reaksiyon gösterdiğini bildirmiştir.

2.2 Marker Destekli Seleksiyon Amacıyla Yapılan Çalışmalar

Antraknoz hastalığına karşı mücadelede en etkili ve sürdürülebilir yöntem dayanıklı ıslah materyallerinin geliştirilmesidir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda dayanıklılıkta rol oynayan çok sayıda gen tespit edilmiş ve bu genler *Co* sembolü ile isimlendirilmiştir. Bugüne kadar hem Orta Amerika hem de Güney Amerika fasulye genotiplerine ait 23 adet *Co* lokusu genetik haritalarda belirlenmiş ve bunlarla ilişkili çok sayıda moleküler marker geliştirilmiştir (Campa vd. 2014; Trabanco vd. 2015). Söz konusu markerlar, çok sayıda ülkede dayanıklı çeşitlerin seçilmesi, yeni dayanıklılık kaynaklarının tespit edilmesi ve farklı gen havuzlarına ait genlerin kombinasyonu ile antraknoza karşı geniş spektrumlu dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi amacıyla fasulye ıslah programlarına dâhil edilmiştir (Boersma vd. 2013; Geetha vd. 2013; Tryphone vd. 2013; Vieira vd. 2018).

Ülkemizde ise moleküler markerler kullanılarak yapılan ıslah çalışmalarında Madakbaş vd. (2009) Orta Karadeniz bölgesindeki *C. lindemuthianum* ırklarına karşı fasulye genotiplerinin *Co-2*, *Co-4*, *Co-4²*, *Co-6* ve *co-8* genlerini taşıdığını bildirmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan diğer bir çalışmada taze fasulyelerde antraknoza karşı Ayşe Kadın tipi 9 yerel çeşit ve 7 dayanıklı yabancı çeşit kullanarak elde edilen 63 F2 hibridinde dayanıklılığın *Co-1* lokusu ile sağlandığı bildirilmiştir (Madakbaş vd. 2013). Bu kapsamda Ayşe kadın tipi fasulyelerin Andean orijinli olduğunu ve Andean kökenli *Co-1* geni ile dayanıklılığın sağlandığını bu çalışma ile doğrulanmıştır. Aynı zamanda Türkiye'nin farklı illerinden toplanan 51 izolat arasında binomial isimlendirme ve uluslararası ayıcı set ile 35 ırkın bulunduğu belirlenmiş ve bu ırlardan 28 adedinin ayırıcı set ile ayrılabilirken, 7 ırkın ayırıcı sette hastalığa neden olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca ayırıcı sette yer alan tüm Güney Amerika orijinli çeşitlerin bu ırlara

karşı hassasiyet gösterdiği bildirilmiştir. Tespit edilen ırkların çoğunlunun *Co-11* geni taşıyan çeşitlere karşı yüksek derecede virulent, bazı ırkların *Co-3*, *Co-4*³, *Co-9*, *Co-5*, *Co-2*, *Co-1*, *Co-6*, *Co-12* geni taşıyan çeşitlere karşı orta derecede virulent; *Co-1*³, *Co-4*, *Co-1*⁵, *Co-4*², *Co-5*² ve *Co-7* geni taşıyan çeşitlere karşı düşük derecede virulent olduğu ifade edilmiştir. Farklı gen kombinasyonlarının özellikle de *Co-1*, *Co-2* ve *Co-4* gen kombinasyonu taşıyan çeşitlerin ülkemizde bu hastalıkla mücadelede oldukça faydalı olacağı belirtilmiştir.

Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 123 fasulye genotipinin *C. lindemuthianum*'un 55 nolu ırkına karşı dayanıklılığını klasik ve moleküler markerlar ile (SCAR ve RAPD) belirleyen Erdinç vd. (2017) 21 genotipin etmene karşı dayanıklı reaksiyon gösterdiğini ve dayanıklılığın daha çok Orta Amerika kökenli *Co-4*, *Co-4*² ve *Co-6* genleriyle sağlandığını tespit etmiştir. Ayrıca dayanıklı genotiplerden bazılarının *Co-1*⁵ ve *Co-10* genleri taşıdığı ve Orta Amerika ve Güney Amerika gen havuzlarına kapsayan bu genotiplerin 55 nolu ırka karşı yüksek seviyede dayanıklılığa sahip olduğu bildirilmiş ve dayanıklı reaksiyon gösteren bu genotiplerin ıslah programlarına dâhil edilmesinin faydalı olacağı ifade edilmiştir. Bununla birlikte sadece 1 genotipte (G89) tüm markerlardan amplifikasyon ürünü elde edilirken, 6 genotipte (G19, G20, G34, G93, G97 ve Jaguar) herhangi bir ürün oluşmadığı bildirilmiştir.

Ülkemizde Van gölü çevresinden toplanan 92 fasulye genotipinin dayanıklılık kaynaklarını 4 farklı SCAR ve 1 RAPD markerı ile testleyen Ekincialp ve Şensoy (2018), 82 genotipin *Co-4*², 54'ünün *Co-4*, 36 genotipin *Co-6*, 15 genotipin *Co-1*⁵ ve 6 genotipin *Co-10* alleleline sahip olduğunu bildirmiştir. G81 nolu genotipin testlenen tüm allelleri taşıdığı bildirilirken, 5 genotipin (G27, G28, G40, G76 ve G86) herhangi bir gen lokusuna sahip olmadığı belirtilmiştir.

Altmış dokuz Fransız fasulye genotipinin 14 SCAR marker ile dayanıklılık kaynaklarını inceleyen Geetha vd. (2013), beş markerdan (SAS13, SZ04, SBB14, SF10, SC08) tek bir amplifikasyon ürünü elde etmiş ve *Co-10*, *Co-4*², *Co-4*, *Co-6* allelleri ile ilişkili bu markerların fasulyede dayanıklılık sağlayan genleri tespit etmede oldukça faydalı

olduğunu bildirmiştir. Ayrıca genotipler arasında en yaygın görülen genlerin sırasıyla *Co-4²*, *Co-10*, *Co-4* ve *Co-6* olduğu bildirilmiştir.

Brezilya'da 118 fasulye hattını üç farklı patojen ırkına karşı 6 SCAR marker ile inceleyen Beraldo vd. (2009), hatlar arasında en yaygın görülen dayanıklılık geninin *Co-6* olduğunu bunu sırasıyla *Co-4²*, *Co-3³*, *Co-5* ve *Co-4* genlerinin takip ettiğini ve bu dayanıklılık genleri ile ilişkili markerların ıslah çalışmalarına katkı sağlayacağını bildirmiştir.

Ekvator ve Guatemala bölgesinde farklı *C. lindemuthianum* ırklarına karşı dayanıklılıkta rol oynayan genleri araştıran Awale vd. (2007), farklı gen havuzlarına ait *Co-1²* ve *Co-4²* gen kombinasyonlarının bölgedeki patojenlere karşı sürdürülebilir dayanıklılıkta en iyi tercih olacağını belirtmiştir.

Brezilya'da yaygın görülen *C. lindemuthianum* ırklarına karşı 55 fasulye genotipinin fenotipik ve moleküler marker yöntemleri ile dayanıklılık kaynaklarını araştıran Vieira vd. (2018), *in vivo* çalışmalarda 28 genotipin dayanıklı reaksiyon gösterdiğini, bunlardan 10 tanesinin 1.0 skala değeri olarak patojenlere karşı oldukça dirençli olduğunu bildirmiştir. Moleküler markerlar ile yapılan çalışmalarda ise 4 farklı SCAR markerın [SH18-SAS13 (*Co-4²*), SAB03 (*Co-5*), SAZ20 (*Co-6*)] dayanıklılık genlerinin tespitinde yararlı olduğu belirtilmiştir. Fenotipik çalışmalar sonucunda dayanıklı reaksiyon gösteren ve *Co-3⁴*, *Co-4²*, *Co-5* ve *Co-6* genleri taşıdığı belirlenen K10 ile *Co-4²* geni taşıyan K13 genotipinin ıslah çalışmalarında donör bitki olmaya aday olabileceği bildirilmiştir. Benzer şekilde Brezilya'da yapılan diğer bir çalışmada *Co-4²*, *Co-5* ve *Co-6* genlerini tek başına veya kombinasyonlarını taşıyan genotiplerin hastalığa karşı daha fazla koruma sağlayacağı bildirilmiştir (Souza vd. 2014).

Kanada'da yaygın olarak yetiştirilen 7 fasulye çeşidinin *C. lindemuthianum*'un farklı ırklarına karşı hastalık reaksiyonlarını ve dayanıklılık genlerini RAPD, SCAR ve SNP (Single-nucleotide polymorphism) markerleri ile araştıran RL Conner vd. (2007), tüm ırklara karşı dayanıklı olan çeşitlerin *Co-1* ve *Co-2* genlerinin kombinasyonu veya

yalnız *Co-1*² geni tarafından yönetildiğini belirtmiştir. Gonçalves-Vidigal vd. (2009) tarafından ise *Co-1* lokusundaki farklı allel kombinasyonlarının her iki gen havuzuna ait genotiplerde dayanıklılık sağlamak için faydalı olacağı belirtilmiştir.

Darben vd. (2017) ise *C. lindemuthianum*'un 73 ve 2047 nolu ırklarına karşı 75 fasulye genotipinin dayanıklılık kaynaklarını, *Co-4*² geniyle ilişkili SAS13 ve *Co-4*² geniyle ilişkili SF10 markerleri ile incelemiştir. Her iki ırka karşı da dayanıklı reaksiyon gösteren 14 genotipten 13 tanesinin *Co-4*² ve *Co-10* genlerine sahip olduğu ve bu genotiplerin ıslah programları için ümitvar bir kaynak olabileceği bildirilmiştir.

2.3 Bitki Patojen İnteraksiyonunda Dayanıklılık Genlerinin Ekspresyonlarındaki Değişimler ve Dayanıklılık Mekanizmasının Uyarılmasında Farklı Kimyasal Uyarıcıların Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi Amacıyla Yapılan Çalışmalar

Fasulyede yapılan konukçu patojen interaksiyonu çalışmalarında patojen enfeksiyonları esnasında birçok farklı genin rol oynadığı ve bunların transkripsiyonlarında önemli farklılıkların bulunduğu farklı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Borges vd. 2012; Padder vd. 2016; Vasconcellos vd. 2016; Fontenelle vd. 2017; Todd vd. 2017). Konukçu patojen interaksiyonunu ortaya koymak amacıyla yapılan bu ve benzeri çalışmalarda savunma ile ilişkili genlerin tespiti ve miktar tayini için farklı yöntemler kullanılmakla beraber Real time PCR yöntemi güvenilir ve kesin bir metot olması ve diğer yöntemlerin doğrulanması amacıyla yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Maios 2006). Bu kapsamda fasulye bitkisi ile yapılan patojen interaksiyonu çalışmalarında da tespit edilen genlerin doğrulanmasında Real time PCR yöntemi farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Borges vd. 2012; Mayo vd. 2015, 2016; Fontenelle vd. 2017).

Dayanıklı fasulye genotipi 'SEL 1308' ile *C. lindemuthianum*'un 73 nolu ırkı arasındaki interaksiyon esnasında bitkinin yaprak, epikotil ve hipokotil dokularında savunma ile ilişkili 12 gende meydana gelen değişimleri, RT-qPCR kullanarak inceleyen Borges vd. (2012) patojenisite ile ilişkili genler (*PR1a*, *PR1b*, *PR2*, *PR16a* ve *PR16b*) de dâhil olmak üzere seçilen tüm genlerin bitki dokusu ve zamana bağlı olarak farklı derecelerde

eksprese olduğunu bildirmişlerdir. Bu kapsamda tüm bitki dokularında enfeksiyon ilerledikçe özellikle *PR1a* ve *PR2b* genlerinin artış gösterdiği ancak *PR1b*'nin yapraklarda diğer dokulara nazaran daha erken eksprese olduğu bildirilmiştir. *PAL* transkriptinin ise enfeksiyonun başlangıcında yapraklarda iki kat artış gösterse de zamanla azaldığı ve yaprakların enfeksiyona karşı daha hızlı tepki gösterdiği bildirilmiştir.

Fasulyede *R. solani*'nin neden olduğu kök çürüklüğünün kontrol edilmesinde biyokontrol ajanı olarak *Trichoderma harzianum*'un etkisini qPCR yöntemiyle araştıran Mayo vd. (2015) bu biyokontrol etmeninin bitki savunma reaksiyonlarıyla ilişkili olan *CH5b*, *CH1*, *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4* ve *PAL* genlerinin ekspresyonlarının uyarılmasında oldukça etkili olduğunu belirtmiştir. Aynı araştırmacılar 2016 yılında gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmada ise *Trichoderma velutinum* ve *Rhizoctonia solani* arasında savunma ile ilişkili gen farklılıklarını incelemiştir. Test edilen 48 gen arasında sadece *WRKY33*, *CH5b* ve *hGS* genlerinin bitkide *T. velutinum* bulunduğunda ekspresyon artışı gösterdiğini, hem *T. velutinum* hem de *R. solani* bulunduğunda ise *hGS* geninde artış olduğunu bildirmişlerdir (Mayo vd. 2016).

Fasulyede *Sclerotinia sclerotiorum*'un neden olduğu beyaz çürüklük hastalığına karşı dayanıklılık mekanizmasını aydınlatmak için patojen enfeksiyonu esnasında eksprese olan genleri suppression subtractive hibridizasyon (SSH) cDNA kütüphanesi yöntemiyle araştıran Oliveira vd. (2015a) 979 unigen elde etmiştir. Tespit edilen genlerden 11 adedinin ekspresyon seviyesini Real-time PCR ile doğrulayan araştırmacılar PR proteinleri, fenilpropanoid pathway genleri ve diğer stres ve savunma ile ilişkili genlerin zamana bağlı olarak farklılıklar gösterdiğini belirlemiştir. Elde edilen sonuçlar konukçu patojen ilişkisinin daha ayrıntılı olarak anlaşılmasına katkı sağlamıştır.

Fasulyede *Fusarium oxysporum* enfeksiyonu esnasında değişen genleri cDNA-AFLP tekniği ile araştıran Xue vd. (2015) elde edilen transkript verisinden 98 adedinin metabolizma, sinyal transferi, protein sentezi ve süreci, gelişme ve hücresel organizasyon, protein taşınması, gen ekspresyon ve RNA metabolizması, redox

reaksiyonu, savunma ve stres tepkileri, enerji metabolizması ve hormon tepkileri ile ilişkili genlerin oluşumunda rol oynadığını belirtmiştir. Ayrıca bu genlerin zamana bağlı olarak qPCR sonuçlarında önemli farklılıklar bulunduğu belirtilmiştir.

Bitki hastalıklarında doğal savunma mekanizmaları patojen enfeksiyonu sırasında uyarılabildiği gibi dışarıdan farklı kimyasalların uygulanması ile de uyarılabilmekte ve hastalıklara karşı dayanıklılık sağlanabilmektedir (Oostendorp vd. 2001; Lopez ve Lucas 2002; Martínez-Aguilar vd. 2016). Dayanıklılığın uyarılmasında kullanılan bu bileşikler bitkilerdeki dayanıklılık mekanizmasında etkili olan salisilik asit, BTH, INA, BABA, jasmonik asit gibi kimyasallarla ilgili genlerin aktivasyonunda ve sinyal mekanizmalarında ikincil uyarıcılar olarak rol oynadıkları bilinmektedir (Kessmann vd. 1994; Lawton vd. 1996; Metraux 2001).

BTH veya ASM bitkilerdeki doğal savunma mekanizmasını uyararak etki gösteren ve dünyada Bion™, Actigard® veya BOOST® gibi ticari isimler ile yaygın olarak kullanılan kimyasal bir uyarıcıdır (Görlach vd. 1996; Brisset vd. 2000). Bitkilerde dayanıklılık mekanizmalarında rol oynayan salisilik asit ve jasmonik asit gibi sistemik kazandırılmış dayanıklılık (SAR) ile ilişkili genleri aktive ederek dayanıklılık sinyal mekanizmasında ikincil uyarıcı olarak rol oynamaktadır (Benhamou ve Belanger 1998; Metraux 2001; Oostendrop 2001). Etki mekanizması üzerinde yapılan çalışmalarda salisilik asit reseptörü olan (salisilik asit binding protein 2) SABP2'nin ASM'yi asit formuna (acibenzolar) dönüştürerek bitkilerde SAR oluşumunu uyardığı belirtilmiştir (Tripathi vd. 2010). BTH'nin savunma ile ilişkili bileşiklerin, PAL aktivitesinin, PR proteinlerin ve fenol birikiminde rol oynayan genlerin transkript seviyelerini arttırarak çok sayıda patojen fungusa karşı etkili bir şekilde koruma sağladığı tespit edilmiştir (Görlach vd. 1996; Benhamou ve Belanger 1998; Jensen vd. 1998; Latunde-Dada ve Lucas 2001; Bokshi vd. 2003; Kauss vd. 2003; Si Amour 2003; Maios 2006).

Hassas ve dayanıklı buğday çeşitlerinde *Fusarium pseudograminearum*'un neden olduğu kök çürüklüğüne karşı metil jasmonat (MeJA) ve BTH uygulamalarının etkisini patojenik ve genetik olarak araştıran Desmond vd. (2005), 26 buğday geninin

ekspresyon seviyelerini inokulasyondan 1, 2 ve 4 gün sonra değerlendirmiş ve her iki çeşitte de *PR1*, *PR2* (b,1-3 glucanase), *PR3* (chitinase), *PR4* (wheatwin), *PR5* (thaumatin-like protein), *TaPERO* (peroxidase), *PR10* ve *TaGLP2a* (germin-like) genlerinin farklı seviyelerde eksprese olduklarını bildirmiştir. Araştırmacılar MeJA uygulamasının her iki çeşitte de bahsedilen gen ifadelerini arttırdığını bildirirken, BTH uygulamasının sadece hassas çeşit Kennedy’de artış meydana getirdiğini belirtmiştir. Ayrıca reaksiyon çalışmalarında her iki çeşitte de başlangıçta hastalık belirtilerinin oluşumu yavaşlarsa dahi çalışma sonunda her iki uygulamanın da hastalık gelişimini önleyemeyerek kontrole yakın seyrettiğini ifade edilmiştir.

Şeker pancarında *Rhizoctonia solani* enfeksiyonuna karşı tohum ve toprağa BTH, BABA ve SA uygulamaları yapan Maios (2006), kimyasal aktivatörlerin çıkış öncesi çökerten ve çıkış sonrası bitki ölümlerini engellemediğini bildirmiştir. Ancak yapılan çalışmada BTH uygulamasının sistemik dayanıklılık ile ilişkili savunma genlerinden kitinaz, peroksidaz, kalkon izomeraz ve kalkon sentaz aktivitelerini değiştirdiği, *R. solani* ve BTH bulunan bitkilerde *chit3* geninin kontrole kıyasla 15 kat artış gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda şeker pancarında BTH uygulamasının gen ifadelerini etkilediği fakat hastalık gelişimine karşı tam bir koruma sağlamadığı bildirilmiştir.

Japon armudunda *Venturia nashicola* enfeksiyonuna karşı yaprağa uygulanan acibenzolar S methyl (ASM)’in etkisini araştıran Faize vd. (2009), uygulamanın hastalığa karşı % 33 oranında koruma sağlamakla birlikte patojenisite ile ilişkili *PR1* gen ifadesinin patojen enfeksiyonundan sonra uygulama yapılmayan bitkilere kıyasla 20 katlık bir artış gösterdiğini belirtmiştir.

Elmada ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora*’ya karşı gövde boyama, kök ıslatma ve yaprak püskürtmesi şeklinde uygulanan BTH’nin etkisini inceleyen Johnson ve Temple (2017), tüm uygulama yöntemlerinin hastalık gelişimini önlemede % 22 ile 25 aralığında koruma sağladığını bildirmiştir. Bunun yanısıra gövde boyaması şeklinde uygulanan BTH’nin, yapraklarda patojenisite ile ilişkili *PR1* ve *PR2* gen ifadelerini 48 kata kadar arttırdığı bildirilmiştir.

Bağda *Plasmora viticola* ve *Erysiphe necator* enfeksiyonları öncesinde BTH uygulaması yapan Dufour vd. (2013), patojen izolatına bağlı olarak hastalık gelişiminin % 61-98 aralığında azalış gösterdiğini belirtmiştir. Bununla birlikte BTH'nin *P. viticola* enfeksiyonuna karşı patojenisite ile ilişkili *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR8* ve *PR10* gen ifadelerini arttırırken, *E. necator*'a karşı *PR3*, *PR6* ve *PR10* genlerinde artışa neden olarak dayanıklılığın uyarılmasında oldukça etkin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca PR protein artışlarının, BTH uygulaması sonucunda meydana gelen indol pathway transkriptlerinin düzenlenmesi ve polifenol ve stilbenlerin kantifikasyon birikimleri ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından 2016 yılında yapılan diğer bir çalışmada, BTH'nin bağda *P. viticola*'ya karşı dayanıklılık sağlamasında PR genlerinden *PR1*, *PR2*, *PR3*; phenylpropanoid pathwaylerinden *PAL* ve *STS*; redox durumunda *GST* ve etilen pathwaylerinde *ACC* genleri ile ilişkili olduğu bildirilmiş ve BTH ile hastalık şiddetinin % 70 oranında azaldığı belirtilmiştir (Dufour vd. 2016).

Domates ve yaban mersini çiçeklerindeki patojen enfeksiyonlarına karşı BTH, INA ve MeJA'nın etkisini araştıran Thomas- Sharma vd. (2017), domateste INA haricinde diğer uygulamaların yaban mersininde ise tüm uygulamaların uyarılmış dayanıklılıkta rol oynayan bazı genlerde önemli değişimler yarattığını bildirmiştir. Bu kapsamda domateste MeJA ve BTH'nin sırasıyla *Pin2* ve *PR4* gen aktivitesini; yaban mersininde ise BTH'nin *PR3* ve *PR4*, MeJA'nın ise sadece *PR4* gen ekspresyonunda önemli düzeyde artışa neden olduğu ifade edilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda bitki aktivatörlerinin domateste *Botrytis cinerea*, yaban mersininde *Monilinia vaccinii-corymbosi* enfeksiyonuna karşı etkisini incelemiş ve gen ifadeleri düzeyinde farklılıklar olmasına rağmen patojen gelişiminin engellenmesinde yetersiz olduğu bildirilmiştir.

Silisyum (Si) ise dünya kabuğunda oksijenden sonra en fazla bulunan element olup toprakta % 70 civarında bulunmaktadır (Wang vd. 2017). Genellikle Si yapraklardan kalsiyum silikat; köklerden silisilik asit olarak alınmakta, plasma membranına *Lsi1* ve *Lsi2* yoluyla geçmektedir (Ma vd. 2006). Alınan silisyum öncelikle hücre duvarında birikmekte ve stresle ilişkili sinyal sisteminde etkili olarak bitkide fiziksel, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları uyarmaktadır (Fauteux vd. 2005). Bitkilerde

fiziksel olarak, kutikula altında ince bir silika katmanı oluşturulmasına, kitinaz, β -1,3 glukanaaz aktivitesiyle sert ve dayanıklı hücre duvarı biçimlenmesine ve papilla oluşumunda rol oynamaktadır (Metraux 2001). Dayanıklılık oluşumundaki biyokimyasal etkilerinin ise polifenoloksidad, glukanaaz, peroksidad ve PAL gibi savunma ile ilişkili enzimlerin aktivasyonu; fenol, flavonoid, fitoaleksin gibi antimikrobiyal bileşiklerin üretimi ve salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve etilen gibi sistemik sinyal mekanizmalarının düzenlenmesi üzerinde olduğu bildirilmektedir (Fauteux vd. 2005). Moleküler mekanizmalara etkisi ise PR proteinleri gibi konukçu direnci ile ilişkili protein ve genlerin transkript seviyelerini güçlendirmektir (Ghareeb vd. 2011; Wang vd. 2017). Bitki patojen interaksiyonunda silisyumun etkisini tespit etmek amacıyla yapılan birçok çalışmada savunma reaksiyonlarını teşvik ederek patojene karşı konukçu direncini arttırdığı bildirilmiştir (Kim vd. 2002; Polanco vd. 2012; Rahman vd. 2015; Rodrigues vd. 2015).

Çeltikte *Magnaporthe oryzae*'ye karşı silisyumun genler üzerindeki etkisini tüm genom düzeyinde inceleyen Brunings vd. (2009), patojen olmadığı durumlarda silisyumun 221 genin transkript seviyelerini etkilediğini ve çeltik dayanıklılık mekanizmasında oldukça önemli bir rol oynadığını bildirmiştir. Ayrıca enfeksiyon esnasında kontrole kıyasla silikon uygulanan bitkilerde 63 genin ifadesinde artış olurken 123 genin ifadesinde azalış meydana geldiği ve bu nedenle çeltik yanıklığı enfeksiyonuna karşı silisyumun transkript seviyelerinde fark yarattığı bildirilmiştir.

Sadece silisyum, silisyum+patojen, sadece patojen uygulanan gül bitkilerinde *Podosphaera pannosa*'ya karşı savunmada rol oynayan fenolik asit ve flavonoidlerin etki mekanizmasını ve konsantrasyonlarını inceleyen Shetty vd. (2011), phenylpropanoid pathwaylerinde önemli enzimleri kodlayan gen ifadelerinde artışlar olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar PAL, CAD ve CHS gen aktivitelerinin tüm uygulamalardan etkilendiğini, silisyum+patojen uygulanan bitkilerde 72. saatte PAL gen transkriptinin 39 kat artarak önemli bir fark oluşturduğunu belirtmiştir. Ayrıca çalışmada, sadece patojen uygulanan bitkilere kıyasla hastalık şiddetinde % 46 oranında azalış meydana geldiği ve bu azalışın fenolik içeriklerin artışıyla gerçekleştiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra sadece silikon uygulanan bitkilerde de önemli fenolik

bileşiklerin birikimini sağlayan gen ifadelerinin indüklendiği ve silisyumun külleme enfeksiyonuna karşı antifungal fenolik metabolitleri artırarak hastalık şiddetini azaltmada aktif rol oynadığı belirtilmiştir.

Hassas fasulye çeşidi Perola'da *C. lindemuthianum*'un neden olduğu antraknoza karşı silisyumun biyokimyasal etkisini inceleyen Polanco vd. (2012), bitkileri 0 (-Si) ve 2 mM (+Si) silisyum içeren besin solüsyonlarında yetiştirmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda silisyum uygulanan bitkilerde hastalık şiddetinin % 27 oranında azaldığı ancak çözünebilir fenolik bileşiklerde değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca (+Si) bitkilerde *PAL*, lipoksigenaz ve lignin konsantrasyonlarında artış görülürken, peroksidaz ve polifenoloksidaz aktivitesinin etkilenmediği ifade edilmiştir. Araştırmacılar, silisyumun dayanıklılıkta rol oynayan bazı biyokimyasal mekanizmaları arttırarak antraknoza karşı direnç oluşumunda etkili olabileceğini belirtmiştir. Aynı araştırmacılar 2014 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada antraknoza karşı yapraktan uygulanan potasyum silikat (KSi), sodium molybdate (NaMo), azoxystrobin ve kombinasyonlarının etkisini incelemiş ve KSi'nin % 29 oranında, KSi+NaMo'nun % 41 oranında hastalık gelişimini engellediğini ve hastalıkla mücadelede oldukça ümitvar olduğunu bildirmiştir (Polanco vd. 2014a). Yine aynı araştırmacılar tarafından yapılan diğer bir çalışmada 0 (kontrol) ve 2 mM silisyum içeren solüsyonda yetiştirilen bitkilerde hem fotosentez hem de antioksidatif metabolizma seviyeleri değerlendirilmiş ve silisyum uygulanan bitkilerin yapraklarında % 33 oranında silisyum biriktiği, hastalık şiddetinin de % 34 oranında engellendiği bildirilmiştir. Bununla birlikte Si uygulanan bitkilerde süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve glutathione reduktaz (GR) enzim aktivitelerinin daha yüksek, hidrojen peroksit (H₂O₂) aktivitesinin daha düşük olduğu ve bu enzim aktivitelerinin antraknoz şiddetinin azaltılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Polanco vd. 2014b).

Tarla koşullarında üç farklı dozda (1, 5, 10 ton/ha) uygulanan kalsiyum silikatın (Si) çeltik yanıklığına karşı etkisini araştıran Rahman vd. (2015), 5 ton/ha uygulanan bitkilerde hastalık şiddetinin % 47.3 oranında azaldığını bildirmiştir. Aynı zamanda araştırmacılar tarafından, Si uygulanan bitkilerde kontrole kıyasla savunma ile ilişkili enzimlerden peroksidaz ve polifenoloksidaz seviyelerinin daha yüksek olduğu,

flavonoid ve klorojenik asitleri kapsayan, fenilalanin amonyak liyazları ve lipoksigenazı kodlayan *PAL* ve *LOX* genlerinin ekspresyon miktarlarında önemli artışlar olduğu belirtilmiştir.

Lipoksigenaz (*LOX*)'ın bir ürünü olan jasmonik asitin de bitkilerde savunma reaksiyonlarında sinyal uyarıcı olarak görev yaptığı bildirilmektedir. Bu kapsamda thionin, osmotin ve ribozomu inaktive eden *RIP60* protein gibi antifungal proteinleri kodlayan genlerin transkript seviyelerini arttırdığı; fiziksel bariyer sağlayan hücre duvarı proteinlerinin ekspresyonunu düzenlediği, fitoaleksinin üretiminde rol alan genleri (*Chs*, *PAL*, *HGMR*) ve fenolik bileşikleri (polifenol oksidaz) uyardığı bildirilmektedir (Creelman ve Mullet, 1997). Jasmonik asitin genleri aktive etmesinin, okszofitodienoik gibi siklopentenoenonların aktive edilmesiyle ilişkili olduğu bilinmektedir (Farmer vd. 2003). Yapılan çalışmalarda bitki patojen interaksyonunda çeşitli bitkilerde jasmonik asit artışı olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Oliveira vd. 2015a; 2015b, Motallebi vd. 2017).

MeJA uygulamasının hassas fasulye çeşidi Perola'da *Sclerotinia sclerotiorum* enfeksiyonuna karşı savunma mekanizmasındaki rolünü araştıran Oliveira vd. (2015b), SSH cDNA kütüphane analizi kullanmış ve uygulama sonrasında bitki patojen interaksyonu boyunca farklı düzeylerde eksprese olan genleri tanımlamıştır. Tanımlanan 94 genin, sinyal üretimi, metabolizma, protein biyogenesi ve hücre savunması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte SSH görüntülemesinin doğrulanması amacıyla savunma ile ilişkili genlerin zamana bağlı ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Bu amaçla 12 günlük fasulye fidelerine 10 mM MeJA uygulanmış ve 12 saat sonra PDA ortamında geliştirilmiş *S. sclerotiorum* fungal diskleri ile inokulasyon yapılmıştır. Patojen+MeJA uygulanan ve patojen+su (kontrol) uygulanan bitkilerden, inokulasyondan 6, 12, 24, 48 ve 72 saat sonra örnekler alınarak, dayanıklılıkla ilişkili bazı transkriptlerdeki farklılıklar incelenmiş ve patojen+MeJA uygulanan bitkilerde *PR3* veya kitinaz (*PvChit1*), kalloz sentaz (*PvCallose*), *PvNBS-LRR* ve *PvF-box* gen ifadelerinin önemli düzeyde artış gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte MeJA uygulamasının bitkilerde *PR1*, *PR2*, *PAL* ve *LOX* genlerinin ekspresyonunu baskıladığı ifade edilmiştir. Çalışma sonucunda MeJA

uygulamasının *S. sclerotiorum* enfeksiyonunu yavaşlatarak kısmi bir direnç oluşturduğu ve dayanıklılık ile ilişkili genlerde değişimlere neden olduğu belirtilmiştir.

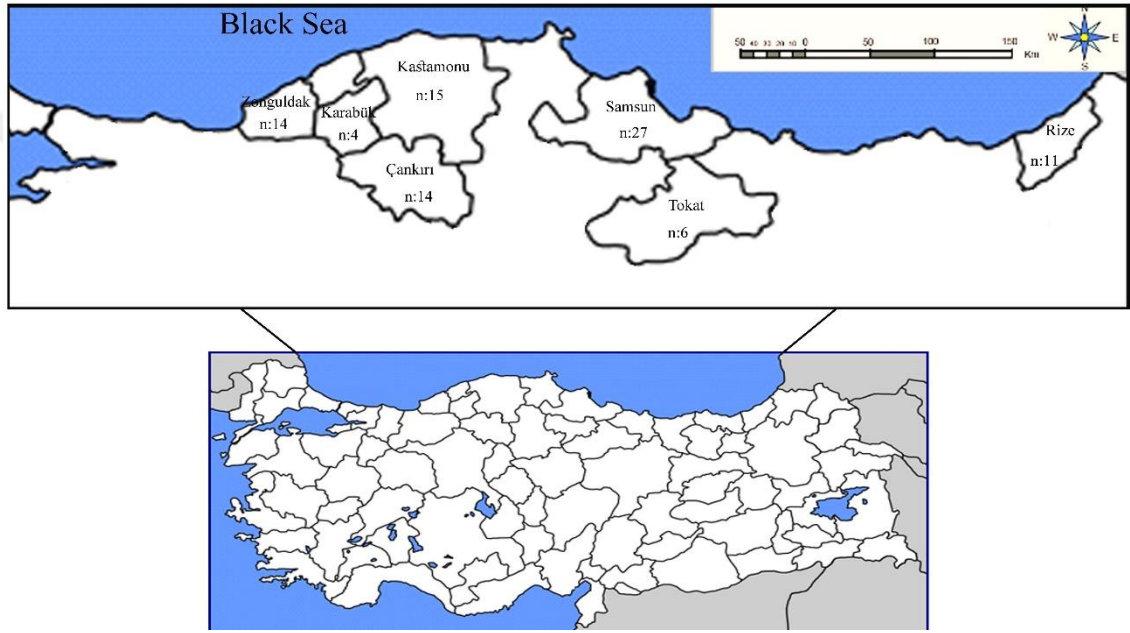
Buğdayda *Fusarium culmorum*'un neden olduğu kök ve kökboğazı çürüklüğüne karşı MeJA uygulamasının bitkideki dayanıklılık genlerine etkisini araştıran Motallebi vd. (2017), hassas ve tolerant buğday çeşitlerinde enfeksiyonun başlangıcında (inokulasyondan 6 saat sonra) uygulanan MeJA'nın kök ve kökboğazı dokularında savunma ile ilişkili genlerden *PAL*, *LOX*, *CYP709C1*, *PR3*, *PR4* ve *PR9* gen ifadelerinde önemli farklılıklar meydana getirdiğini bildirmiştir. Hassas çeşitte dayanıklıya kıyasla *PR3*, *LOX* ve *PAL* genlerinin yaklaşık 10 kat daha fazla eksprese olduğu, buna karşın *PR4*, *PR9* ve *CYP709C1* genlerinin baskılandığı ifade edilmiştir. Aynı zamanda MeJA uygulamasının hassas çeşitte semptomları azalttığı ancak dayanıklı çeşitte bir etki oluşturmadığı belirtilmiştir.

Soya fasulyesinde *Phakopsora pachyrhizi*'nin neden olduğu fasulye pasına karşı BTH, jasmonik asit ve silisyumun hastalık şiddeti ve dayanıklılık gen ifadelerine etkisini inceleyen Cruz vd. (2020), BTH'nin dayanıklılık gen ifadelerinde fark oluşturmaksızın hastalık gelişimini % 36 oranında engellediğini, jasmonik asitin ise hastalık şiddetini azaltmamasına rağmen 12. saatteki *PAL* gen ifadesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Si uygulamalarında ise patojen ile inokule edilen bitkilerde inokulasyon yapılmayanlara kıyasla 72. saatte *MET* ve *PAL* genlerinin, 12. saatte ise *LOX* ve *CHAL* gen ifadelerinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Si uygulamalarının fenolik ve flavonoid biyosentezinde rol alan *PAL* ve *CHAL* genlerinin aktivitesini artırarak soya pasının hastalık şiddetinin azaltılmasına katkı sağlayacağı bildirilmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 *Colletotrichum lindemuthianum* İzolatlarının Elde Edilmesi ve Saklanması

Çalışma kapsamında kullanılan patojen izolatlarının temini için Türkiye’de fasulye üretiminin yoğun olduğu Samsun, Karabük, Kastamonu, Zonguldak, Rize, Çankırı ve Tokat illerine 2017-2018 yıllarında surveyler yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Enfekteli fasulye bitkilerinin toplanması amacıyla survey yapılan iller

Bu surveyler esnasında tüm illerde en az 5 km aralıklarla farklı tarlalardan tipik hastalık belirtisi gösteren bitkiler toplanarak etmen izolasyonu amacıyla laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.2). Enfekteli bitkilerin kapsül, yaprak ve sap dokularından 1-2 mm’lik küçük parçalar alınarak yüzeysel dezenfeksiyon amacıyla % 1’ lik sodyumhipoklorür’ de (NaOCl) 2 dakika tutulmuş ve bunu takiben 3 seri steril saf sudan geçirilmiştir. Daha sonra steril filtre kâğıtları arasında kurutularak PDA (Potato Dekstroz Agar, Merck) ortamı içeren petri kaplarına 4’er adet olacak şekilde konulmuştur. Petri kapları $23\pm1^{\circ}\text{C}$ ’ de 12 saat aydınlık (yakın ultraviyole ışık) 12 saat karanlık periyot içeren inkübasyon odasında 10 gün süreyle geliştirilmiştir. Daha sonra gelişen fungusların her biri % 1’lik su agarına yayırılarak tek spor izolasyonu ile

saflaştırılmıştır. Elde edilen izolat bilgileri izelge 3.1’de verilmiştir. İzolatlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere filtre kâğıtları üzerinde 4°C’ de saklanmıştır.



şekil 3.2 *Colletotrichum lindemuthianum*’un kapsül, yaprak ve saplarda oluşturduğu hastalık belirtileri

Çizelge 3.1 Survey yapılan iller ve izolat bilgileri

İzolat ismi	Şehir	İlçe-köy	Yıl
S1	Samsun	Çarşamba	2017
S2	Samsun	Çarşamba	2017
S3	Samsun	Çarşamba-Kumtepe	2017
S4	Samsun	Çarşamba-Kumtepe	2017
S5	Samsun	Çarşamba-Kumtepe	2017
S6	Samsun	Çarşamba-Kumtepe	2017
S7	Samsun	Kumca	2017
S8	Samsun	Terme	2017
S9	Samsun	Çarşamba-Paşayazı	2017
S10	Samsun	Çarşamba-Kırkhan	2017
S11	Samsun	Durusu	2017
S12	Samsun	Merkez	2017
S13	Samsun	Merkez	2017
S14	Samsun	Terme-Korkucak	2017
S15	Samsun	Kumtepe	2017
S16	Samsun	Kumtepe	2017
S17	Samsun	Terme	2017
S18	Samsun	Merkez	2017
S19	Samsun	Çarşamba-Paşayazı	2017
S20	Samsun	Kumtepe	2017
S21	Samsun	Çarşamba- Kumtepe	2017
S22	Samsun	Kızılot	2017
S23	Samsun	Merkez	2017
S24	Samsun	Çarşamba- Kumtepe	2017
S25	Samsun	Merkez	2017
S26	Samsun	Çarşamba- Kumtepe	2017
S27	Samsun	Merkez	2017
T1	Tokat	Niksar-Yeşilhisar	2017
T2	Tokat	Niksar-Yeşilköy	2017
T3	Tokat	Niksar-Yeşilhisar	2017
T4	Tokat	Niksar-Yeşilhisar	2017
T5	Tokat	Niksar-Yeşilhisar	2017
T6	Tokat	Merkez	2017
Ç1	Çankırı	İlgaz-Yalaycık	2017
Ç2	Çankırı	İlgaz-Yalaycık	2017
Ç3	Çankırı	İlgaz	2017
Ç4	Çankırı	İlgaz-Eksik	2017
Ç5	Çankırı	İlgaz	2017
Ç6	Çankırı	İlgaz -Başdibek	2017
Ç7	Çankırı	İlgaz	2017
Ç8	Çankırı	İlgaz-Kazancı	2017
Ç9	Çankırı	İlgaz	2017
Ç10	Çankırı	İlgaz-Kazancı	2017
Ç11	Çankırı	İlgaz-Gaziler	2017
Ç12	Çankırı	İlgaz-Gaziler	2017
Ç13	Çankırı	İlgaz	2017

Çizelge 3.1 Survey yapılan iller ve izolat bilgileri (devam)

İzolat ismi	Şehir	İlçe-köy	Yıl
Ç14	Çankırı	İlgaz	2017
Z1	Zonguldak	Bakacak	2017
Z2	Zonguldak	Devrek	2017
Z3	Zonguldak	Bakacak	2017
Z4	Zonguldak	Devrek	2017
Z5	Zonguldak	Çubuk	2017
Z6	Zonguldak	Üçburgaz	2017
Z7	Zonguldak	Devrek	2017
Z8	Zonguldak	Bacakkadı	2017
Z9	Zonguldak	Bakacak	2017
Z10	Zonguldak	Devrek	2017
Z11	Zonguldak	Gökçebel	2017
Z12	Zonguldak	Bakacak	2017
Z13	Zonguldak	Devrek	2017
Z14	Zonguldak	Devrek	2017
K1	Kastamonu	Merkez	2017
K2	Kastamonu	Merkez	2017
K3	Kastamonu	Damlaçay	2017
K4	Kastamonu	Merkez	2017
K5	Kastamonu	Merkez	2017
K6	Kastamonu	Merkez	2017
K7	Kastamonu	Damlaçay	2017
K8	Kastamonu	Müslüman mah.	2017
K9	Kastamonu	Araç	2017
K10	Kastamonu	Merkez-Yolkonak	2017
K11	Kastamonu	Merkez-Yolkonak	2017
K12	Kastamonu	Damlaçay	2017
K13	Kastamonu	Merkez-Damlaçay	2017
K14	Kastamonu	Tosya	2017
K15	Kastamonu	Merkez	2017
KR1	Karabük	Dereköy	2017
KR2	Karabük	Nebioğlu	2017
KR3	Karabük	Dereköy	2017
KR4	Karabük	Nebioğlu	2017
R1	Rize	Merkez	2017
R2	Rize	Merkez	2017
R3	Rize	Merkez	2018
R4	Rize	Merkez	2018
R5	Rize	Merkez	2018
R7	Rize	Merkez	2018
R8	Rize	Merkez	2018
R9	Rize	Merkez	2018
R10	Rize	Merkez	2018
R11	Rize	Merkez	2018
R12	Rize	Merkez	2018

3.1.2 İzolatların geliştirilmesi ve teşhisi

Elde edilen tek spor izolatlar fasulye agara (500 ml fasulye suyu, 8 gr agar, 1 gr KH_2PO_4 , 1 gr KNO_3 , 0.5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 gr KCl, 500 ml su) aşılınmış ve karanlık ortamda 15 gün süreyle geliştirilmiştir. *C. lindemuthianum*'a ait acervulus, konidi ve setalar mikroskop altında görüntülenmiş, Sutton (1992) ve Hall (1994)'e göre morfolojik olarak teşhis edilmiştir. Aynı zamanda türe spesifik primerler (ClF4-ITS4) ile PCR yapılarak morfolojik teşhis doğrulanmıştır (Chen vd. 2007).

3.2 *Colletotrichum lindemuthianum*'un Populasyon Yapısındaki Genetik Farklılıkların Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) ve Inter Primer Binding Site (iPBS) Yöntemleri ile İncelenmesi

3.2.1 Patojen izolatlarından DNA ekstraksiyonu

Fasulye agarda 15 gün süreyle geliştirilen fungus izolatlarından DArT (<http://www.diversityarrays.com>) DNA izolasyon metodu kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Agar üzerinden yaklaşık 100 mg miselyum+spor yığını bistüri yardımıyla kazınarak eppendorf tüplere aktarılmış, üzerine 650 µl ekstraksiyon bufferı (125 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.8 M NaCl, 1% CTAB, 1% sarcosyl, 2% PVP-40 (K29-32), 0.5% sodium disulphite) eklenerek 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığına kadar soğuması beklenerek üzerine eşit hacimde chloroform/isoamylalkol (24/1) karışımı eklenmiş ve 13000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Üstte biriken sıvıdan 500 µl alınarak yeni eppendorf tüplere aktarılmış ve eşit hacim isopropanol ilave edilmiştir. Yaklaşık bir saat -20 °C'de inkübe edildikten sonra 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek oluşan DNA pelleti, 250 µl % 70 ethanol ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Ardından pellet 25-50 µl steril bi-distile ($\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$) su ile süspanse edilmiştir. DNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak 260/280 nm ölçüm yapılarak tespit edilmiş ve tüm DNA örnekleri -20°C' de saklanmıştır.

3.2.2 *Colletotrichum lindemuthianum*'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların ISSR yöntemi ile incelenmesi

Patojen izolatları arasındaki genetik farklılıkların ISSR yöntemi ile araştırılmasında farklı microsatellit tekrarları içeren 5' veya 3' çapalı primerler (University of British Columbia) kullanılmıştır. Ön denemelerde 5 izolat ile 30 primer testlenerek PCR koşulları optimize edilmiş ve faydalı genetik polimorfizm sağlayan primerler tespit edilerek tüm izolatlar arasındaki genetik polimorfizmleri incelemek için kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 ISSR çalışmalarında ön denemeye alınan primerler ve özellikleri

Primerler	Primerlerin baz dizileri	Annealing sıcaklığı (°C)	% G+C
(AG) ₈ G	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GG-3'	52 °C	52.9
(GA) ₈ T	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AT-3'	50 °C	47.1
(GA) ₈ C	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AC-3'	50 °C	52.9
(AC) ₈ T	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CT-3'	50 °C	47.1
(AG) ₈ YT	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GYT-3'	52 °C	47.2
(AG) ₈ YC	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GYC-3'	55 °C	52.8
(GA) ₈ YT	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AYT-3'	53 °C	47.2
(GA) ₈ YC	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AYC-3'	54 °C	52.8
(CA) ₈ RT	5'-CAC ACA CAC ACA CAC ART-3'	52 °C	47.2
(AC) ₈ YT	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CYT-3'	52 °C	47.2
(AC) ₈ YA	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CYA-3'	53 °C	47.2
(ATG) ₆	5'-ATG ATG ATG ATG ATG ATG-3'	50 °C	33.3
BHB(GA) ₇	5'-BHB GAG AGA GAG AGA GA-3'	53 °C	51
(GC) ₉ YR	5'-GCG CGC GCG CGC GCG CGC YR-3'	55 °C	95
(AC) ₉ RY	5'-ACA CAC ACA CAC ACA CAC RY-3'	54 °C	50
(GA) ₉ RY	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AGA RY-3'	54 °C	50
(AT) ₉ YR	5'-ATA TAT ATA TAT ATA TAT YR-3'	36 °C	50
(TG) ₈ RT	5'-TGT GTG TGT GTG TGT GRT-3'	53 °C	47.2
(AG) ₈ T	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GT-3'	50 °C	47.1
(CT) ₈ RG	5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRG-3'	54 °C	52.8
DHB(CGA) ₅	5'-DHB CGA CGA CGA CGA CGA-3'	56 °C	63
YHY(GT) ₇ G	5'-YHY GT GT GT GT GT GT G-3'	52°C	51.8
BDB(ACA) ₅	5'-BDB ACA ACA ACA ACA ACA-3'	56°C	37.1
BBD(AAC) ₅	5'-BBD AAC AAC AAC AAC AAC-3'	54°C	37.1
DVD(AAG) ₅	5'-DVD AAG AAG AAG AAG AAG-3'	56°C	35.2
(GT) ₈ A	5'-GTG TGT GTG TGT GTG TA-3'	46°C	47.1
(GC) ₈ A	5'-GCG CGC GCG CGC GCG CA-3'	54°C	94.1
(GC) ₈ C	5'-GCG CGC GCG CGC GCG CC-3'	56°C	100
(CG) ₈ A	5'-CGC GCG CGC GCG CGC GA-3'	54°C	94.1
DDB(CCA) ₅	5'-DDB CCA CCA CCA CCA CCA-3'	56°C	62.9

PCR amplifikasyonları ise 0.2 mM dNTPs, 0.24 µM primer, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris- HCl pH 8.8, 50 mM KCl, % 0.8'lik Nonident P40, 1 U *Taq* DNA polimeraz (Thermo Scientific, Waltham, USA) içeren 25 µl' lik hacimlerde 94 °C' de 30 s, primerlerin G+C içeriğine bağlı olarak belirlenen annealing sıcaklığında (Ta) 30 s, 72 °C' de 2 dk 35 döngü ve sonra 72 °C' de 10 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 *Colletotrichum lindemuthianum*'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların iPBS yöntemi ile incelenmesi

iPBS analizinde kullanılacak primerler ise Kalendar vd. (2010) tarafından bildirilen primerler arasından seçilmiştir. Ön denemelerde 27 primer ile 5 izolat test edilmiş ve faydalı genetik polimorfizm sağlayan primerler seçilerek tüm izolatlar arasındaki genetik polimorfizmleri incelemek amacıyla kullanılmıştır (Çizelge 3.3). PCR amplifikasyonları 25-50 ng DNA, 1×Dream Taq Buffer, 1 µM primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 U Dream *Taq* DNA polimeraz ve 0.04 U *Pfu* DNA polimeraz (Thermo Scientific, Waltham, USA) içeren 25 µl' lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. PCR protokolü başlangıçta 95°C' de 3 dk bir döngü, 95°C' de 15 s, 50-65°C'de 1 dk (primerlere göre değişken), 68°C'de 1 dk 30 döngü ve 72°C'de 5 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Baloch vd. 2015).

Elde edilen tüm PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jelde 100 V'da 2 saat süreyle elektroforetik olarak ayrılmıştır. Elektroforez tankında ve jelin hazırlanmasında 1×TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) tampon çözeltisi kullanılmıştır (Sambrook vd. 1989). PCR ürünlerinin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific, Waltham, USA) kullanılmıştır. Son olarak agaroz jel "ethidium bromide" (1 mg/ml) ile boyanarak UV ışık altında görüntülenmiş ve bio-imaj bilgisayar sistemi (Syngene, Cambridge, UK) kullanılarak kaydedilmiştir.

Çizelge 3.3 iPBS analizinde ön denemeye alınan primerler ve özellikleri

iPBS primerleri	Primerlerin baz dizileri	Annealing sıcaklığı (°C)	% G+C
iPBS2221	5'-ACC TAG CTC ACGATGCCA-3'	57°C	55
iPBS2237	5'-CCC CTA CCT GGC GTG CCA-3'	55°C	72
iPBS2239	5'-ACC TAG GCT CGG ATG CCA-3'	55°C	50
iPBS2242	5'-GCC CCA TGG TGG GCG CCA-3'	57°C	77
iPBS2390	5'-GCA ACA ACC CCA-3'	57°C	58
iPBS2395	5'-TCC CCA GCG GAG TCG CCA-3'	53°C	72
iPBS2080	5'-5'-CTC ATG ATG CCA-3'	63°C	50
iPBS2389	5'-CTC TCA ATG AAA GCA CCA-3'	50°C	44
iPBS2415	5'-ACG AAG GGA CCA-3'	60°C	58
iPBS2257	5'-CTC TCA ATG AAA GCA CCA-3'	50°C	44
iPBS2402	5'-CCC CTC CTT CTA GCG CCA-3'	50°C	66
iPBS2380	5'-CAA CCT GAT CCA-3'	50°C	50
iPBS2074	5'-GCT CTG ATA CCA-3'	50°C	50
iPBS2386	5'-CTG ATC AAC CCA-3'	50°C	50
iPBS2085	5'-ATG CCG ATA CCA-3'	53°C	50
iPBS2251	5'-GAA CAG GCG ATG ATA CCA-3'	53°C	50
iPBS2222	5'-ACT TGG ATG CCG ATA CCA-3'	53°C	50
iPBS2219	5'-GAA CTT ATG CCG ATA CCA-3'	53°C	44
iPBS2232	5'-AGA GAG GCT CGG ATA CCA-3'	55°C	55
iPBS2077	5'-CTC ACG ATG CCA-3'	55°C	58
iPBS2224	5'-ATC CTG GCA ATG GAA CCA-3'	55°C	50
iPBS2399	5'-AAA CTG GCA ACG GCG CCA-3'	52°C	61
iPBS2252	5'-TCA TGG CTC ATG ATA CCA-3'	52°C	44
iPBS2217	5'-ACT TGG ATG TCG ATA CCA-3'	52°C	44
iPBS2382	5'-TGT TGG CTT CCA-3'	51°C	50
iPBS2400	5'-CCC CTC CTT CTA GCG CCA-3'	51°C	66
iPBS2295	5'-AGA ACG GCT CTG ATA CCA-3'	60°C	50

3.2.4 Veri analizi

ISSR ve iPBS markerleri ile elde edilen PCR ürünleri önce ayrı ayrı daha sonra bir araya getirilerek NTSYS ver. 2.02 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis) software programına aktarılmıştır (Rohlf 1998). Primerlerin çoğalttıkları farklı moleköl ağırlığa sahip bantlar 0 (yok) ve 1 (var) olarak kodlanmış ve rectangular matriks verisi kullanılarak değerlendirilmiştir. İzolatlar arasındaki benzerlik matriksi SIMQUAL (Similarity for qualitative data) programı kullanılarak Dice'in metoduna göre oluşturulmuştur. Elde edilen benzerlik katsayısı ve UPGMA aracılığıyla dendogramlar oluşturularak izolatlar arasındaki genetik akrabalık değerlendirilmiştir (Sneath ve Sokal 1973). Kullanılan marker yöntemleri ile oluşturulan dendogramları değerlendirmek için kofenetik matris değerleri hesaplanmış ve mantel testi ile karşılaştırılmıştır. De Riek vd. (2001)'nin tanımladığı formüle göre ortalama polimorfizm içerikleri (PIC, polymorphism information content) hesaplanmıştır. Elde edilen band sayıları, polimorfik bandların yüzdesi (PPB), Nei'nin gen farklılığı (h), Shannon information index (I)'i, toplam gen farklılığı (H_T), populasyonlar içindeki gen farklılığı (H_S), genetik farklılaşma (G_{ST}) ve gen akışı (N_M) POPGENE istatistik programı aracılığıyla tespit edilmiştir (Yeh vd. 1999). Coğrafik populasyon farklılıkları ise TFPGA (ver. 1.3) programı kullanılarak 1.023 permütasyonlu bootstrap analizi ile oluşturan dendogramla gösterilmiştir. Ayrıca izolatların populasyon dağılımı ve genetik yapısı STRUCTURE v.2.2 programı kullanılarak analiz edilmiştir (Pritchard vd. 2000). Her bir cluster için 10 bağımsız koşturma (K:2-10) gerçekleştirilmiş ve program her koşturma için (Monte Carlo Markov Chain: 5.000) 50.000 tekrara ayarlanmıştır. En iyi gruplanmayı temsil eden populasyon sayıları, STRUCTURE HARVESTER programı kullanarak ΔK değeri ile belirlenmiştir (Evanno vd. 2005). Populasyonlar arasında ve içindeki moleköl varyans analizi (AMOVA, 1.023 permütasyon, $P < 0.001$) ise ARLEQUIN ver. 3.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Excoffier vd. 2005).

3.3 Ülkemizdeki Bazı Önemli Fasulye Genotip ve Çeşitlerinin Hastalık Etmenine Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi

3.3.1 Bitkilerin yetiştirilmesi

Ülkemizde yaygın olarak ekimi yapılan 40 adet fasulye çeşidinin (Çizelge 3.4) ve önceki çalışmalarda ümitvar olduğu belirlenen 40 adet fasulye genotipinin (Çizelge 3.5) hastalığa karşı reaksiyonları kontrollü koşullarda patojenisite testi ile değerlendirilmiştir. Bu kapsamda % 1'lik sodyum hipoklorür (NaOCl)'de 2 dakika yüzey dezenfeksiyona tabi tutulan ve 3 kez steril saf sudan geçirilen 4 adet fasulye tohumu toprak, kum, gübre karışımı içeren (1:1:1 v/v/v) 16 cm çapındaki saksılara ekilmiştir. Bitkiler yaklaşık olarak 14 gün süreyle 23°C'deki bitki yetiştirme odasında ilk trifoliat yaprakları oluşuncaya kadar yetiştirilmiştir. Deneme üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Patojen izolatının geliştirilmesi ve patojenisite çalışmaları

Patojenisite çalışmalarında ön denemelerde patojen olduğu belirlenen S27 nolu *C. lindemuthianum* izolatı kullanılmıştır. Bu kapsamda fungus sporulasyonunu teşvik etmek amacıyla patojen izolatı M3 ortamında (10 g süzkroz, 20 g agar, 2 g KH₂PO₄, 1 g MgSO₄.7H₂O, 6 g peptone, 1 g yeast extract agar, 1000 ml distile su) 23°C'de 15 gün süreyle karanlıkta geliştirilmiştir (Pinto vd. 2012). Daha sonra fungus sporları, petri kaplarına 20 ml steril distile su eklenerek cam bir spatula ile kültür yüzeyinden kazınarak toplanmıştır. Spor konsantrasyonu, thoma lamı ile sayım yapılarak 1.2x10⁶ spor/ml olarak ayarlanmış ve yetiştirilen fasulye bitkilerinin tüm yapraklarına basınçlı el pülverizatörü kullanılarak püskürtülmüştür. Kontrol olarak kullanılan bitkilere ise saf su püskürtülmüştür. İnokulasyondan sonra bitkiler 20±2°C sıcaklık 12 saat ışık içeren iklim odalarına yerleştirilmiş ve ilk 2 gün yaprak ıslaklığını korumak amacıyla naylon torbalar içerisinde bekletilmiştir. Daha sonrasında bitkiler torba içerisinden çıkartılmış ve belirli periyotlarda nem sağlamak amacıyla su püskürtülmüştür.

Çizelge 3.4 Patojenisite çalışmalarında kullanılan fasulye çeşitleri ve özellikleri

No	Çeşit ismi	Tür	Elde edildikleri kurum
1	Seher yıldızı	Taze	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
2	Zeynebim	Taze	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
3	Karabacak	Taze	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
4	40 günlük	Taze	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
5	Fransız	Taze	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
6	Boncuk	Taze	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
7	Sazova	Taze	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
8	Magnum	Taze	May Tohum
9	Java	Taze	May Tohum
10	Asya	Taze	May Tohum
11	Sofia	Taze	May Tohum
12	Volare	Taze	May Tohum
13	Gina	Taze	May Tohum
14	Özayşe	Taze	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
15	Yalova 5	Taze	Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü
16	Yalova 17	Taze	Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü
17	Perolar	Taze	Makrogen Tohumculuk
18	Sarıköz	Taze	Makrogen Tohumculuk
19	Gelincik	Taze	Makrogen Tohumculuk
20	Hanımteni	Taze	Sim Arzuman Tarım Ürünleri
21	Tavil	Taze	Makrogen Tohumculuk
22	Miray	Taze	Sim Arzuman Tarım Ürünleri
23	Nazende	Taze	Makrogen Tohumculuk
24	Mina	Taze	Makrogen Tohumculuk
25	Buse Oturak	Barbunya	Makrogen Tohumculuk
26	Selim	Barbunya	Sim Arzuman Tarım Ürünleri
27	Sembol	Barbunya	Makrogen Tohumculuk
28	Belinay Sırık	Barbunya	Makrogen Tohumculuk
29	Klas	Barbunya	Poltar Tarım
30	Sırık barbunya	Barbunya	Poltar Tarım
31	Akdağ	Kuru	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
32	Zülbiye	Kuru	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
33	Akın	Kuru	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
34	Önceler	Kuru	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
35	Karacaşehir 90	Kuru	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
36	Göynük 98	Kuru	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
37	Bulduk	Kuru	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü
38	Mecidiye	Kuru	Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
39	Aras	Kuru	Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü
40	Yakutiye	Kuru	Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü

Çizelge 3.5 Patojenisite çalışmalarında kullanılan bazı ümitvar fasulye genotipleri ve lokasyonları

No	Fasulye Genotipi	Elde edildiği şehir	No	Fasulye Genotipi	Elde edildiği şehir
1	ISPT-6	Isparta	21	BRS-3	Bursa
2	MGL-4	Muğla	22	BLKSR-3	Balıkesir
3	KTH-26	Kütahya	23	YLV-32	Yalova
4	ÇNK-8	Çanakkale	24	DNZL-3	Denizli
5	BRS-21	Bursa	25	IZM-4	İzmir
6	MNS-5	Manisa	26	BLKSR-19	Balıkesir
7	BLCK-7	Bilecik	27	ÇNK-4	Çanakkale
8	ISPT-3	Isparta	28	YLV-31	Yalova
9	AYD-2	Aydın	29	ANT-22	Antalya
10	AYD-1	Aydın	30	BRS-4	Bursa
11	DNZL-9	Denizli	31	ISP-4	Isparta
12	MGL-30	Muğla	32	BRS-24	Bursa
13	ANT-31	Antalya	33	KTH-17	Kütahya
14	KTH-27	Kütahya	34	IZM-2	İzmir
15	BRD-25	Burdur	35	BRS-22	Bursa
16	DZC-2	Düzce	36	YLV-14	Yalova
17	ÇNK-2	Çanakkale	37	YLV28	Yalova
18	ÇNK-6	Çanakkale	38	DZC-3	Düzce
19	UŞK-1	Uşak	39	BRS-23	Bursa
20	BLKSR-14	Balıkesir	40	BRD-2	Burdur

3.3.3 Hastalık reaksiyonlarının değerlendirilmesi

İnokulasyondan 7 gün sonra bitkiler 1-9 skolasına göre değerlendirilmiştir (Schoonhoven ve Pastor-Corrales 1987).

1: Hastalık belirtisi yok

3: Yaprakların alt yüzeyindeki birincil damarlarda veya kapsülde yüzey alanının yaklaşık % 1'ini kaplayan birkaç küçük lezyon

5: Yaprığın alt yüzeyindeki birincil veya ikincil damarlarda veya petiolde çok sayıda küçük lezyon. Kapsülün yaklaşık % 5'ini kaplayan, sporlu veya sporsuz küçük (2 mm'den küçük), yuvarlak lezyonlar

7: Yaprakların alt yüzeyinde çok sayıda genişlemiş lezyon. Nekrotik lezyonlar yaprağın üst yüzeyinde veya petiolde de gözlenebilir. Kapsülün yaklaşık % 10'unu kaplayan, genellikle sporlu, orta büyüklükte lezyonlar (2 mm'den daha büyük)

9: Yaprak, yaprak sapı, gövde, dallar ve hatta bitki dokusunun çoğunun ölümüyle sonuçlanan büyüme noktasındaki lezyonların bir sonucu olarak bitki dokusunun % 25 veya daha fazlasında şiddetli nekrozlar. Kapsülde çok sayıda, büyük ve sporulasyonu olan lezyonlar sonucu kapsül deformasyonu, düşük tohum sayısı ve kapsül ölümü

Hastalık reaksiyon skoru 1–3 olan bitkiler dayanıklı, 4–9 alan bitkiler duyarlı olarak kabul edilmiştir.

3.4 Ülkemizdeki Bazı Fasulye Genotiplerindeki Dayanıklılık Kaynaklarının Marker Destekli Seleksiyon (MAS) ile Belirlenmesi

3.4.1 Bitkilerin yetiştirilmesi ve DNA ekstraksiyonu

Çalışmanın bu kısmında bitkisel materyal olarak 35 farklı ilden elde edilen 693 fasulye genotipi kullanılmıştır (Şekil 3.3). Bitkiler 3.3.1'de belirtildiği şekilde yetiştirilmiş ve her bir fasulye genotipinden 100 mg bitki dokusu alınarak DArT (<http://www.diversityarrays.com>) DNA izolasyon metodu kullanılarak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonları ise spektrofotometrik olarak 260/280 nm ölçüm yapılarak belirlenmiş ve tüm DNA örnekleri 20 nmol konsantrasyona ayarlanarak PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C' de saklanmıştır.

3.4.2 Marker destekli seleksiyon çalışmaları

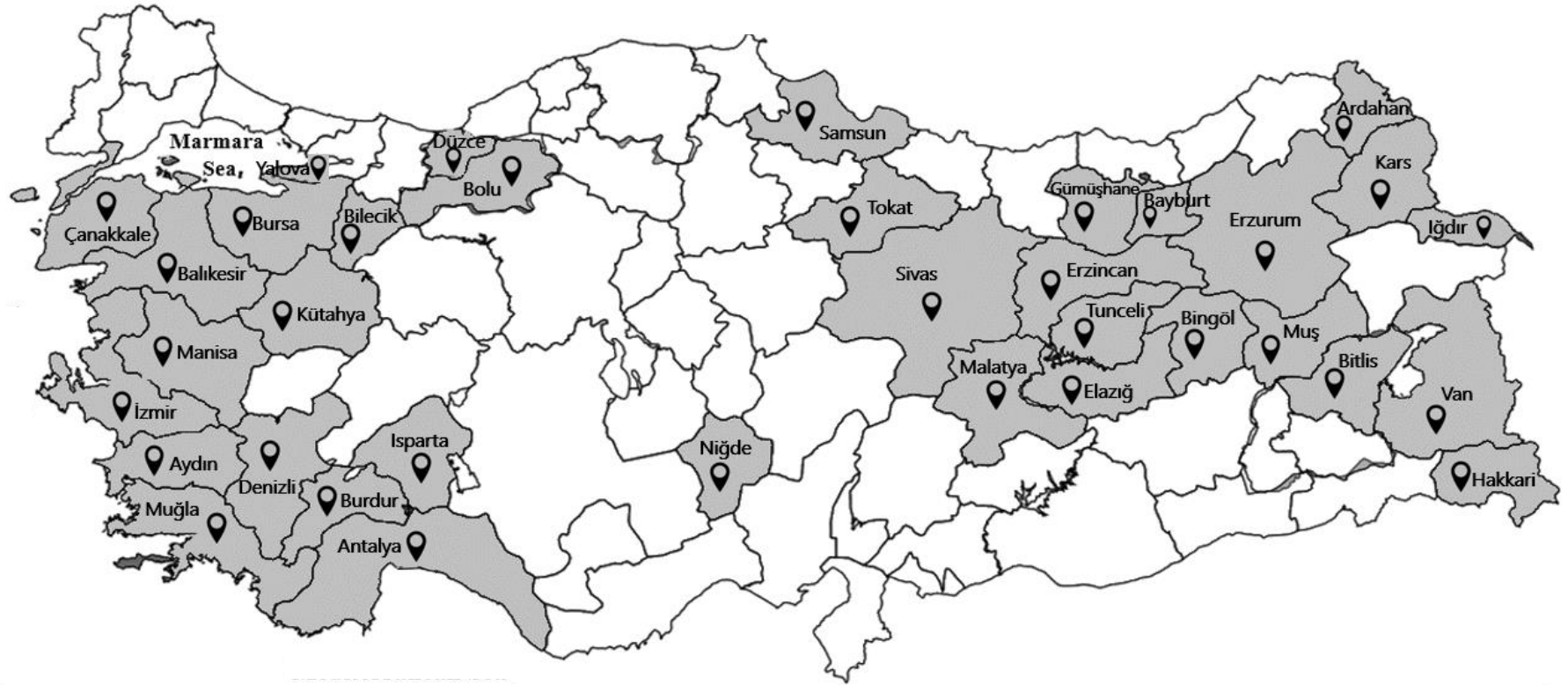
Fasulye genotiplerinden elde edilen DNA örnekleri Co dayanıklılık genleri ile ilişkili SCAR, RAPD, STS ve CAPS moleküler markerları kullanılarak test edilmiştir. Bu kapsamda yapılan ön çalışmalarda uluslararası ayırıcı sete ait antraknoza karşı dayanıklılık kaynakları bilinen Michelite (MA; Co-11, Co-6, Co-1), Michigan Dark Red

Kidney (MDRK; AND; *Co-11*, *Co-1*⁴), Cornell 49242 (MA; *Co-1*⁵, *Co-13*, *Co-2*), Ouero negro (*Co-4*, *Co-10*, *Co-4*²), PI 207262 (MA; *Co-3*), Perry Marrow, Widusa (AND; *Co-1*⁵), Kaboon, To (MA; *Co-4*), Tu (MA; *Co-5*), AB136 (MA; *Co-6*) ve Usp-Ant-1 (*Co-4*²) fasulye çeşitleri kullanılarak PCR yöntemlerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Fasulye genotiplerinin antraknoz hastalığına karşı moleküler markerlerle tespitinde kullanılan primerler ve PCR protokolleri çizelge 3.6'da belirtildiği gibi programlanan thermocyclerda (Thermo Scientific, Waltham, USA) gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları 0.2 µM dNTPs, 0.3 µM primer, 2.5 mM MgCl₂, PCR buffer, 10-20 ng DNA, 1 U *Taq* DNA polimeraz içeren 20 µl' lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir.

3.4.3 Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri % 1.2-2.5'lük agaroz jelden 1×TAE buffer içerisinde 100 V'da 2 saat süreyle elektroforetik olarak ayrılmıştır. PCR ürünlerinin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific, Waltham, USA) kullanılmıştır. Son olarak agaroz jel "ethidium bromide" (1 mg/ml) ile boyanarak UV ışık altında görüntülenmiş ve bio-imaj bilgisayar sistemi (Syngene, Cambridge, UK) kullanılarak kaydedilmiştir. *Co-2* lokusu ile ilişkili olan SCAreoli primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin *DraI* enzim kesimi ise üretici firma protokolüne göre 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Fasulye genotiplerindeki dayanıklılık genlerinin varlığı, referans fasulye çeşitleri ile kıyaslanarak var (+) yok (-) olarak değerlendirilmiştir.



Antalya	:23	Bayburt	:16	Bolu	:2	Denizli	:3	Erzurum	:177	Isparta	:6	Malatya	:17	Niğde	:2	Tunceli	:4
Ardahan	:11	Bilecik	:8	Burdur	:10	Düzce	:8	Gümüşhane	:13	İzmir	:3	Manisa	:4	Samsun	:7	Van	:40
Aydın	:5	Bingöl	:20	Bursa	:18	Elazığ	:15	Hakkari	:28	Kars	:3	Muğla	:14	Sivas	:46	Yalova	:17
Balıkesir	:22	Bitlis	:35	Çanakkale	:10	Erzincan	:42	Iğdır	:6	Kütahya	:8	Muş	:23	Tokat	:27		

Şekil 3.3 Fasulye genotiplerinin elde edildikleri iller ve genotip sayıları

Çizelge 3.6 Fasulye genotiplerindeki *Co*- dayanıklılık genlerinin belirlenmesi için kullanılan markerler ve PCR koşulları

Primer	Gen bölgesi	Marker	Baz çifti	PCR ürünü	PCR döngüsü	Literatüre
OPF10	<i>Co-1</i>	RAPD	5'-GGAAGCTTGG-3'	530	94°C 1 dk., 35°C 1 dk, 72°C 2 dk, 3 döngü; 94°C 10 s, 40°C 20 s, 72°C 2 dk 34 döngü ve 72°C 5 dk	Young ve Kelly (1997)
OPA18	<i>Co-1</i> ⁵	RAPD	5-AGGTGACCGT-3'	1500	94°C 1 dk, 35°C 1 dk, 72°C 2 dk, 3 döngü; 94°C 10 s, 40°C 20 s, 72°C 2 dk 34 döngü ve 72°C 5 dk	Gonçalves-Vidigal ve Kelly (2006)
OPAZ04	<i>Co-11</i>	RAPD	5'-CCAGCCTCAG-3'	565	94°C 1 dk, 35°C 1 dk, 72°C 2 dk, 3 döngü; 94°C 10 s, 40°C 20 s, 72°C 2 dk, 34 döngü ve 72°C 5 dk	Silva vd. (2009)
SB12	<i>Co-3</i> ³	SCAR	5'-CCT TGA CGC ACC TCC ATG -3' 5'-TTG ACG ATGGG TTG GCC -3'	350	94°C 2 dk; 94°C 60s, 68°C 60s, 72°C 60s, 35 döngü ve 72°C 7 dk.	Mendez de Vigo vd. (2005)
SF10	<i>Co-10</i>	SCAR	5'-GGA AGC TTG GTG AGC AAG GA -3' 5'-GGA AGC TTG GCT ATGATG GT -3'	1072	94°C 3 dk; 94°C 15s, 65°C 60s, 72°C 90s, 35 döngü ve 72°C 7 dk	Correa vd. (2000)
TGA1.1	<i>Co-1</i> ⁴	STS	5'-CAGAGGATGCTTCTCACGGT-3' 5'-AAGCCATGGATCCCATTTG-3'	570	95°C 3 dk, 92°C 30 s, 50°C 1 dk, 72°C 1 dk 34 döngü ve 72°C 5 dk	Gonçalves-Vidigal vd. (2011)
SBB14	<i>Co-4</i> ²	SCAR	5'-GTG GGA CCT GTT CAA GAA TAA TAC-3' 5'-GTG GGA CCT GGG TAG TGT AGA AAT-3'	1150/ 1050	94°C 10s, 67°C 40s, 72°C 1.5 dk, 34 döngü ve 72°C 5 dk	Kelly vd. (2003)
SC08	<i>Co-4</i>	SCAR	5'-AGA ATG CCT TTA GCT GTT GG-3' 5'-CAG AGA GGC TAG GCT TAT CG-3'	910	94°C 30s, 65°C 60s, 72°C 1.5 dk, 34 döngü	de Queiroz vd. (2004); Kelly vd. (2003)
SZ04	<i>Co-6</i>	SCAR	5'-GGC TGT GCT GAT TAA TTC TGG-3' 5'-TGC TCA TTT TAT AAT GGA GAA AAA-3'	567	94°C 30s, 45°C 120s, 72°C 1,5 dk, 45 döngü	de Queiroz vd. (2004); Kelly vd. (2003)
SCAreoli	<i>Co-2</i>	CAPS	5'-GGG AGA CAT CCA TCA GAC AAC TCC-3' 5'-GTA TCC ATT TGAA GGA GCT-3'	1000	94°C 10s, 58°C 40s, 72°C 2 dk, 35 döngü ve 72 °C 5 dk <i>DraI</i> enzim kesimi (37 °C)	Geffroy vd. (1998)
SAB3	<i>Co-5</i>	SCAR	5'-TGG CGC ACA CAT AAG TTC TCA CGG -3' 5'-TGG CGC ACA CCA TCA AAA AAG GTT-3'	400	94°C 3 dk; 94°C 10s, 65°C 30s, 72°C 2 dk, 30 döngü ve 72°C 5 dk	Vallejo ve Kelly (2001)
OPV20	<i>Co-13</i>	RAPD	5'-CAGCATGGTC-3'	680	94°C 1 dk, 35°C 1 dk, 72°C 2 dk, 3 döngü; 94°C 10 s, 40°C 20 s, 72°C 2 dk, 34 döngü ve 72°C 5 dk	Lacanalldo vd. (2010)

3.5 Patojen Genotiplerine Bağlı Olarak Bitkideki Dayanıklılık Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin İncelenmesi

ISSR ve iPBS çalışmaları sonucunda farklı genetik grupları temsil eden S27 ve Z10 patojen izolatları dayanıklılıkla ilişkili gen ifadelerindeki farklılıkların incelenmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.5.1 Bitkilerin yetiştirilmesi, inokulasyon yöntemi ve örnek alımı

Çalışmada hassas fasulye çeşidi Gina kullanılmış ve bitkiler bölüm 3.3.1’de belirtildiği gibi ilk trifoliat yaprakları oluşuncaya kadar yetiştirilmiştir. Patojen izolatlarının geliştirilmesi ve inokulasyon yöntemi ise bölüm 3.3.2’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. İzolatlar bitkilere ayrı ayrı uygulanmış ve denemeler 3 tekerrürlü olarak planlanmıştır. Sağlıklı kontrol olarak kullanılan bitkilere ise saf su püskürtülmüştür. İnokulasyondan 0, 24, 48, 72 ve 96 saat sonrasında her saksıdaki bitkilerin ilk çıkan trifoliat yapraklarından yaklaşık 2 cm büyüklüğünde diskler alınmış ve bunlar bir araya getirilerek örnek havuzları oluşturulmuştur. Toplamda yaklaşık 50 mg bitki dokusu eppendorf tüplere konulmuş ve sıvı azot içerisinde dondurularak RNA izolasyonlarında kullanılmak üzere -80°C’de saklanmıştır.

3.5.2 Bitki dokularından RNA izolasyonu ve DNase uygulaması

Bitki dokularından RNA izolasyonları NucleoZOL (Macherey-Nagel) bufferı kullanılarak üretici firma protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda sıvı azot içerisinde dondurulmuş 50 mg bitki dokusu 500 µl NucleoZOL içeren eppendorf tüpe koyulmuş ve homojenize edilmiştir. Üzerine 200 µl DEPC’li su koyularak alt üst edilmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 15 dakika 12.000 x g’de santrifüj edilmiştir. 500 µl supernatant yeni tüpe aktarılacak üzerine 500 µl isopropanol eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Santrifüj ile çöktürülen pellet 500 µl % 75 ethanol ile yıkanmış ve 50 µl DEPC su içerisinde çözündürülmüştür. Elde edilen RNA miktar ve saflıkları Nanodrop ND-

Spectrometer 1000 cihazı ile 260/280 ve 260/230 nm dalga boylarındaki absorban oranları ile tespit edilmiştir. DNA kontaminasyonunu engellemek için elde edilen RNA'lara üretici firma protokolü modifiye edilerek DNase uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 4 µg RNA, 1 U *DNase I* enzimi (Thermo Scientific, Waltham, USA) 10x reaksiyon bufferı ile karıştırılarak hazırlanan süspansiyon 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ardından 5 mM EDTA ilave edilerek 65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

3.5.3 Elde edilen bitki örneklerinden cDNA sentezi ve Real-time PCR analizi

cDNA sentezi, iScript™ cDNA sentez kiti (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *DNase I* uygulaması yapılan her bir örnekten 2 µg RNA alınarak, 5X Reverse Transkriptaz Reaksiyon buffer, 0.5 µl iScript Reverse Transkriptaz enzimi ile karıştırılmış ve reaksiyon hacmi 15 µl'e ayarlanmıştır. Daha sonra 25°C'de 5 dk, 42°C'de 30 dk ve 85°C'de 5 dk inkübasyon yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar 1:20 oranında su ile seyreltilerek ekspresyon çalışmalarında kullanılmıştır. Real time PCR çalışmaları çift sarmal DNA'ya bağlanarak floresan özellik gösteren SYBR Green yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Real time PCR amplifikasyonları 2x iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) karışımı, 0.5 µM primer (Çizelge 3.7) ve 2 µl cDNA örneği içeren 10 µl' lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7 Fasulye bitkisindeki savunma mekanizmaları ile ilişkili genlere ait primerler (Oliveira vd. 2015b)

Dayanıklılık Genleri	Primer sekansı
Patojenisite ile ilişkili <i>PR1</i>	F: AAAGCCAAGAGCGATTCTCTTTTCA R: GAACACTCTGATTTGATAACACTTC
β -1,3 endoglukonaz- <i>PR2</i>	F: GAAGATGAGCTCAAAGCTGGTAA R: CAAGGATTGGCCAAAAGGTA
Kitinaz- <i>PR3</i>	F: ATTGTTGTGCCAATCCCTTT R: CACCGCCATACAGTTCAAAA
Phenylalanine ammonia-lyase- <i>PAL</i>	F: GACACACAAGTTGAAGCACCA R: TGCAGCTTCTTAGCATCCTTC
Glutathione S-transferaz- <i>GST</i>	F: AGCTCTTCAAGGACACTGAGCCAA R: AAAGGCTGTGGATGCTGCACTAGA
Lipoksigenaz- <i>LOX</i>	F: AGCACTGTGCCTGTTTTCACT R: AACACACGAGAAGATTCAACCA
Peroksidaz- <i>POD</i>	F: TCCTTTTCAGCACTTTCACT R: AGAAAGCAGTGTTCTTGTGG
<i>Actin</i>	F: TGCATACGTTGGTGATGAGG R: AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG

PCR koşulları ise 50°C' de 2 dk, 95°C' de 30 s ilk denatürasyon, 95°C' de 15 s, 60°C 60 s süreyle 40 döngü olacak şekilde programlanan LightCycler® 96 Real-Time PCR (Roche) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Her Real time PCR uygulamasından sonra non spesifik amplifikasyonlar ve dimer oluşumunu kontrol etmek amacıyla 95°C' de 60 s, 65°C' de 60 s, 97°C' de 1 s okuma yapılarak erime eğrisi (melting curve) analizi gerçekleştirilmiştir. Her reaksiyon için ilk anlamlı artışın tespit edildiği C_T değeri housekeeping gen olarak kullanılan *actin* geninin C_T değeri ile normalize edilmiştir. Test edilen genlerdeki nispi değişim miktarının belirlenmesinde Livak ve Schmittgen (2001)'e ait $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formülü kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar log2 tabanlı kat artışı olarak belirtilmiştir.

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ hedef gen} - C_T \text{ actin})_{x \text{ zamanı}} - (C_T \text{ hedef gen} - C_T \text{ actin})_{0. \text{saat}^*}$$

*x zamanı 24, 48, 72 ve 96 saatleri ifade ederken, 0.saat hedef genin ekspresyonunun actine göre normalize edilmiş halini ifade etmektedir.

Dayanıklılık ile ilişkili gen ifadelerinin log2 kat artışları arasındaki farklılık Minitab 13 istatistik programı kullanılarak varyans analiz ile incelenmiştir. Ortalamalar arasındaki fark ise LSD ($P=0.05$) testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca genlerin ekspresyon

profillerinin liste halinde verilerek daha iyi anlaşılmasını sağlamak için <http://www.heatmapper.ca/expression/> uygulaması ile ısı tablosu (heatmap) oluşturulmuştur.

3.6 *Colletotrichum lindemuthianum*'a Karşı Dayanıklılık Mekanizmasının Uyarılmasında Farklı Kimyasal Uyarıcıların Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisinin Real Time PCR ile İncelenmesi

Patojen gelişiminin engellenmesi ve bitkideki doğal savunma mekanizmalarının uyarılması amacıyla silisyum (Si; sıvı potasyum silikat; %26 SiO₂+%13 K₂O), metil jasmonate (MeJA; Sigma-Aldrich) ve 1,2,3- benzothiadiazole-7-thiocarboxylic acid S-methyl ester (BTH; Syngenta) bitki aktivatörleri kullanılmıştır. Hassas fasulye çeşidi Gina ve yaygın patojen izolatı Z10 ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Her bitki aktivatörü dört adet uygulamadan oluşmuştur. Bunlar,

- a; Sadece patojen uygulanan (Kontrol)
- b; Bitki aktivatörü+patojen uygulanan (Patojen+BTH, Patojen+Si, Patojen+MeJA)
- c; Sadece bitki aktivatörü uygulanan (Si; Sadece Silisyum, MeJA; Sadece MeJA, BTH; Sadece BTH)
- d; herhangi bir uygulama yapılmayan sağlıklı bitkilerden oluşmuş ve 3 biyolojik 2 teknik tekrür olacak şekilde planlanmıştır.

3.6.1 Bitki aktivatörlerinin uygulama dozu ve yöntemi

Bitki aktivatörlerinin uygulanmasında literatür taramasında farklı bitkilerde etkili olduğu bildirilen 2 mM BTH, 2 mM silikon ve 0.1 mM MeJA kullanılmıştır. MeJA ve BTH uygulamalarında bitkiler bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi ilk trifoliat yaprakları oluşuncaya kadar yetiştirilmiş ve belirtilen dozlarda hazırlanan süspansiyonlar yapraklar iyice ıslanuncaya kadar basınçlı pülverizatör kullanılarak tüm bitkiye uygulanmıştır.

Silisyum uygulamasında ise bitkiler Hoagland solüsyonu içerisinde (3 mmol L⁻¹ KNO₃, 2 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0.5 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0.25 mmol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 mmol L⁻¹ NH₄H₂PO₄, 12.5 µmol L⁻¹ H₃BO₃, 1 µmol L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, 0.25 µmol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O, 0.25 µmol L⁻¹ MnCl₂.4H₂O, 0.25 µmol L⁻¹, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 25

$\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ EDTA bisodium) hidroponik sistemde yetiştirilmiştir (Liao vd. 2004). Bu amaçla yüzeysel olarak dezenfekte edilen fasulye tohumları petri kaplarında nemli filtre kağıtları üzerinde 5 gün süreyle çimlendirilmiştir. Çimlenen fideler adaptasyon amacıyla 2 gün $1/5$ oranındaki Hoagland solüsyonu içerisinde bekletilmiştir. Gelişen fideler 2 mM potasyum silikat eklenerek hazırlanan $5 \text{ litre } 1/2$ oranında Hoagland solüsyonu içeren 25 cm 'lik saksılara aktarılmış ve ilk trifoliat yaprakları oluşuncaya kadar yetiştirilmiştir. Besin solüsyonu her hafta yenilenerek, pH'nın 5.5 civarında kalması sağlanmıştır.

3.6.2 İnokulasyon yöntemi ve örnek alımı

Bitki aktivatörlerinin uygulanmasından 48 saat sonra bölüm 3.3.2'de belirtildiği gibi patojen inokulasyonu yapılmıştır. İnokulasyondan 0, 24, 48, 72 ve 96 saat sonra ilk çıkan trifoliat yapraklardan örnekler alınmıştır. Bitkilerden örnek alınmasında homojenite sağlamak için her saksıdaki bitkilerin ilk üçlü yaprağından disk delici ile 2 cm büyüklüğünde diskler alınmış ve bunlar bir araya getirilerek örnek havuzları oluşturulmuştur. Alınan örnekler sıvı azotta dondurulmuş ve -80°C 'de saklanmıştır. RNA izolasyonlarının yapılması, cDNA sentezi ve Real time PCR ile dayanıklılık genlerinin tespiti ise bölüm 3.5.2 ve 3.5.3'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

3.6.3 Hastalık reaksiyonlarının değerlendirilmesi

Bitki aktivatörlerinin hastalık gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için inokulasyondan 7 gün sonra tüm bitkiler bölüm 3.3.3'de belirtildiği gibi değerlendirilmiştir.

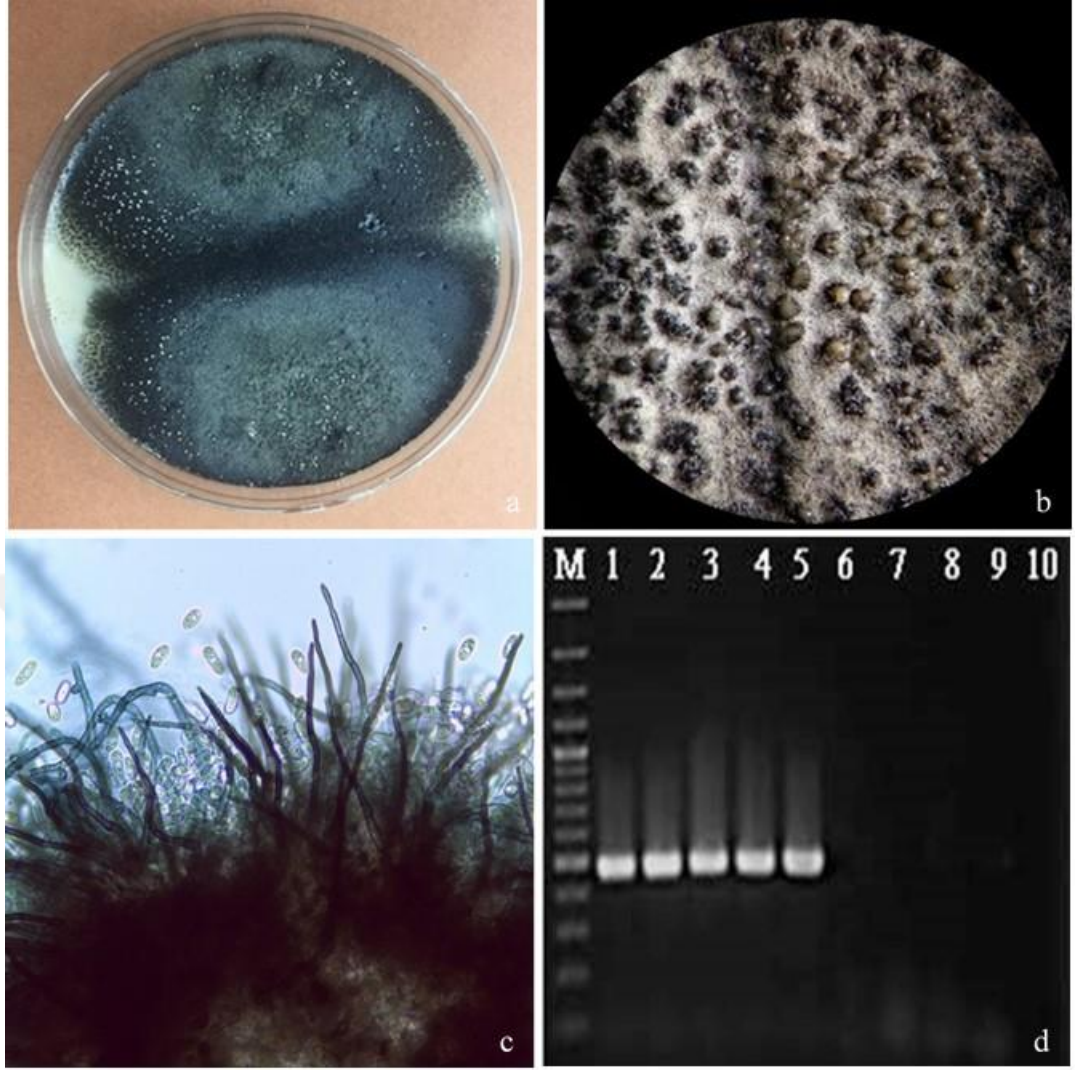
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Colletotrichum lindemuthianum* izolatlarının elde edilmesi ve teşhisi

Colletotrichum lindemuthianum'un izolatlarının elde edilmesi amacıyla fasulye üretiminin yoğun olduğu 7 ilde survey yapılmıştır. Tipik antraknoz belirtileri gösteren bitkilerin kapsül, sap, gövde ve yapraklarından yapılan izolasyonlar sonucunda 91 adet *C. lindemuthianum* izolatı elde edilmiş ve bu izolatların illere göre dağılımı şekil 3.1 ve çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen izolatların morfolojik ve kültürel özelliklerine bakılarak tamamının *C. lindemuthianum* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca türe spesifik ITS4/CIF4 primeri kullanılarak tüm izolatlardan beklenen büyüklükte (461 bp) amplifikasyon ürünü elde edilmiş ve *C. lindemuthianum* izolatlarının morfolojik tanımlanması PCR testi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1 Survey yapılan iller ve bu illerden elde edilen izolat miktarları

Bölge	İller	İzolat isimleri	Toplam izolat sayısı
Orta Karadeniz	Samsun	S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27	27
Orta Karadeniz	Tokat	T1, T2, T3, T4, T5, T6	6
Batı Karadeniz	Kastamonu	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11, K12, K13, K14, K15	15
Batı Karadeniz	Çankırı	Ç1, Ç2, Ç3, Ç4, Ç5, Ç6, Ç7, Ç8, Ç9, Ç10, Ç11, Ç12, Ç13, Ç14	14
Batı Karadeniz	Zonguldak	Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9, Z10, Z11, Z12, Z13, Z14	14
Batı Karadeniz	Karabük	KR1, KR2, KR3, KR4	4
Doğu Karadeniz	Rize	R1, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12	11
Toplam İzolat Sayısı			91



Şekil 4.1 *Colletotrichum lindemuthianum* izolatlarının kültür ortamlarındaki gelişimi

(a), sporulasyonu (b), konidi ve seta oluşumu (c), türe spesifik ClF4/ITS4 primeri ile PCR amplifikasyonu (d) (M: Gene ruler 100 bp DNA ladder, 1-5: *C. lindemuthianum* DNA'sı, 6-9: Farklı fungus DNA'sı, 10: negatif kontrol)

4.2 *Colletotrichum lindemuthianum*'un Populasyon Yapısındaki Genetik Farklılıkların Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) ve Inter Primer Binding Site (iPBS) Yöntemleri ile İncelenmesi

4.2.1 *Colletotrichum lindemuthianum*'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların ISSR yöntemi ile incelenmesi

Fasulyede antraknoza neden olan *Colletotrichum lindemuthianum*'un populasyon yapısındaki farklılıkları tespit etmek amacıyla yapılan ISSR analizinde 30 primer test edilmiştir. Ön denemelerde bu primerlerden 9 adedi tekrarlanabilir ve faydalı

polimorfizm sağlamıştır (Çizelge 4.2). Bu primerler ile 91 *C. lindemuthianum* izolatu testlenmiş ve izolatlar arasında 0.5-3.5 kb arasında değişen büyüklüklerde 62 adet (6.8 fragment/primer) bant amplifiye edilmiştir.

Çizelge 4.2 İzolatlar arasındaki genetik polimorfizmi belirlemek amacıyla kullanılan ISSR primerleri ve elde edilen veriler

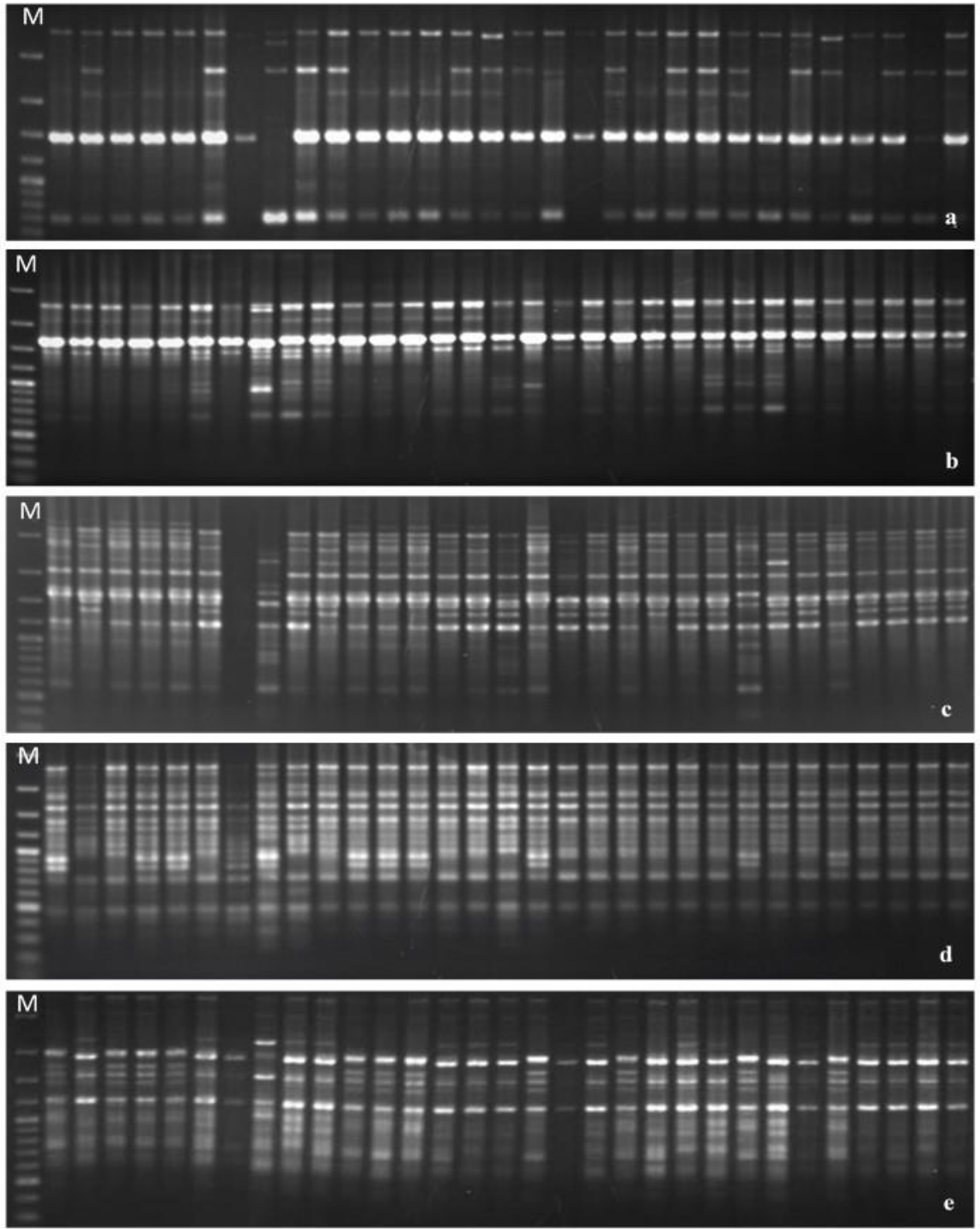
ISSR primerleri	Primer sekansları (5'-3')	Ta (°C)	G+C (%)	TB ^a	PB	PPB (%)	PIC değeri
(AG) ₈ YC	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	54	52.8	7	4	57.1	0.27
(GA) ₈ C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52	52.9	9	8	88.8	0.23
(AC) ₈ T	ACACACACACACACACT	52	47.1	5	2	40.0	0.18
(AC) ₈ YA	ACACACACACACACACYA	56	47.2	5	4	80.0	0.19
(GA) ₉ RY	GAGAGAGAGAGAGAGAGARY	54	50.0	7	6	85.7	0.34
(AG) ₈ T	AGAGAGAGAGAGAGAGT	56	47.1	8	8	100.0	0.49
DHB(CGA) ₅	DHBCGACGACGACGACGA	56	63.0	11	4	36.3	0.08
YHY(GT) ₇ G	YHYGTGTGTGTGTGTGTG	52	51.8	6	5	83.3	0.25
BDB(ACA) ₅	BDBACAACAACAACAACA	56	37.1	4	1	25.0	0.12
Toplam				62	42		
Ortalama				6.88	4.66	69.52	0.238

Ta, primerlerin annealing sıcaklığı; G+C, primerlerin guanin sitosin yüzdesi; TB; toplam bant sayısı; PB, polimorfik bant sayısı; PPB, polimorfizm seviyesi; PIC, her primer için polimorfizm bilgi içeriği

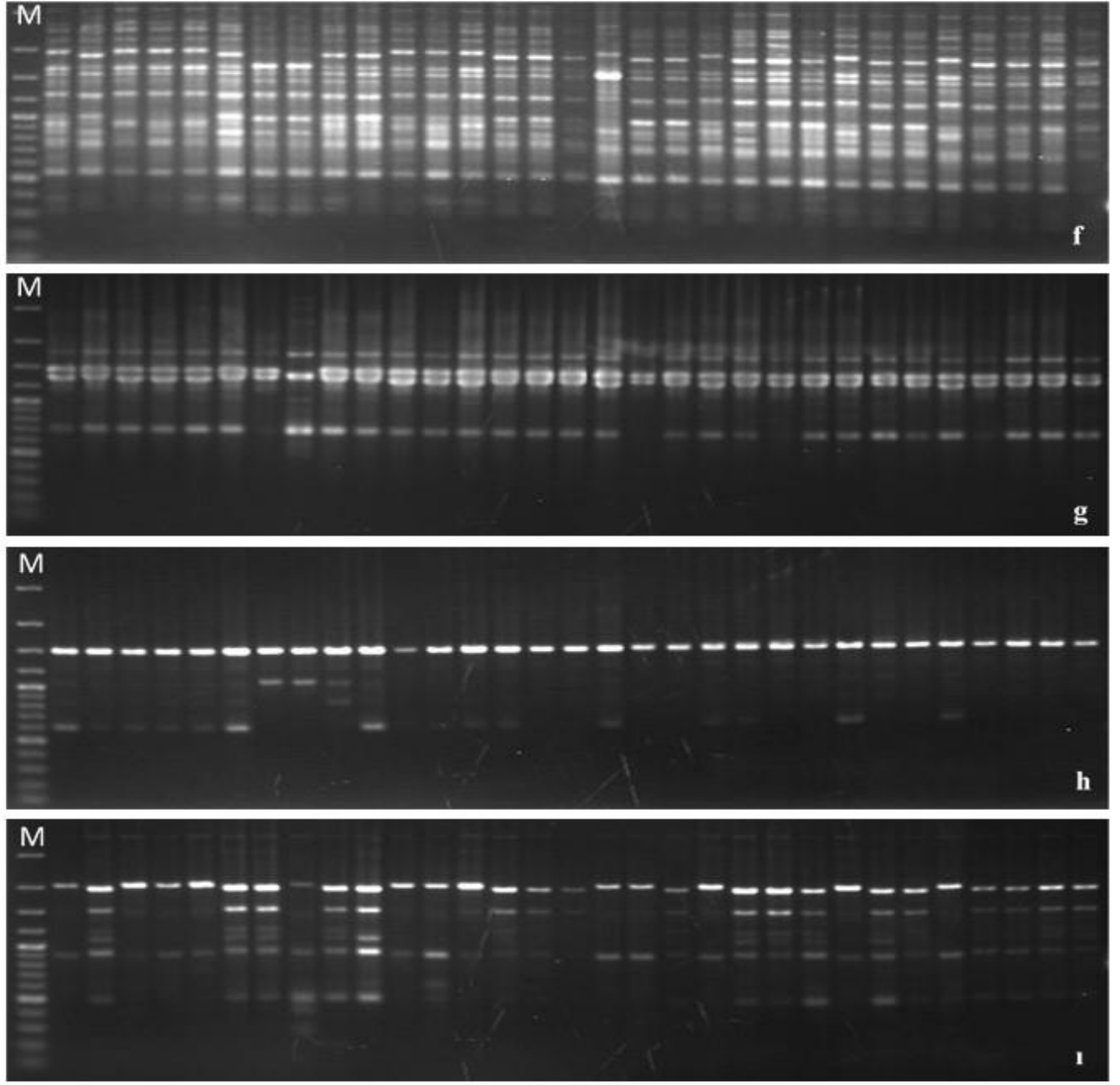
Değerlendirilen DNA fragmentlerindeki polimorfizm seviyesi % 67.7 (polimorfik band sayısı / toplam band sayısı x 100) olarak belirlenmiş olup her primerin ortalama 4.66 polimorfik band verdiği tespit edilmiştir. Her primer için değerlendirilen ortalama band sayısı ise 6.88 olup, primerler arasında 4 (BDB(ACA)₅) ile 11 (DHB(CGA)₅) arasında değiştiği görülmüştür. Patojen izolatları arasında en fazla intraspesifik farklılık 8 polimorfik band üreten (% 100) (AG)₈T ile elde edilir iken, % 25 polimorfizm ile BDB(ACA)₅ primeri en az bilgi veren primer olmuştur. ISSR primerlerinin ortalama PIC değeri ise ortalama 0.238 olup 0.08 DHB(CGA)₅ ile 0.49 ((AG)₈T) arasında değişmiştir. ISSR primerleri ile elde edilen PCR amplifikasyonları şekil 4.2' de verilmiştir.

ISSR verisinin Dice'ın metoduna göre yapılan UPGMA cluster analizi ise Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilen patojen izolatları arasında % 69 benzerlik ile iki ana grubun bulunduğunu göstermiştir. Birinci ana grup 19 Samsun izolatı ve 1 Tokat izolatından oluşmuştur. İkinci grup ise 71 izolat [(Zonguldak (14), Kastamonu (15), Çankırı (14), Karabük (4), Tokat (5), Samsun (8) ve Rize (11)] ile en büyük grubu oluşturmuş ve yaklaşık % 90 benzerlik ile iki alt gruba ayrılmıştır. İkinci grup içerisindeki Rize bölgesine ait izolatlar, diğer 6 bölgedeki izolatlardan ayrı olarak gruplanmıştır (Şekil 4.3).

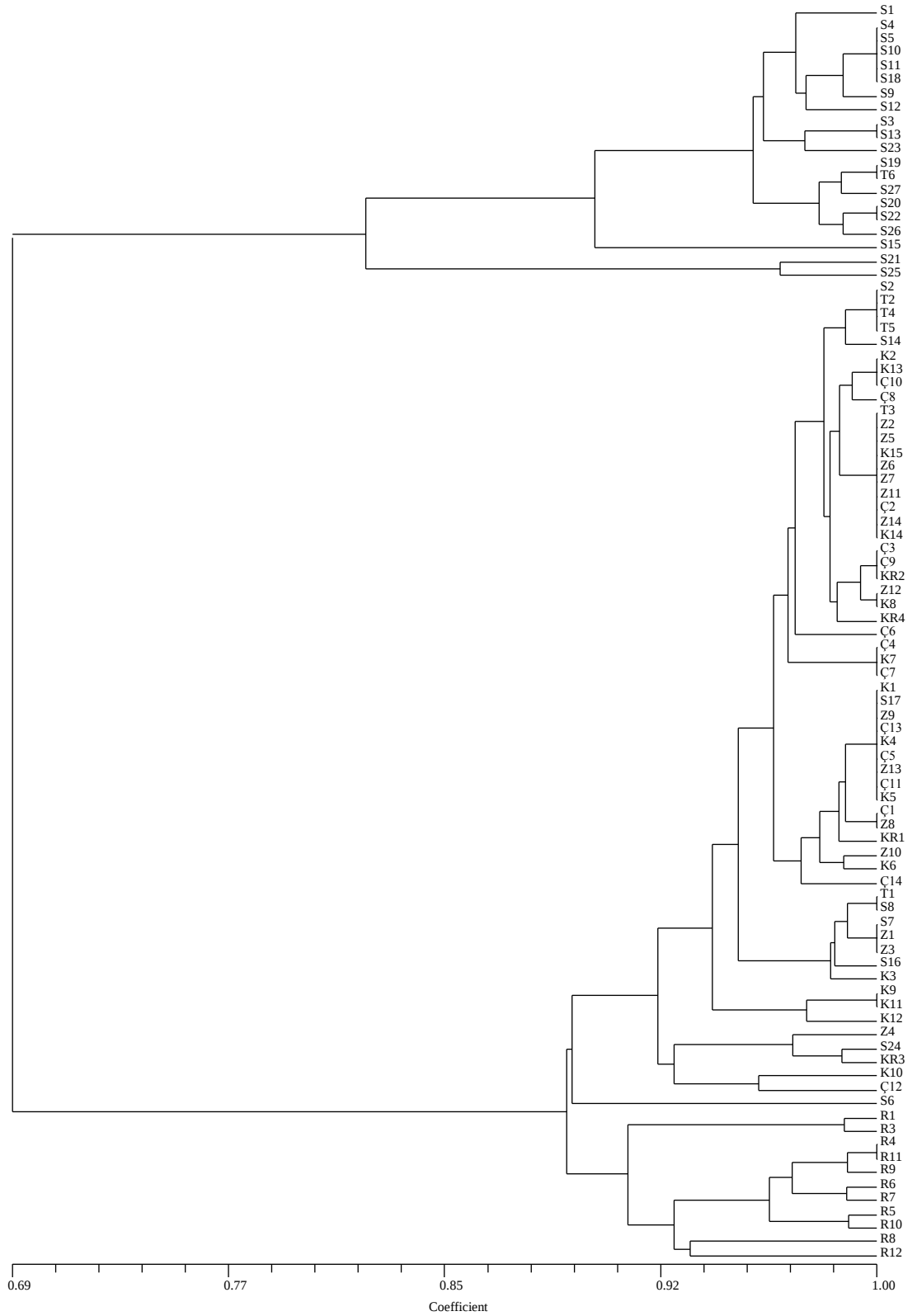




Şekil 4.2 *Colletotrichum lindemuthianum* izolatlarının (AC)₈YA (a); (GA)₈C (b); YHY(GT)₇G (c); DHB(CGA)₅ (d); (GA)₉RY (e) primerleri ile PCR sonucu elde edilen ISSR profilleri (M: Gene ruler 100 bp DNA ladder)



Şekil 4.2 *Colletotrichum lindemuthianum* izolatlarının (AG)₈YC (f); (AC)₈T (g); BDB(ACA)₅ (h); (AG)₈T (i) primerleri ile PCR sonucu elde edilen ISSR profilleri (M: Gene ruler 100 bp DNA ladder) (devam)



Şekil 4.3 *Colletotrichum lindemuthianum* izolatlarına ait ISSR verisinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramı (S: Samsun; Z: Zonguldak; K: Kastamonu; T: Tokat, Ç: Çankırı; R: Rize; KR: Karabük)

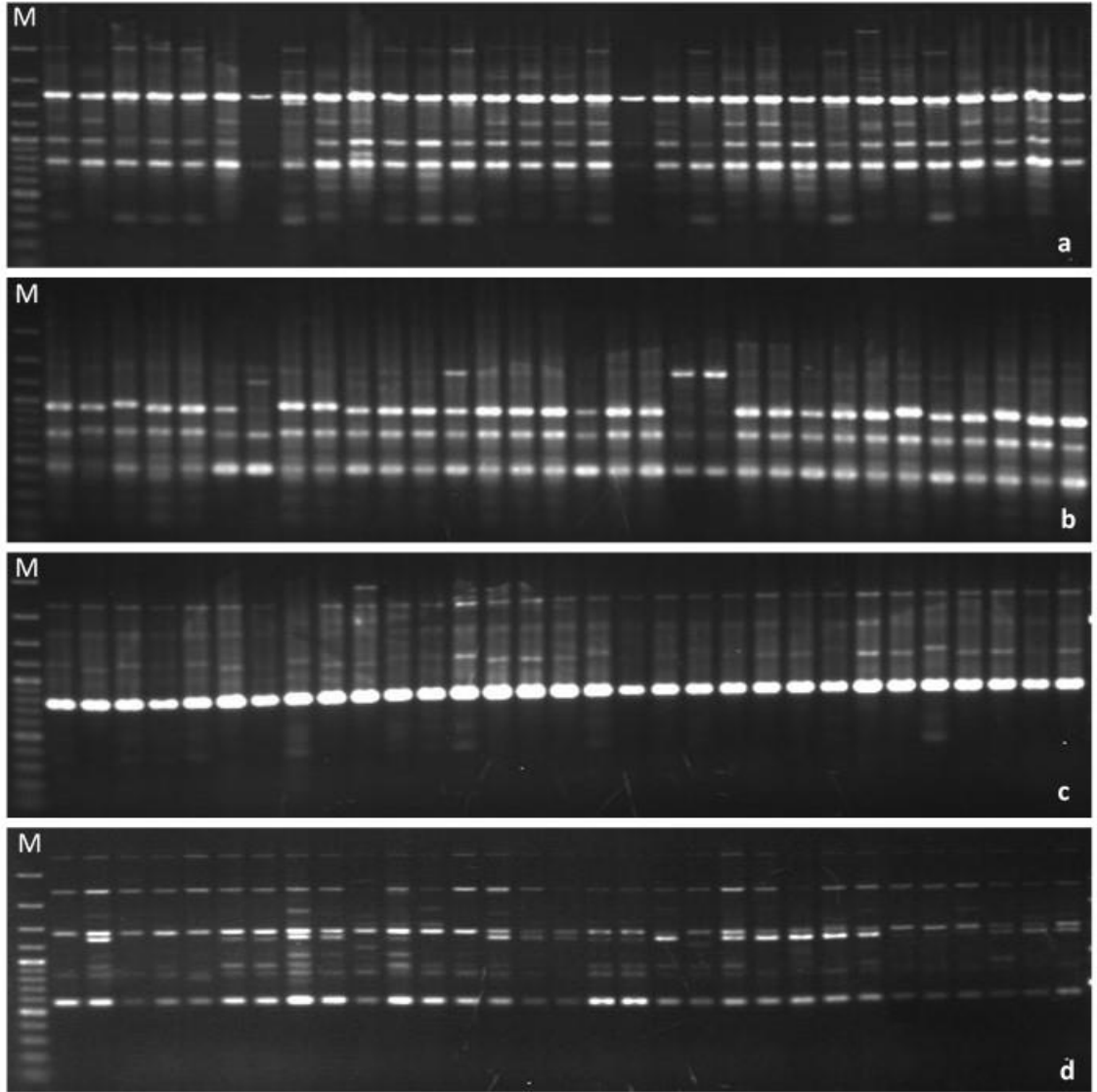
4.2.2 *Colletotrichum lindemuthianum*'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların iPBS yöntemi ile incelenmesi

iPBS çalışmalarında ise test edilen 27 primerden 4 adedinin *C. lindemuthianum* populasyonları arasındaki genetik farklılığı ortaya koymak için faydalı polimorfizm sağladığı görülmüştür (Çizelge 4.3). Diğer primerler izolatlar arasında düşük seviyede polimorfizm sağlaması veya hiç PCR ürünü oluşturmaması nedeniyle elemine edilmiştir. Kullanılan 4 primer ile büyüklüğü 0.35 ve 2.3 kb arasında değişen 27 bant elde edilmiş olup bunların 18 (% 69)'i polimorfik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4). Her primer başına düşen ortalama bant sayısı ise 6.75 olup, primerler arasında 4 (iPBS2077) ile 9 (iPBS2219) arasında değişmiştir. Test edilen primerler arasında iPBS2399 en yüksek polimorfizm yüzdesine (% 83.3) sahip primer olmuştur. Her primer için ortalama polimorfizm bilgi içeriği (PIC) 0.192 olup, 0.06 (iPBS 2399) ile 0.36 (iPBS2077) arasında değişmiştir.

Çizelge 4.3 İzolatlar arasındaki genetik polimorfizmi belirlemek amacıyla kullanılan iPBS primerleri ve elde edilen veriler

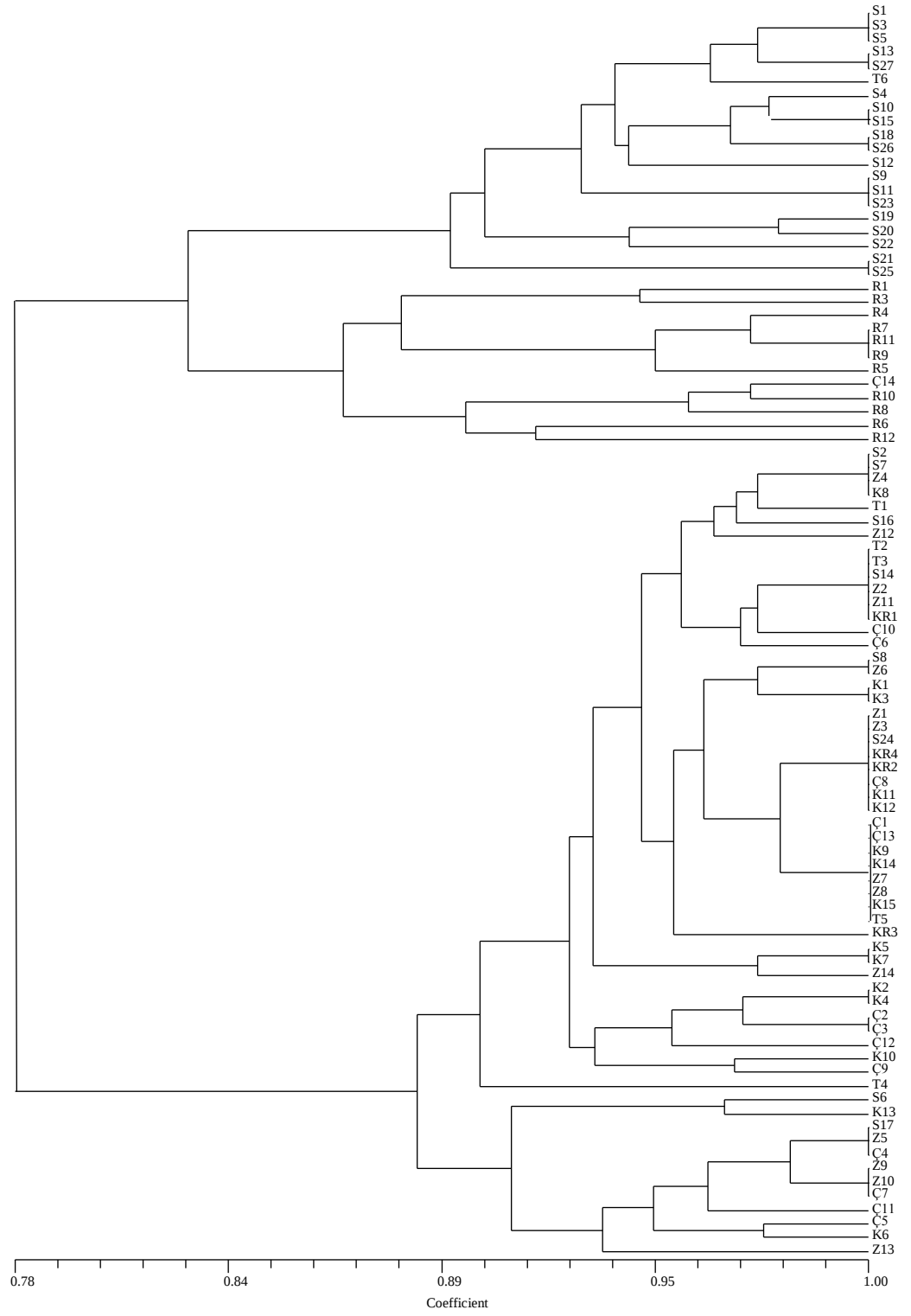
iPBS primerleri	Primer sekansları (5'-3')	Ta (°C)	G+C (%)	TB ^a	PB	PPB (%)	PIC değeri
iPBS2077	CTCACGATGCCA	55	58	4	3	75.0	0.36
iPBS2219	GAACCTTATGCCGATACCA	53	44	9	4	44.4	0.14
iPBS2399	AAACTGGCAACGGCGCCA	52	61	6	5	83.3	0.06
iPBS2221	ACCTAGCTCACGATGCCA	57	55	8	6	75.0	0.21
Toplam				27	18		
Ortalama				6.75	4.5	69.4	0.192

Ta, primerlerin annealing sıcaklığı; G+C, primerlerin guanin sitosin yüzdesi; TB; toplam bant sayısı; PB, polimorfik bant sayısı; PPB, polimorfizm seviyesi; PIC, her primer için polimorfizm bilgi içeriği



Şekil 4.4 *C. lindemuthianum* izolatlarının iPBS primerleri ile elde edilen jel görüntüleri (iPBS 2221 (a); iPBS 2399 (b); iPBS 2077 (c); iPBS 2219 (d) primeri (M: Gene ruler 100 bp DNA ladder))

iPBS verisi kullanılarak oluşturulan dendogramda patojen izolatları arasında % 78 benzerlik ile iki ana cluster ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte ISSR analizinden elde edilen dendogramdaki gruplanma ile karşılaştırıldığında, gruplar içerisindeki izolatların dağılımında bazı farklılıklar gözlenmiştir. Grup 1 % 82 benzerlikle 2 alt gruba ayrılmış ve Rize bölgesinden elde edilen izolatların ISSR analizi ile elde edilen dendogramda birinci gruba ait olan izolatlarla birlikte gruplandığı görülmüştür. Grup 2 ise yaklaşık % 89 genetik benzerlikle 2 alt gruba ayrılmıştır (Şekil 4.5).

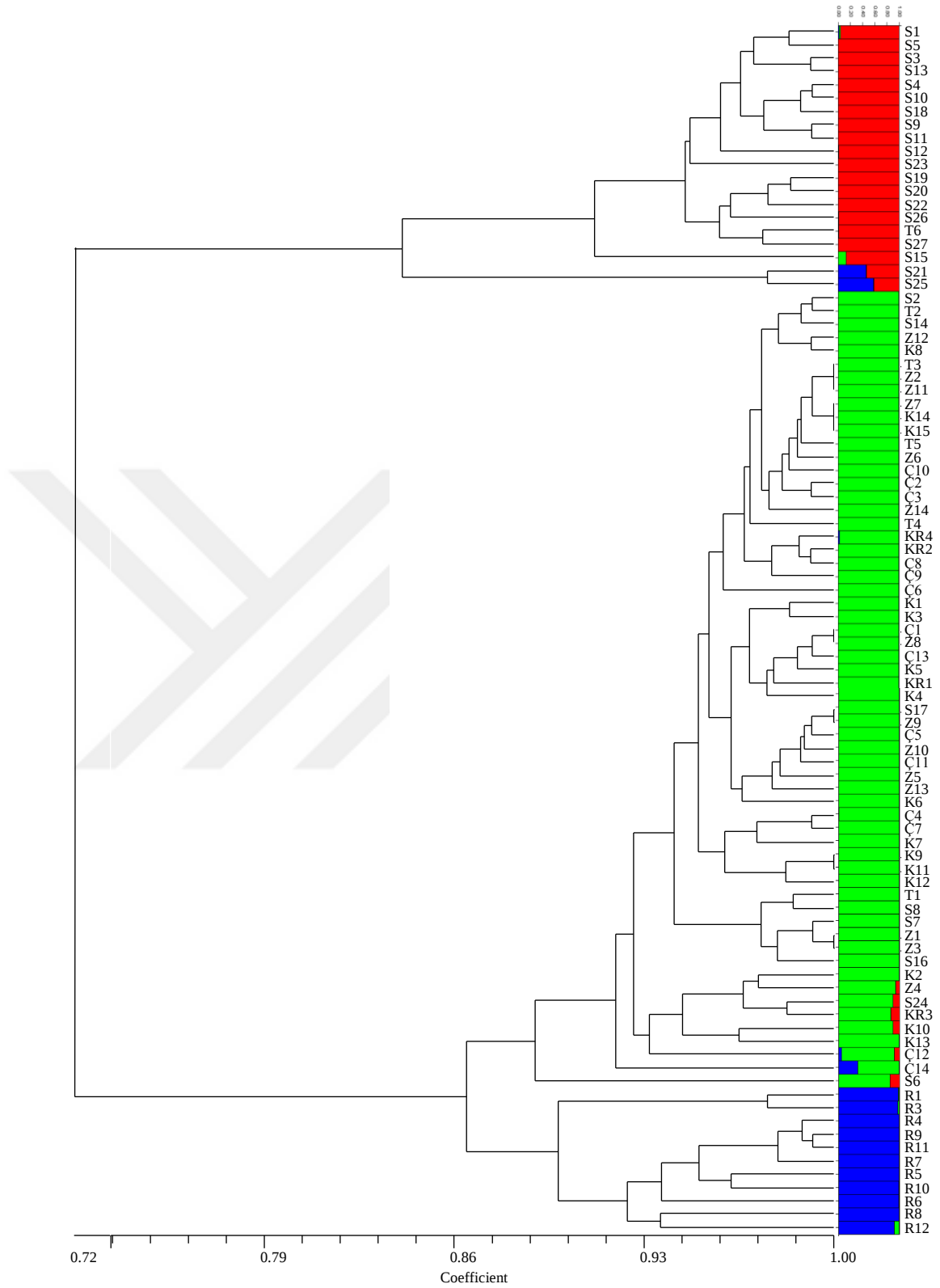


Şekil 4.5 *Colletotrichum lindemuthianum* izolatlarına ait iPBS verisinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramı (S: Samsun; Z: Zonguldak; K: Kastamonu; T: Tokat, Ç: Çankırı; R: Rize; KR: Karabük)

4.2.3 *Colletotrichum lindemuthianum*'un populasyon yapısındaki genetik farklılıkların iPBS ve ISSR yöntemlerinin birleştirilerek incelenmesi

iPBS ve ISSR markerlerinin birleştirilmiş verisi ile yapılan UPGMA analizi patojen izolatlarını % 72 genetik benzerlikle iki ana gruba ayırmış ve her ana grubun iki alt grup içerdiği görülmüştür (Şekil 4.6). Oluşturulan kombine dendogramda gruplar içerisindeki izolatların dağılımı iPBS'den daha çok ISSR ile oluşturulan dendograma benzerlik göstermiştir. Elde edilen sonuçlar izolatların coğrafik orijinleri ve dendogramdaki gruplanmaları arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermiş ve aynı bölgeye ait izolatlar farklı coğrafik bölgelerdeki izolatlara kıyasla daha yakın ilişkili bulunmuştur.

Grup I, ISSR analizi ile elde edilen dendogramdaki gibi Samsun izolatlarının % 70.3'ünü ve 1 tane Tokat izolatını içermiştir. S21 ve S25 izolatlarının bu gruptaki diğer izolatlardan oldukça farklı olduğu görülmüştür. Grup II ise yaklaşık % 87 benzerlik ile iki alt gruba ayrılmıştır. Rize bölgesinden elde edilen tüm izolatlar, diğer bölgeleri temsil eden izolatlardan ayrı olarak gruplanmıştır. Cluster analizlerinin uygunluğunu test etmek için benzerlik matrisi verileri MXCOPH algoritması kullanılarak karşılaştırılmış kofenetik korelasyon katsayıları ISSR ve iPBS için sırasıyla 0.96 ve 0.87 olarak tespit edilmiştir. Mantel testi ile kofenetik matris değerlerinin karşılaştırılması ise dendogramlar arasında güçlü bir doğrusal ilişki ($r= 0.73$) olduğunu ve her iki moleküler markerın, *C. lindemuthianum* populasyonları içindeki ve arasındaki varyasyonu değerlendirmek için güçlü birer yöntem olduklarını göstermiştir.



Şekil 4.6 *Colletotrichum lindemuthianum* izolatlarının iPBS ve ISSR verilerinin kombine edilmesiyle oluşturulan dendrogramı ve structure analizi (S: Samsun; Z: Zonguldak; K: Kastamonu; T: Tokat, Ç: Çankırı; R: Rize; KR: Karabük)

Populasyon farklılıkları incelendiğinde ise en yüksek polimorfik lokus % 58.43 ile Samsun populasyonunda görülürken, diğer populasyonlarda % 12.36 (Karabük) ile % 48.31 (Tokat) arasında değişmiştir (Çizelge 4.4). Populasyonlardaki Nei'nin gen farklılık (h) değerleri 0.046 (Karabük) ve 0.217 (Samsun) arasında görülür iken, Shannon indexi değerleri 0.069 ile 0.321 arasında değişmiştir. Populasyonlardaki toplam gen farklılığının (H_T) 0.165 ± 0.023 olduğu, bu değer % 59.4'nün (H_S : 0.098 ± 0.009) populasyonlar içerisindeki farklılıklardan kaynaklandığı görülmüştür. Benzer şekilde G_{ST} indeksi de toplam genetik farklılığın 0.4'nün populasyonlar arası farklılıklardan kaynaklandığını göstermiştir. Gen akışı (N_M) değeri ise 0.748 olarak tespit edilmiş ve populasyonlar arasındaki gen akışının düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Populasyonlar arasındaki F_{ST} değerleri ise 0.6046-0.0060 arasında olup Samsun ve Rize illeri ile diğer iller arasındaki F_{ST} değerleri istatistiksel olarak ($P < 0.001$) önemli bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4 *Colletotrichum lindemuthianum*'un populasyonları arasındaki ve içerisindeki genetik farklılığın dağılımı

Populasyonlar	N*	PL, %	h	I
Samsun	27	58.43	0.217 ± 0.207	0.321 ± 0.296
Tokat	6	48.31	0.138 ± 0.145	0.221 ± 0.232
Kastamonu	15	26.97	0.071 ± 0.135	0.114 ± 0.205
Çankırı	14	21.35	0.054 ± 0.118	0.087 ± 0.182
Zonguldak	14	29.21	0.073 ± 0.136	0.118 ± 0.205
Karabük	4	12.36	0.046 ± 0.124	0.069 ± 0.186
Rize	11	28.09	0.091 ± 0.159	0.140 ± 0.236
Tüm populasyonlar	$H_T: 0.165 \pm 0.023$	$H_S: 0.098 \pm 0.009$	$G_{ST}: 0.400$	$N_M: 0.748$

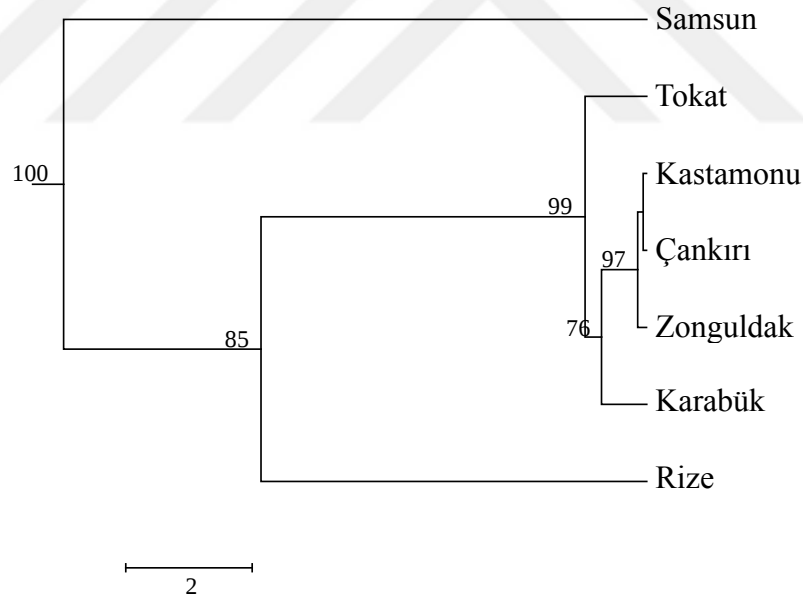
*N, izolat sayısı; PL, % polimorfik lokus; h, Nei'nin gen farklılığı; I, Shannon index değeri) (H_T : Toplam gen farklılığı; H_S : populasyonlar içindeki gen farklılığı; G_{ST} : Populasyonlar arasında bulunan toplam gen farklılığının oranı, N_M : Gen akışı

Çizelge 4.5 *Colletotrichum lindemuthianum* populasyonları arasındaki F_{ST} değerleri

Populasyonlar	Samsun	Tokat	Kastamonu	Zonguldak	Çankırı	Karabük
Tokat	0.2709					
Kastamonu	0.4523*	0.0708				
Zonguldak	0.4943*	0.1085	0.0086			
Çankırı	0.4740*	0.0970	-0.0011	-0.0060		
Karabük	0.3947*	0.0332	0.0376	0.0111	0.0501	
Rize	0.3974*	0.3675*	0.5718*	0.6046*	0.5577*	0.5126*

* F_{ST} $P < 0.001$

Nei'nin genetik uzaklığı metodu ile oluşturulan dendogramda ise tüm populasyonlar % 100 bootstrap değeri ile iki ana gruba ayrılmıştır (Şekil 4.7). Samsun populasyonu diğer populasyonlardan ayrı gruplanmıştır. Tokat, Kastamonu, Zonguldak, Çankırı ve Karabük populasyonları 0.028 genetik uzaklıkla bir arada yer alırken, Rize populasyonu 0.12 genetik uzaklık ile ayrı bir cluster oluşturmuştur.



Şekil 4.7 Nei'nin genetik uzaklığı kullanılarak *Colletotrichum lindemuthianum* izolatlarının coğrafik populasyonları için oluşturulan dendogramı (Bootstrap analizi 1,000 permütasyonlu gerçekleştirilmiştir)

STRUCTURE analizi de dendogramda oluşan gruplanmaya benzer bir populasyon dağılımı göstermiştir (Şekil 4.6). En yüksek ΔK değeri $K=3$ 'de ($\ln P(K) = -1102.9$) bulunmuş olup 3 genetik grup belirlenmiştir. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar

izolatların coğrafik dağılımları ile ilişkili bulunmuş olup, Grup I çoğunlukla Samsun bölgesinden elde edilen izolatlardan oluşurken, Rize'den elde edilen izolatlar Grup III içerisinde yer almıştır. Diğer bölgelerden elde edilen 60 izolat ise Grup II içerisinde dağılım göstermiştir. AMOVA analizi de bölgeler arasında oldukça önemli farklılıkların olduğunu ve toplam genetik varyasyonun % 41.3'ünün bölgeler arasındaki farklılıklardan kaynaklandığını göstermiştir (Çizelge 4.6). Bu kapsamda tespit edilen varyasyonun % 58.7'nin izolatlar arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6 *Colletotrichum lindemuthianum* populasyonlarına ait moleküler varyans analizi (AMOVA)

Varyasyon kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Varyans içerikleri	Varyasyon yüzdesi (%)	Fst	P-value*
Populasyonlar arası	6	328.888	3.919	41.29		
Populasyonlar içi	85	473.492	5.570	58.70	0.412	<0.0000
Toplam	91	802.380	9.489			

4.3 Ülkemizdeki Bazı Önemli Fasulye Genotip ve Çeşitlerinin Hastalık Etmenine Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi

Çalışma kapsamında ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen bazı fasulye çeşitleri ile önceki çalışmada morfolojik özellikler açısından ümitvar olduğu belirlenen bazı fasulye genotiplerinin etmene (S27 nolu izolat) karşı reaksiyonları belirlenmiştir. Patojenisite testi sonucunda etmenin test edilen tüm fasulyelerde yüksek derecede patojen olduğu ve tipik antraknoz belirtilerine neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). Fasulye çeşitleri arasında hastalık şiddeti değerleri 1.1-8.1, fasulye genotipleri arasında 1.5-9.0 arasında değişmiştir (Çizelge 4.7; Çizelge 4.8). Fasulye çeşitleri içerisinde Sazova, Akdağ, Zülbiye, Akın, Önceler, Karacaşehir ve Buse oturak hastalığa karşı dayanıklı reaksiyon gösterirken, diğer tüm çeşitlerin hassas reaksiyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Genotipler içerisinde ise AYD-2, YLV-31, BRS-4, ISPT-4, YLV-14, BRS-23 dayanıklı olarak değerlendirilirken diğer tüm genotiplerin hassas reaksiyon gösterdiği görülmüştür (Çizelge 4.8).



Şekil 4.8 Patojenisite sonucunda *Colletotrichum lindemuthianum*'un fasulye bitkisinin yaprak üst yüzeyi, alt yüzeyi ve gövdesinde neden olduğu tipik antraknoz belirtileri



Şekil 4.9 Dayanıklı ve hassas fasulye çeşitleri arasındaki reaksiyon farkı (dayanıklı; Zülbiye, hassas; Yakutiye (a), dayanıklı; Sazova, hassas; Boncuk (b))

Çizelge 4.7 Patojenisite çalışmalarına dâhil edilen fasulye çeşitlerinin patojen izolatına karşı reaksiyonları

No	Çeşit ismi	Tür	Skala değeri	Reaksiyon
1	Seher yıldızı	Taze	7.1	Hassas
2	Zeynebim	Taze	7.0	Hassas
3	Karabacak	Taze	7.0	Hassas
4	40 günlük	Taze	6.9	Hassas
5	Fransız	Taze	7.5	Hassas
6	Boncuk	Taze	7.0	Hassas
7	Sazova	Taze	1.0	Dayanıklı
8	Magnum	Taze	6.7	Hassas
9	Java	Taze	7.0	Hassas
10	Asya	Taze	7.8	Hassas
11	Sofia	Taze	3.7	Hassas
12	Volare	Taze	7.3	Hassas
13	Gina	Taze	7.5	Hassas
14	Özayşe	Taze	6.4	Hassas
15	Yalova 5	Taze	6.5	Hassas
16	Yalova 17	Taze	5.0	Hassas
17	Perolar	Taze	6.7	Hassas
18	Sarıköz	Taze	7.7	Hassas
19	Gelincik	Taze	8.1	Hassas
20	Hanımteni	Taze	7.9	Hassas
21	Tavil	Taze	4.8	Hassas
22	Miray	Taze	7.9	Hassas
23	Nazende	Taze	7.4	Hassas
24	Mina	Taze	7.8	Hassas
25	Buse Oturak	Barbunya	2.8	Dayanıklı
26	Selim	Barbunya	5.3	Hassas
27	Sembol	Barbunya	3.3	Hassas
28	Belinay Sırık	Barbunya	5.9	Hassas
29	Klas	Barbunya	6.9	Hassas
30	Sırık barbunya	Barbunya	4.7	Hassas
31	Akdağ	Kuru	3.0	Dayanıklı
32	Zülbiye	Kuru	2.3	Dayanıklı
33	Akın	Kuru	1.0	Dayanıklı
34	Önceler	Kuru	2.2	Dayanıklı
35	Karacaşehir 90	Kuru	1.8	Dayanıklı
36	Göynük 98	Kuru	6.6	Hassas
37	Bulduk	Kuru	6.6	Hassas
38	Mecidiye	Kuru	5.8	Hassas
39	Aras	Kuru	6.3	Hassas
40	Yakutiye	Kuru	8.1	Hassas

Çizelge 4.8 Patojenisite çalışmalarına dâhil edilen fasulye genotiplerinin patojen izolatına karşı reaksiyonları

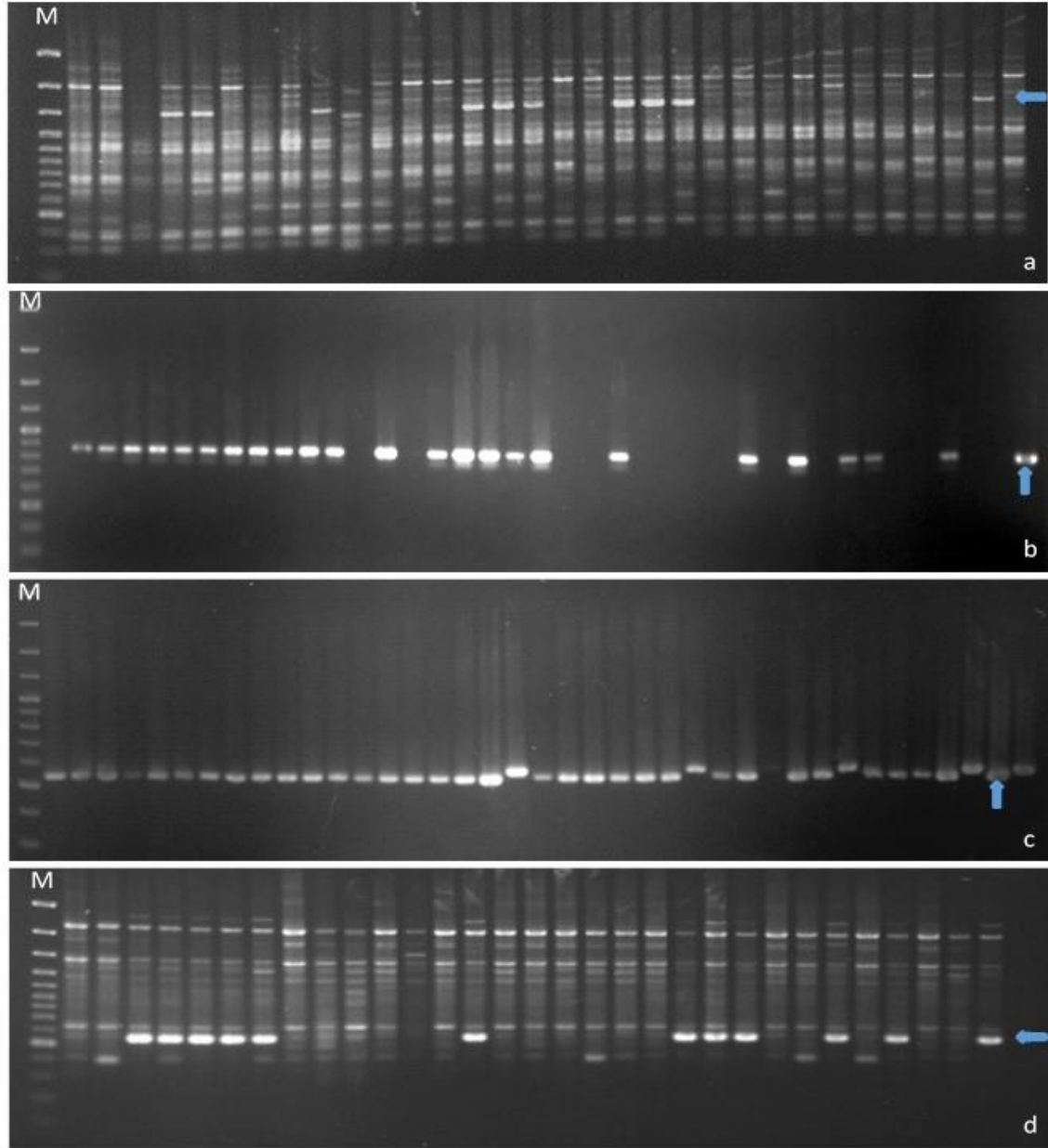
No	Fasulye Genotopi	Elde edildiği Şehir	Skala değeri	Reaksiyon
1	ISPT-6	Isparta	8.3	Hassas
2	MGL-4	Muğla	9	Hassas
3	KTH-26	Kütahya	8.3	Hassas
4	ÇNK-8	Çanakkale	9	Hassas
5	BRS-21	Bursa	9	Hassas
6	MNS-5	Manisa	7.3	Hassas
7	BLCK-7	Bilecik	7.3	Hassas
8	ISPT-3	Isparta	7.3	Hassas
9	AYD-2	Aydın	2.3	Dayanıklı
10	AYD-1	Aydın	9	Hassas
11	DNZL-9	Denizli	9	Hassas
12	MGL-30	Muğla	9	Hassas
13	ANT-31	Antalya	9	Hassas
14	KTH-27	Kütahya	7.5	Hassas
15	BRD-25	Burdur	6.8	Hassas
16	DZC-2	Düzce	4.3	Hassas
17	ÇNK-2	Çanakkale	9	Hassas
18	ÇNK-6	Çanakkale	9	Hassas
19	UŞK-1	Uşak	9	Hassas
20	BLKSR-14	Balıkesir	9	Hassas
21	BRS-3	Bursa	9	Hassas
22	BLKSR-3	Balıkesir	9	Hassas
23	YLV-32	Yalova	8.3	Hassas
24	DNZL-3	Denizli	3.5	Hassas
25	IZM-4	İzmir	6.7	Hassas
26	BLKSR-19	Balıkesir	9	Hassas
27	ÇNK-4	Çanakkale	7	Hassas
28	YLV-31	Yalova	3	Dayanıklı
29	ANT-22	Antalya	7.8	Hassas
30	BRS-4	Bursa	1.8	Dayanıklı
31	ISPT-4	Isparta	2.8	Dayanıklı
32	BRS-24	Bursa	9	Hassas
33	KTH-17	Kütahya	8.5	Hassas
34	IZM-2	İzmir	8.3	Hassas
35	BRS-22	Bursa	5.7	Hassas
36	YLV-14	Yalova	1.5	Dayanıklı
37	YLV28	Yalova	9	Hassas
38	DZC-3	Düzce	7.9	Hassas
39	BRS-23	Bursa	1.6	Dayanıklı
40	BRD-2	Burdur	9	Hassas

4.4 Ülkemizdeki Bazı Fasulye Genotiplerindeki Dayanıklılık Kaynaklarının Marker Destekli Seleksiyon (MAS) ile Belirlenmesi

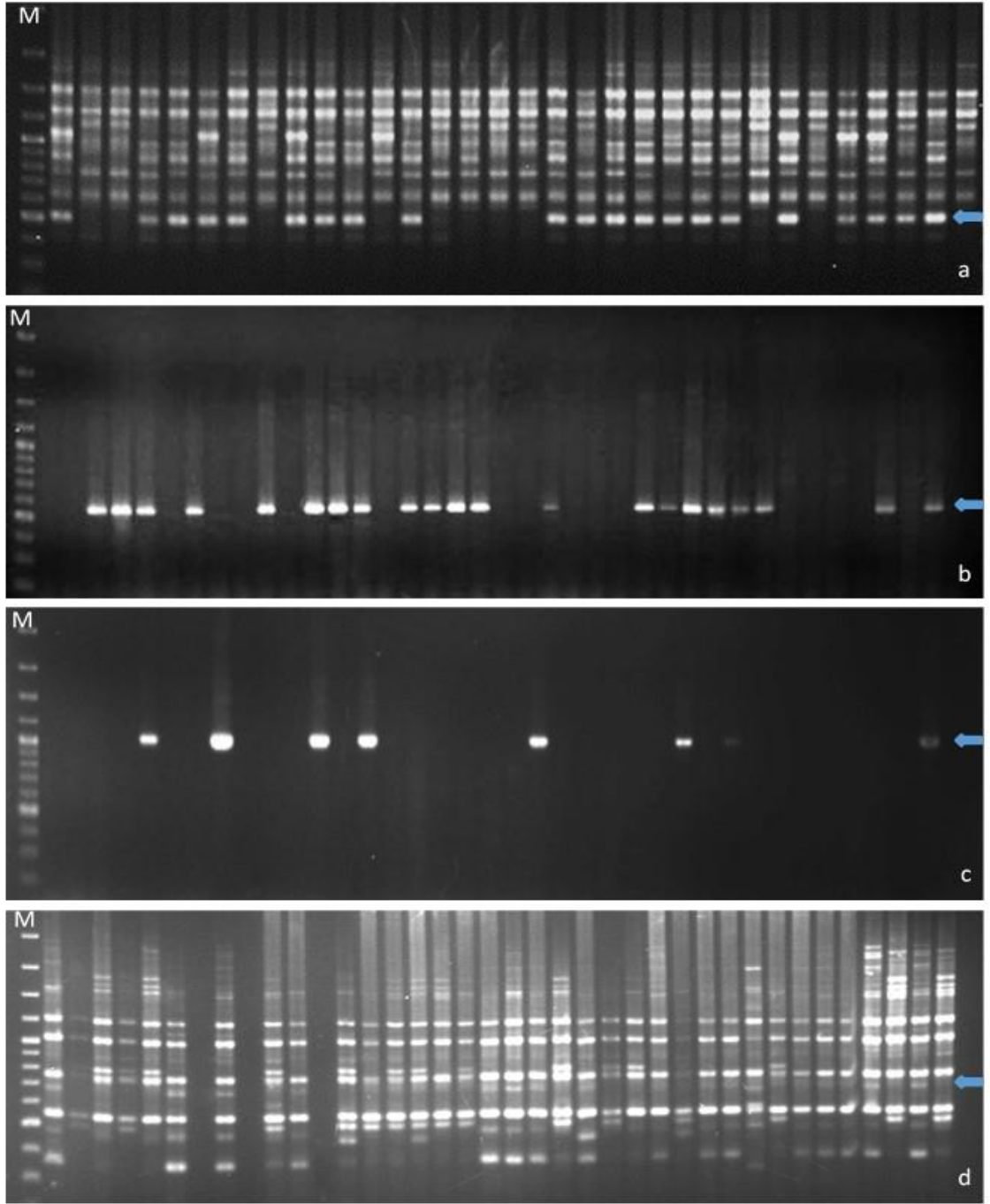
Colletotrichum lindemuthianum'un neden olduğu antraknoz hastalığına karşı fasulye genotiplerinde dayanıklılık sağlayan gen lokuslarının moleküler markerlerle belirlenmesi için yapılan çalışmalarda 693 fasulye genotipinden DNA ekstraksiyonu yapılmış ve dayanıklılıkla ilişkili *Co* genleri 12 farklı primer ile incelenmiştir. Yapılan PCR çalışmaları sonucunda test edilen tüm primerlerden beklenen büyüklükte PCR ürünleri elde edilmiştir.

*Co-1*⁵ lokusu ile ilişkili OPA18 primeri ile 1500 bp büyüklüğünde bir band amplifiye edilmiş ve 602 fasulye genotipinde tespit edilerek, Türkiye'deki fasulye genotiplerinde en fazla bulunan gen lokusu olduğu görülmüştür (Çizelge 4.9; Şekil 4.10). *Co-4* lokusu ile ilişkili olan SC08 primeri ise örneklerden 910 bp büyüklüğünde ürün çoğaltmış ve 470 fasulye genotipinde bulunarak, varlığı en fazla tespit edilen ikinci dayanıklılık geni olmuştur. *Co-6* geni ile ilişkili bir SCAR marker olan SZ04 ise 414 fasulye genotipinden 567 bp büyüklüğünde bir bandın çoğalmasını sağlamıştır. *Co-11* lokusu ile ilişkili olan OPAZ04 hassas fasulye genotiplerinden 565 bp DNA fragmenti çoğaltırken, *Co-1* geni ile ilişkili OPF10 primeri 530 bp büyüklüğünde ürün amplifiye etmiştir (Şekil 4.10; Şekil 4.11). *Co-1*⁴ lokusu ile ilişkili olan STS markerı TGA1 primeri ise 300 fasulye genotipinden 570 bp PCR ürünü çoğaltmıştır (Şekil 4.11). SCAR marker olan ve *Co-10* lokusunun tespitine olanak sağlayan SF10 primeri ise örneklerden 1072 bp büyüklüğünde bir bandı çoğaltmış ve 130 genotipte var olduğu tespit edilmiştir. *Co-13* lokusu ile ilişkili RAPD markerı olan OPV20 primeri ise örneklerden 680 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürününün oluşmasını sağlamış ve 113 fasulye genotipinin bu geni taşıdığı görülmüştür (Şekil 4. 11). Mesoamerican gen havuzuna ait *Co-4*² lokusu ile ilişkili olan SBB14 markerı ise 21 fasulye genotipinde 1150 bp amplifikasyon ürünü çoğaltmıştır (Şekil 4.12). *Co-2* lokusu ile ilişkili bir marker olan SCAreoli primerinin PCR ürünlerinin *DraI* enzimi ile kesimi sonucu, test edilen tüm genotipler arasında 3 genotipte 1000 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir. *Co-3*³ lokusu ile ilişkili olan SB12 primeri ise 350 bp büyüklüğünde band çoğaltmış ve 693 genotip içerisinde sadece 2 genotipte varlığı tespit edilmiştir. SCAR marker olan ve *Co-5*

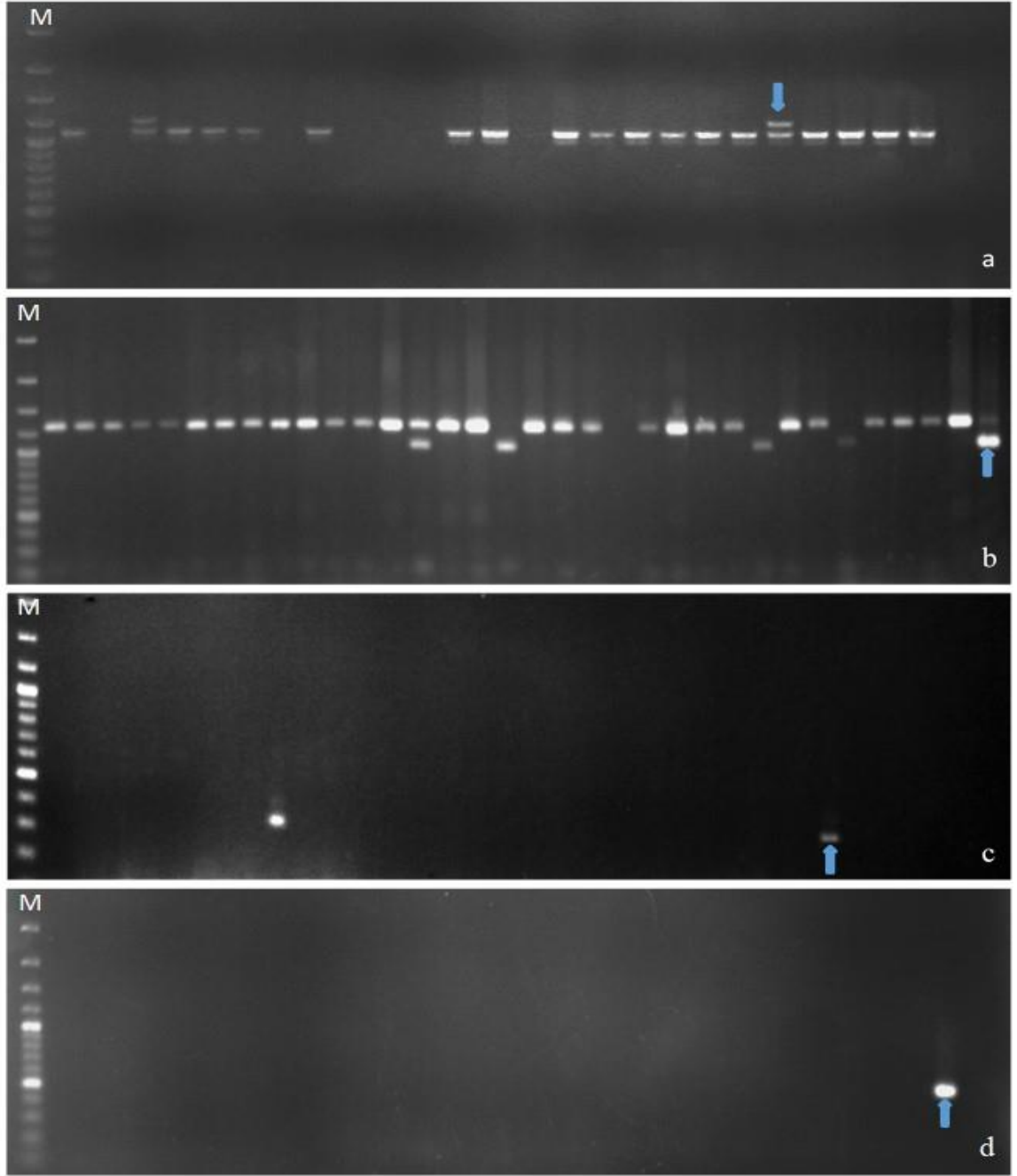
lokusunun tespitine olanak sağlayan SAB3 primeri ise sadece referans örnek TU'dan 400 bp büyüklüğünde bir bandın çoğalmasını sağlamıştır.



Şekil 4.10 Marker destekli seleksiyon yöntemiyle OPA18, SC08, SZ04 ve OPAZ04 primer amplifikasyonları sonucu elde edilen jel görüntüleri (OPA18/1500 bp, +: Cornell 49242; -: Widusa (a); SC08/910 bp, +: Quero negro; -: TO (b); SZ04/567 bp, +: Michelite; -: AB136 (c); OPAZ04/565 bp, +: MDRK; -: Michelite (d) (M: GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific)



Şekil 4.11 Marker destekli seleksiyon yöntemiyle OPF10, TGA1, SF10 ve OPV20 primer amplifikasyonları sonucu elde edilen jel görüntüleri (OPF10/530 bp, +: Michelite; -: Cornell 49242) (a); TGA1/570 bp +: MDRK; -: Quero negro (b); SF10/1072 bp +: Quero negro; -: MDRK (c); OPV20/680 bp (+:Cornell 49242; -: MDRK (d) (M: GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific))

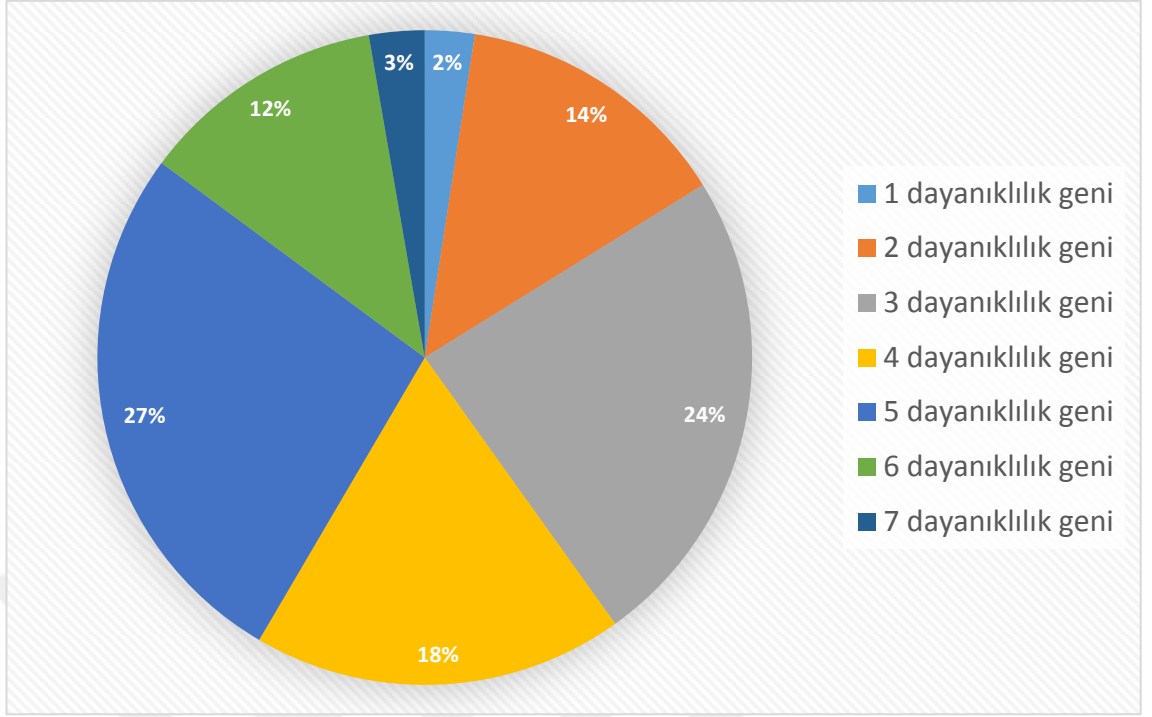


Şekil 4.12 Marker destekli seleksiyon yöntemiyle SBB14, SCAreoli, SB12 ve SAB3 primer amplifikasyonları sonucu elde edilen jel görüntüleri (SBB14/1150-1050 bp +: Quero negro; -: Usp-Ant-1 (a); SCAreoli/1000 bp +: Cornell 49242; -: TO (b); SB12/350 bp +: PI 207262; -: Michelite (c); SAB3/400 bp +: TU; -: TO (d) (M: GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific))

Çizelge 4.9 Marker taramasında beklenilen PCR ürünlerini veren fasulye genotiplerinin dağılımı

Primer	Gen lokusu	Beklenilen PCR ürününü veren fasulye genotip adedi	Dayanıklılık gen sayısı	Test edilen genotip sayısı
OPA18	<i>Co-1</i> ⁵	91	602	693
SC08	<i>Co-4</i>	470	470	693
SZ04	<i>Co-6</i>	414	414	693
OPF10	<i>Co-1</i>	294	399	693
OPAZ04	<i>Co-11</i>	372	321	693
TGA1.1	<i>Co-1</i> ⁴	300	300	693
SF10	<i>Co-10</i>	130	130	693
OPV20	<i>Co-13</i>	113	113	693
SBB14	<i>Co-4</i> ²	21	21	693
SCAreoli	<i>Co-2</i>	3	3	693
SB12	<i>Co-3</i> ³	2	2	693
SAB3	<i>Co-5</i>	0	0	693

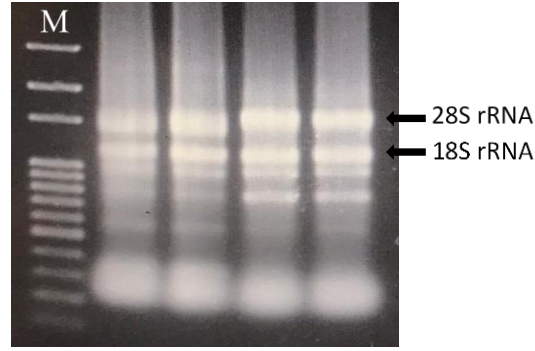
Fasulye genotipleri genel olarak değerlendirildiğinde en fazla bulunan dayanıklılık genlerinin sırasıyla *Co-1*⁵, *Co-4*, *Co-6*, *Co-1*, *Co-11*, *Co-1*⁴, *Co-10*, *Co-13* olduğu belirlenmiştir. *Co-4*², *Co-2* ve *Co-3* genlerinin ise oldukça az sayıda örnekte bulunduğu tespit edilmiştir. *Co-5* geni ise test edilen genotiplerde bulunamamıştır. Ayrıca tüm fasulye genotiplerinin 1 ile 7 arasında değişen sayılarda *Co* lokusu taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Genotiplerin büyük çoğunluğu (%27) 5 adet gene sahipken, 166 genotip (%24) 3 gen, 127 genotip (%18) 4 gen barındırmaktadır. 17 genotip sadece 1 dayanıklılık geni taşıırken, 19 genotipin 7 adet *Co* lokusuna sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hastalığa karşı dayanıklı reaksiyon gösteren AYD-2, YLV-31, BRS-4, BRS-23, ISPT-4 ve YLV-14 genotiplerinin *Co-1*, *Co-1*⁵, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Co-11* ve *Co-13* genlerini içeren farklı kombinasyonlar taşıdığı görülmüştür. Bu genotiplerin başta *Co-11* dayanıklılık geni olmak üzere en fazla *Co-6* ve *Co-1*⁵ genlerini taşıdıkları belirlenmiştir.



Şekil 4.13 Farklı illerden elde edilen fasulye genotiplerinin taşıdığı Co dayanıklılık genlerinin dağılımı

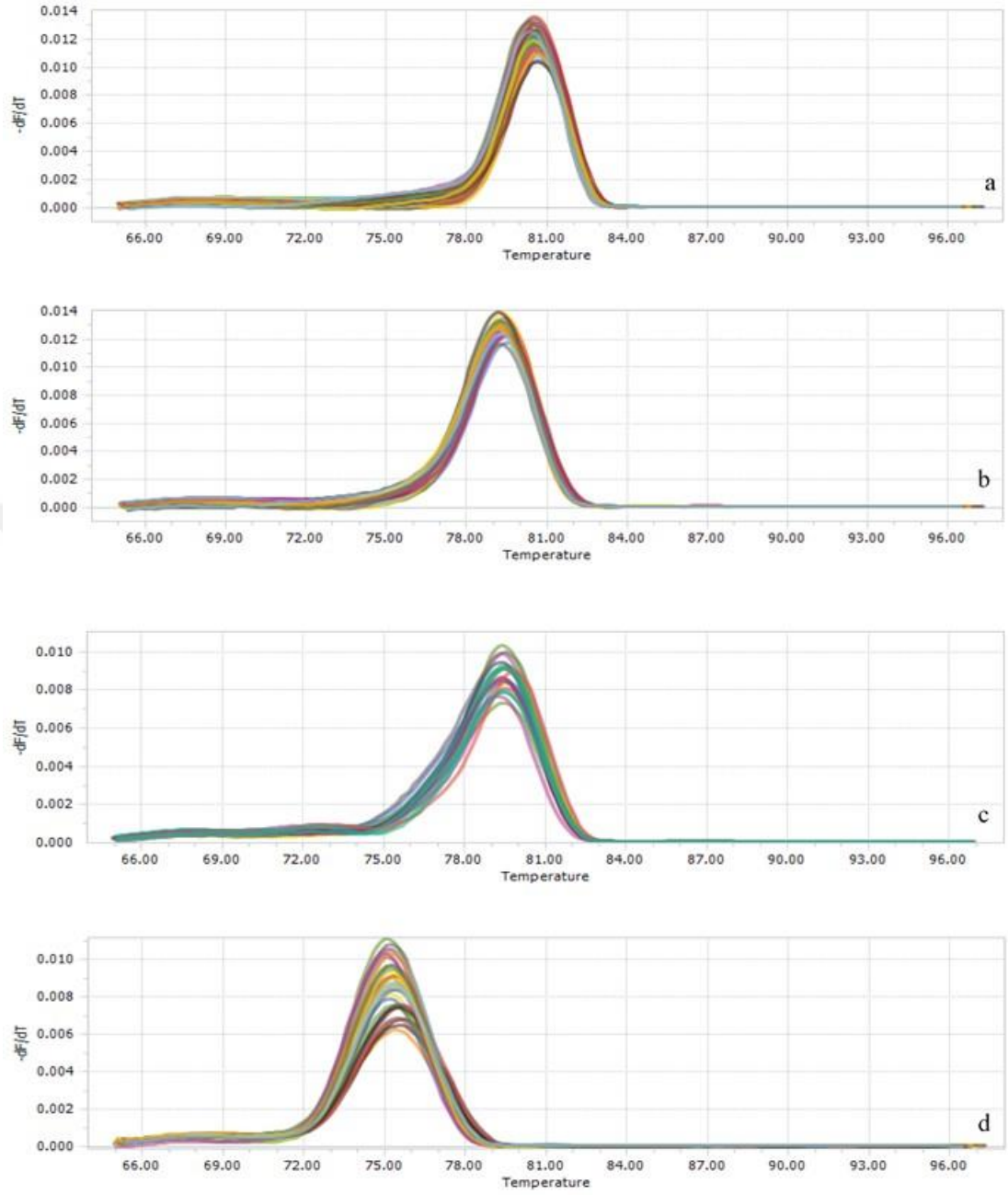
4.5 Patojen Genotiplerine Bağlı Olarak Bitkideki Dayanıklılık Gen Ekspresyonlarındaki Değişimlerin İncelenmesi

Patojen genotiplerine bağlı olarak bitkideki dayanıklılık ile ilişkili bazı gen ekspresyonlarındaki değişimlerin incelenmesi amacıyla ISSR ve iPBS çalışmaları sonucunda farklı genotipleri temsil eden S27 ve Z10 patojen izolatları kullanılmıştır. Patojenisite çalışmalarında belirtildiği gibi trifoliolate yaprakları çıkana kadar yetiştirilen Gina fasulye çeşidine inokulasyon yapılmış ve inokulasyondan 0, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde örnekler alınarak RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.14).

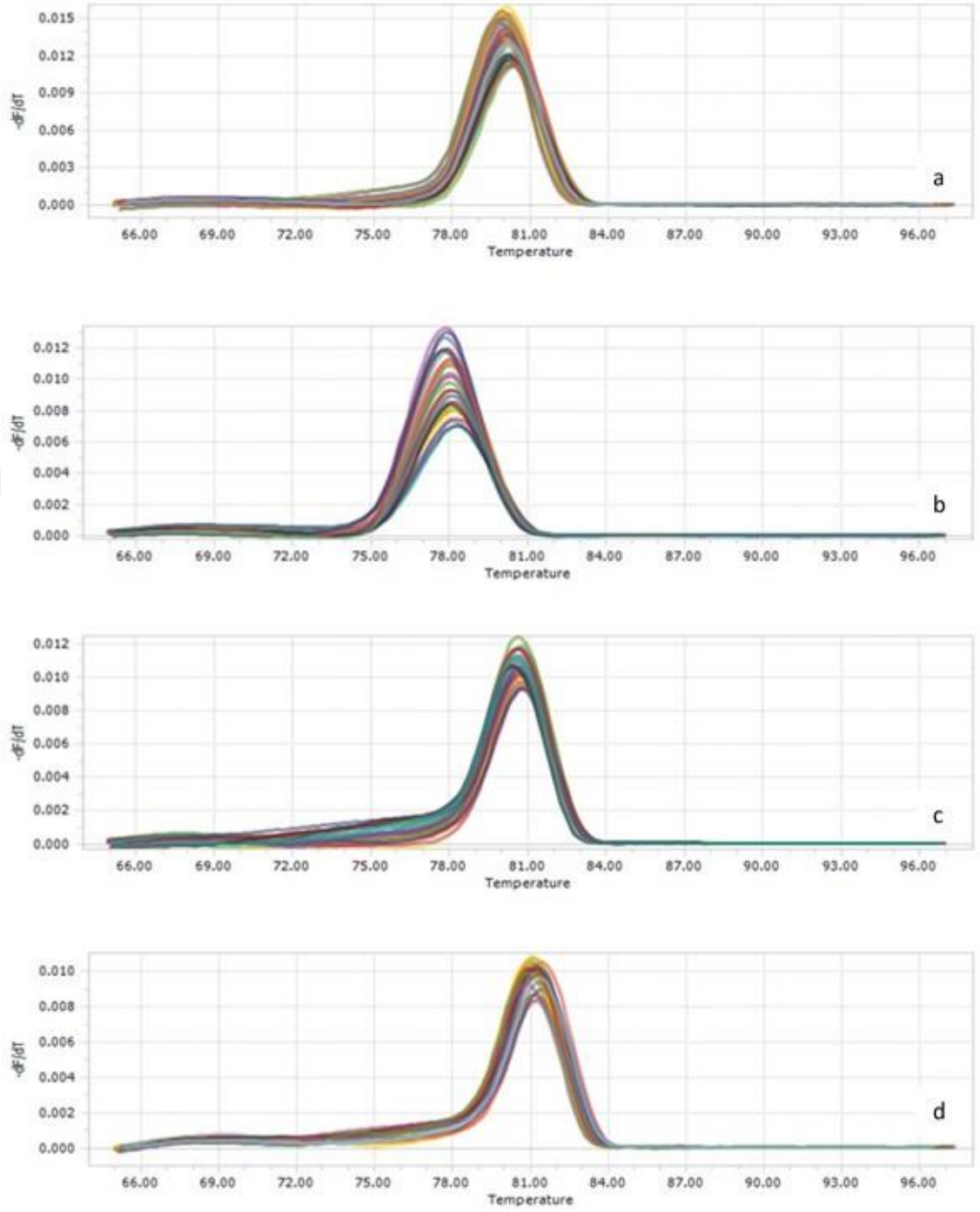


Şekil 4.14 İzole edilen RNA'ların bleach agaroz jel görüntüsü (M: marker 100 bp ladder)

Çalışma kapsamında *actin* geni referans gen (housekeeping gen) olarak kullanılmış ve fasulyede dayanıklılık ile ilişkili *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ekspresyonlarındaki farklılıklar incelenmiştir. Yapılan PCR çalışmalarında tüm primerler tek bir spesifik ürününün çoğalmasını sağlamıştır. Ayrıca PCR amplifikasyonundan sonra elde edilen ürünün hedef DNA'ya ait olup olmadığını kontrol etmek ve başka PCR ürünü ya da primer dimerlerinin bulunup bulunmadığını tespit etmek için erime eğrisi (melting curve) analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda hedef gen hariç herhangi bir PCR ürünün ya da primer dimerinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu kapsamda yapılan erime eğrisi analizlerinde *actin* geninin 80.34 °C'de erime piki oluşturduğu gözlemlenmiştir. *PR1*, *PR2* ve *PR3* genlerinin erime piki değerleri sırasıyla 79.26, 79.19, 75.10 °C olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Diğer *GST*, *LOX*, *PAL*, *POD* genlerine ait erime piki değerleri ise 80.1, 78.01, 80.81 ve 81.16 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15 Fasulye bitkisindeki *actin*, *PR1*, *PR2* ve *PR3* genlerine ait erime eğrisi (melting curve) analizleri (a, *actin* geni erime sıcaklığı 80.34°C; b, *PR1* geni erime sıcaklığı 79.26°C; c, *PR2* geni erime sıcaklığı 79.19°C; d, *PR3* geni erime sıcaklığı 75.10°C)



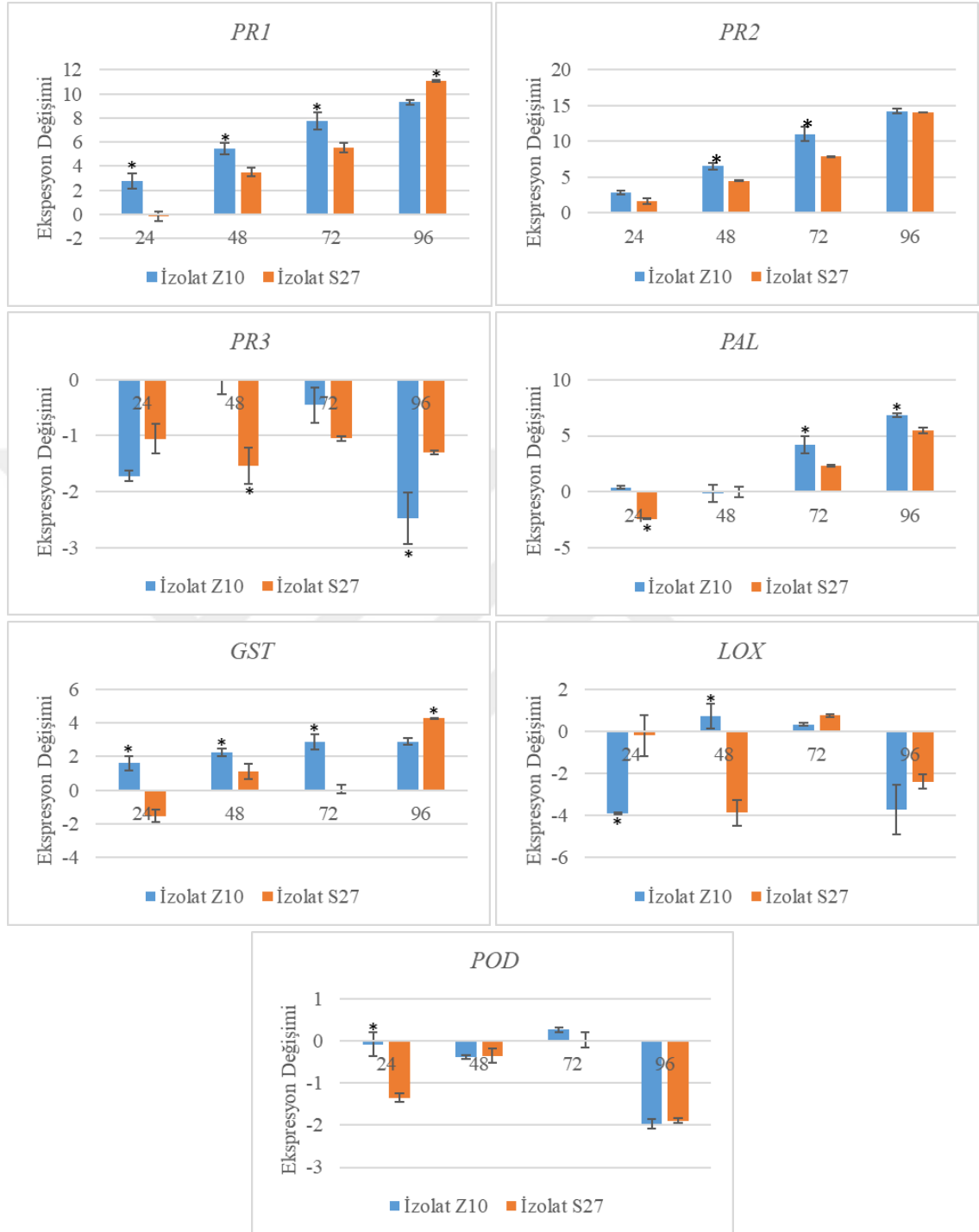
Şekil 4.16 Fasulye bitkisindeki *GST* , *LOX* , *PAL* ve *POD* dayanıklılık genlerine ait erime eğrisi (melting curve) analizleri (a, *GST* geni erime sıcaklığı 80.10°C; b, *LOX* geni erime sıcaklığı 78.01°C; c, *PAL* geni erime sıcaklığı 80.81°C; d, *POD* geni erime sıcaklığı 81.16°C)

Fasulye bitkisindeki savunmayla ilişkili farklı dayanıklılık genlerinin ekspresyonundaki değişiklikler incelendiğinde gerek izolatlar gerekse de farklı zaman aralıklarındaki gen ifadelerinde istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.17; Şekil 4.18). Bitkilerde patojen enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkta rol oynayan önemli bir gen olan *PR1* gen ifadesindeki değişim incelendiğinde tüm zaman noktalarında izolatlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıkların bulunduğu görülmüştür. Her iki izolata karşı gen ifadesinin 24. saatten başlayarak hızlı bir artış göstermiş ve 96. saatte yaklaşık 10 katlık bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Bu kapsamda Z10 izolatına karşı gen ifadesindeki artış daha yüksek seyrederken 96. saatte diğer izolata karşı artışın daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür.

Bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılıkla ilişkili β -1-3 endoglucanase enzim aktivitesinde rol oynayan *PR2* gen ifadesi de zamana bağlı olarak yüksek seviyede bir artış göstermiştir. Farklı izolatlar arasında 48 ve 72. saatlerdeki gen ifadelerinde istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmekle beraber Z10 izolatına karşı bu gen ifadesindeki değişimin daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 4.17; Şekil 4.18).

Kitinase enzim aktivitesinde rol oynayan *PR3* gen ifadesinde ise kontrole göre zaman içerisinde bir azalışın olduğu görülmüştür. Bu gen ifadesinde zaman içerisinde değişken bir eğilim görülmekle beraber izolatlar arasında 48 ve 96. saatlerdeki gen ifadelerinde önemli farklılıkların bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17; Şekil 4.18).

Savunma ile ilişkili bileşiklerin sentezinde rol oynayan *PAL* (Phenylalanine Ammonia-lyase) aktivitesindeki değişimler incelendiğinde 24, 72 ve 96. saatlerdeki fark anlamlı bulunmuştur. Özellikle 48. saate kadar kontrole göre belirgin bir farklılık görülmeyen bu gen ifadesi 72. saatte hızla artmaya başlamış ve 96. saatte 5-6 katlık bir artış görülmüştür. Bu kapsamda yine Z10 izolatına karşı bu artışın daha yüksek seviyelerde seyrettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.17; Şekil 4.18).



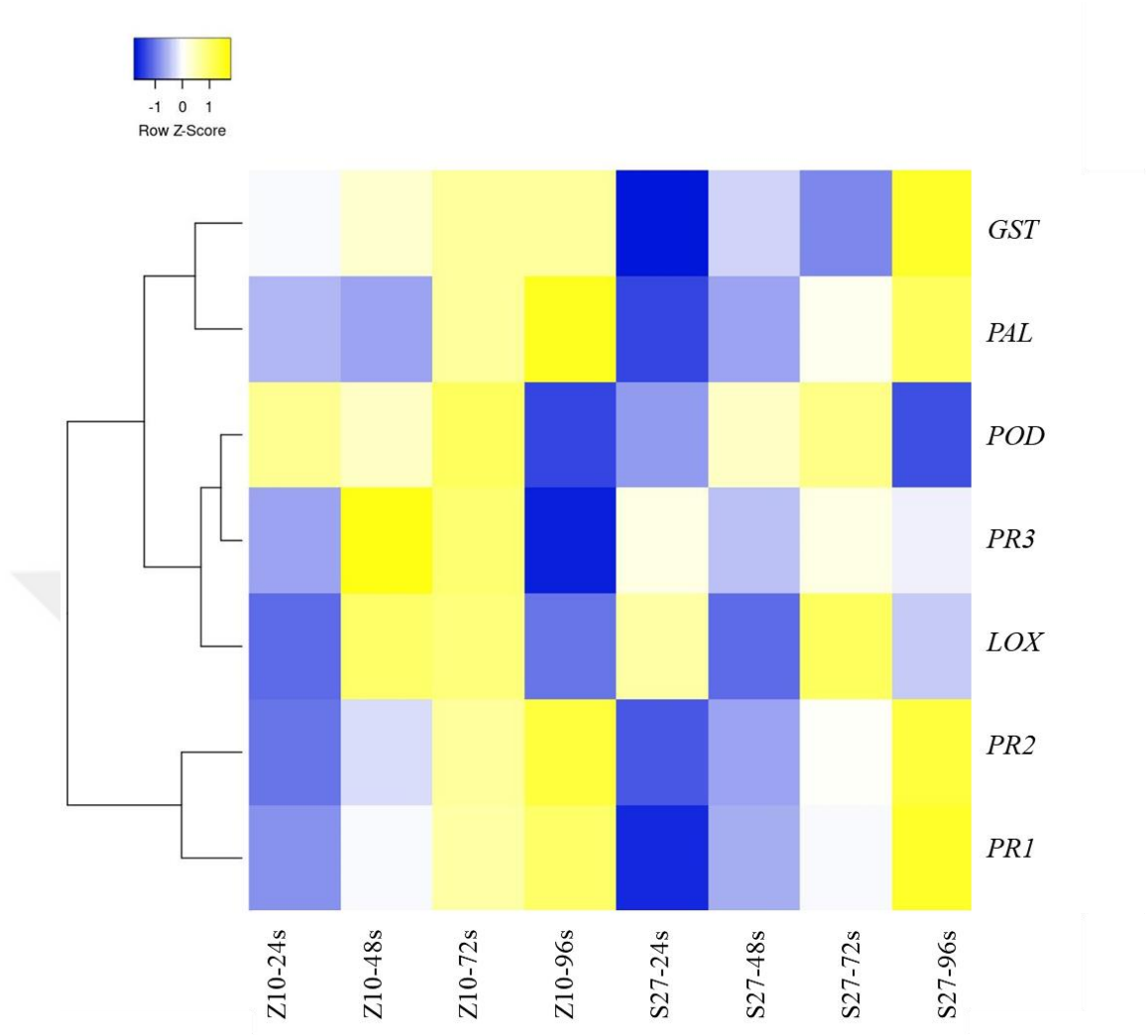
Şekil 4.17 *C. lindemuthianum*'un farklı genotip gruplarını temsil eden patojen izolatlarına karşı PR1, PR2, PR3, PAL, GST, LOX ve POD gen ifadelerindeki değişim

*Ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak (LSD, P=0.05) önemlidir

Bitkilerde H_2O_2 birikiminde etkili bir gen olan *GST* (Glutathione S-transferase) değişimi incelendiğinde izolatlar arasında tüm zaman noktalarında önemli farklılıkların bulunduğu görülmüştür. Z10 izolatına karşı 24. saatten itibaren bu gen ifadesinde 1.60-2.88 katlık belirli bir seviyede artış olur iken diğer izolata karşı bu gen ifadesinin başlangıçta önemli seviyede düştüğü daha sonrasında artarak 96. saatte 4.27 kat ile en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.17; Şekil 4.18).

Lipoksigenaz (*LOX*) gen ifadesinde patojen enfeksiyonuna karşı değişken bir tablo gözlenmiş ve 24 ile 48 saattlerde izolatlar arasında önemli farklılığın bulunduğu tespit edilmiştir. Z10 izolatına karşı kontrole göre 24 (-3.9 kat) ve 96. (-3.72 kat) saatlerde belirgin bir azalış görülürken diğer saatler kontrole aynı seviyede kalmıştır. Diğer izolatta ise 48 (-3.87 kat) ve 96. (-2.4 kat) saatlerde kontrole göre bir azalış söz konusu olmuştur (Şekil 4.17; Şekil 4.18).

POD (Peroxidase) gen ifadesinde ise zamana bağlı olarak belirgin bir azalış görülmekle beraber 24. saatteki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Z10 izolatı ile enfekteli örneklerde 96. saate kadar kontrol ile belirgin bir fark görülmezken, 96. saatte yaklaşık 2 kat seviyesinde azalış görülmüştür. Diğer izolatta ise bu azalış 24. saatte başlamış daha sonra bir miktar artış eğilimi izlemiştir. Ancak 96. saatte yine belirgin bir azalış göstermiştir (Şekil 4.17; Şekil 4.18).

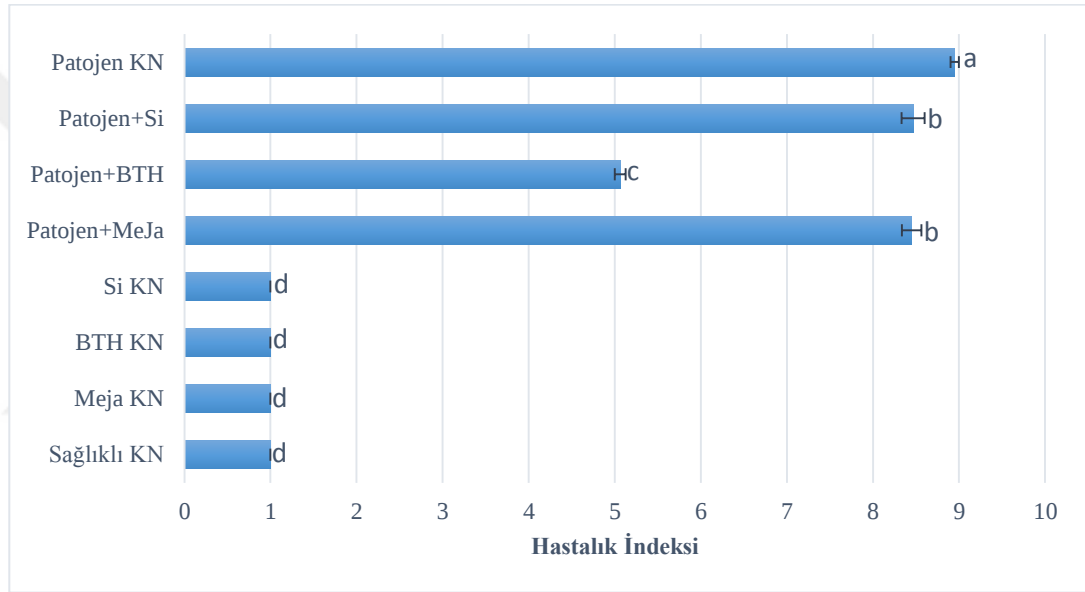


Şekil 4.18 *C. lindemuthianum*'un farklı genotip gruplarını temsil eden patojen izolatlarına karşı *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerindeki zamansal değişimi gösteren ısı tablosu (heatmap)

Mavi renk referans gene (*actin*) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, sarı renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir

4.6 *Colletotrichum lindemuthianum*'a Karşı Dayanıklılık Mekanizmasının Uyarılmasında Farklı Kimyasal Uyarıcıların Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisinin Real Time PCR ile İncelenmesi

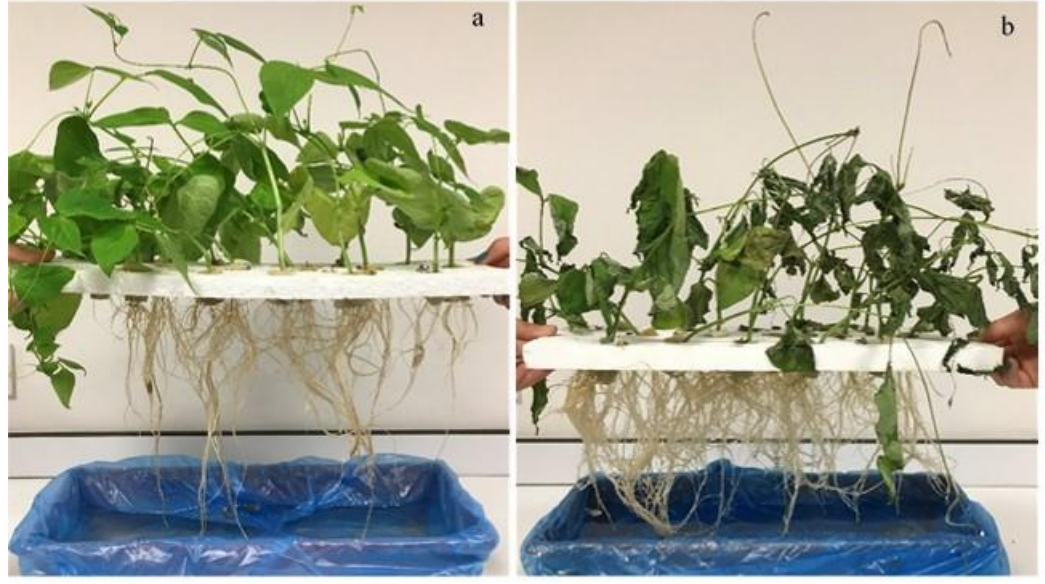
C. lindemuthianum'un neden olduğu hastalık gelişiminin engellenmesi ve bitkideki dayanıklılık genlerinin uyarılması için BTH, silisyum ve MeJA uygulamalarının etkisi *in vivo* koşullarda araştırılmıştır. İnokulasyondan 48 saat önce yapılan farklı aktivatör uygulamaları sonucunda fasulye bitkisindeki hastalık indeks oranları arasında istatistiksel olarak ($P<0.5$) önemli farklılıkların bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 İnokulasyondan önce uygulanan farklı dayanıklılık uyarıcılarının *C. lindemuthianum*'un neden olduğu hastalık gelişimi üzerine etkileri

(Aynı harfi alan hastalık indeks ortalamaları arasındaki fark istatistiksel ($P<0.5$) olarak önemli değildir)

Kontrol olarak kullanılan Gina fasulye bitkileri hastalığa karşı yüksek derecede hassas olup hastalık indeksi 8.95 ± 0.05 olarak tespit edilmiştir. Silisyum ve MeJA uygulamalarının hastalık gelişimi üzerinde benzer derecelerde etkili olduğu (Şekil 4.20; Şekil 4.21) görülmüş olup hastalık indeks değerleri sırasıyla 8.46 ± 0.13 ve 8.45 ± 0.11 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20 Silisyum uygulaması yapılan fasulye bitkilerinde *C. lindemuthianum*'un neden olduğu hastalık gelişimi
(a; sağlıklı bitki, b; enfekteli bitki)



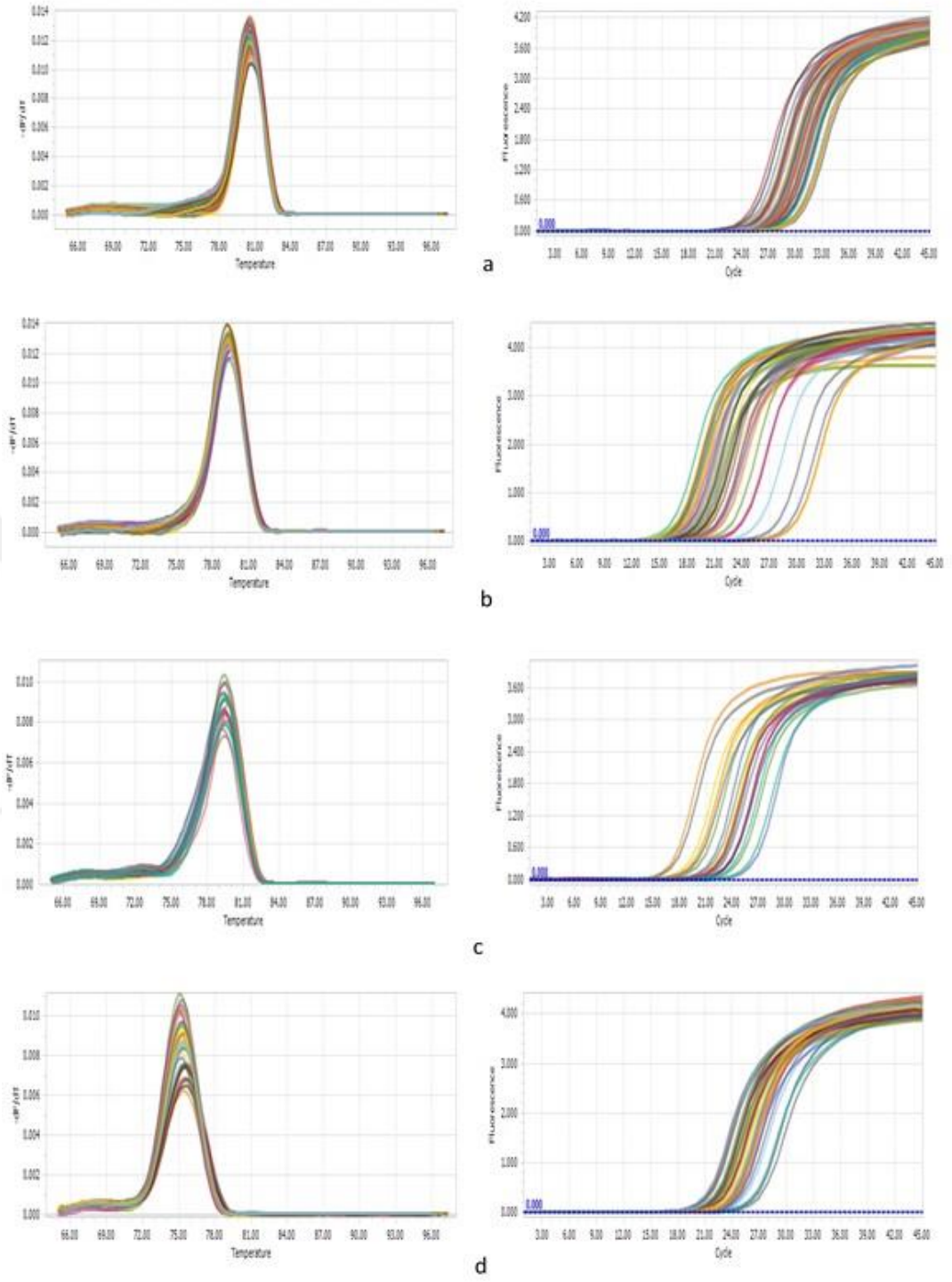
Şekil 4.21 MeJA uygulamasının (soldan sağa doğru MeJA+patojen, sadece MeJA, sadece patojen) hastalık gelişimini engelleyici etkisi

Değerlendirilen aktivatörler arasında en yüksek etki ise BTH uygulaması ile sağlanmış olup hastalık indeksi 5.06 ± 0.06 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde BTH uygulamasının fasulye bitkilerinde lezyon gelişimi ve sayısında önemli bir azalmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22). Aktivatörlerin tek başına uygulanmasının ise kontrol bitkileri ile kıyaslandığında herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı görülmüştür.

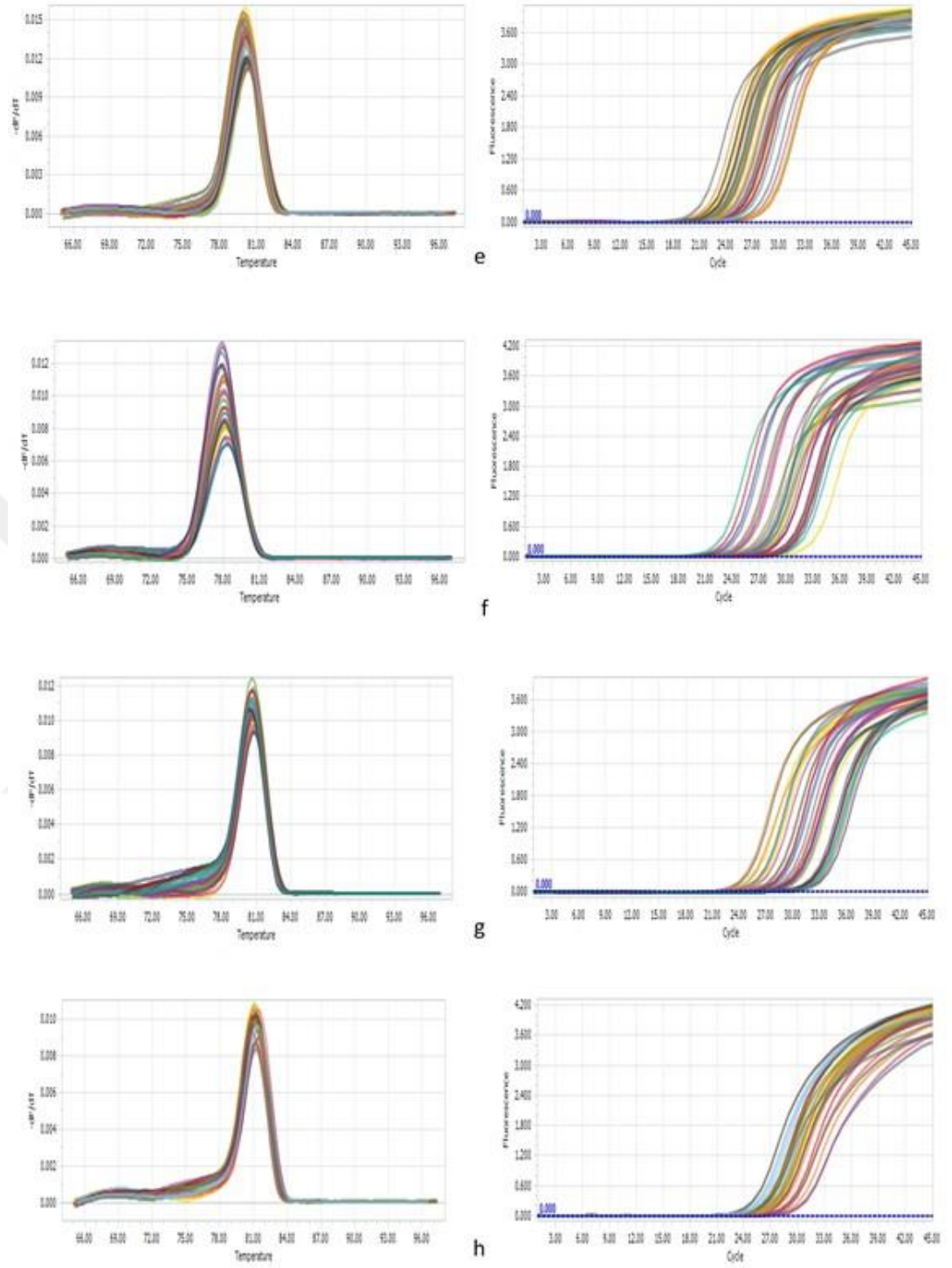


Şekil 4.22 BTH uygulamasının (soldan sağa doğru BTH+patojen, sadece BTH, sadece patojen) hastalık gelişimini engelleyici etkisi

BTH, silisyum ve jasmonik asitin fasulyedeki dayanıklılık ile ilişkili *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadeleri üzerindeki etkisinin tespiti için Bölüm 4.5’de olduğu gibi referans gen olarak *actin* geni kullanılmış ve tüm bitki aktivatörlerinin dayanıklılık ile ilişkili gen transkriptlerinde bazı farklılıklara neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan erime eğrisi analizlerinde herhangi bir primer dimer oluşumuna rastlanmamış, tüm primerlerden tek bir PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 Fasulye çeşitlerindeki farklı dayanıklılık genlerine ait melting curve analizleri ve amplifikasyon curveleri (a: *actin*, b: *PR1*, c: *PR2*, d: *PR3*)

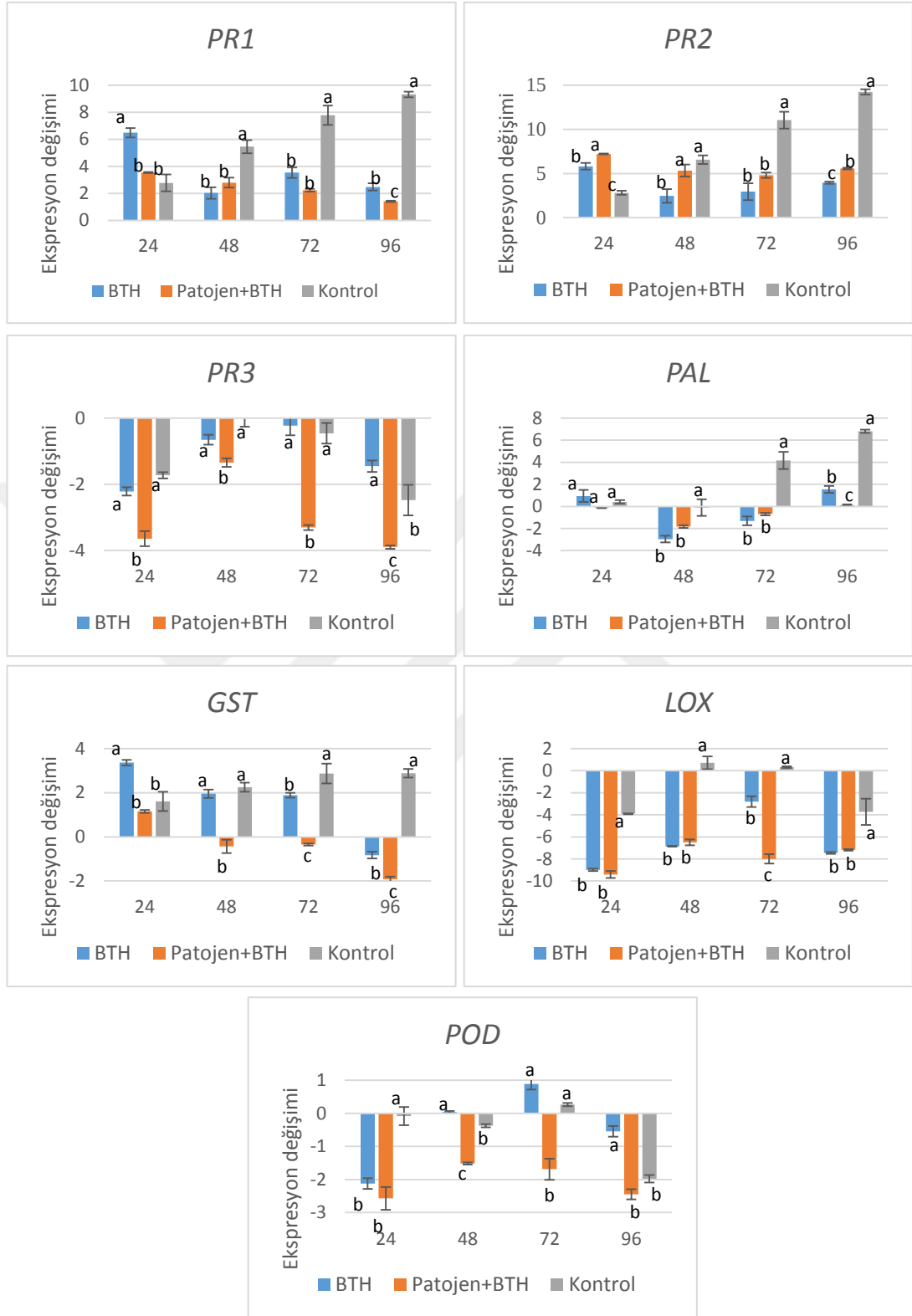


Şekil 4.23 Fasulye çeşitlerindeki farklı dayanıklılık genlerine ait melting curve analizleri ve amplifikasyon kurveleri (e: *GST*, f: *LOX*, g: *PAL*, h: *POD*) (devam)

BTH uygulamasının dayanıklılık genlerine etkisi incelendiğinde, *PR1* gen ifadesinin tüm zaman aralıklarında sadece patojen verilen kontrollere göre önemli farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.24; Şekil 4.25). Uygulamadan 24 saat sonra *PR1* gen ifadesi hızlı bir şekilde artarak 6.48 kata ulaşmıştır. Daha sonrasında azalarak devam etmiş ve diğer saatlerde 2.02-3.53 arasında değişim göstermiştir. BTH+patojen uygulaması ise *PR1* gen ifadesinde zamanla azalan bir eğilime neden olmuş ve transkript seviyesi 3.54 ile 1.41 arasında değişmiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise *PR1* gen ifadesinin kademeli olarak arttığı ve 96. saatte en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Genel olarak ele alındığında BTH uygulamasının erken dönemde hızlı şekilde *PR1* gen ekspresiyonunu arttırdığı belirlenmiştir.

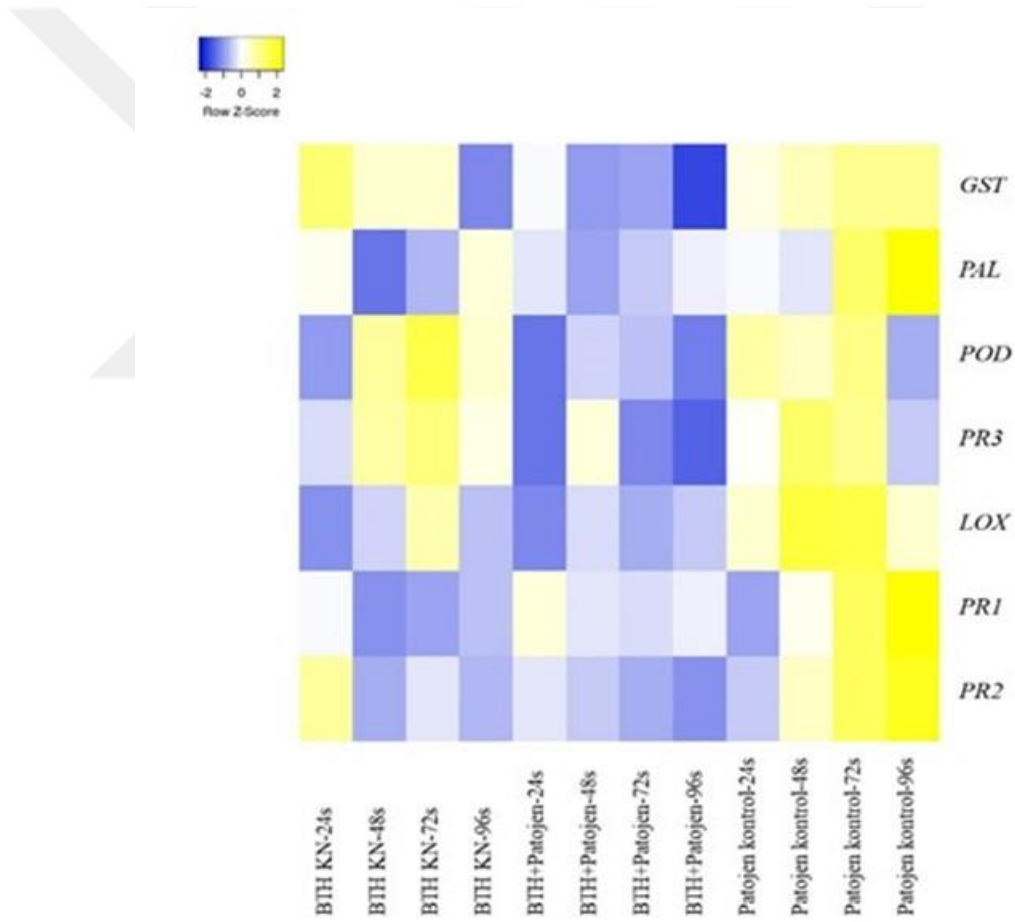
PR2 gen ifadesi ise 24. saatte BTH uygulamasında 5.82 kat, BTH+patojen uygulamasında 7.22 kat artarak tüm zamanlar içerisinde en yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. Sadece patojen uygulanan kontrol bitkilerinde ise *PR2* geninin enfeksiyonun başlangıcından itibaren zamanla artış göstererek 96. saatte 14.24 kata ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.24; Şekil 4.25). Kitinaz enzim aktivitesiyle ilişkili *PR3* gen transkriptinde ise kontrol dâhil tüm uygulamalarda azalış olduğu görülmüştür. Uygulamalar arasında tüm zaman aralıklarında en yüksek azalış BTH+patojen uygulamasında olmuş ve diğer uygulamalardan istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Dayanıklılık ile ilişkili *PAL* gen ifadesi ise 24. saatte tüm kombinasyonlarda çok düşük seviyede eksprese olmuş ve kombinasyonlar arasında önemli bir fark oluşturmamıştır. Ancak 48 ve 72. saatlerde kontrole göre diğer uygulamalarda *PAL* gen ifadesinin azaldığı görülmüş, 96. saatte tekrar arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.24; Şekil 4.25). BTH uygulamasında *GST* gen ifadeleri incelendiğinde ise patojen+BTH uygulamasının 24. saatte kontrole yakın olmasına rağmen diğer zaman aralıklarında önemli seviyede azaldığı görülmüştür. Sadece BTH uygulanan örneklerde ise başlangıçta kontrolden daha yüksek bir ekspresyon görülmesine rağmen zamanla azalan bir eğilim tespit edilmiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise *GST* gen ifadesinin zamanla artarak 96. saatte 2.88 kata ulaştığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.24 BTH, Patojen+BTH ve sadece patojen (Kontrol) uygulanan bitkilerde *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerindeki değışim grafiğı

LOX gen ifadesi ise BTH ve BTH+patojen uygulanan tüm bitkilerde 24. saatten itibaren azalış göstermiş ve uygulamalar arasında 72. saat haricinde önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise *LOX* gen ifadesi değişken bir tablo çizmiş ve diğer uygulamalardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (Şekil 4.24; Şekil 4.25). *POD* gen transkripti ise sadece BTH uygulanan bitkilerde 24. saatte 2.12 katlık bir azalış göstermiş daha sonrasında 72. saate kadar yükselerek 0.88 kat arttığı görülmüştür. Patojen+BTH uygulanan bitkilerde ise 2.57 ile 2.44 arasında değişen miktarlarda azalış göstermiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise artıp azalan bir eğilim görülmüş ve 96. saatte 1.97 kat azalarak BTH+patojen uygulamasındaki bitkilere benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.25 BTH uygulamasının *C. lindemuthianum* enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerindeki zamansal değişimine etkisini gösteren ısı tablosu (heatmap)

Mavi renk referans gene (*actin*) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, sarı renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir

Silisyum uygulamasının *C. lindemuthianum*'a karşı dayanıklılıkta rol oynayan genlere etkisi incelendiğinde ise gerek uygulamalar gerekse de zamanlar arasında gen ifadelerinde istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.26; Şekil 4.27). Sadece silisyum uygulanan bitkilerde *PR1* gen ifadesi hızlı bir şekilde artış göstermiş ve 24. saatte 8.01 olan artış miktarı, 96. saatte azalarak 5.84 olarak belirlenmiştir. Patojen+Si uygulaması da *PR1* gen ifadesinin 24. saatte hızlı bir şekilde artışına yol açtıktan sonra stabil kalarak 5.44-5.74 arasında değişen artış oranları göstermiştir. Sadece patojen uygulanan kontrol bitkilerde ise *PR1* gen ifadesinde 24. saatte 2.77 katlık bir artış meydana gelmiş ve bu artış diğer zaman aralıklarında da artarak 96. saatte 9.32 kat ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

PR2 gen transkriptleri incelendiğinde ise sadece silisyum uygulanan bitkilerde en yüksek artış 7.35 kat ile 72. saatte gözlenmiştir (Şekil 4.26; Şekil 4.27). Patojen+Si uygulanan bitkilerde ise *PR2* gen ifadesi 7.55-10.93 kat artarak zamanla kademeli olarak yükselmiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerdeki *PR2* gen ifadesi başlangıçta diğer uygulamalardan daha düşük seviyede kalmasına rağmen hızlı bir şekilde artış göstererek 96. saatte 14.24 kat artmış ve en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

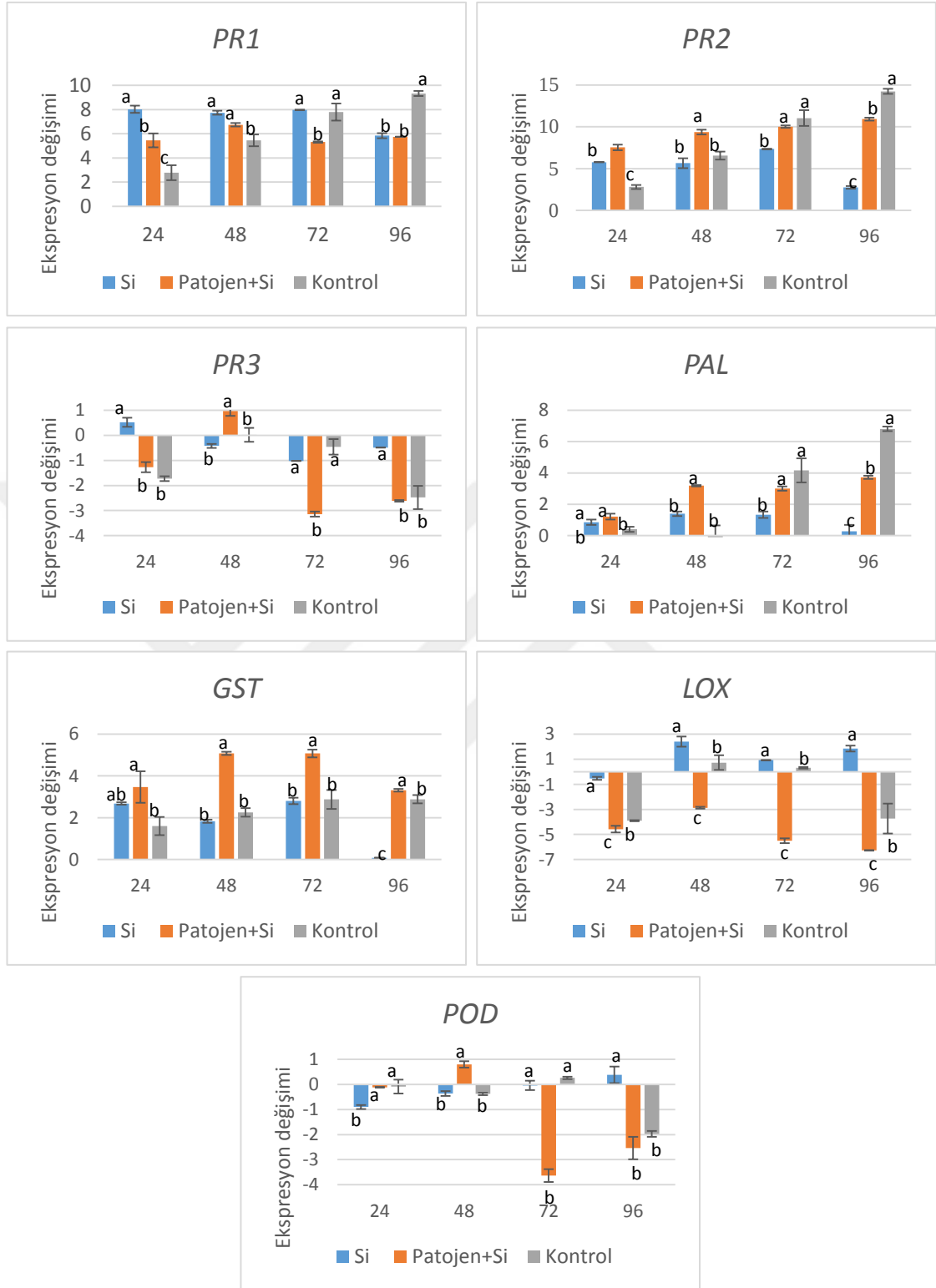
PR3 gen ifadesi incelendiğinde ise sadece Si uygulanan bitkilerde 24. saatte 0.52 katlık bir artış göstermiş daha sonrasında azalan bir grafik çizdiği görülmüştür. Patojen+Si uygulanan bitkilerde *PR3* gen ekspresyonunun sadece 48. saatte 0.97 katlık bir artış gösterdiği daha sonrasında hızla düşerek 3.14 kat azaldığı tespit edilmiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise 0.01 ile -2.47 kat aralığında genel bir azalış görülmüştür (Şekil 4.26; Şekil 4.27).

PAL gen transkriptinde ise tüm kombinasyon ve zamanlarda artış gözlenmiştir. Bu kapsamda sadece Si uygulanan bitkilerde 48. saatte 1.39 kat artarak en yüksek seviyeye ulaşırken, patojen+Si uygulanan bitkilerde 96. saatte 3.71 kat artarak en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise *PAL* gen ifadesi 72. saatte hızlı bir yükselişe geçmiş ve 96. saatte 6.81 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4.26; Şekil 4.27).

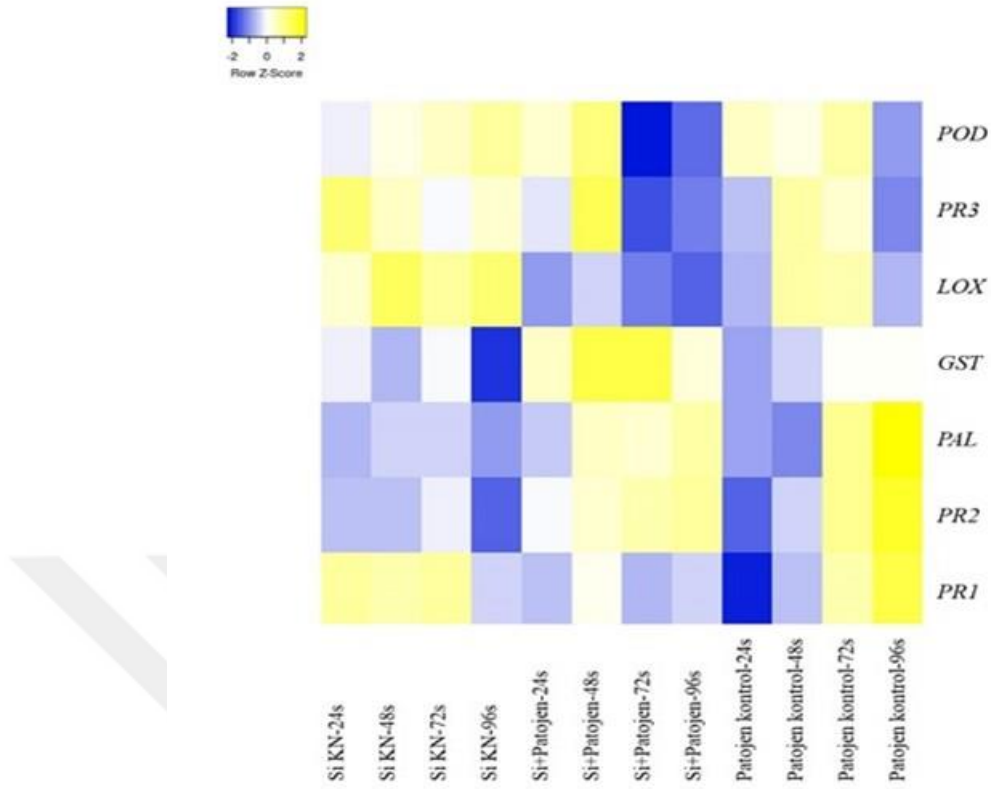
GST gen ifadesi değerlendirildiğinde sadece Si uygulanan bitkilerde 72. saate kadar artış görülmesine rağmen 96. saatte ani bir düşüş gözlemlenmiştir. Patojen+Si uygulanan bitkilerdeki *GST* gen ifadesi de enfeksiyonun başlangıcından itibaren hızlı bir yükseliş göstermiş ve 72. saatte 5.07 kat artmıştır. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise *GST* gen transkriptinin kademeli olarak arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.26; Şekil 4.27).

Uygulamalar arasında *LOX* gen ifadesi incelendiğinde sadece Si uygulanan bitkilerde değişken bir eğilim görülmekle birlikte genel olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.26; Şekil 4.27). Patojen+Si uygulanan bitkilerde ise sadece Si uygulanan bitkilerin aksine *LOX* gen ifadesinin -4.58 ile -6.26 kat aralığında azalış gösterdiği belirlenmiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise *LOX* transkriptinin değişken bir tablo çizdiği görülmüş ve tüm zamanlarda uygulamalara kıyasla önemli farklılıklar oluşturduğu tespit edilmiştir.

POD gen ifadesi incelendiğinde ise sadece Si uygulanan bitkilerde enfeksiyonun başlangıcında (24. ve 48. saat) azalış görülmüş ardından çok küçük miktarlarda arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.26; Şekil 4.27). Patojen+Si uygulanan örneklerde ise sadece Si uygulanan bitkilerin aksine 48. saatte gen ifadesinde artış görülürken 72. ve 96. saatlerde hızlı düşüşlerin olduğu belirlenmiştir. Sadece patojen uygulamasında ise 96. saate kadar bu gen ifadesinde önemli bir değişim olmaz iken 96. saatte -1,97 kat azalış gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.26 Si, Patojen+Si ve sadece patojen (Kontrol) uygulanan bitkilerde *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerindeki değışim grafiğı



Şekil 4.27 Silisyum uygulamasının *C. lindemuthianum* enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerindeki zamansal değişimine etkisini gösteren ısı tablosu (heatmap)

Mavi renk referans gene (*actin*) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, sarı renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir

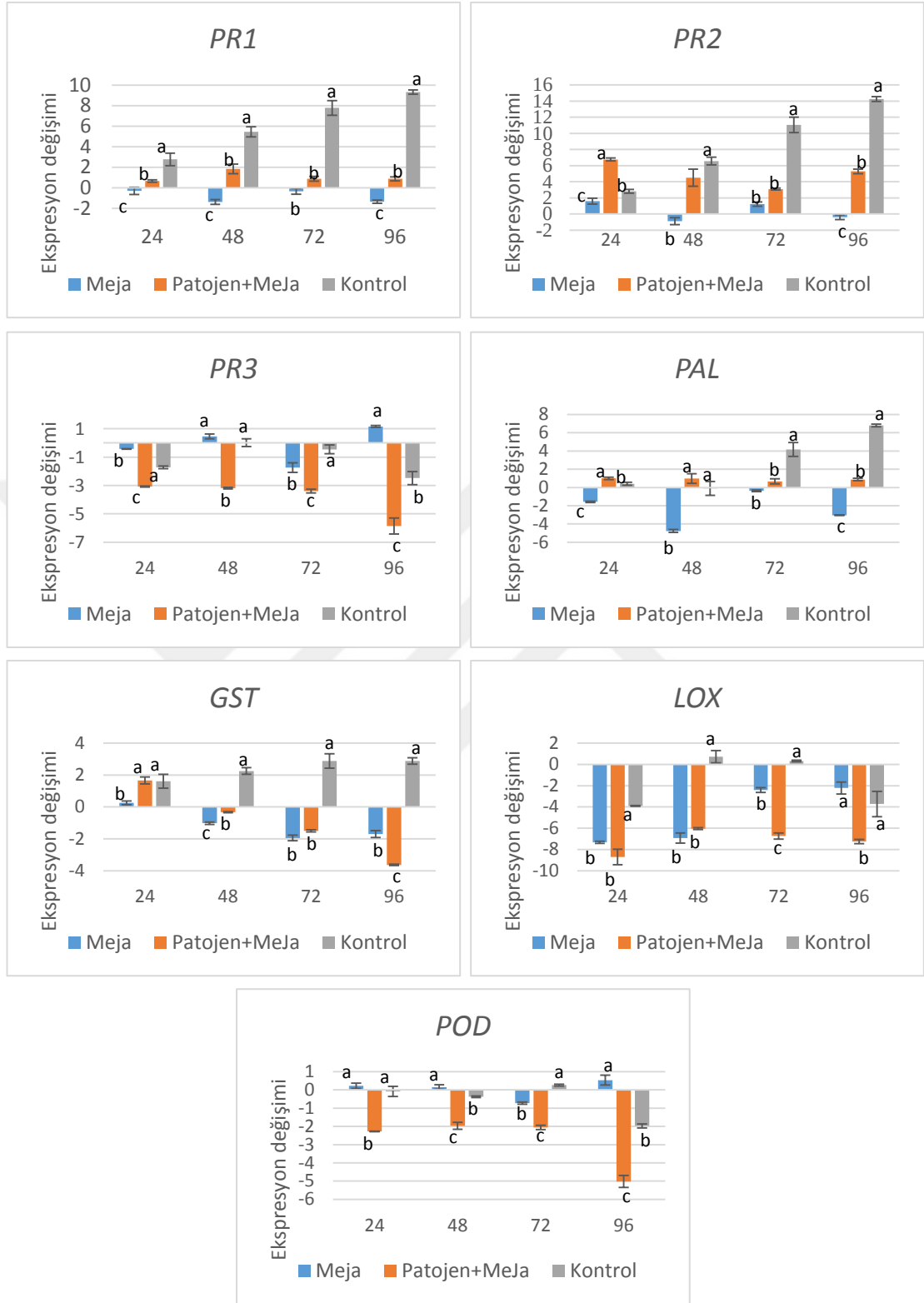
MeJA uygulamasının dayanıklılık ile ilişkili genlere etkisi incelendiğinde ise *PR1* gen ifadesinin sadece MeJA uygulanan bitkilerde genel olarak azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.28; Şekil 4.29). MeJA+patojen uygulanan bitkilerde ise *PR1* gen transkripti 48. saatte 1.84 kat artarak en yüksek seviyeye ulaşırken, sadece patojen uygulanan bitkilerde zamansal olarak kademeli bir artışın olduğu görülmüştür. Sadece patojen uygulaması bu genin 96. Saatte 9.32 kat artmasına neden olmuştur. *PR2* gen ifadesi ise sadece MeJA uygulanan bitkilerde 1.59 ile -0.38 arasında değişirken, MeJA+patojen uygulanan bitkilerde 6.76 ile 5.28 arasında değişim göstermiştir (Şekil 4.28; Şekil 4.29). Sadece patojen uygulanan örneklerde ise 2.82'den 14.24'e kadar kademeli bir artış tespit edilmiştir. *PR3* gen ifadesinin sadece MeJA uygulanan bitkilerde değişken bir tablo çizdiği ve -0.43 ile 1.16 kat arasında değiştiği gözlenirken,

MeJA+patojen uygulanan bitkilerde zamana bağılı olarak düştüğü belirlenmiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise *PR3* gen ifadesi azalma eğilimi göstermiş ve 96. saatte -2.47 kat azalarak en düşük seviyeye ulaşmıştır.

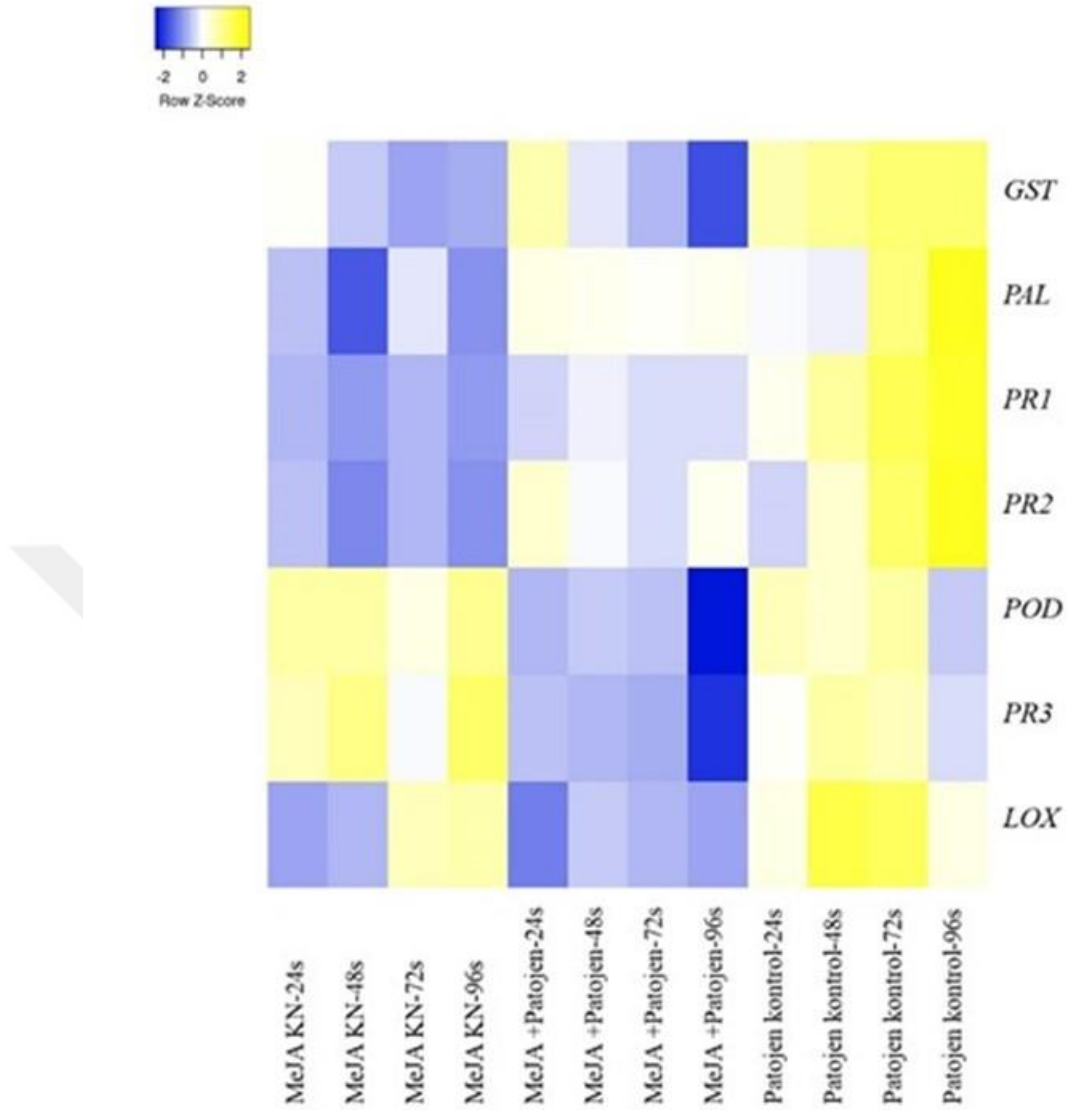
PAL gen ifadesi ise uygulamalar arasında oldukça farklı sonuçlar ortaya koymuştur (Şekil 4.28; Şekil 4.29). Sadece MeJA uygulanan ve MeJA+patojen uygulanan bitkilerde *PAL* gen ifadesinin tüm zamanlarda tersi yönde artış-azalış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu kapsamda MeJA+patojen uygulanan örneklerde *PAL* gen ifadesi yükselirken, sadece MeJA uygulananlarda azalış gösterdiği gözlenmiştir. Sadece patojen uygulanan bitkilerde ise 72. saate kadar belirgin bir değişiklik olmaz iken bu saatten itibaren hızlı bir artış olduğu görülmüştür.

GST gen ekspresyonu incelendiğinde ise tüm uygulamalarda 24. saatte artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.28; Şekil 4.29). Enfeksiyonun 48. saatinden itibaren sadece MeJA ve MeJA+patojen uygulanan bitkilerde *GST* gen ifadesinin azaldığı ve 96. saatte sırasıyla -1.69 ile -3.63 kat düştüğü belirlenmiştir. Buna karşın sadece patojen uygulanan bitkilerde *GST* transkripti zamansal olarak kademeli bir şekilde artış göstermiş ve istatistiksel olarak farklı sonuçlar ortaya koymuştur.

LOX gen ifadesi ise MeJA uygulamasının tüm kombinasyonlarında azalış göstermiştir (Şekil 4.28; Şekil 4.29). Bu kapsamda 24. saatte MeJA uygulaması için -7.33, MeJA+patojen uygulaması için -8.7 ve patojen kontrol için -3.9 kat azalış oranları ile en düşük ekspresyon seviyeleri kaydedilmiştir. Daha sonrasında sadece MeJA uygulanan ve sadece patojen uygulanan bitkilerde yükselme eğilimi gözükse dahi belirgin bir artış olmadığı tespit edilmiştir. *POD* gen ifadesinde ise MeJA, MeJA+patojen ve patojen uygulamaları arasında oldukça farklı sonuçlar gözlenmiştir. Sadece MeJA uygulanan bitkilerde *POD* gen ifadesinde 0.22 ile 0.53 arasında çok küçük değişimler olduğu görülmüştür. Benzer şekilde sadece patojen uygulanan bitkilerde de *POD* gen ifadesinde 72. saate kadar belirgin bir değişim gözlenmemiş ancak 96. saatte ani bir düşüş tespit edilmiştir. MeJA+patojen uygulamasında ise bu gen ifadesinin enfeksiyon boyunca -2.27 ile -5.02 aralığında farklı oranlarda düştüğü görülmüştür.



Şekil 4.28 MeJA, Patojen+ MeJA ve sadece patojen (Kontrol) uygulanan bitkilerde *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerindeki değışim grafiğı



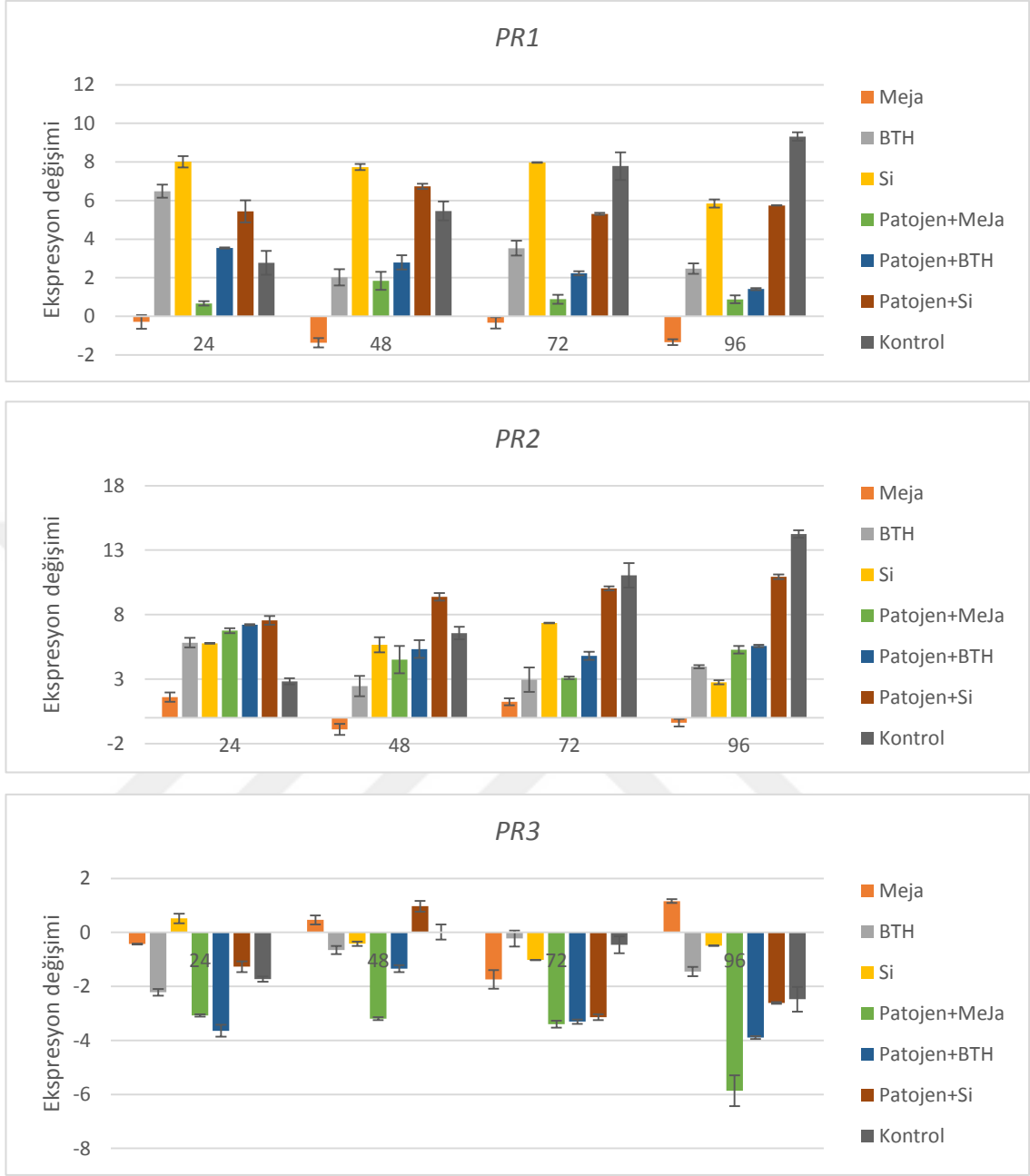
Şekil 4.29 MeJA uygulamasının *C. lindemuthianum* enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerindeki zamansal değişimine etkisini gösteren ısı tablosu (heatmap)

Mavi renk referans gene (*actin*) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, sarı renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir

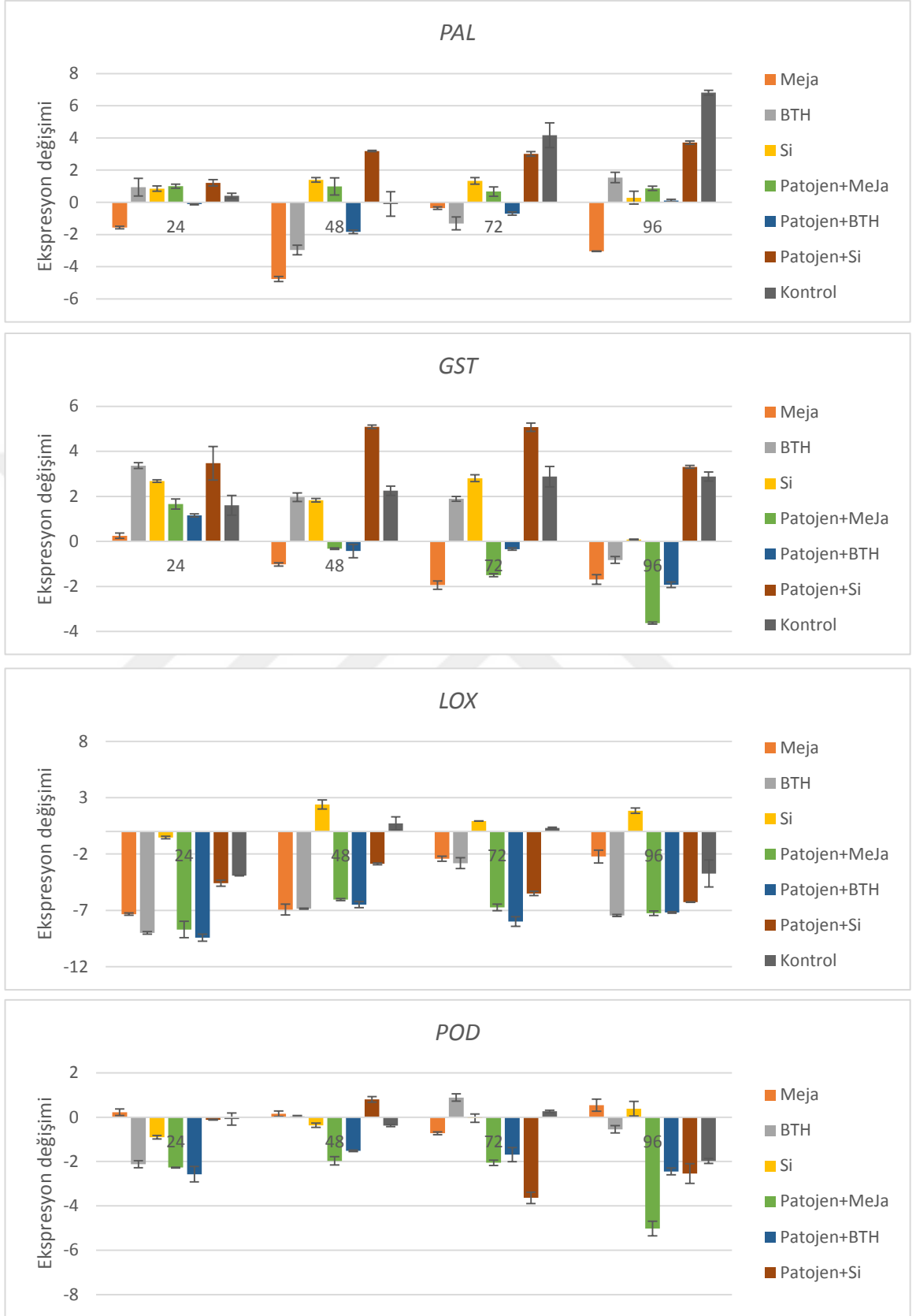
Aktivatörlerin dayanıklılık genlerine etkisi birbirleriyle karşılaştırıldığında ise *PR1* gen ifadesinin MeJA uygulanan bitkiler haricindeki tüm aktivatörlerde artış gösterdiği, bunlar içerisinde de en fazla artışın silikon uygulamalarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30; Şekil 4.31). Sadece patojen uygulanan bitkilerde (kontrol) ise *PR1* gen ifadesi kademeli bir yükseliş göstermiş ve enfeksiyonun 96. saatinde tüm uygulamalardan daha fazla artışa neden olmuştur. *PR2* gen ifadesinin ise enfeksiyonun

başlangıcında tüm uygulamalarda kontrolden daha fazla artış gösterdiği ancak zamanla kontrole göre daha az eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte genel olarak patojen+aktivatör uygulamalarında sadece aktivatör uygulananlara kıyasla daha fazla artış söz konusudur. *PR3* gen ifadesi ise patojenisite ile ilişkili *PR1* ve *PR2* genlerinin aksine genel bir azalış göstermiştir. Si 24. saat, MeJA ise 48 ve 96. saatler hariç tüm uygulama ve zamanlarda azalış eğilimi göstermiştir. Patojen+MeJA uygulanan bitkiler ise gen ifadesinin en fazla düşüş yaşadığı uygulama olmuştur.

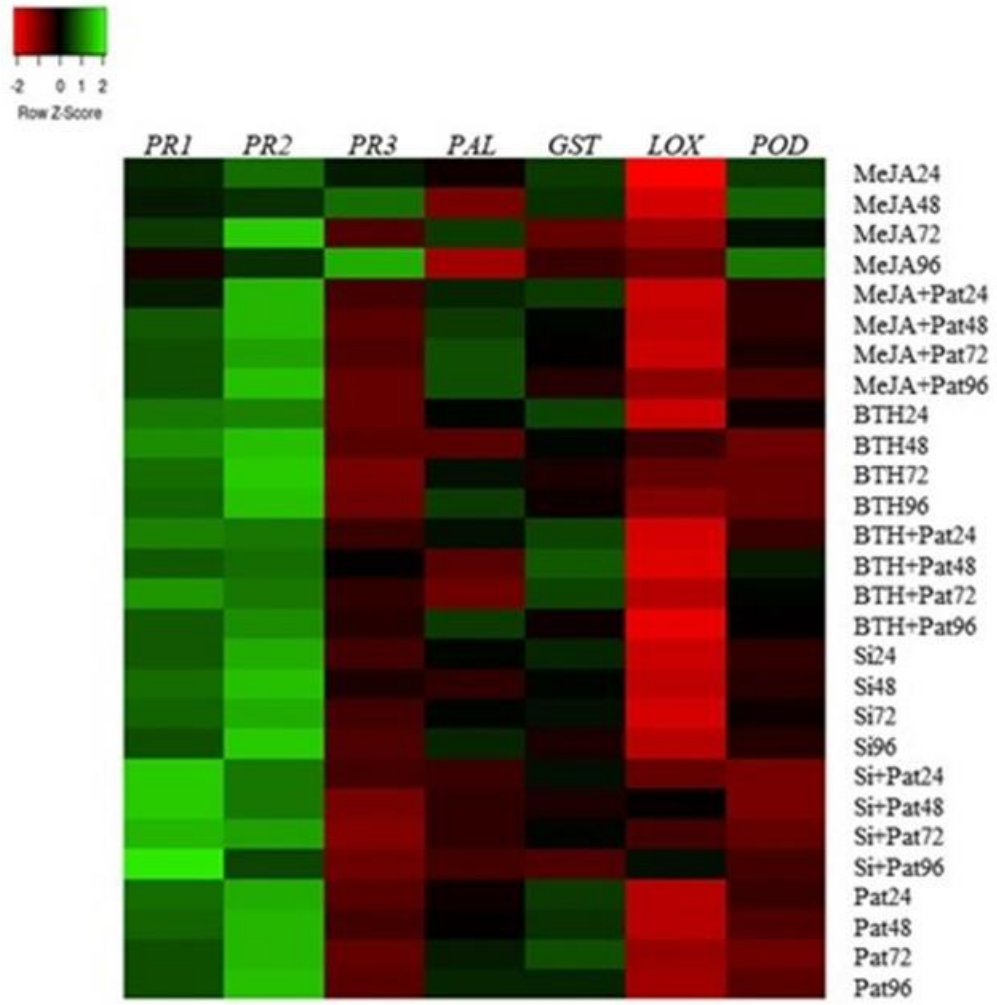
PAL gen ifadesi ise uygulamalar arasında oldukça değişken bir tablo çizmiştir. Patojen+silisyum uygulaması ile kontrol grubunda zamansal olarak belirgin bir artış gözlenirken, diğer uygulamalardaki artış oranı oldukça düşük seviyede hatta zaman zaman azalma şeklinde seyretmiştir (Şekil 4.30; Şekil 4.31). *GST* gen ifadesinde ise enfeksiyon başlangıcında tüm uygulamalarda artış gözlenmesine rağmen zamanla fark olduğu görülmektedir. Bu kapsamda patojen+silisyum uygulamasında genel bir gen artışı meydana gelirken, patojen+MeJA ve patojen+BTH uygulamalarında zamanla azalış olduğu gözlenmektedir. *LOX* gen transkripti ise sadece silikon uygulanan bitkiler ve kontrolün 48 ve 72. saatleri haricindeki tüm uygulamalarda belirgin bir azalış göstermiştir. *POD* gen ifadesinin de *LOX* genine benzer şekilde uygulamaların büyük bir kısmında azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.30 Tüm uygulama yapılan bitkilerdeki *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerinin karşılaştırıldığı değişim grafiği



Şekil 4.30 Tüm uygulama yapılan bitkilerdeki *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerinin karşılaştırıldığı değışim grafiğı (devam)



Şekil 4.31 Fasulye ile *C. lindemuthianum* arasındaki interaksyonu esnasında bitki aktivatörlerinin dayanıklılık genlerine etkisini gösteren ısı tablosu (heatmap)

Kırmızı renk referans gene (*actin*) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, yeşil renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fasulyede zarara neden olan fungal hastalık etmenleri içerisinde *C. lindemuthianum*'un neden olduğu antraknoz hastalığı ülkemizde ve dünyada fasulye üretimini kısıtlayan en önemli hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir (Kelly ve Vallejo 2004; Padder vd. 2017). Diğer pek çok hastalık etmeni ile mücadelede olduğu gibi bu hastalık etmeninin kontrolünde de en etkili yöntemin dayanıklı çeşit ıslahı olduğu bilinmektedir (Meziadi vd. 2016). Ancak patojenin yüksek genetik farklılığa sahip olması ve çok sayıda ırkının bulunması hastalıkla mücadelede dayanıklı çeşit ıslahı çalışmalarını oldukça zorlaştırmaktadır (Ishikawa vd. 2008, Martiniano-Souza vd. 2017) Bu kapsamda dünyada patojen populasyonlarının karakterize edilmesi ve dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Ülkemizde ise dünyada önde gelen bir fasulye üreticisi olmasına rağmen etmenin genetik ve patojenik farklılıkları ile patojene karşı dayanıklılık kaynakları hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. *Colletotrichum lindemuthianum*'a karşı entegre mücadele yöntemlerine katkı sağlamak ve bu amaçla yapılan ıslah çalışmalarının etkinliğini arttırmak için yapılan bu tez çalışması kapsamında ise etmeninin ülkemizdeki populasyon yapısı detaylı olarak ortaya konulmuş, hastalığa karşı ıslah çalışmalarında kullanılabilecek farklı dayanıklılık kaynakları belirlenerek bir gen havuzu oluşturulmuş ve bazı alternatif mücadele yöntemlerinin etkinliği gen ifadesi düzeyinde araştırılmıştır.

Bitkilerde hastalığa sebep olan patojen populasyonlarındaki genetik farklılıkların ortaya konulması etmen biyolojisi, patojenik ve genetik özellikleri hakkında detaylı bilgiler edinilmesini sağlamaktadır. Patojen populasyonları ile ilgili elde edilen bu bilgiler hastalığa karşı yapılan ıslah programlarının ve kontrol stratejilerinin etkinliğinin artırılması açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu kapsamda *C. lindemuthianum* izolatları arasındaki genetik farklılıkları araştırmak için dünyada RAPD, AFLP, RFLP, RAMS, IRAP ve ITS sequencing gibi farklı teknikler kullanılarak yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Ansari vd. 2004; Mahuku ve Riascos 2004; Bardas vd. 2007; Barcelos 2011; Mota vd. 2016; Martiniano-Souza vd. 2017). Bu çalışma kapsamında ise fasulyede antraknoza neden olan *C. lindemuthianum*'a karşı mücadele stratejileri belirlemek ve ıslah çalışmalarına katkı sağlamak için etmen populasyonları arasındaki

genetik farklılıkların ISSR ve iPBS markerler ile araştırılması hedeflenmiştir. Etmen popülasyonları arasındaki genetik farklılıkların araştırılmasında iPBS yönteminin etkinliği dünyada ilk kez ele alınmıştır. Elde edilen sonuçlar dünyada farklı araştırmacılar tarafından bildirilen sonuçlara benzer şekilde ülkemizdeki patojen izolatları arasında yüksek derecede genetik varyasyonun olduğunu ve patojen popülasyonları arasında yaklaşık % 72 benzerlikle iki ana grubun bulunduğunu ortaya koymuştur. Farklı yöntemlere ait dendogramlar arasındaki kofenetik korelasyon katsayıları da oldukça yüksek olup her iki dendogram arasında güçlü bir doğrusal ilişkinin bulunduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Bardas vd. (2009) Yunanistan'daki fasulye üretim alanlarında yaklaşık % 80 farklılıkta 2 ana grubun bulunduğunu belirtmiştir. Meksika'nın farklı bölgelerinden elde ettikleri 59 adet *C. lindemuthianum* izolatını RAPD ve AFLP primerleri ile analiz eden Gonzalez vd. (1998) ise patojen izolatlarını iki ana gruba ayırmış ve bu gruplar içerisinde daha küçük alt grupların oluştuğu bildirilmiştir. Benzer şekilde farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda patojen izolatları arasında birkaç farklı grubun bulunduğu belirtilmiştir (Sicard vd. 1997; Damasceno e Silva vd. 2007; Sharma vd. 2007; Souza vd. 2010; Barcelos 2011). Ülkemizde ise bu kapsamda yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlı olup Canseven (2011), farklı bölgelerden elde ettiği patojen izolatlarının RAMS analizi ile % 62 genetik farklılık ile 2 ana gruba, REP-PCR analizinde % 67-79.6 genetik polimorfizm ile 5 ana gruba, RAPD analizinde ise % 62-77 oranında genetik farklılık ile 3 ana gruba ayrıldığını bildirmiştir.

Çalışma kapsamında yapılan farklı popülasyon analizleri de ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilen patojen izolatları arasındaki popülasyon yapısının ve etmenin evrimsel sürecinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bu kapsamda dendogramda izolatların gruplanması ve coğrafik dağılımları arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Dendogramda aynı coğrafik orijine sahip patojen izolatları arasındaki genetik farklılığın farklı bölgelere oranla daha düşük seviyelerde olduğu ve özellikle Samsun ve Rize bölgelerindeki izolatların diğer bölgelere göre daha farklı olduğu görülmüştür. Yapılan STRUCTURE analizi de patojen izolatlarının dendogramdaki coğrafik dağılımını destekleyen nitelikte sonuçlar sağlamıştır. Benzer şekilde Ansari vd. (2004) patojen izolatlarının coğrafik dağılımı ile genetik farklılıkları arasında yakın

bir ilişkinin olduğunu belirtmiştir. Varyans analizi (AMOVA) ve G_{ST} değerleri ise populasyonlar arasında yüksek seviyede (%40) genetik farklılıkların bulunduğunu göstermekte olup bu durum ülkemizde farklı populasyonlar arasında genetik materyal akışının sınırlı düzeyde olduğunu göstermektedir. Populasyonlar içerisinde görülen bu genetik farklılıkların ise patojen çoğalması esnasındaki genetik rekombinasyonlardan ve özellikle farklı sporlar arasındaki konidial anastomosisden kaynaklandığı düşünülmektedir (Ishikawa vd. 2012). Ayrıca ülkemizde fasulye yetiştiriciliği yapılan bu alanlarda yaygın olarak lokal fasulye genotiplerinin yetiştiriliyor olmasının populasyonlar içerisindeki bu genetik farklılıkların oluşumuna katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Madakbaş vd. (2013) ülkemizde etmenin çok sayıda ırkının bulunmasının bölgesel gen havuzlarının baskısı ve çevresel koşullarla ilişkili olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde Sicard vd. (1997) ve Souza vd. (2010) patojen populasyonlarında görülen genetik farklılıkların sırasıyla % 58.46 ve % 69.03 oranında populasyonlar arasındaki farklılıklardan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Ancak Damasceno e Silva vd. (2007) ise Brezilya’da tespit edilen genetik farklılığın % 3.94’nün populasyonlar arasında oluştuğunu % 96.06’lık oranın ise populasyonlar içerisindeki farklılıklardan kaynaklandığını belirtmiştir. Ülkemizdeki fasulye üretim alanlarındaki patojen populasyonları arasındaki gen akışı (N_M : 0.7482) ise oldukça düşük seviyelerde olup bu durumun bölgelere göre farklı fasulye genotiplerinin yetiştirilmesi ve bölgeler arasındaki tohum naklinin düşük seviyelerde olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca aynı patojen populasyonları içerisinde görülen bu farklılıkların patojenin yaşam döngüsü içerisinde oluşan eşeyli çoğalma, paraseksual döngü, mutasyon ve transpozonlar gibi farklı olaylar nedeniyle meydana gelmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir (Ishikawa vd. 2012; Padder vd. 2017).

Colletotrichum lindemuthianum izolatları arasında yüksek seviyede patojenik ve genetik farklılıkların bulunmasında dolayı hastalığa karşı dayanıklı çeşit geliştirilmesinin oldukça zahmetli olduğu bildirilmektedir (Ishikawa vd. 2008). Bu kapsamda etmenin yaygın patojenik gruplarına karşı farklı fasulye genotiplerinin reaksiyonlarının belirlenmesi için yoğun çalışmalar gerçekleştirilmekte olup bazı fasulye genotiplerinin etmen karşı dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Bardas vd. 2007). Bu çalışmada da test edilen fasulye çeşit ve genotiplerinin etmene karşı reaksiyonlarında

önemli farklılıkların bulunduğu, bununla birlikte 7 çeşidin (Sazova, Buse Oturak, Akdağ, Zülbiye, Akın, Önceler, Karacaşehir 90) ve 6 genotipin (AYD-2, YLV-31, BRS-4, ISP-4, YLV-14, BRS-23) etmene karşı dayanıklı reaksiyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu kapsamda dayanıklı olarak belirlenen çeşit/genotiplerin ıslah çalışmalarında genitor bitki olarak önemli potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Madakbaş vd. (2006) 16 taze fasulye çeşidinin 5 izolata karşı reaksiyonlarını sera ve laboratuvar koşullarında değerlendirmiş ve Karaayşe çeşidinin sera koşullarında tüm izolatlara karşı dayanıklı olurken, laboratuvar koşullarında hassasiyet gösterdiğini bildirmiştir. Sazova ve Nassua çeşitleri ise sera koşullarında bir izolata karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Keterew vd. (2018) kullanılan etmene ve inokulasyon yöntemine bağlı olarak bazı çeşitlerin hastalığa karşı dayanıklı reaksiyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu kapsamda bölgedeki yaygın patojenik ya da genetik grupların belirlenerek ıslah çalışmalarının yönlendirilmesinin daha faydalı olacağı düşünülmektedir.

Dünyadaki pek çok fasulye üretim alanında olduğu gibi ülkemizdeki patojen popülasyonlarının yüksek genetik farklılık ve ırk oluşumu göstermesi bu hastalığa karşı ıslah çalışmalarını güçleştirmekte ve sürekli olarak yeni dayanıklılık kaynaklarının araştırılmasını gerektirmektedir (Kelly ve Vallejo 2004; Gonçalves-Vidigal vd. 2009). Bu kapsamda dünyada hastalığa karşı dayanıklılıkta rol oynadığı belirlenen birçok gen tespit edilmiş ve bunların bazıları ile ilişkili moleküler markerler ıslah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanılmıştır (Boersma vd. 2013; Geetha vd. 2013; Tryphone vd. 2013; Vieira vd. 2018). Ülkemizde önemli bir fasulye üreticisi olmasına karşın bu hastalığa karşı dayanıklı çeşit ıslahı ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlı olup önemli bir genetik potansiyele sahip olan ülkemizdeki mevcut gen kaynaklarının belirlenmesi ve yeni ıslah materyallerinin oluşturulması oldukça önem taşımaktadır (Madakbaş vd. 2013; Erdinç vd. 2017; Ekincialp ve Şensoy 2018). Bu çalışma kapsamında da daha önce farklı projelerden elde edilen 693 fasulye genotipinin dayanıklılık kaynakları moleküler markerlarla belirlenmiştir. Test edilen genotipler arasında dayanıklılık ile ilişkili genlerden en yaygını *Co-1⁵* geni olmuş ve bunu sırasıyla *Co-4*, *Co-6*, *Co-1*, *Co-11*, *Co-1⁴* genleri takip etmiştir. Ayrıca ülkemizde *Co-1⁴*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-11* ve *Co-13* genlerini taşıyan fasulye genotipleri ilk kez belirlenmiş olup

hastalığa karşı dayanıklılık gen havuzu için oldukça önemli olacağı düşünülmektedir. Test edilen fasulye genotiplerinin taşıdıkları dayanıklılık gen sayısı ise 1-7 arasında değişmekle beraber büyük çoğunluğunun en az 5 dayanıklılık geni içerdiği görülmüştür. Hastalığa karşı dayanıklı reaksiyon gösteren fasulye genotiplerinde ise en yaygın dayanıklılık geninin *Co-11* olduğu ve bunu *Co-6* ve *Co-1⁵* genlerinin takip ettiği görülmüştür. Ayrıca bu genotiplerin *Co-1*, *Co-4*, *Co-10* ve *Co-13* genlerini taşıdığı belirlenmiştir. Bu kapsamda ülkemizde *Co-1*, *Co-1⁴*, *Co-1⁵*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-10*, *Co-11* ve *Co-13* gen kombinasyonlarını içeren fasulye genotiplerinin hastalığa karşı dayanıklılık gösterdiği düşünülmektedir. Benzer şekilde Genchev vd. (2010) *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4³*, *Co-9*, *Co-12*, *Co-13* ve *Co-15* gen kombinasyonlarının dünya genelinde hastalığa karşı dayanıklılık sağladığını belirtmişlerdir. Brezilya’da ise *Co-4²*, *Co-5* ve *Co-6* gen kombinasyonlarının hastalığa karşı etkin koruma sağladığı belirlenmiştir (Souza vd. 2014). Benzer şekilde dünyada patojenin farklı ırklarına karşı dayanıklılık sağlayan gen kombinasyonları farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Geetha vd. 2013; Tryphone vd. 2013; Vieira vd. 2018). Ülkemizde bu kapsamda yapılan sınırlı çalışmalarda ise Erdinç vd. (2017) bazı fasulye genotiplerindeki dayanıklılığın *Co-1⁵*, *Co-4*, *Co-4²*, *Co-6* ve *Co-10* genleri ile ilişkili olduğunu, Madakbaş vd. (2013) ise patojenin lokal ırklarına karşı dayanıklılığın *Co-1*, *Co-2* ve *Co-4* genleri ile sağlandığını belirtmiştir. Bu kapsamda farklı dayanıklılık genlerini içerdiği belirlenen bu fasulye genotiplerinin ülkemizde yapılacak ıslah çalışmalarına gen kaynağı olarak önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bitki patojen interaksyonunda bitkide hastalık gelişimini önlemek amacıyla savunma ile ilişkili genler uyarılmakta ve patojene karşı direnç oluşmaktadır. Bu korunma bitkinin kendisini daha etkili savunmasını sağlayan metabolik değişimler ile savunma mekanizmalarının uyarılmasına dayanmaktadır. Bu kapsamda bitkide dayanıklılığı sağlayan biyokimyasal, sitolojik ve moleküler değişimler meydana gelmekte ve bu olaylarla ilişkili gen ekspresyonlarında önemli farklılıklar gözlenmektedir. Fasulyede yapılan konukçu patojen interaksyonu çalışmalarında patojen enfeksiyonları esnasında birçok farklı genin rol oynadığı ve bunların transkripsiyonlarında önemli farklılıkların bulunduğu farklı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Borges vd. 2012; Padder vd. 2016; Vasconcellos vd. 2016; Farooq 2017; Fontenelle 2017; Todd vd. 2017). Bu

Çalışma kapsamında da farklı izolat genotipleri arasında dayanıklılığın uyarılmasında rol oynayan gen ekspresyonlarındaki farklılıklar Real-Time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar fasulyede savunmayla ilişkili olan gen ifadelerinde (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PAL*, *GST*, *LOX* ve *POD*) gerek izolatlar açısından gerekse de farklı zaman aralıklarındaki değışimleri açısından istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğunu göstermiştir. Genel olarak patojen enfeksiyonunu takiben *PR1*, *PR2*, *PAL* ve *GST* gen ifadelerinde artış görülür iken bitki savunma mekanizmalarındaki azalmanın bir işareti olarak *PR3*, *LOX* ve *POD* genlerinin baskılandığı görülmüştür. Özellikle PR genlerinin göstermiş olduğu ekspresyon farklılıkları nedeniyle fasulyede *C. lindemuthianum*'a karşı dayanıklılıkta etkin rol oynadığı gözlemlenmiştir. Patojen enfeksiyonunu takiben *PR1* ve *PR2* gen ifadelerinin zamana bağılı olarak oldukça yüksek oranda arttığı, bununla birlikte kitinaz enzim aktivitesinde rol oynayan *PR3* gen ifadesinin ise sağlıklı bitkilere göre daha az oranda eksprese edildiğı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Borges vd. (2012) fasulye genotipi SEL 1308 ile avirulent *C. lindemuthianum* 73 ırkı arasında interaksiyon sonucu meydana gelen değışimleri inokulasyondan 24, 48, 72, 96 saat sonra incelemiş ve PR proteinlerini kodlayan genlerin patojen inokulasyonu sonrasında farklı düzeylerde eksprese olduğunu ve ekspresyon seviyelerinin doku ve zamana göre değıştiğini bildirmiştir. İncelenen PR proteinleri arasında *PR1* ve *PR2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Yine fasulyenin dayanıklı ve hassas hatları ile 73 nolu *C. lindemuthianum* ırkı arasındaki interaksiyonu inceleyen Farooq (2017) enfeksiyonun başlangıcında (24. ve 48. saat) *PR1b* geninin sadece dayanıklı hatta, *PR2* geninin ise her iki hatta da önemli düzeyde arttığını bildirmiştir. Fasulye-*S. sclerotiorum* arasındaki savunma ile ilişkili genlerdeki değışimi inceleyen Oliveira vd. (2015b) *PR1* ve *PR2* genlerinin enfeksiyon zamanına bağılı olarak artış gösterdiğini ve 72. saatte en yüksek ekspresyon seviyesine ulaştığını bildirmiştir. Benzer şekilde *PR3* geninin sadece enfeksiyonun başlangıcında (6 ve 12. saatlerde) eksprese olduğu daha sonra tespit edilemediğini belirtmişlerdir. Diğer bir çalışmada *Rhizoctonia solani* enfeksiyonuna karşı biyokontrol ajanı olarak *Trichoderma harziaum*'un etkisini inceleyen Mayo vd. (2015) sadece patojen uygulamasının bitkideki enfeksiyon sürecini kolaylaştırmak için savunmayla ilişkili *CH5b*, *CH1*, *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4* ve *PAL1* gen aktivitelerini baskıladığını bildirmiştir. Benzer şekilde domateste *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

enfeksiyonu esnasında *PR1* ve *PR4* genlerinin baskılanmasının bitki savunma mekanizmalarındaki azalmanın göstergesi olduğu belirtilmiştir (Zhao vd. 2003).

Bitkilerde doğal olarak bulunmayan ancak patojen enfeksiyonunu takiben oluşan fitoaleksinlerin biyosentezinde rol oynayan *PAL* gen aktivasyonunun ise başlangıçta düşük seviyelerde iken 72. saatten itibaren enfeksiyon sürecine tepki olarak hızla arttığı gözlemlenmiştir. Borges vd. (2012) fasulye yapraklarında kontrole göre *PAL* ekspresyonunun 24. saatte iki kat arttığını ve yaprakların diğer dokulara göre enfeksiyona daha hızlı cevap verdiğini bildirmiştir. Ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak daha sonrasında ekspresyonun hızla azaldığını belirtmiştir. Oliveira vd. (2015b) ise *S. sclerotiorum* enfeksiyonu boyunca *PAL* geninde artış gözlemlendiğini ve en yüksek ekspresyonun 48. saatte görüldüğünü bildirmiştir. Bitkilerde savunma ve stresle ilişkili genler olan *LOX* ve *POD* ekspresyonu incelendiğinde ise bu genlerin patojen enfeksiyonunu takiben azalma eğilimi gösterdiği bununla birlikte *GST* aktivitesinde hızlı bir artış olduğu görülmüştür. Lipoksigenaz geninin, sinyal üretimini aktive ederek bitki savunmasında önemli rol oynayan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir (Blee 2002). Bu kapsamda Oliveira vd. (2015b) enfeksiyonun başlangıcında (12. saat) *LOX* geninin en yüksek seviyede artış gösterdiğini ancak daha sonrasında kontrole yakın bir değişim gösterdiğini belirtmiştir. *POD* gen ifadesinde ise fasulyedeki *S. sclerotiorum* enfeksiyonuna karşı yalnız başlangıçta artış görüldüğü enfeksiyonun ilerlemesiyle bu çalışmadakine benzer şekilde ekspresyonda önemli bir düşüş görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde *S. sclerotiorum* enfeksiyonuna karşı *GST* geninin 48. saate kadar kademeli bir şekilde arttığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte Mayo vd. (2016) fasulyede *Trichoderma velutinum* ve *Rhizoctonia solani* varlığında bitkideki *GST* geninin her iki etmenin hem tek başına bulunması durumunda hem de bir arada olduklarında önemli düzeyde azaldığını bildirmiştir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlar farklı genotip gruplarını temsil eden izolatlar arasında ekspresyon düzeyleri açısından önemli farklılıkların bulunduğunu göstermektedir. Özellikle Z10 izolatına karşı gen ifadelerindeki değişimin daha yüksek seviyelerde meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu kapsamda bitkideki dayanıklılık ile ilişkili gen ekspresyonlarının kullanılan izolata bağlı olarak değişken olduğu görülmüştür. Benzer şekilde bitkilerdeki

patojen enfeksiyonuna karşı tepkinin etmen, çeşit ve zaman açısından önemli farklılıklar gösterdiği farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Lu vd. 2005; Wang vd. 2013).

Günümüzde bitki patojenlerine karşı kimyasal mücadele yöntemleri yaygın olarak kullanılmasına rağmen bu kimyasalların gerek insan gerekse de çevre açısından olumsuz etkiler taşıması ve insanların doğal ürünler kullanımına yönelik artan bir eğilim göstermesi çevre açısından daha az zararlı uygulamaların geliştirilmesine yönelik çalışmaların yoğunluk kazanmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte önemli bir fasulye üreticisi olan ülkemizde gerek bu hastalığa karşı konukçu dayanıklılığının kullanımına yönelik çalışmalarda gerekse de alternatif mücadele konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise belirtilen alanlardaki eksikliği gidermek amacıyla fasulye antraknozu etmenine karşı alternatif mücadele yöntemi olarak bazı bitki aktivatörlerinin etkisinin belirlenmesi ve hastalığa karşı dayanıklılık mekanizmasında rol oynayan gen ifadeleri ve mekanizmaların detaylı olarak aydınlatılması hedeflenmiştir. Bitki aktivatörlerinin hastalık gelişimi üzerindeki etkisi *in vivo* koşullarda değerlendirildiğinde MeJA ve silisyum uygulamalarının istatistiksel olarak benzer sonuçlar verdiği ve hastalık gelişimini engellemede yetersiz kaldığı görülmüştür. Dayanıklı fasulye çeşidinde antraknoza karşı silisyumun etkisini inceleyen Polanco vd. (2012) silisyum uygulanan bitkilerde hastalık şiddetinin % 27 oranında azaldığını bildirmiştir. Benzer şekilde çeltikte yapılan çalışmalarda da farklı hastalık etmenlerine karşı silisyum uygulamalarının hastalık şiddetini azalttığı belirtilmiştir (Brunings vd. 2009; Rahman vd. 2015; Van Bockhaven vd. 2015). Fasulyede *S. sclerotiorum* enfeksiyonuna karşı 10 mM MeJA uygulayan Oliveria vd. (2015a) enfeksiyon oluşumunun geciktiğini ve nekrotik alanların oluşmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte soya fasulyesinde *Phakopsora pachyrhizi*'ye karşı uygulanan jasmonik asit uygulamasının hastalık şiddetini azaltmadığı belirtilmiştir (Cruz vd. 2020). Bu kapsamda silisyum ve MeJA'nın hastalık şiddetini engellemede etkisinin düşük olmasının aktivatörün uygulama zamanı, yöntemi ve uygulanan bitki aktivatörünün konsantrasyonundaki farklılıklarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Değerlendirilen uygulamalar arasında hastalık kontrolünde en yüksek etki ise BTH uygulaması ile sağlanmış ve hastalık indeksi 5.06 (%43.7 engelleme) olarak bulunmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde BTH uygulamasının fasulye

bitkilerinde lezyon gelişimi ve sayısında önemli bir azalmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Cruz vd. (2020) soya fasulyesinde BTH uygulaması ile *Phakopsora pachyrhizi* enfeksiyonunun % 36 oranında engellendiğini bildirmiştir.

Aktivatör uygulanan bitkilerdeki dayanıklılık gen ifadelerinin incelenmesinde ise tüm uygulamaların sağlıklı bitkilerde savunma ile ilişkili genlerde zamana bağlı önemli değişimlerin meydana gelmesine neden olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle MeJA uygulamasının tüm gen ifadelerinde azalma şeklinde değişime neden olduğu gözlenmiştir. Oliveira vd. (2015a) fasulye bitkilerindeki dayanıklılık mekanizmasında rol oynayan MeJA uygulamasının *PR* proteinlerinin ekspresyonunda baskılayıcı rol oynadığını ve dayanıklılıkla ilişkili jasmonik asit ve salisilik asit pathwayleri arasında antagonistik ilişkinin bulunduğunu belirtmiştir. Özellikle bitkilerde dayanıklılıkla ilişkili salisilik asit pathwayinde rol oynayan diğer uygulamaların ise genel olarak değerlendirildiğinde *PR1*, *PR2*, *GST* aktivitelerinin artış eğilimi gösterdiği *PR3*, *LOX* ve *POD* gen ifadelerinin ise azalma eğilimi gösterdiği görülmüştür. Benzer şekilde Thomas-Sharma vd. (2017) BTH, MeJA ve INA uygulamasının domates ve yaban mersini bitkilerinde *PR3*, *PR4* ve *Pin2* gen ifadelerinde önemli artışa neden olduğunu ancak bu konukçularda uygulamaların *Botrytis cinerea* ve *Monilinia vaccinii-corymbosi* enfeksiyonuna karşı yeterli bir koruma sağlamadığını bildirmiştir. Polanco vd. (2014b) ise silisyum içeren ortamda fasulye bitkileri yetiştirildiğinde antraknoz hastalığına karşı sadece % 34 oranında bir koruma sağladığını buna karşın süperoksit dismutase, askorbat peroksidase ve glutathione reductase enzim aktivitelerinin arttığını bildirmiştir.

Bitkilerde dayanıklılık uyarıcılarının patojen ile birlikte uygulamalarında ise değişken sonuçlar gözlemlenmiştir. Silisyum ve MeJA uygulamalarının hastalık gelişiminde yeterli bir koruma sağlamamakla beraber dayanıklılık gen ifadelerinde önemli değişikliklerin oluşmasına neden olmuştur. Silisyum uygulamasının bitkide antraknoza karşı direnci sağlayan *PR1*, *PR2*, *PAL* ve *GST* genlerinin ifadelerinin artmasına neden olduğu görülmüştür. *PR3* ve *POD* genlerinde ise 48. saatte zayıf bir artış görülmüştür. Buna karşın *LOX* gen ifadesinin tüm zamanlarda azaldığı görülmüştür. MeJA ile birlikte patojen uygulanan bitkilerde ise *PR1*, *PR2* ve *PAL* genlerinin arttığı

gözlenmiştir. *GST* geni ise enfeksiyonun ilk aşamasında biraz artmakla beraber daha sonrasında diğer genlerle birlikte patojen enfeksiyonu sürecinde büyük ölçüde baskılandığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Cruz vd. (2020) soya fasulyesinde soya pasına karşı silisyum uygulamasının *PAL* geniyle birlikte *LOX* gen aktivitesinde artışa neden olurken, jasmonik asit uygulamasının sadece *PAL* gen ifadesini yükselttiğini bildirmiştir. BTH uygulaması incelendiğinde ise *PR1* ve *PR2* gen ifadeleri enfeksiyonun erken döneminde hızlı bir artış göstermiş ancak zaman içerisinde bir miktar azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. *PR3* gen ifadesi ise genel olarak azalma şeklinde bir eğilim göstermiştir. *PAL* ve *GST* genleri enfeksiyonun belli zamanlarında artış göstermekle beraber genel olarak *LOX* geni gibi azalış eğiliminde oldukları gözlemlenmiştir. Dufour vd. (2016) yaptıkları çalışmada BTH uygulamasının bağda *Plasmopora viticola*'ya karşı uygulanması ile hastalık şiddetinin % 70 oranında düştüğünü ve *PR1*, *PR2*, *PR3* genlerinin arttığını belirtmiştir. Bu çalışmada ise *PR1* ve *PR2* genleri artış eğilimi gösterirken, *PR3* geninin azalma şeklinde eğilim gösterdiği görülmüştür. Diğer bir çalışmada şeker pancarında *Rhizoctonia solani* enfeksiyonuna karşı tohum ve toprağa BTH, BABA ve SA uygulamaları yapan Maios (2006), kimyasal aktivatörlerin çıkış öncesi çökerten ve çıkış sonrası bitki ölümlerini engellemediğini bildirmiştir. Ancak yapılan çalışmada BTH uygulamasının sistemik dayanıklılık ile ilişkili savunma genlerinden kitinaz, peroksidaz, kalkon izomeraz ve kalkon sentaz aktivitelerini değiştirdiğini, *R. solani* ve BTH bulunan bitkilerde *chit3* geninin kontrole kıyasla 15 kat artış gösterdiğini bildirmiştir. Çalışma sonucunda şeker pancarında BTH uygulamasının gen ifadelerini etkilediği fakat hastalık gelişimine karşı tam bir koruma sağlamadığı bildirilmiştir. Johnson ve Temple (2016) ise elmada ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora*'ya karşı BTH uygulamasının hastalık kontrolünde % 25'e kadar azalma sağladığı ve ayrıca yapraklardaki *PR1* ve *PR2* gen ekspresyonlarının önemli derecede artmasına neden olduğunu belirtmiştir. Japon armudunda soruna neden olan *Venturia nashicola*'ya karşı acibenzolar S methyl (ASM) uygulamasının etkisini araştıran Faize vd. (2009) uygulamanın hastalığa karşı % 33 koruma sağladığını, ayrıca *PR1* gen ifadesinin 1. günde kontrole göre yaklaşık 5 katlık bir artış gösterdiği, daha sonrasında 3. güne kadar hızlı bir şekilde azaldığı 5. günde ise kontrole göre 20 katlık bir artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu kapsamda ASM uygulamasının patojen enfeksiyonu sonrasında *PR1* genini indüklediği belirtilmiştir.

Benzer şekilde BTH'nin; savunma ile ilişkili bileşiklerin, *PR* proteinleri ve fenol birikiminde rol oynayan genlerin transkript seviyelerini arttırarak çok sayıda patojen fungusa karşı etkili bir şekilde koruma sağladığı farklı çalışmalarda tespit edilmiştir (Benhamou ve Belanger 1998; Jensen vd. 1998; Bokshi vd. 2003; Kauss vd. 2003; Si Ammour 2003; Maios 2006).

Fasulye üretim alanlarında sorun olan bu etmene karşı farklı mücadele olanaklarının ele alındığı bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde ülkemizdeki patojen populasyonları arasında yüksek seviyede genetik farklılığın ve düşük gen akışının bulunduğu tespit edilmiş olup elde edilen sonuçların bu hastalığa karşı kontrol yöntemlerinin etkinliğinin artırılmasında ve dayanıklılık ıslahı çalışmalarında araştırmacılara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca ülkemizdeki yerel fasulye genotiplerinde belirlenen farklı *Co* dayanıklılık gen kaynakları ıslah çalışmaları için önemli bir gen havuzu sağlayacaktır. Çalışma kapsamında dayanıklı olarak tespit edilen çeşit ve genotiplerin ise genitör bitki olarak önemli potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir. Fasulye antraknozuna karşı kullanılan bitki aktivatörlerinden BTH uygulamasının ise hastalıkla mücadelede oldukça önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Dayanıklılık gen ifadelerindeki değişimler ise bu aktivatörlerin farklı hastalık etmenlerine karşı da fasulye bitkisinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Hastalığa karşı dayanıklılık ile ilişkili gen ifadelerini kontrol eden mekanizmaların ortaya konmasının ise ıslah çalışmalarının etkinliğinin artmasına ve etmene karşı yeni mücadele stratejilerinin geliştirilmesine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alam, M. and Rudolph, K. 1993. Occurrence and characterization of the races of bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 228-234.
- Andersen, E.J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y. and Nepal, M.P. 2018. Disease resistance mechanisms in plants. *Genes*, 9(7); 339.
- Angioi, S.A., Rau, D., Attene, G., Nanni, L., Bellucci, E., Logozzo, G., Negri, V., Zeuli, P.S. and Papa, R. 2010. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(5); 829-843.
- Anonim. 2021. Web sitesi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. Erişim Tarihi: 15.03.2021.
- Anonim. 2017a. Web sitesi: <http://www.bayburtpostasi.com.tr>. Erişim Tarihi: 10.02.2021.
- Anonim. 2017b. Web sitesi: <http://www.yeniufukelazig.com>. Erişim Tarihi: 10.02.2021.
- Anonymous. 2021. Web sitesi: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim Tarihi: 25.03.2021.
- Ansari, K.I., Palacios, N., Araya, C., Langin, T., Egan, D. and Doohan, F.M. 2004. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathology*, 53(5); 635-642.
- Arseneault, T., Pieterse, C.M., Gérin-Ouellet, M., Goyer, C. and Fillion, M. 2014. Long-term induction of defense gene expression in potato by *Pseudomonas* sp. LBUM223 and *Streptomyces scabies*. *Phytopathology*, 104(9); 926-932.
- Awale, H., Falconi, E., Villatoro, J.C., and Kelly, J.D. 2007. Variability in *Colletotrichum lindemuthianum* from Ecuador and Guatemala. In Kelly, J. et al.(eds). *Annual Report Bean Improvement Cooperative*, 50; 85-86.
- Awale, H.E., Safeena, M.I., Vallejo, V.A. and Kelly, J.D. 2008. Sq4 Scar marker linked to the *Co-2* gene on bll appears to be linked to the *Ur-11* gene.
- Balardin, R.S., Jarosz, A.M. and Kelly, J.D. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. *Phytopathology*, 87(12); 1184-1191.
- Balardin, R.S. and Kelly, J.D. 1998. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(6); 1038-1047.
- Baloch, F.S., Derya, M., Andeden, E.E., Alsaleh, A., Cömertpay, G., Kilian, B. and Özkan, H. 2015. Inter-primer binding site retrotransposon and inter-simple sequence repeat diversity among wild *Lens* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58; 162-168.

- Barcelos, Q.L., Souza, E.A. and Damasceno e Silva, K.J. 2011. Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 10(1); 230-242.
- Bardas, G.A., Koutita, O. and Tzavella- Klonari, K. 2009. Molecular diversity and assessment of biological characteristics of Greek *Colletotrichum lindemuthianum* populations. *Journal of Phytopathology*, 157(5); 311-318.
- Bardas, G.A., Koutita, O. and Tzavella-Klonari, K. 2007. Geographical distribution, pathotype characterization, and molecular diversity of *Colletotrichum lindemuthianum* in Greece and resistance of Greek bean cultivars. *Plant Disease*, 91(11); 1379-1385.
- Benhamou, N. and Bélanger, R.R. 1998. Induction of systemic resistance to Pythium damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *The Plant Journal*, 14(1); 13-21.
- Beraldo, A.L.A., Colombo, C.A., Chiorato, A.F., Ito, M. F. and Carbonell, S.A.M. 2009. Use of SCAR markers in common bean breeding for anthracnose resistance. *Bragantia*, 68(1); 53-61.
- Blée, E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, 7(7); 315-322.
- Boersma, J.G., Conner, R. L., Balasubramanian, P.M., Yu, K. and Hou, A. 2013. Marker-assisted dissection of anthracnose resistance in the dry bean cultivar Morden003. *Can. J. Plant Sci.* 93; 1115-1123.
- Bokshi, A.I., Morris, S.C. and Deverall, B.J., 2003. Effects of benzothiadiazole and acetyl salicylic acid on β - 1,3- glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathology*, 52(1); 22-27.
- Borges, A., Melotto, M., Tsai, S.M. and Caldas, D.G.G., 2012. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. *Journal of Plant Physiology*, 169(12); 1216-1220.
- Brisset, M.N., Cesbron, S., Thomson, S.V. and Paulin, J.P., 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6); 529-536.
- Brunings, A.M., Datnoff, L.E., Ma, J.F., Mitani, N., Nagamura, Y., Rathinasabapathi, B., Kirst, M. 2009. Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Annals of Applied Biology*, 155(2); 161-170.
- Campa, A., Rodríguez-Suárez, C., Giraldez, R., Ferreira, J.J. 2014. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC plant biology*, 14(1); 1-12.

- Canseven Küçükyan, S. 2011. Virulence and genetic diversity of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates collected from common bean varieties of Turkey. Yüksek Lisans Tezi. Boğaziçi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Chen, Y.Y., Conner, R.L., Gillard, C.L., Boland, G.J., Babcock, C., Chang, K.F., ... Balasubramanian, P.M. 2007. A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. *Plant Disease*, 91(10); 1271-1276.
- Correa, R.X., Costa, M. R., Good- God, P.I., Ragagnin, V.A., Faleiro, F.G., Moreira, M. A. and de Barros, E.G. 2000. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. *Crop Science*, 40(3); 804-807.
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1); 355-381.
- Cruz, M.F.A., Pinto, M.O., Barros, E.G. and Rodrigues, F.Á. 2020. Differential gene expression in soybean infected by *Phakopsora pachyrhizi* in response to acibenzolar- S- methyl, jasmonic acid and silicon. *Journal of Phytopathology*, 168(10); 571-580.
- Damasceno e Silva, K.J., De Souza, E. A. and Ishikawa, F.H. 2007. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Phytopathology*, 155(4); 241-247.
- Darben, L.M., Gonela, A., Elias, H.T., da Silva, C.R., Pastre, H.H. and Gonçalves-Vidigal, M.C. 2017. Common bean germplasm resistant to races 73 and 2047 of *Colletotrichum lindemuthianum*. *African Journal of Biotechnology*, 16(19); 1142-1149.
- de Queiroz, V.T., de Sousa, C.S., Costa, M.R., Sanglad, D.A., Arruda, K.M.A., de Souza, T.L.P.O., ... Moreira, M.A. 2004. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. Annual report.
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E. and De Loose, M. 2001. AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8); 1254-1265.
- Desmond, O.J., Edgar, C.I., Manners, J.M., Maclean, D.J., Schenk, P.M. and Kazan, K. 2005. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3-5); 171-179.
- Dufour, M.C., Lambert, C., Bouscalt, J., Mérillon, J.M. and Corio- Costet, M.F. 2013. Benzothiadiazole- primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 62(2); 370-382.

- Dufour, M.C., Magnin, N., Dumas, B., Vergnes, S. and Corio-Costet, M.F., 2016. High-throughput gene-expression quantification of grapevine defense responses in the field using microfluidic dynamic arrays. *BMC Genomics*, 17(1); 1-20.
- Ekincialp, A. and Şensoy, S. 2013. Determination of some vegetables traits in the Van Lake basin bean genotypes. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Journal of Agricultural Sciences*, 23(2); 102-111.
- Ekincialp, A. and Şensoy, S. 2018. Phenotypic and molecular determination of anthracnose disease resistance in Lake Van Basin's bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.). *Legume Research*, 41(1); 135-142.
- Erdinç 2012. Van Gölü Havzasi Fasulye Genotipleri Arasındaki Akrabalık İlişkilerinin Ve Antraknoz (*Colletotrichum lindemuthianum*) (Sacc. & Magnus) Lambs. Scrib.) Hastalığına Dayanıklılığın Fenotipik Ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- Erdinç, C., Turkmen, O., Demir, S. and Sensoy, S. 2017. Determination of the anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. And Magn.) Lambs. Scrib.) resistance in some Turkish bean genotypes by artificial inoculation and molecular methods. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 27(1); 175-185.
- Erper, I., Ozer, G., Kalendar, R., Avci, S., Yildirim, E., Alkan, M. and Turkkan, M. (2021). Genetic diversity and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolates associated with red cabbage in Samsun (Turkey). *Journal of Fungi*, 7(3); 234.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8); 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 117693430500100003.
- Faize, M., Faize, L. and Ishii, H. 2009. Gene expression during acibenzolar-S-methyl- induced priming for potentiated responses to *Venturia nashicola* in Japanese pear. *Journal of Phytopathology*, 157(3); 137-144.
- Farmer, E.E., Alméras, E. and Krishnamurthy, V. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4); 372-378.
- Farooq, M. 2017. Gene Expression Profiling in *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum* Pathosystem. Doctoral dissertation, SKUAST Kashmir.
- Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J.G. and Bélanger, R.R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1); 1-6.
- Fioreze, A.C.D.C.L., Grigolo, S., Piva, C.A.G., and Sartori, L. 2018. Common bean landraces as potential sources of resistance to anthracnose. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 48(2); 126-133.

- Fontenelle, M.R., Santana, M.F., Cnossen, A., Bazzolli, D.M., Bromonschenkel, S.H., de Araújo, E.F. and de Queiroz, M.V. 2017. Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. *European Journal of Plant Pathology*, 147(3); 653-670.
- Galvan, M.Z., Menendez-Sevillano, M.C., De Ron, A.M., Santalla, M. and Balatti, P.A., 2006. Genetic diversity among wild common beans from northwestern Argentina based on morpho-agronomic and RAPD data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5); 891-900.
- Garrido, C., Carbu, M., Acreo, F.J., Boonham, N., Coyler, A., Cantoral, J.M., Budge, G. 2009. Development of Protocols for Detection of *Colletotrichum acutatum* and Monitoring of Strawberry Anthracnose Using Real-Time PCR. *Plant Pathology*, 58; 43–51.
- Geetha, S.B., Subbareddy, S., Satishchandra, P., Moses, R. and Chandra, S. 2013. Morphological and molecular screening of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm using SCAR markers for *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) Scrib. causing anthracnose resistance. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(1); 84-97.
- Geffroy, V., Creusot, F., Falquet, J., Sévignac, M., Adam-Blondon, A.F., Bannerot, H., Gepts, P. and Dron, M. 1998. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 96(3); 494-502.
- Genchev, D., Christova, P., Kiryakov, I., Beleva, M. and Batchvarova, R. 2010. Breeding of common bean for resistance to the physiological races of anthracnose identified in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(2); 1814-1823.
- Ghareeb, H., Bozsó, Z., Ott, P.G., Repenning, C., Stahl, F. and Wydra, K. 2011. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75(3); 83-89.
- Goncalves-Vidigal, M.C. and Kelly, J.D. 2006. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. *Euphytica*, 151; 411-419.
- Gonçalves, A.M.O., Gonçalves-Vidigal, M.C., Vidigal Filho, P.S., Poletine, J.P., Lacanallo, G.F. and Coimbra, G.K. 2010. Characterization of the anthracnose resistance gene in Andean common bean Corinthiano cultivar. *Annual Report Bean Improvement Cooperative*, 53; 220-221.
- Gonçalves-Vidigal, M.C., Cruz, A.S., Garcia, A., Kami, J., Vidigal Filho, P.S., Sousa, L. L., ... Pastor-Corrales, M.A. 2011. Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1*⁴ genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND 277. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(5); 893-903.

- Gonçalves-Vidigal, M.C., Pedro Filho, S.V., Medeiros, A.F. and Pastor-Corrales, M.A. 2009. Common bean landrace Jalo Listras Pretas is the source of a new Andean anthracnose resistance gene. *Crop Science*, 49(1); 133-138.
- Gonzaga, L.L., Costa, L.E.O., Santos, T.T., Araújo, E.F. and Queiroz, M.V., 2015. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2); 485-496.
- González, M., Rodríguez, R., Zavala, M.E., Jacobo, J.L., Hernández, F., Acosta, J., Martínez, O. and Simpson, J. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology*, 88(4); 292-299.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, 8(4); 629-643.
- Hall, R. 1994. Bean diseases, bean pathogens, bean disease control. *Compendium of Bean Diseases*, 4-5 pp.
- Ishikawa, F., Souza, E. and Davide, L. 2008. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. *Biologia*, 63(2); 156-161.
- Ishikawa, F.H., Souza, E.A., Shoji, J.Y., Connolly, L., Freitag, M., Read, N.D. and Roca, M.G. 2012. Heterokaryon incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. *PloS One*, 7(2); e31175.
- Jensen, B.D., Olumide Latunde- Dada, A., Hudson, D. and Lucas, J.A. 1998. Protection of Brassica seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. *Pest Management Science*, 52(1); 63-69.
- Johnson, K.B. and Temple, T.N., 2016. Comparison of methods of acibenzolar-S-methyl application for post-infection fire blight suppression in pear and apple. *Plant Disease*, 100(6); 1125-1131.
- Johnson, K.B., Temple, T.N. 2017. Induction of systemic acquired resistance aids restoration of tree health in field-grown pear and apple diseased with fire blight. *Plant Disease*, 101(7); 1263-1268.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P. and Schulman, A.H. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(8); 1419-1430.
- Kauss, H., Seehaus, K., Franke, R., Gilbert, S., Dietrich, R.A. and Kröger, N. 2003. Silica deposition by a strongly cationic proline- rich protein from systemically resistant cucumber plants. *The Plant Journal*, 33(1); 87-95.

- Kelly, J.D., and Vallejo, V.A., 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience*, 39(6); 1196-1207.
- Kelly, J.D., Gepts, P., Miklas, P.N., Coyne, D.P. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research*, 82(2-3); 135-154.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. and Ryals, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1); 439-459.
- Keterew, Y., Dawit, W., Selvaraj, T. and Lencho, A. 2018. Physiological characterization and evaluation of common bean genotypes against anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magnus) Lams-Scriber) races in West Shewa, Ethiopia. *International Journal of Life Sciences*, 6(3); 744-754.
- Kim, S.G., Kim, K.W., Park, E.W. and Choi, D. 2002. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*, 92(10); 1095-1103.
- Kiptoo, G.J., Kinyua, M.G., Kiplagat, O.K., and Matasyoh, L.G. 2020. Incidence and severity of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) on selected common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Agricultural Research*, 5; 84.
- Lacanallo, G.F., Goncalves-Vidigal, M.C., Vidigal-Filho, P.S., Kami, J., Gonela, A. 2010. Mapping of an Andean gene for resistance to anthracnose in the landrace Lallo Listras Pretas. *Annual Report Bean Improvement Cooperative*, 53; 96-97.
- Latunde-Dada, A.O. and Lucas, J.A. 2001. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58(5); 199-208.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. and Ryals, J. 1996. Benzoethiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal*, 10(1); 71-82.
- Liao, H., Yan, X., Rubio, G., Beebe, S. E., Blair, M. W. and Lynch, J.P. 2004. Genetic mapping of basal root gravitropism and phosphorus acquisition efficiency in common bean. *Functional Plant Biology*, 31(10); 959-970.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4); 402-408.
- Logozzo, G., Donnoli, R., Macaluso, L., Papa, R., Knüpffer, H. and Zeuli, P.S. 2007. Analysis of the contribution of Mesoamerican and Andean gene pools to European common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm and strategies to establish a core collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(8); 1763-1779.

- Lopez, A.M.Q. and Lucas, J.A. 2002. Effects of plant defence activators on anthracnose disease of cashew. *European Journal of Plant Pathology*, 108(5); 409-420.
- Lu, Z.X., Gaudet, D.A., Frick, M., Puchalski, B., Genswein, B. and Laroche, A. 2005. Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. *BMB Reports*, 38(4); 420-431.
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y. and Yano, M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature*, 440(7084); 688-691.
- Madakbaş, S.Y., Dolar, S., Bayraktar, H. and Ellialtıoğlu, Ş. 2006. Orta Karadeniz bölgesi'nde taze fasulye yetiştirilen alanlarda görülen antraknoz hastalığı etmenine (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc&Magnus) Lambs. Scrib) ait ırkların tesbiti ve bazı fasulye çeşitlerinin hastalığa dayanım durumlarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi VI. Sebze Tarımı Sempozyumu. 19-22 Eylül 2006. (138-142); Kahramanmaraş.
- Madakbaş, S.Y., Hız, M.C., Gültekin, Y. and Sayar, M.T. 2009. STS/SCAR belirteçler kullanılarak taze fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) hat ve çeşitlerinde antraknoza (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc&Magnus) Lambs. Scrib) dayanıklılık genlerinin tespiti üzerine araştırmalar. XVI. Biyoteknoloji Kongresi, 13-16.
- Madakbaş, S.Y., Hız, M.C., Küçükyan, S. and Sayar, M.T. 2013. Transfer of *Co-1* gene locus for anthracnose disease resistance to fresh bean (*Phaseolus vulgaris* L.) through hybridization and molecular marker-assisted selection (MAS). *Journal of Agricultural Science*, 5(4); 94.
- Mahmodi, F., Kadir, J.B., Puteh, A., Pourdad, S.S., Nasehi, A. and Soleimani, N. 2014. Genetic diversity and differentiation of *Colletotrichum* spp. isolates associated with Leguminosae using multigene loci, RAPD and ISSR. *The Plant Pathology Journal*, 30(1); 10.
- Mahuku, G.S. and J.J. Riascos. 2004. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. *Eur. J. Plant Pathol.*, 110; 253-263.
- Maibam, N., Chandra, S., Baiswar, P., Majumder, D. and Saikia, K. 2015. Host Plant Resistance and Yield Loss due to Anthracnose caused by *Colletotrichum lindemuthianum* in French Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Indian Journal of Hill Farming*, 28(1).
- Maios, C. 2006. Expression of defence-related genes in sugar beet plants infected with *Rhizoctonia solani* and treated with benzo-(1, 2, 3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH). Doctoral dissertation. McGill University, Canada.
- Martínez-Aguilar, K., Ramírez-Carrasco, G., Hernández-Chávez, J.L., Barraza, A. and Alvarez-Venegas, R. 2016. Use of BABA and INA as activators of a primed state in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7.

- Martiniano-Souza, M.C., Gonçalves-Vidigal, M.C., Lacanallo, G.F., Costa, A.F., Vidigal Filho, P.S., Dartibale, G.B., ... Felipin-Azevedo, R. 2017. Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing its regions.
- Mayo, S., Cominelli, E., Sparvoli, F., González-López, O., Rodríguez-González, A., Gutiérrez, S. and Casquero, P.A. 2016. Development of a qPCR strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum*–*Rhizoctonia solani* interaction. *Frontiers in Plant Science*, 7; 1109.
- Mayo, S., Gutierrez, S., Malmierca, M.G., Lorenzana, A., Campelo, M.P., Hermosa, R. and Casquero, P.A. 2015. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers in Plant Science*, 6; 685.
- Méndez-Vigo, B., Rodríguez-Suárez, C., Paneda, A., Ferreira, J.J. and Giraldez, R. 2005. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. *Euphytica*, 141(3); 237-245.
- Métraux, J.P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1); 13-18.
- Meziadi, C., Richard, M.M., Derquennes, A., Thareau, V., Blanchet, S., Gratias, A., Pflieger, S. and Geffroy, V., 2016. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. *Plant Science*, 242; 351-7.
- Mota, S.F., Barcelos, Q.L., Dias, M.A. and Souza, E.A. 2016. Variability of *Colletotrichum* spp. in common bean. *Genetics and Molecular Research*, 15 (2); 15027176.
- Motallebi, P., Tonti, S., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Pisi, A., Nipoti, P., Hashemi, M. and Prodi, A. 2017. Induction of basal resistance by methyl jasmonate against *Fusarium culmorum* in bread wheat. *Cereal Research Communications*, 45(2); 248-259.
- Okubara, P.A., Schroeder, K.L. and Paulitz, T.C. 2005. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications to Studies on Soilborne Pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(3); 300-313.
- Oliveira, M.B., de Andrade, R.V., Grossi-de-Sá, M.F., and Petrofeza, S. 2015b. Analysis of genes that are differentially expressed during the *Sclerotinia sclerotiorum*-*Phaseolus vulgaris* interaction. *Frontiers in Microbiology*, 6; 1162.
- Oliveira, M.B., Junior, M.L., Grossi-de-Sá, M.F. and Petrofeza, S. 2015a. Exogenous application of methyl jasmonate induces a defense response and resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean plants. *Journal of Plant Physiology*, 182; 13-22.
- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. and Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1); 19-28.

- Özer, G., Sameeullah, M., Bayraktar, H. and Göre, M.E. 2017. Genetic diversity among phytopathogenic Sclerotiniaceae, based on retrotransposon molecular markers. *Phytopathologia Mediterranea*, 56(2); 251-258.
- Özer, G., Imren, M., Alkan, M., Paulitz, T. C., Bayraktar, H., Palacioğlu, G., ... Dababat, A.A. 2020. Molecular and pathogenic characterization of *Cochliobolus anamorphs* associated with common root rot of wheat in Azerbaijan. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(1); 147-158.
- Padder, B.A., Kamfwa, K., Awale, H.E. and Kelly, J.D. 2016. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. *PloS One*, 11(11); p.e0165823.
- Padder, B.A., Sharma, P.N., Awale, H.E. and Kelly, J.D. 2017. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, 317-330.
- Padder, B.A., Sharma, P.N., Sharma, O.P. and Kapoor, V. 2007. Genetic diversity and gene flow estimates among five populations of *Colletotrichum lindemuthianum* across Himachal Pradesh. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70(1); 8-12.
- Palacioglu, G., Bayraktar, H. and Ozer, G. 2020. Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Turkey and resistance of Turkish bean cultivars. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 18(3); 3.
- Pastor-Corrales, M.A., Otoya, M.M., Molina, A. and Singh, S.P. 1995. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. *Plant Disease*, 79(1); 63-67.
- Pekşen, E. ve Artık, C. 2005. Antibesinsel maddeler ve yemelik tane baklagillerin besleyici değerleri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(2); 110-120.
- Pinto, J.M.A., Pereira, R., Mota, S.F., Ishikawa, F.H. and Souza, E.A. 2012. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. *Phytopathology*, 102(5); 490-497.
- Polanco, L.R., Rodrigues, F.A., Moreira, E. N., Duarte, H.S.S., Cacique, I.S., Valente, L. A., ... Vale, F.X.R. 2014a. Management of anthracnose in common bean by foliar sprays of potassium silicate, sodium molybdate, and fungicide. *Plant Disease*, 98(1); 84-89.
- Polanco, L.R., Rodrigues, F.A., Nascimento, K.J., Cruz, M.F., Curvelo, C.R., DaMatta, F.M. and Vale, F.X. 2014b. Photosynthetic gas exchange and antioxidative system in common bean plants infected by *Colletotrichum lindemuthianum* and supplied with silicon. *Tropical Plant Pathology*, 39(1); 35-42.
- Polanco, L.R., Rodrigues, F.A., Nascimento, K.J.T., Shulman, P., Silva, L.C., Neves, F. W., and Vale, F.X.R. 2012. Biochemical aspects of bean resistance to anthracnose mediated by silicon. *Annals of Applied Biology*, 161(2); 140-150.
- Pourmahdi, A. and Taheri, P. 2015. Genetic diversity of *Thanatephorus cucumeris* infecting tomato in Iran. *Journal of Phytopathology*, 163(1); 19-32.

- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2); 945-959.
- Rahman, A., Wallis, C.M. and Uddin, W. 2015. Silicon-induced systemic defense responses in perennial ryegrass against infection by *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology*, 105(6); 748-757.
- RL Conner, Y.D., Balasubramanian, P., Yu, K., Park, S.J., Penner, W.C., and Yager, L. M. 2007. Phenotypic and genotypic identification of anthracnose resistance in kidney bean cultivars grown in western Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, 87(2); 405-412.
- Rodrigues, F.A., Polanco, L.R., Duarte, H.S.S., Resende, R.S. and Vale, F.X.R. 2015. Photosynthetic gas exchange in common bean submitted to foliar sprays of potassium silicate, sodium molybdate and fungicide and infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Phytopathology*, 163(7-8); 554-559.
- Rohlf, F.J. 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0. New York: Exeter Publishing.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* 1989. 2nd edn Cold Spring Harbor. NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schoonhoven AV, Pastor-Corrales MA, 1987. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia. 56 pp.
- Sharma, P.N., Padder, B.A., Sharma, O.P., Pathania, A. and Sharma, P. 2007. Pathological and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* (bean anthracnose) across Himachal Pradesh, a north-western Himalayan state of India. *Australasian Plant Pathology*, 36(2); 191-197.
- Shetty, R., Fretté, X., Jensen, B., Shetty, N. P., Jensen, J. D., Jørgensen, H. J. L., ... and Christensen, L.P. 2011. Silicon-induced changes in antifungal phenolic acids, flavonoids, and key phenylpropanoid pathway genes during the interaction between miniature roses and the biotrophic pathogen *Podosphaera pannosa*. *Plant Physiology*, 157(4); 2194-2205.
- Si- Ammour, A., Mauch- Mani, B. and Mauch, F. 2003. Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection. *Molecular Plant Pathology*, 4(4); 237-248.
- Sicard, D., Michalakakis, Y., Dron, M. and Neema, C. 1997. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, 87(8); 807-813.
- Silva, C.R., Gonçalves-Vidigal, M.C., Garcia, A., Vidigal Filho, P.S., Gonela, A. 2009. Identification of a Molecular Marker Linked to *Co-11* Anthracnose Resistance Gene in Common Bean. *Cooperative*, 46.

- Sneath, P.H. and Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.
- Souza, E.A., Camargo Jr, O.A. and Pinto, J.M. 2010. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. Genetics and Molecular Research, 9(3); 1759-1769.
- Souza, T.L.P.O., Wendland, A., Rodrigues, M. S., Almeida, L.C.S., Correia, F.R., Rodrigues, L.A., ... Melo, L.C. 2014. Anthracnose resistance sources to be explored by the common bean breeding programs in Brazil. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE).
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*., 1-26.
- Şehirali, S. 1988. Yemeklik dane baklagiller. Ankara Üniversitesi Z.F. Yayını, No: 1089, 314 s., Ankara.
- Thomas- Sharma, S., Leebens- Mack, J.H., and Scherm, H. 2017. Marker gene overexpression in flowers treated with resistance inducers does not correlate with protection against flower- infecting fungi in tomato and blueberry. Journal of Phytopathology, 165(1); 53-63.
- Todd, A.R., Donofrio, N., Sripathi, V.R., McClean, P.E., Lee, R.K., Pastor-Corrales, M. and Kalavacharla, V.K. 2017. Marker-assisted molecular profiling, deletion mutant analysis, and rna-seq reveal a disease resistance cluster associated with *Uromyces appendiculatus* infection in common bean *Phaseolus vulgaris* L. International Journal of Molecular Sciences, 18(6); 1109.
- Trabanco, N., Campa, A. and Ferreira, J.J. 2015. Identification of a new chromosomal region involved in the genetic control of resistance to anthracnose in common bean. The Plant Genome, 8(2); plantgenome2014-10.
- Tripathi, D., Jiang, Y.L. and Kumar, D. 2010. SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. FEBS Letters, 584(15), 3458-3463.
- Tryphone, G.M., Chilagane, L.A., Protas, D., Kusolwa, P.M. and Nchimbi-Msolla, S. 2013. Marker assisted selection for common bean diseases improvements in Tanzania: Prospects and future needs. Plant breeding from laboratories to fields. Intech, 121-147.
- Vallejo, V. and Kelly, J. D. 2001. Development of a SCAR marker linked to *Co-5* locus in common bean. Annual Report-bean Improvement Cooperative, 44; 121-122.
- Van Bockhaven, J., Spíchal, L., Novák, O., Strnad, M., Asano, T., Kikuchi, S., ... De Vleeschauwer, D. 2015. Silicon induces resistance to the brown spot fungus *Cochliobolus miyabeanus* by preventing the pathogen from hijacking the rice ethylene pathway. New Phytologist, 206(2); 761-773.
- Vasconcellos, R.C.C., Lima, T.F.C., Fernandes-Brum, C.N., Chalfun-Junior, A. and Santos, J.B. 2016. Expression and validation of *PvPGIP* genes for resistance to

- white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Genetics and Molecular Research, 15(11).
- Vieira, A.F., Almeida, L.C.S., Rodrigues, L.A., Costa, J.G.C., Melo, L.C., Pereira, H.S., ... Souza, T.L.P.O. 2018. Selection of resistance sources to common bean anthracnose by field phenotyping and DNA marker-assisted screening. Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE).
- Walters, D., Newton, A.C. and Lyon, G. (Eds.). 2007. Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. John Wiley & Sons.
- Wang, Z., Huang, S., Jia, C., Liu, J., Zhang, J., Xu, B., and Jin, Z. 2013. Molecular cloning and expression of five glutathione S-transferase (GST) genes from Banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). Plant Cell Reports, 32(9); 1373-1380.
- Wang, M., Gao, L., Dong, S., Sun, Y., Shen, Q. and Guo, S. 2017. Role of silicon on plant-pathogen interactions. Frontiers in Plant Science, 8; 701.
- Xue, R., Wu, J., Zhu, Z., Wang, L., Wang, X., Wang, S. and Blair, M.W. 2015. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. PLoS One, 10(6); e0127698.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B., Ye, Z.H., Mao, J.X. 1999. POPGENE version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Young, R.A. and Kelly, J.D. 1997. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. Crop Science, 37(3); 940-946.
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.L., Schaller, A., He, S.Y., and Howe, G.A., 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. The Plant Journal, 36(4); 485-499.