

Fasulye Antraknozu Hastalık Etmeni (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lambs. Scrib.) Irklarının Belirlenmesi: II. Fungusun İzolasyonu, Saklanması, İnokülasyonu ve Skala Değerlendirmesi

Seher Yıldız MADAKBAŞ¹ Şebnem ELLİALTIOĞLU² Sara DOLAR³
Harun BAYRAKTAR³

¹Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

³Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara

Özet: Dünyada geniş bir yayılım alanına sahip olan fasulyenin en önemli hastalıklarından birisi, *Colletotrichum lindemuthianum* fungusunun sebep olduğu antraknozdur. Fasulye yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı bölgelerde bitkilerde büyük zararlar yapmakta, dayanıklılık özelliğine sahip olmayan yerli ve yabancı pek çok kültür çeşidinde hastalık oluşturmaktadır. Dünyada mevcut olan antraknoz ırklarının tam sayısını vermek mümkün değildir. Yaklaşık olarak 150 antraknoz ırkının olduğu ve bu sayının yeni ırkların çıkışıyla değişebileceği literatürde belirtilmiştir. Ülkemizde var olduğu tespit edilen ve yaygınlaşma riskinin bulunduğu bu patojene karşı dayanıklılık kaynaklarının araştırılması, olası gen kaynaklarının korunarak değerlendirilmesi, dayanıklılık özelliğinin ıslah materyalleriyle yerli çeşidimize aktarılması gerekmektedir. Anılan bu hastalığa dayanıklılığın kalıtımını belirlemek amacıyla 2007 yılında ilk aydınlatıcı bilgilere ulaşılmıştır. Konu ile ilgili çalışacak araştırmacıların yararlanması amacıyla hazırlanan bu derlemede; hastalık etmeninin izole edilmesi, çoğaltılması, hastalık etmeninin kısa süreli ve uzun süreli saklanması, inokülasyon işlemleri, spor süspansiyonunun hazırlanması ve değerlendirmelerin yapılmasında kullanılan skala hakkında bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*, izolasyon, inokülasyon, muhafaza

Determination of Races of Bean Anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lambs. Scrib.) Disease: II. Isolation of Fungus and Conservation and Inoculation and Scale Evaluation

Abstract: Anthracnose caused by *Colletotrichum lindemuthianum* fungus is one of the most important diseases having a wide spread field in the world. It is done very large damages on the plants in the regions being make dense of the bean cultivation and formed disease a good number of native and foreign culture variety no having resistance characteristics. It is not possible to give an accurate number of races of anthracnose available in the world. In literature it is indicated that there are approximately 150 races of anthracnose and this number will change as new races have been emerged. It is necessary transferred our native variety with breeding materials of resistance characteristic and guardedly evaluated of probable gene resources and researched of resistance resources against this pathogen having of proliferation risk and determined existing in the our country. In 2007, the first informative data are reached so as to determinate the inheritance of this disease resistance, aforementioned. In this review that is prepared on the purpose of utilizing of investigators; it is aimed to give data about increasing and isolation of disease agent and conservation in short and long period and inoculation processes and prepared of spore suspension and scale of using make of assessments.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, *Colletotrichum lindemuthianum*, isolation, inoculation, conservation

Giriş

Dünyada geniş bir yayılım alanına sahip fasulyenin en önemli hastalıklarından biri olan antraknoza, *Colletotrichum lindemuthianum* fungal etmeni sebep olmaktadır. Bu fungusun çok sayıda ırkının da bulunduğu bilinmektedir. Antraknozun patojeni olarak tanımlanan *C. lindemuthianum* Kuzey Amerika, Avrupa, Afrika, Avustralya, Asya ve Latin Amerika ülkelerinden Meksika, Guatemala, Venezuela, Kolombiya ve Brezilya'da olduğu gibi Türkiye'de de ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu etmen özellikle yüksek neme sahip ve serin

bölgelerde yetişen fasulye bitkilerinde zarar yapmakta dayanıklılık özelliğine sahip olmayan yerli ve yabancı pek çok kültür çeşidinde hastalık oluşturmaktadır.

C. lindemuthianum fungal etmeni, *P. vulgaris* L., *P. lunatus*, *P. limensis* Macf., *P. acutifolius* var. *latifolius* Fre., *P. coccineus*, *P. aureus* Roxb. türlerinde bir patojendir. Bu patojen ile mücadelede karşılaşılan en önemli sınırlayıcı faktör ise fungusun birbirinden farklı çok sayıda ırkının mevcut olmasıdır (Bigirimana ve ark. 2000). Etmen dünyanın tropik ve subtropik alanlarında, özellikle soğuk ve nemli koşullarda, çok fazla patojenik çeşitlilik göstermektedir. Farklı çalışmalarda müşterek

olan ırkları ayırt etmeksizin ve bütün ülkelerdeki literatürü okumaksızın, dünyadaki antraknoz ırklarının tam sayısını vermek mümkün olmayacaktır. Balardin'in 41 ırk, Mukuku'nun 90 ırk ve Pathania'nın bazı çalışmalarında ortak olarak bilinen 140 ırktan 10 ırkı rapor ettiği belirtilmektedir. Diğer bazı çalışmalarda da tek tek ırklar belirlenmiştir. Yaklaşık olarak antraknozun 150 ırkı olduğu ve bu sayının yeni ırkların çıkışıyla değişebileceği ifade edilmektedir (Kelly ve Vallejo 2004). Bununla birlikte antraknoz ırklarının belirlenmesinde kullanılan 12'lik ayırım setinin ırk tayininde başarılı sonuçlar verdiği de kaydedilmektedir (Young ve Kelly 1996). Madakbaş ve ark. (2009) tarafından kullanılan bu set, özellikleri ve ırk tayininin yapıışı, bundan önceki bir derleme makalesinde birinci bölüm olarak okuyucuların kullanımına sunulmuştur. Burada ise hastalık etmeninin izole edilmesi, çoğaltılması, hastalık etmeninin kısa süreli ve uzun süreli saklanması, inokülasyon işlemleri, spor süspansiyonunun hazırlanması ve değerlendirmelerin yapıışında kullanılan skala hakkında bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

Fungal materyalin elde edilmesi

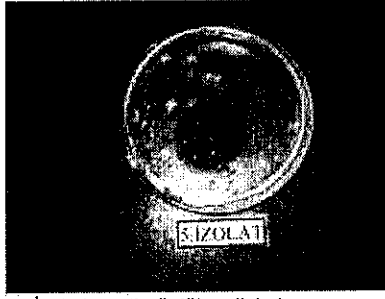
Fungusun izole edilmesi amacıyla ilk aşama olarak meyve oluşum döneminde araziye gidilerek hastalıklı bitki materyali (bakla örnekleri) toplanır (Şekil 1). Her bir bitkiden alınan hastalıklı bakla örnekleri birbiriyle karıştırılmadan toplandığı yerin adı veya kodu yazılarak ayrı ayrı kese kâğıtlarına konulur.



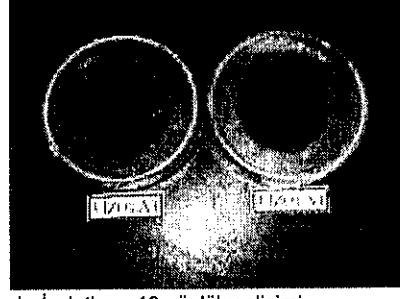
Şekil 1. Antraknozlu baklalar

Materyaller değerlendirilinceye kadar + 4°C'de buzdolabında saklanmalıdır.

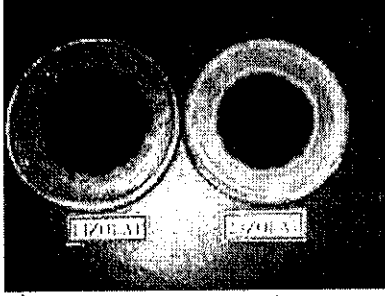
Fungusun izolasyonu aşamasında öncelikle hastalıklı bitki materyallerinin antraknoz belirtisi gösteren baklaları üzerindeki nekrotik lezyonlardan binoküler altında iğne ucuyla sporlar alınarak *C.lindemuthianum* fungusu içerip içermediğine bakılmalıdır. Lezyonların üzerinde *C.lindemuthianum* fungusu olan kısımlardan küçük parçacıklar alınır, bu parçacıklar % 1'lik sodyumhipoklorit çözeltisinde 1 dakika tutulduktan sonra, saf steril suda 3 kez 2'şer dakika bekletilir ve nemi alınmak üzere steril kurutma kâğıtlarına bırakılır. Ekim işlemi, önceden petrilere hazırlanmış olan PDA (200 g patates, 30 g dekstroz ve 30 g agar) ortamına yapılır. 25°C sıcaklığın sağlandığı iklim dolabına petrilere yerleştirilir ve 7-10 gün sonra *C.lindemuthianum* fungusunun gelişimi incelenir. Gelişimin sağlandığı petrilere küçük birer parça alınarak kültür saflaştırılır. *C.lindemuthianum*, diğer funguslara nazaran çok yavaş gelişeceği, çimlenmesinin zor oluşu ve diğer funguslar ya da farklı patojenler tarafından çok kolay üzeri kapatılarak gelişiminin engellenebileceği göz ardı edilmemelidir. Gelişme olan petrilere birkaç defa alt kültüre alınarak (Mathur ve ark. 1950), diğer patojenlerin gelişimi engellenebilir ve saf izolatlar elde edilebilir. Şekil 2'de PDA ortamındaki *C.lindemuthianum* izolatlarının gelişme aşamaları gösterilmiştir.



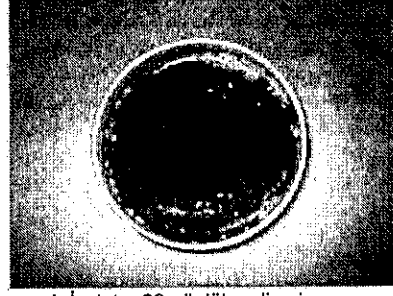
a- İzolatların 5 günlük gelişimi



b- İzolatların 10 günlük gelişimi



c- İzolatların 17 günlük gelişimi



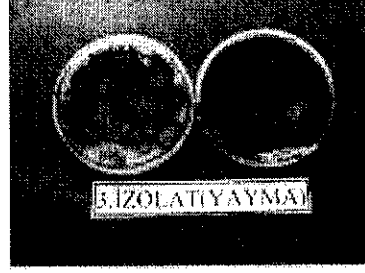
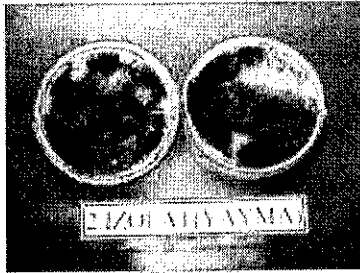
d- İzolatın 22 günlük gelişimi

Şekil 2. Hastalıklı bitki materyallerinden elde edilmiş olan *C. lindemuthianum* izolatları
a- İzolatların 5 günlük gelişimi, b- İzolatların 10 günlük gelişimi,
c- İzolatların 17 günlük gelişimi, d- İzolatın 22 günlük gelişimi

İzolatların yayma metoduyla çoğaltılması

İnokülasyon için hazırlanacak olan spor süspansiyonuna yeterli miktarda spor sağlamak amacıyla, izolatlar yayma metoduyla çoğaltılmalıdır. Bu amaçla her bir izolat için, bir laboratuvar tüpüne 10 ml saf su konularak otokolavda steril edilmeli ve bu tüplere her bir izolatın küçük bir parça alınarak ayrı

ayrı konulmalıdır. Tüpler içerisinde sporların düzgünce yayılması için 3 dakika vorteksleme işlemi yeterlidir. Bunun ardından sporlarının bulunduğu her bir tüpten mikropipetle 1 ml alınarak PDA ortamı içeren petrilere yayılır. Her bir izolatın 10'ar petriye yayma yapılabilir. Bu yolla 20 gün içerisinde hızlı bir gelişim sağlanabilir ve spor miktarı artırılır (Şekil 3).



Şekil 3. *C. lindemuthianum* izolatlarının yayma metoduyla çoğaltılması

İzolatların muhafaza edilmesi

İzolatlar iki şekilde muhafaza edilmektedir: Birincisi izolatlar inokülasyon işlemleri için sık sık kullanılacaksa kısa süreli 6 ay muhafaza ve ikincisi de izolatların inokülasyon için çoğaltılması sırasında elden çıkmasını engellemek için -20°C'de saklanması ve koruma altına alınmasıdır. Birinci muhafaza şeklinde saflaştırılmış olan izolatlar, PDA ortamı içeren eğik agarlara kısa süreli saklamak amacıyla aktarılır (Şekil 4). Eğik agarda *C. lindemuthianum* fungusunun gelişimi sağlandıktan sonra 6 ay süreyle +4°C'de buzdolabında muhafaza edilebilir. Eğik agarda bulunan fungusun canlılığını kaybetmesini önlemek amacıyla tekrar çoğaltılması ve eğik agara alınması gerekmektedir. 6 ay sonra eğik agardaki izolatlar, PDA içeren petrilere

alt kütüre alınarak fungusun gelişmesi sağlanır. Bu ortamın hazırlanabilmesi için; 500 g yeşil fasulye baklası, 16 g agar ve 1L distile su gereklidir. Yeşil fasulyelerin her iki ucu kesilir. Baklalar yıkanır, 15-20 dakika otoklavlanarak baklaların pişmesi sağlanır. Agarlı su (16 g agar ve 1L distile su) hazırlanır ve 20 dakika otoklavlanır. Temiz tüplere agarlı sudan 3'er ml dökülür. Her tüpe fasulye baklası yukarıdan aşağıya doğru (dik) yerleştirilir. Tüplerin ağzı yuvarlak şekilde hazırlanmış olan steril pamuklarla kapatılır. 20 dakika bu tüpler otoklavlanır. Otoklavladıktan sonra 30 dakika ortam katılaşmaya kadar beklenir. Fungusu içeren petrilere köşe kısmından steril iğne ucuyla agarlı fungusdan küçük bir parça kesilir. Steril fasulye baklasını içeren tüplerin içine bu agarlı fungus parçası

yerleştirilir. Tüpler 25°C sıcaklıktaki inkübatöre konulur. 3-4 gün fungus tamamen gelişinceye kadar beklenir. Önceden hazırlanmış olan yeşil fasulye baklası içeren tüplere fungus tekrar aktararak alt kültüre alınır. İki hafta sonra haşlanmış ve otoklav edilmiş taze fasulye parçalarının üzerine çoğaltılmış olan izolatlardan alınan *C.lindemuthianum* sporları inokülasyon için kullanılabilir ya da PDA içeren eğik agarlı ortamlarda tekrar çoğaltılarak 6 ay süreyle muhafaza altına alınabilir. Böylece elde edilmiş olan izolatlar canlılığını ve virülens etkisini kaybetmeden muhafaza edilmiş olmaktadır (Goncalves-Vidigal ve ark. 2004; Balardin ve Kelly 1998).



Şekil 4. İzolatların eğik agara alınması

-20°C'de uzun süreli muhafaza yönteminde amaç; gelecekte kullanım için izolatları rezerv olarak depolamak ve izolatların elden çıkmasını önlemektir. Bu yöntemde saflaştırılmış ve antraknoz fungusunu içeren izolatlardan ikişer petri, sterilize edilmiş filtre kağıtları (2 cm x 2 cm), iğne ve pens kullanılmalıdır. Laminar flow kabinde pens alkole batırılıp ateşe tutularak steril edildikten sonra soğutulmalıdır. PDA içeren petrilere 4-5 parça 2 cm x 2 cm büyüklüğünde kesilmiş olan filtre kağıtları pens yardımıyla yerleştirilmelidir. Önceden PDA ortamında çoğaltılmış olan izolatlar steril iğneyle küçük parçalara bölünmeli ve bu parçalar steril filter kağıt üzerine alınarak daha küçük parçalara ayrılmalıdır. Agarlı fungus parçacıkları, PDA'lı ortamda bulunan küçük filtre kağıtlarının üzerine yerleştirilmelidir. Petri değil de, eğer büyük kaplar kullanılacaksa PDA ortamı içeren bu kapların üzerine 15 tane küçük filtre kağıdından yerleştirilebilir. Petrilere kapatılarak üzerine izolatin adı ve tarihi yazılır. Petrilere 25°C inkübatöre üst kısmı alta ve alt kısmı üste gelecek şekilde yerleştirilir. 5-7 gün sonra fungus filtre kağıdını tamamen kaplayacaktır. Tekrar laminar kabinde ve steril koşullarda petrilere açılarak içerisinde bulunan filtre kağıtların üzerine önceden yerleştirilen agarlı kısım dikkatli bir şekilde kazınır. Bütün petrilere bu işlemler gerçekleştirildikten sonra her bir izolatin yer aldığı küçük filtre kağıtları bu sefer PDA ortamı içermeyen boş petrilere konur. Fungus içeren filtre kağıtlarının kurutulması amacıyla inkübatöre konur (25°C). 4-5 gün sonra filtre kağıtları

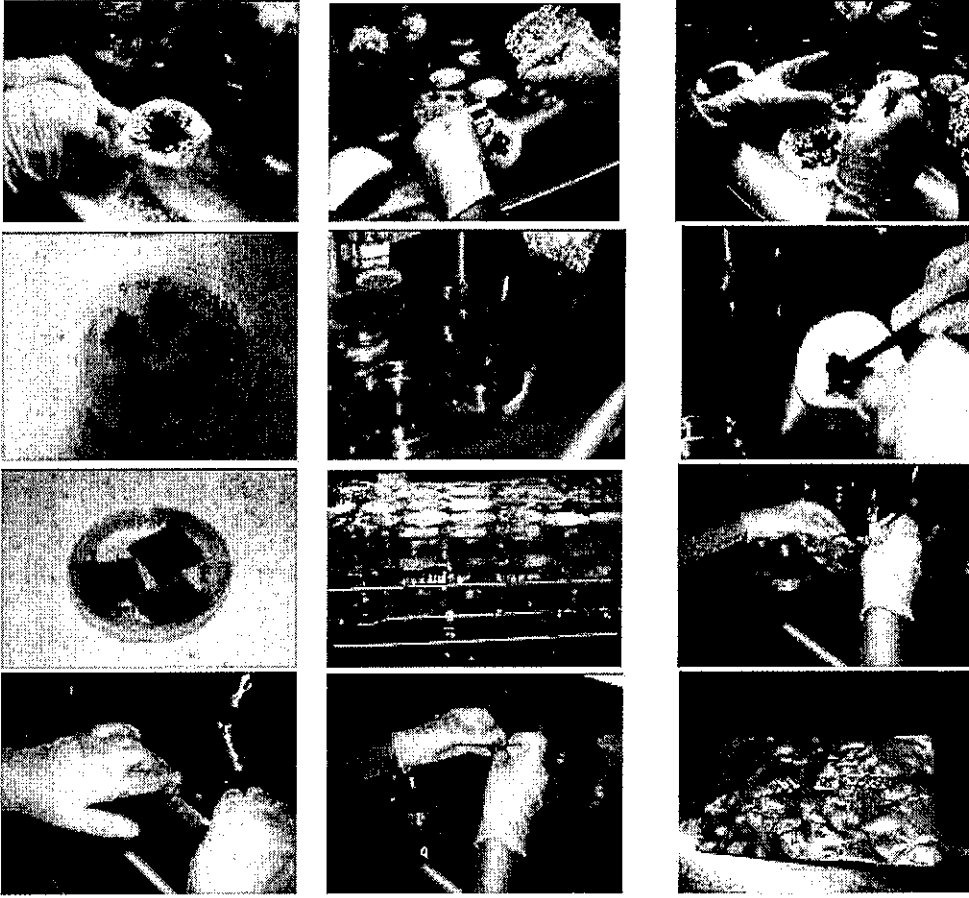
kurur. Sterilize edilmiş alüminyum folyelerin içerisine her bir izolatu içeren küçük filtre kağıtları pens yardımıyla yerleştirilir. Alüminyum folyeler katlanır ve torba içerisine konulur. Katlanmış alüminyum folye bohçacıklarının üzerine izolatin adı (CL.Tür.1.0) ya da numarası ve tarih yazılır (Şekil 5). Böylece değişik bölgelerden toplanmış olan antraknoz koleksiyonu düzenlenmiş olur. -20°C'de dondurucuya yerleştirilir (Awale 2007).

İnokülasyon için spor süspansiyonunun hazırlanması

Fasulyelere inokülasyon yapılacağı gün, önce Thoma lamında spor sayımı yapılır. İzolatin bulunduğu petri kutusuna 10 ml saf steril su konularak fırça yardımıyla sporlar kazınır. Daha sonra 4 katlı bir tülbent kullanılarak süzme işlemi gerçekleştirilir. Böylece misellerin, ortam olarak kullanılan PDA parçacıklarından ayrılması sağlanır (Şekil 6). *C.lindemuthianum* fungusunun spor konsantrasyonu Thoma lamı kullanılarak $1,2 \times 10^6$ ya ayarlanmalıdır (Pastor-Corrales ve ark. 1995; Balardin ve Kelly 1998).

Sera ve laboratuvar koşullarında inokülasyonların yapılması

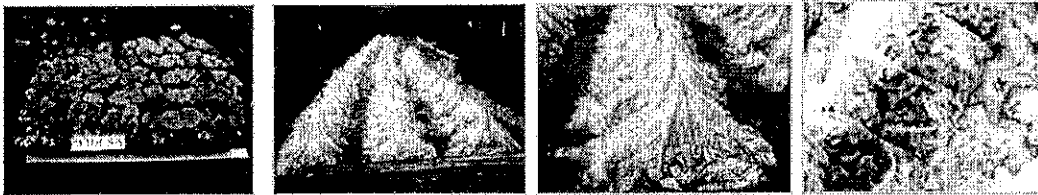
Elde edilen inokulum kaynağı, sera koşullarında 10 günlük fidelerin ilk gerçek yapraklarına ve laboratuvar koşullarında ise 10 günlük koparılmış yaprakların her birine püskürtme yöntemiyle uygulanabilir (Bigirimana ve ark. 2000). Serada test edilecek fasulye çeşidi tohumları, viyollere ekilir; çıkışından 10 gün sonra fasulye fidelerinin ilk gerçek yapraklarına (Şekil 7 a) hastalık etmeninin spor süspansiyonundan püskürtülür. İnokülasyon yapılmış viyoller, ıslatılmış olan naylon torbaların içerisine yerleştirilir (Şekil 7 b). Naylon torbaların yapraklara zarar vermemesi için viyollerin orta kısmına 30 cm'lik çubuklar dikilir (Şekil 7 c). Viyollerin içinde bulunduğu torbaların ağzı sıkıca bağlanır ve torbaların üst kısmına 5-6 delik açılır. İnokülasyon işleminden geçirilen viyollerin, serada sisleme düzeneğinin altına yerleştirilmesi, direkt güneş ışığına maruz kalmaması ve nemini koruması için üst kısımdan 'net (ağ)' ile gölgelendirme yapılması yararlı olur. İnokülasyon yapılmış fideler 2.5 gün torbalar içerisinde kapalı tutulur. Günün sıcak saatlerinde sislemenin çalıştırılması sayesinde antraknozun fidelerde gelişimi için gerekli olan nem sağlanabilir ve ortam serin tutulur. 2.5 gün sonra viyollerin ağzı yavaş yavaş açılarak bitkiler dış ortama alıştırılabilir (Şekil 7 d). Fidler bir gün boyunca dış koşullara alıştırıldıktan sonra, naylon torbalar tamamen açılır. Günün sıcak saatlerinde sislemenin çalıştırılmasına devam edilmelidir. İlk gözlemler 5-7 gün sonra alınmaya başlanır. Ancak bazı çeşitlerde belirtiler daha geç ortaya çıkabilir, bu durumda gözlemlere 15 gün boyunca devam edilmesi gerekebilir. Değerlendirmeler 0-9 skalasına göre yapılmalıdır (Balardin ve Kelly 1998).



Şekil 5. İzolatların -20°C'de muhafazası için yapılan işlemler



Şekil 6. Spor süspansiyonunun hazırlanması



Şekil 7 a. inokülasyon öncesi bitkilerin görünüşü, b. inokülasyonundan sonra viyollerin torbalara alınması, c. plastik torbaların yükseltilmesi, d. bitkilerin dış koşullara alıştırılması

Laboratuvar koşullarında koparılmış yaprak metodunun kullanılmasında 10 cm çapında petri kutuları kullanılabilir. Her petriye 2'şer yaprak konularak (Şekil 9) ve 20 ml steril saf su ilave edilmesi uygundur. Koparılmış yapraklar petrilerin içine üst yüzeyi alta gelecek şekilde yerleştirilmelidir. Yaprakların alt yüzeyine $1,2 \times 10^6$ spor/ ml'lik hazırlanmış olan inokulum, püskürtme yöntemiyle bulaştırılır. İklim dolabının nemi % 100'e ve sıcaklık

21°C'ye ayarlandıktan sonra koparılmış yapraklarda *C.lindemuthianum* fungusunun çimlenmesi için petri kutuları 2 gün karanlıkta bekletilir ve üst kısımları kaba filtre kağıtlarıyla örtülür. İki günden sonra ışıklandırma, 12 saat aydınlık (1200 lux ışık şiddeti) ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmalıdır. Hastalık belirtilerine ait gözlemler sera koşullarında olduğu gibi 5-7 gün sonra alınabilir ve 0-9 skalasına göre değerlendirilir (Bigirimana ve Höfte 2001).



Şekil 9. Koparılmış yaprak metoduna göre inokülasyon yönteminin uygulanışı

İnokülasyon sonrasında yapılan gözlem ve değerlendirmeler

Sera ve laboratuvar koşullarında fasulye çeşitlerinin kullanılan izolata karşı göstermiş olduğu reaksiyonlar, 0-9 skalasına göre belirlenir (Pastor-Corrales 1992):

- 0-1 : Hastalıkla ilgili hiçbir belirtinin bulunmaması,
- 2 : Alt yaprak yüzeyinde orta damar üzerinde birkaç küçük lezyon bulunması,
- 3 : Yaprak yüzeyinin alt kısmında orta damarları üzerinde daha sık küçük lezyonlar (toplam alanın % 1'ni örter) bulunması,
- 4 : Orta damarda mevcut lezyonlar ve bazen yaprak yüzeyinde ikinci damarlarda lezyonların görülmesi,
- 5 : Orta ve ikinci yaprak damarları üzerinde biraz küçük yayılmış lezyonlar (toplam yaprak alanının % 5'ni örten daha küçük lezyonlar) bulunması,
- 6 : Yaprakların alt ve üst yüzeyinde ve gövdelerde ve petiollerde 5. derecedekine benzer birkaç küçük lezyon bulunması,
- 7 : Yaprığın sırt kısmında yayılmış geniş lezyonlar ve gövde, petiollerde birkaç

lezyon (yaprak alanının % 10'nu örten geniş lezyonlar) bulunması,

- 8 : Kahverengi dokular tarafından meydana getirilmiş, genişleyip birleşmiş lezyonlar, klorotik ve apsis yaprakçıkları bitki büyümesinde azalma ve petiollerde birçok lezyon bulunması,
- 9 : Bitkilerin şiddetli bir şekilde hastalanması veya ölmesi (yaprakların % 15 ve daha çoğunu örten geniş lezyonlar).

Skalaya göre her bir bitkiden elde edilen değerler iki sınıfta toplanır. Yapraklar 0- 3 arasında değer almışsa "dayanıklı", eğer 4-9 arasında değer almışsa "duyarlı" olarak kaydedilir (Balardin ve Kelly 1998) (Şekil 10).

Koparılmış yaprak metodunda ise; 8 ve 9 skala değerleri yaprak yüzeyini yüzde olarak örten lezyon genişliğine göre değerlendirilebilir (Şekil 11). İrk tayininin yapılması gerekiyorsa, bu derlemenin birinci bölümünde ve Madakbaş (2007) tarafından açıklanan yöntemler izlenmelidir.



Şekil 10. Sera koşullarında *C.lindemuthianum* fungusuyla bulaştırılmış yapraklar



Şekil 11. Laboratuvar koşullarında *C.lindemuthianum* fungusuyla bulaştırılan koparılmış yapraklar

Balardin ve ark. (1990) ile Pastor-Corrales (1991)'in de belirttiği gibi; yapay inokülasyonların uygulanmasında ıslahçı, patojen dozunu tam olarak ayarlayıp, püskürtme araçları kullanılmalıdır. Sera ve iklim odalarında bitkilerin içinde bulunacağı çevre koşulları, ıslahçının -bitki türünün- isteklerine uygun olarak kontrollü olarak ayarlanmalıdır. Fasulye antraknozu konusunda çalışılırken, herhangi bir genotipe ait birkaç adet bitki ile dayanıklılık testleri yapılabilir. İnokülasyonda kullanılan inokulum, bölgedeki doğal popülasyondan izole edilmiş fizyolojik ırklardan meydana gelmelidir. Hastalıklı bitkilerden izole edilmiş fizyolojik ırklar, dayanıklılık genlerinin teşhisinde ve bu genleri ticari çeşitlere aktarmada kullanılır. Bir bölgede bulunmayan fizyolojik ırklarla çalışırken, o fizyolojik ırkları bölgeye bulaştırarak yaymaktan kaçınılmalıdır. Fizyolojik ırkların bitkilerde yapmış olduğu zararları değerlendirmede çeşitli skalalardan yararlanılır. Bitkilerin dayanıklılık derecesini belirlemek ve bunu istatistiki olarak değerlendirmek için, uluslararası kabul görmüş olan 0-9 skalası kullanılmaktadır.

İnokülasyon işleminin oldukça emek isteyen ve bitkisel materyalin yetiştirilmesine, uygun iklim koşullarının sağlanmasına ihtiyaç göstermesi, ayrıca fiziksel olarak de alana gereksinim duyulması nedeniyle pek çok dalda olduğu gibi fitopatolojide de moleküler tekniklerin kullanımını gerekli kılmaktadır. Her ne kadar klasik inokülasyon yöntemleri her zaman geçerliliğini koruyacaksa da, yoğunluk günümüzde giderek moleküler yöntemlerin kullanımına doğru yönelmektedir. Moleküler markörlerle yardımcı seleksiyon ıslahı (MYS) geleneksel sera temelli inokülasyon işlemlerine nazaran, erken dönemde seleksiyon imkanı sağlaması ve çevre şartlarından etkilenmeyen genotip temelli seleksiyon olanağı vermesi açısından büyük avantajlar sağlamaktadır. SSR (mikrosatellite), RAPD (Random-amplified fragment) DNA dizilerinin co-dominant moleküler STS (sequence-tagged-sequence) ve SCAR (sequence-amplified regions) markörler kullanılarak yapılan seleksiyon uygulamaları, antraknoz dayanıklılık çalışmalarında da yer bulmaya başlamıştır (Young ve ark. 1998; Ragagnin ve ark. 2003; Mendez-Vigo ve ark. 2005). Markörler yardımıyla seleksiyon yapılması, zaman ve işgücünü azaltacağından bu konudaki çalışmaların da ivme kazanacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Awale H., E.Falconi, J.C.Villatorra, J.D. Kelly, 2007. Control and characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Ecuador and Guatemala. Annu.Reprt. Bean Coop. 50:85-86.

Balardin, R.S., M.A. Pastor- Corrales, M.M. Ofoya, 1990. Variabilidad de patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum* no Estado de Santa Catarina. Fitop. Bras., 15: 243-245.

Balardin, R.S., J.D. Kelly, 1998. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* races and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. J. of Amer. Soc. Hort. Sci., 123: 6, 1038 -1047.

Bigirimana, J., P. Rop de, R. Fontain, M. Höfte, 2000. Bean anthracnose: Infection methods and influence of plant stage on resistance. Proceedings, 52nd international symposium on crop protection, Gent, Belgium, 9 May

2000, part II. Mededelingen Faculteit Lndbouwkundige en Toege Paste Biologische Wetenschappen Universitaet Gent., 65-2b, 583-585.

Bigirimana, J., M. Höfte, 2001. Bean anthracnose inoculation methods and influence of plant stage on resistance of *Phaseolus vulgaris*. J.Phytopathology, 149, 403-408.

Goncalves-Vidigal, M.C., C. Thomazella, H.T. Elias, P.S. Vidigal-Filho. 2004. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates by using differential cultivars. Annu. Rep. Bean Improv. Coop., 47: 53-54.

Kelly, J.D., V.A. Vallejo, 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. HortScience. 39:1196-1207.

Madakbaş S.Y., S. Dolar, H. Bayraktar, Ş. Ellialtıoğlu, 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. 19-22 Eylül 2006 Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi VI. Sebze Tarım Sempozyumu, 138-142.

Madakbaş, S.Y., 2007. Fasulye antraknozu (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lambs. Scrib) hastalığına dayanıklılığın kalıtımı üzerine araştırmalar (Doktora tezi). Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Ankara, 107s.

Madakbaş S.Y., Ş. Ellialtıoğlu, F.S. Dolar, H. Bayraktar. 2009. Fasulye antraknozu hastalık etmeni (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lambs. Scrib.) ırklarının belirlenmesi: I. 12'lik ayırım seti 'Differential Set' çeşitlerinin özellikleri ve ırk tayini tablosunun kullanılması. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi (İncelemede).

Mathur, R.S., H.L. Barnett, V. Lilly, 1950. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. Phytopathology, 40: 104 -114.

Mendez-Vigo, B., C. Rodriguez-Suarez, A. Paneda, J.J. Ferreira, R. Giraldez, 2005. Molecular markers and allelic relationships of anthracnose resistance gene cluster B4 in common bean. Euphytica, 143: 237 -245.

Pastor-Corrales, M.A. 1991. Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. Phytopathology, 81: 694.

Pastor-Corrales, M.A., 1992. Recomendaciones y acuedas del primer tallen de antracnosis en América Latina. Pages: 240-250. In: La antracnosis del Frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina. Doc.de trabajo 113-Centro internacional de agricultura tropical, Cali, Colombia.

Pastor-Corrales, M.A., M.M. Okaya, A. Molina, S.P.Singh, 1995. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. Plant Disease, 79; 1, 63 -67.

Ragagnin, V.A., D.A. Sanglard, T.L.P.O. De Souza, M.A. Moreira, E.G. De Barros, 2003. Simultaneous transfer of resistance genes for rust, anthracnose, and angular leaf spot to cultivar Perola assisted by molecular markers. Annu. Rep. Bean Improv. Coop., 46: 159-160

Young, R.A., J.D. Kelly, 1996. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. Plant Disease, 80 (6), 650 -654.

Young, R.A., M. Melotto, R.O. Nodira, J.D. Kelly, 1998. Marker- assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar G 2333. Theor. Appl. Genet., 96: 87- 94.