



**TOPRAK BAKTERİLERİNİN PGPR
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASINDA
PCR TEMELLİ MOLEKÜLER
TEKNİKLERİN UYGULANMASI**

Burak ALAYLAR

Doktora Tezi

**Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE**

2017

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TOPRAK BAKTERİLERİNİN PGPR ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASINDA PCR TEMELLİ MOLEKÜLER
TEKNİKLERİN UYGULANMASI**

Burak ALAYLAR

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

TOPRAK BAKTERİLERİNİN PGPR ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASINDA PCR
TEMELLİ MOLEKÜLER TEKNİKLERİN UYGULANMASI

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Burak ALAYLAR tarafından hazırlanan bu çalışma, 18/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza :

Üye : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **04/01/2018** tarih ve ...**1**.../...**10**..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: TAGEM-15/ARGE/70

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

TOPRAK BAKTERİLERİNİN PGPR ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASINDA PCR TEMELLİ MOLEKÜLER TEKNİKLERİN UYGULANMASI

Burak ALAYLAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada, Erzurum ve çevresindeki zirai alanlardan rizosferik toprak örnekleri toplanmış ve aseptik koşullarda laboratuvar ortamına taşınmıştır. Bu örneklerden saf bakteriyel izolatlar elde edilerek saflaştırılmış ve bunların arasından azot fiksasyonu, fosfat çözme ve IAA üretme bakımından PGPR özelliği gösterenler konvensiyonel yöntemler kullanılarak seçilmiştir. Aktif izolatların tanımlanmasında klasik mikroskopik incelemeler ve moleküler teknikler kullanılmıştır. İzolatların moleküler identifikasyonu evrensel 16S rRNA gen bölgesine spesifik primerlerinin kullanıldığı PCR uygulaması, amplikonların sekans analizleri ve NCBI veri tabanında BLAST analizi ile yapılmıştır. Daha sonra bu aktif izolatlar bu özelliklerin araştırılmasında kullanılabilecek PCR temelli moleküler tekniklerin uygulanması için kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda PGPR özelliği tespit edilen 34 aktif izolat belirlenmiş ve moleküler tanımları yapılmıştır. Ayrıca bu izolatların kullanılmasıyla azot fiksasyonu ile ilişkili *nif*, fosfat çözündürme ile ilişkili *pqq* ve IAA üretimi ile ilişkili *ipdc* gen bölgeleri için spesifik yeni primer çiftleri tasarlanmıştır.

2017, 150 sayfa

Anahtar Kelimeler: 16S rRNA, Azot fiksasyonu, Fosfat çözme, IAA üretimi, PCR, PGPR.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IMPLEMENTATION OF PCR-BASED MOLECULAR TECHNIQUES FOR STUDYING PGPR PROPERTIES IN SOIL BACTERIA

Burak ALAYLAR

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In the present study, rhizospheric soil samples were collected from agricultural regions in Erzurum and near locations, and aseptically transferred to the laboratory. Pure bacterial isolates were obtained and active ones were selected by using conventional methods according to the PGPR criteria that include nitrogen fixation, phosphate solubilization and IAA production. Conventional microscopic examinations and molecular techniques were used for identification of the active isolates. Molecular identification of the isolates was done by using PCR with universal primers for 16S rRNA gene region, sequencing of amplicons and the BLAST analysis of NCBI database. These active isolates were then used to develop PCR-based molecular techniques that could be used to investigate these properties.

According to the results, 34 active isolates with PGPR property were determined and their molecular characterization was done. In addition, using these isolates, new pairs of specific primers were designed for the nitrogen fixation-related *nif*, phosphate dissolution-related *pqq* and IAA production related *ipdc* gene regions.

2017, 150 pages

Keywords: 16S rRNA, Nitrogen fixation, Phosphate solubilization, IAA production, PCR, PGPR.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü TAGEM (TAGEM-15/ARGE/70) tarafından desteklenmiş olup, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Atatürk Üniversitesi Rektör Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye ve Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ümit İNCEKARA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. Mehmet KARADAYI'ya, Sayın Arş. Gör. Dr. Gökçe KARADAYI'ya çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımlarını gördüğüm, Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a, Sayın Uzman Biyolog Selma SEZEN'e Sayın Uzman Biyolog Taha Yasin KOÇ'a, Sayın Uzman Biyolog Abdussamed Yasin DEMİR'e Sayın Uzman Biyolog Selin DOĞAN'a, Sayın Uzman Biyolog Ceyda IŞIK'a Sayın Arş. Gör. Dr. Neslihan HİDİROĞLU İSPİRLİ'ye, Sayın Kimyager Mine İSAOĞLU'na, Sayın Çevre Mühendisi Ekrem GÜLLÜCE'ye ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli annem Meryem ALAYLAR'a, babam Mehmet Selim ALAYLAR'a ve kız kardeşlerim Nazan ALAYLAR'a, Pınar ALAYLAR'a ve Burcu ALAYLAR'a teşekkür ederim.

Burak ALAYLAR

Aralık, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteriler (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR).....	5
2.2. PGPR Türlerinin Biyofertilizer Olarak Kullanımı	7
2.2.1. Biyofertilizerin tanımı	7
2.2.2. Biyofertilizer özellikli PGPR türlerinin konukçu bitkilerle etkileşimi	8
2.2.3. Biyofertilizer olarak PGPR türlerinin etki mekanizmaları.....	10
2.2.3.a. Biyolojik azot fiksasyonu	10
2.2.3.b. Fosfat çözen bakteriler	15
2.2.3.c. PGPR türlerinin toprak streslerinin azaltılmasında kullanımı	20
2.3. PGPR Türlerinin Biyostimulant Olarak Kullanımı	21
2.3.1. Bitki büyüme teşvik edicilerinin üretiminde PGPR kullanımı.....	23
2.3.2. PGPR türleri tarafından üretilen fitohormonlar.....	25
2.3.2.a. İndol-3-asetik asit (IAA).....	25
2.3.2.b. Sitokininler	26
2.3.2.c. Giberellinler.....	27
2.3.2.d. Etilen	28
2.4. PGPR Türlerinin Biyoprotektant Olarak Kullanımı.....	31
2.4.1. Hidrojen siyanid (HCN) üretiminde PGPR kullanımı	32
2.4.2. Siderofor üretiminde PGPR kullanımı	33
2.4.3. PGPR türlerinin antifungal aktivitesi	34
2.4.4. Patojenlerin kontrolü	35

2.4.5. PGPR türleri tarafından kitinaz ve glukanaaz üretimi	36
2.4.6. PGPR türleri tarafından antibiyotik üretimi	37
2.5. PGPR Türlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	38
2.5.1. Konvensiyonel yöntemler.....	38
2.5.2. Moleküler yöntemler	39
2.5.2.a. Molibdenli nitrogenaz (<i>Nif</i>) geni	39
2.5.2.b. Pirolokinolin kinon (<i>Pqq</i>) geni	43
2.5.2.c. İndol piruvat dekarboksilaz (<i>IPDC</i>) geni	45
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	47
3.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler	48
3.2. Yöntem	56
3.2.1. Toprak bakterilerinin temini ve izolasyonu.....	56
3.2.2. Toprak bakterilerinin çalışma stoklarının hazırlanması ve saklanması.....	56
3.2.3. Konvensiyonel yöntemlerle PGPR türlerinin tespit edilmesi.....	57
3.2.3.a. Azot fiksasyonu yapan izolatların belirlenmesi.....	57
3.2.3.b. Fosfatlı bileşenleri çözebilen izolatların belirlenmesi.....	57
3.2.3.c. IAA üreten izolatların belirlenmesi	57
3.3. Konvensiyonel Yöntemlere Alternatif Olabilecek PCR Temelli	
Moleküler Yöntemlerin Geliştirilmesi	58
3.3.1. DNA izolasyonu	58
3.3.2. DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının	
hazırlanması	60
3.3.3. DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu	60
3.3.4. Bakteri izolatlarının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu.....	60
3.3.5. PGPR nitelikleri için ilgili gen bölgelerinin belirlenmesi	62
3.3.6. <i>In silico</i> uygulamalarla çalışmada kullanılacak ilgili bölgelere ait	
primerlerin tasarlanması.....	63
3.3.7. Tasarlanan gen spesifik primerlerle PCR uygulamaları.....	64
3.3.8. Sonuçların değerlendirilmesi.....	64
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	65

4.1. Toprak Örneklerinin Alınması ve Bakteri İzolasyonu	65
4.2. Moleküler Tanı Sonucu Belirlenen Bakteri Türleri	66
4.3. Test Bakterilerine Konvensiyonel Yöntemlerin Uygulanması	68
4.3.1. Azot fiksasyonu deneyleri	68
4.3.2. Fosfat çözme deneyleri.....	70
4.3.3. IAA üretme deneyleri	71
4.4. Test Bakterilerine Moleküler Yöntemlerin Uygulanması	73
4.4.1. Azot fiksasyonuna yönelik moleküler deneyler	73
4.4.2. Fosfat çözmeye yönelik moleküler deneyler	78
4.4.3. IAA üretmeye yönelik moleküler deneyler	88
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	90
KAYNAKLAR	98
EKLER	117
EK 1.....	117
EK 2.....	118
EK 3.	119
EK 4.....	120
EK 5.....	121
EK 6.....	122
EK 7.....	123
EK 8.....	124
EK 9.....	125
EK 10.....	126
EK 11.....	127
EK 12.....	128
EK 13.....	129
EK 14.	130
EK 15.....	131
EK 16.....	132
EK 17.....	133
EK 18.....	134
EK 19.....	135

EK 20.....	136
EK 21.....	137
EK 22.....	138
EK 23.....	139
EK 24.	140
EK 25.....	141
EK 26.....	142
EK 27.....	143
EK 28.....	144
EK 29.....	145
EK 30.....	146
EK 31.....	147
EK 32.....	148
EK 33.....	149
EK 34.....	150
ÖZGEÇMİŞ	151

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece (Sıcaklık)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶)
µM	Mikromolar
A	Adenin
AMP	Adenozin monofosfat
C	Sitozin
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
Dntp	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FeSO ₄	Demir (II) Sülfat
g	Gram
G	Guanin
IAA	İndol-3-Asetik Asit
L	Litre
LB Broth	Luria Bertani Broth
M	Molar
ml	Mililitre (10 ⁻³)
mM	Milimolar
NA	Nutrient agar
NaCl	Sodyum klorür
Nm	Nanometre
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodasil sülfat
T	Timin
TBE	Tris-EDTA borat tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu

TSA	Tryptic Soy Agar
U	Urasil



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PGPR türleri tarafından topraktaki fosfor çözünmesinin şematik gösterimi	19
Şekil 2.2. Etilen fitohormonun bitkiler üzerindeki etkileri	30
Şekil 2.3. PGPR türleri tarafından antibiyotik üretimi.	38
Şekil 2.4. <i>Azotobacter vinelandii</i> ’de azot fiksasyonu için gerekli minumum <i>nif</i> geninin gösterimi	40
Şekil 2.5. Nitrogenazın yapısı ve biyosentezinde gerekli genlerin gösterimi.....	41
Şekil 2.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> operonunda <i>Pqq</i> biyosentezi	45
Şekil 2.7. Prokaryotlarda IAA sentezinin şematik gösterimi.....	46
Şekil 4.1. Azot fiksasyonu yapabilen ve yapamayan bakterilerin AFM agar besiyeri üzerinde gelişim durumlarının gösterilmesi.....	70
Şekil 4.2. Fosfatlı bileşenleri çözebilen ve çözemeyen bakterilerin Pikovskaya’s agar besiyeri üzerinde gelişim durumları ve berrak zon oluşumu.....	71
Şekil 4.3. Test bakterilerinin IAA üretebilme potansiyellerinin kolorimetrik olarak incelenmesi	73
Şekil 4.4. Azot fiksasyonu (+) özellikli test bakterilerinin Kadino/Emino primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	73
Şekil 4.5. Azot fiksasyonu (–) özellikli test bakterilerinin Kadino/Emino primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	74
Şekil 4.6. Azot fiksasyonu (+) özellikli test bakterilerinin NifH1/NifH2 primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	74
Şekil 4.7. Azot fiksasyonu (–) özellikli test bakterilerinin NifH1/NifH2 primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	75
Şekil 4.8. Azot fiksasyonu (+) özellikli test bakterilerinin F2/R6 primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	76
Şekil 4.9. Azot fiksasyonu (–) özellikli test bakterilerinin F2/R6 primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	76

Şekil 4.10. Azot fiksasyonu (+) özellikli test bakterilerinin NifA1F/NifA1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	77
Şekil 4.11. Azot fiksasyonu (–) özellikli test bakterilerinin NifA1F/NifA1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	78
Şekil 4.12. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqBCDF/PqqBCDR primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	79
Şekil 4.13. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqBCDF/PqqBCDR primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	79
Şekil 4.14. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqFF/PqqFR primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	80
Şekil 4.15. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqFF/PqqFR primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	81
Şekil 4.16. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin Pqq5F/Pqq5R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	81
Şekil 4.17. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin Pqq5F/Pqq5R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	82
Şekil 4.18. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqA2F/PqqA2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	83
Şekil 4.19. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqA2F/PqqA2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	84
Şekil 4.20. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqB1F/PqqB1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	84
Şekil 4.21. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqB1F/PqqB1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	85
Şekil 4.22. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqB2F/PqqB2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	86
Şekil 4.23. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqB2F/PqqB2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	86
Şekil 4.24. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqF2F/ PqqF2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	87

Şekil 4.25. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqF2F/ PqqF2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları.....	88
Şekil 4.26. IAA üretme yeteneği (+) olan test bakterilerinin avbgltx1F/avbipd c1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	89
Şekil 4.27. IAA üretme yeteneği (+) olan test bakterilerinin ipdc6F/ipdc6R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları	89



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	PGPR türlerinin etki mekanizmaları.....	6
Çizelge 2.2.	Atmosferik azot fikse edebilen PGPR türlerinin konukçu bitkiler üzerindeki ilişkileri.....	14
Çizelge 2.3.	PGPR türleri tarafından üretilen fitohormonlar	30
Çizelge 2.4.	Azot fiksasyonunda görev alan (<i>nif</i>) gen ürünleri ve fonksiyonları	42
Çizelge 3.1.	PGPR özelliği gösteren ilgili gen bölgeleri	62
Çizelge 3.2.	Literatürde yer alan primerlerin baz dizilimi.....	62
Çizelge 3.3.	Tasarlanan primerlerin baz dizilimi.....	63
Çizelge 4.1.	Arazi çalışmasına ait konum ve örnekleme bilgileri	65
Çizelge 4.2.	Moleküler tanı sonucu belirlenen bakteri türleri	66
Çizelge 4.3.	Test bakterilerinin azot fiksasyonu potansiyellerinin konvensiyonel yöntemlerle belirlenmesi	69
Çizelge 4.4.	Test bakterilerinin fosfatlı bileşikler çözebilme potansiyellerinin konvensiyonel yöntemlerle belirlenmesi.....	70
Çizelge 4.5.	Test bakterilerinin IAA üretebilme potansiyellerinin konvensiyonel yöntemlerle belirlenmesi	72

1. GİRİŞ

Son yıllarda hızla artmakta olan dünya nüfusu, insan yaşamının temel gereksinimlerinden biri olan gıda ihtiyacının da artmasına sebep olmuştur. Bu durum mevcut zirai çalışmaların geliştirilmesi ve bu çalışmalar neticesinde çeşitli stratejilerin belirlenmesi ile sonuçlanmıştır. Bu alanda ilk geliştirilen stratejilerde pestisitler ve kimyasal gübrelerin kullanımında önemli artışlar olmuş ve kısa vadede taleplerin karşılanabilmesi için alternatif bir çözüm üretilmiştir. Bununla birlikte geçen zaman içerisinde bu kimyasalların üretim maliyetlerinin artması ve bunların aşırı kullanımları hem ekonomik hem de çevresel sorunların ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır (Chauhan *et al.* 2015; Vejan *et al.* 2016; Vimal *et al.* 2017).

Dünya Gıda ve Tarım Örgütü 2011 yılı verilerine göre; yeryüzünde hızla devam etmekte olan kuraklaşma, sürekli değişen iklim koşulları, patojenler, pestisitlerin ve insan kaynaklı etkenlerin çevreye vermiş olduğu zararlar yaklaşık 24 milyar ton verimli ürün alınabilecek toprağın kaybına sebep olmuştur (Gopalakrishnan *et al.* 2014; Chauhan *et al.* 2015; Haiyambo *et al.* 2015; Ruzzi and Aroca 2015).

Mevcut olan bu tablo daha ekonomik ve çevreci stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmış ve araştırma odaklarını topraktaki kimyasal maddelerin azaltılmasını hedefleyen çevre dostu ürün miktarında ve kalitesinde artış sağlayacak alternatif doğal yöntemlerin geliştirilmesine yöneltmiştir. Bu yöntemlere; doğal gübrelerin kullanımının arttırılması, kompost, hasat kalıntıları gibi birçok ürün için yönetim stratejilerinin geliştirilmesi; toprakların nadasa bırakılmaları, birden fazla ürünün aynı anda ekilmesi ya da her yıl farklı bir ekin ekerek topraklarda ürün rotasyonunun sağlanması gibi farklı uygulamalar örnek olarak verilebilir (Vimal *et al.* 2017).

Yapılan güncel araştırmalarda özellikle biyolojik gübrelerin hazırlanması ve bu gübrelerin kullanımı ile toprak verimliliğinin arttırılabildiği, kimyasal gübrelerin kullanımından zarar görmüş toprak yapısının iyileştirilebildiği ve ürün kalitesinin

önemli ölçüde arttırılabildiği gösterilmiştir. Günümüzde bu mikrobiyolojik gübrelerin hazırlanmasında; bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (plant growth promoting rhizobacteria - PGPR) önemli bir yer teşkil etmektedir (Sharan and Nehra 2011; Gopalakrishnan *et al.* 2014; Chauhan *et al.* 2015).

Rizobakteriler toprakta doğal olarak bulunan, yoğun bir şekilde bitki köklerinin çevresinde ve üzerinde kolonize olan, bitki gelişimine katkı sağlayan veya bitki patojenleri gibi zararlı ajanlara karşı bitkilerin korunmasını teşvik edici toprak bakterileridir. Zirai bitkilerin erken gelişimi safhasında, inoküle edilen bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler sayesinde bu bitkilerin kök ve gövdelerinde biyokütle artışının meydana geldiği bilinmektedir. Yine bu bakterilerin süs bitkilerine inokülasyonunda ise; tohum çimlenmesi, bitki sertliği, klorofil miktarı, baklagillerdeki nodül sayısı, dokulardaki besleyici nitelikteki madde artışı gibi olgular bitkilerin daha uzun süre sağlıklı kalabilmesini sağlamaktadır (Sharan and Nehra 2011; Ruzzi and Aroca 2015; Zaidi *et al.* 2015). Biyofertilizer, biyoprotektan ve biyostimulant özelliklerinden dolayı rizobakteriler; tarımda kullanılan birçok zararlı kimyasal gübrenin, pestisitlerin ve hormonların yerini alabilecek çevre dostu, toprak verimini arttıran, ürün kalitesine olumlu etki göstermektedir. Günümüzde dünya genelindeki birçok bilim adamı bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin zirai ve ekolojik uygulamalarıyla ilgili çalışmalara önem vermekte ve bu konuyla ilgili bilimsel verileri insanlığın hizmetine sunmaktadır (Bhattacharyya and Jha 2012; Mire *et al.* 2016; Odoh 2017).

Rizobakteriler ile ilgili yapılan akademik çalışmalar incelendiğinde bugüne kadar azot fiksasyonu, fosfat çözebilme yeteneği, IAA üretimi gibi çeşitli bitki büyümesini teşvik edici hormonları üretebilme, siderofor bileşenleri üretebilme gibi bitki büyümesini teşvik edici rizobakteri olma özelliğinin tespit edilmesinde konvensiyonel yöntemler kullanılmış ve bu yöntemler sayesinde birçok bakterinin PGPR özellikleri tespit edilmiştir (Vaikuntapu 2014; Zafar *et al.* 2017). Bununla birlikte bu alanda yapılan araştırmaların sayısındaki önemli artış, konvensiyel yöntemlerin yerini alabilecek daha

güvenilir, ekonomik, kolay ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı son yıllarda bu ihtiyacın karşılanması için doğrudan PGPR özelliklerinin ortaya çıkmasından sorumlu gen bölgelerini hedef alan PCR temelli moleküler tekniklerin kullanılması en önemli yaklaşımlardan birisi haline gelmiştir. Örneğin; Bruto ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış oldukları çalışmada, çeşitli PGPR türlerinin spesifik gen aileleri incelenmiş ve ACC deaminaz (*acdS*), fosfat çözebilme (*pqqB*, *pqqC*, *pqqD*, *pqqE*, *pqqF*) ve azot fiksasyonu (*nifD*, *nifH*, *nifK*) ile ilgili çok sayıda gen tanımlanmıştır. Yine literatürdeki benzer birçok güncel çalışmada da PGPR ile ilişkilendirilebilecek çok sayıdaki spesifik genin bilgisine de ulaşmak mümkündür (Spaepen *et al.* 2008; Mashiguchi *et al.* 2011; Bruto *et al.* 2014; Nascimento *et al.* 2014; Won *et al.* 2014; Borland *et al.* 2015; Cho *et al.* 2015; Parsons *et al.* 2015). Buna karşın halen PGPR türlerinin güvenilir, ekonomik, kolay ve hızlı olarak analiz edilmesine olanak sağlayacak yeni moleküler tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut tez çalışmamızda azot fiksasyonunda önemli rol üstlenen *nif* geni, fosfat çözünmesinde *pqq* geni, IAA üretiminde ise *ipdc* geni PGPR özelliklerinin araştırılmasında önemli görevler almaktadır. *Nif* genleri azot fiksasyonuna katılan genlerdir. Bu genler azot fiksasyonu yapabilen bakterilerde bulunmaktadır. *Klebsiella pneumoniae* gibi serbest yaşayan azot fiksasyonu yapabilen bakterilerde bir operon olarak ortaya çıkmaktadır. *Nif* genleri azot fiksasyonunda gerekli nitrogenaz ve bazı düzenleyici proteinleri kodlar. Azot fiksasyonunda yaklaşık 20 farklı *nif* gen ürünü görev almaktadır (Dahal 2016).

Pirolokinolin kinon (PQQ) biyosentezinde yer alan genler birçok mikroorganizmada PQQ operonunun bir parçası olarak tanımlanmıştır. *Pqq* geni operon yapısının sayısı ve bulundukları mikroorganizmaya göre değişmektedir. PQQ, bitki büyümesini destekleyen önemli bir faktör olarak düşünülmüştür. PQQ bakteri ve bitkilerde hücre çoğalmasını ve stres toleransını destekleyen bir vitamin olarak da düşünülmektedir. Son

zamanlarda yapılan çalışmalar ise bu genin ürünlerinin fungal patojenlere karşı bir biyokontrol maddesi olarak işlevlerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Yüksek oranda PQQ üreten bakteriler, çeşitli bakteri cinslerinde tespit edilmiştir. Bu bakteriler arasında; *Acinetobacter*, *Ancylobacte*, *Gluconobacter*, *Hyphomicrobium*, *Klebsiella*, *Paracoccus*, *Polyporus*, *Pseudomonas*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methylovorus*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Thiobacillus*, ve *Xanthobacter* yer almaktadır. PQQ önemli bir fosfat çözücü faktördür. PQQ üreten bakterilerin birçoğu inorganik fosfat zebilmektedirler. Bu bakterilerde ise fosfat çözme yeteneğine sahip *pqq* genleri yer almaktadır (An 2016).

IpdC geni, indol piruvat dekarboksilaz enzimini kodlar ve İndol-3-Piruvat (IPA) yolağındaki ana basamağı katalize eder ve IAA retimi yapan bakterilerde bu gen yer almaktadır. IAA bazı bakteriler tarafından bitki gelişimini teşvik etmede ana unsur olarak kullanılmaktadır ve fitostimlasyonu maksimize etmek için IAA biyosentezinin genetik manipülasyonu ile ilgili çalışmalara büyük ilgi vardır. Bu bakteriyel inoklantların ideal kullanım koşullarını belirlemek IAA için modifiye edilmiş bakteriyel fitostimlasyonun ekolojik etkisini incelememiz sonucunda ortaya çıkacaktır. (Duca *et al.* 2014).

Sonuç olarak, PGPR türlerine artan ihtiyacın giderilmesine katkı sağlamak amacıyla hazırlanan doktora tez alışmamızda Erzurum çevresinden izole edilen aktif toprak bakterileri moleküler olarak tanılanmıştır. Bu bakteriler içerisinde PGPR özelliklerinden (azot fiksasyonu yapabilen, fosfat çözebilen ve IAA üreten) bir ya da birkaçını gösteren türlerin daha hızlı seçilimi için güvenilir, ekonomik, ve kolay analiz edilmesine olanak sağlayacak PCR temelli moleküler tekniklerin uygulanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteriler (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR)

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) ilk kez 1978 yılında Kloepper ve Schroth tarafından keşfedilmiştir. Bu bilim adamları rizobakterileri; bitki gelişimine olumlu etkileri olan, genellikle bitkilerin kökleri üzerinde ve çevresinde yer alan toprak bakterileri olarak tanımlamışlardır. PGPR'lar ayrıca bitki sağlığını artırıcı rizobakteriler veya bitki nodüllerini artırıcı bakteriler olarak da adlandırılmaktadır (Burr and Caesar 1984; Hayat *et al.* 2010). Günümüzde PGPR türleri tarımsal anlamda kullanışlı, bitki gelişimine katkı sağlayan, yararlı ve çoğunlukla serbest yaşayan bakteri türleri olarak tanımlanmaktadır. Literatürdeki birçok çalışmada PGPR türleri biyolojik gübre olarak da adlandırılmaktadır (Zaidi *et al.* 2015). Geçmiş yıllarda yapılan birçok arazi uygulamalarında PGPR'ların; patates, şeker pancarı, turp gibi birçok ürünün verim artışına katkı sağladığı anlaşılmıştır. Yine bu bakterilerin ticari uygulamaları da denenmiş ve ekonomik anlamda faydalarının olduğu tespit edilmiştir. PGPR'lar, konukçu bitki ve bu bakteriler arasında meydana gelen özel etkileşimlerin bir sonucu olarak bitki kök yüzeylerinde, köklerin hücreler arası boşluklarında ve bunları çevreleyen toprak katmanlarında (rizosfer) kolonize olmaktadır. Bitki kökleri üzerinde kolonize olan PGPR türleri bitki gelişimine dolaylı ve doğrudan etkileyen mekanizmalara sahiptir. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler birçok mekanizmayla birlikte; bitki gelişimi üzerine, verim ve besin alımını artırmasına katkı sağlamaktadır. Bazı bakteriyel türler doğrudan bitkisel hormon sentezleyerek bitki fizyolojisini düzenlemektedir. Buna karşın bazı bakteriler ise topraktaki mineral ve azot miktarını arttırarak dolaylı yollardan bitki büyümesine katkıda bulunurlar. Bu bakterilerin aynı anda iki ya da daha fazla bitki büyümesini teşvik edici özelliğe sahip olabileceği bilinmektedir. Bu özellikler bitki büyümesini doğrudan, dolaylı veya sinerjistik yollarla teşvik edebilir (Joseph *et al.* 2007; Yasmin *et al.* 2007; Tailor and Joshi 2014).

Bakteriyel inokulantların bitki büyümesini teşvik edici etkinlikleri, uygulandıkları

toprağın besinsel koşullarını doğrudan etkilemektedir. Yapılan araştırmalar bakteriyel inokülantın bitki büyümesini teşvik etmede besleyicilik yönünden fakir topraklarda, besin yönünden zengin topraklara nazaran çok daha etkili olabileceğini göstermiştir. Efektif PGPR türlerinin seçilimi için gnatobiyotik koşullarda büyümeyi teşvik etme kapasitelerinin araştırılması ve *in vitro* koşullarda çeşitli metabolitleri üretebilme yeteneklerinin araştırılması oldukça kullanışlı bir yaklaşımdır (Egamberdiyeva 2007).

Bu bilgiler göz önüne alındığında birçok farklı mekanizma ile bitki gelişimini olumlu yönde etkileyen PGPR türlerinin temelde; toprağın besin kalitesini arttıran biyofertilizerler, bitkisel hormonlar ve çeşitli büyüme ajanlarını sentezleyen biyostimulantlar ve topraktaki bitki patojenlerinin üzerine antagonistik etki gösteren biyoprotektanlar olmak üzere üç grupta toplanması mümkündür.

Çizelge 2.1. PGPR türlerinin etki mekanizmaları (Bhattacharyya and Jha 2012)

PGPR Formları	Tanım	Etki Mekanizması	Referanslar
Biyofertilizer	Canlı mikroorganizmaları içeren, tohum, bitki yüzeyi veya toprağa uygulandığında rizosferde koloni oluşturabilen ve konukçu bitki üzerinde temel besin miktarını arttırarak bitki büyümesini teşvik ederler	Biyolojik azot fiksasyonu Çözünmeyen fosforun kullanımı	Vessey 2003 Somers <i>et al.</i> 2004
Biyostimulant	İndol asetik asit, giberellik asit, sitokininler ve etilen gibi bitki hormonları üretebilen mikroorganizmalar	Fitohormonların üretimi	Lugtenberg <i>et al.</i> 2002, Somers <i>et al.</i> (2004)
Biyoprotektan	Bitki patojenik ajanlarını kontrol ederek bitki gelişimini teşvik eden mikro organizmalar	Antibiyotik, siderofor, hidrolitik enzimlerin üretimi, Patojenler üzerine etkisi İndüklenmiş direnç sistemi	Somers <i>et al.</i> 2004 Chandler <i>et al.</i> 2008

2.2. PGPR Türlerinin Biyofertilizer Olarak Kullanımı

2.2.1. Biyofertilizerin tanımı

PGPR'ları biyolojik fertilizer olarak adlandırmaya başlamadan önce, biyolojik fertilizer terimini tanımlamak gerekmektedir. Modern sözlükler bu terimin tanımını içermemektedir. Biyofertilizer kelimesiyle ilgili dünya çapında web taramaları sonucunda sayısız yorumun bulunduğu çok sayıda internet sitesi yer almaktadır. Bu web siteleri biyofertilizerleri; yosun ekstratlarından elde edilen herhangi bir şey, kentsel atıklardan elde edilmiş kompost, tanımlanamayan çeşitli mikrobiyal karışımlar, organik bileşiklerle (proteinler ve vitaminler) desteklenmiş kimyasal gübre formülasyonları olarak tanımlamışlardır. Aynı şekilde bilimsel literatürde ise biyofertilizerler yeşil gübrelerden (Rao and Gill 1995; Ventura and Ladha 1997; Vessey 2003), hayvan gübrelerinden (Abdel-Magid *et al.* 1995) ve bitki özütlerinden (Zodape 2001) oluşan çok sayıdaki örneği temsil edebileceğine dair yorumlar mevcuttur. Mikrobiyal biyofertilizerler (biyolojik gübre) canlı mikroorganizmaları içeren bir madde olarak tanımlanmakla birlikte tohum, bitki yüzeyleri veya toprak üzerine uygulandığında rizosferde veya bitki içerisinde koloni oluşturarak konukçu bitki için birincil besin maddelerinin mevcudiyetini arttırarak büyümeyi teşvik eder. Bu tanım mantığa dayanan bir tanım olmakla birlikte biyofertilizer teriminin tam olarak açıklanmasını kısıtlamaktadır. Biyoloji bilim dalı canlı organizmaları incelediğinden biyofertilizerlerin; konukçu bitkinin besin durumunu bitki ile birlikte devam ettirerek arttıran canlı organizmaları içermesi gerekmektedir. Bu tanım biyofertilizerleri organik gübrelerden ve organik bileşik içeren gübrelerden de (doğrudan veya çürüme ile toprak verimini arttırmaktadır) ayırmaktadır. Benzer şekilde, biyofertilizer terimi; yeşil gübre, gübre veya organik destekli kimyasal gübre terimleri ile birbirlerinin yerine kullanılmamalıdır. Okon ve Labandera 1994 yılında ilk kez rizosferik organizmaların toprak besin maddelerinin kullanımını iyileştiren biyolojik etkenler olduğunu ancak bunların toprak besinlerinin (kimyasal gübreler, mikorizal funguslar ve PGPR'lar gibi) yerini alamayacağını ve dolayısıyla biyofertilizer olarak adlandıramayacağını savunmuşlardır (Vessey 2003; Malusá and Vassilev 2014).

Fuentes-Ramirez ve Caballero-Mellado 2005 yılında biyofertilizerleri canlı mikroorganizma içeren farklı mekanizmalar yoluyla bitki büyümesi ve ürün verimi üzerinde doğrudan veya dolaylı yararlı etkiler yapan bir ürün olarak tanımlamıştır. Yine bu bilim insanları biyofertilizer tanımını bitki patojenlerini kontrol etmek için kullanılan bakterileri de içine alacak şekilde genişletmişlerdir. Bitkinin beslenme durumu mikroorganizma tarafından arttırıldığı sürece, bir mikroorganizmanın varlığı toprak besinlerini değiştirerek (biyolojik azot fiksasyonu) veya besin maddelerini daha kullanabilir hale getirerek (fosfat çözünmesi) veya bitkinin besin erişebilirliğini arttırarak (bitki kök yüzey alanının artışı) biofertilizer olarak adlandırılmaktadır. PGPR'ların tümü biyofertilizer olarak tanımlanamaz. Zararlı organizmaların kontrolü ve bitki büyümesini teşvik eden bakteriler biyopestisitlerdir fakat biyofertilizer değildirler. Buna rağmen bazı PGPR'lar hem biyofertilizer hem de biyopestisit olarak hareket ederek büyümeyi teşvik etmektedir. Örneğin, *Burkholderia cepacia* suşlarının, *Fusarium* alt türlerine karşı biyolojik kontrol özelliklerine sahip oldukları bilinmektedir. Aynı zamanda siderofor üretimi yoluyla demir oranının düşük olduğu koşullar altında mısırın büyümesini teşvik edebilir (Bevivino *et al.* 1998; Vessey 2003; Malusá and Vassilev 2014).

Şimdiye kadar detaylı bir şekilde tanımlandığı üzere biyofertilizerler bitkinin beslenme durumunu arttırarak bitki büyümesini teşvik eden canlı mikroorganizmalar içermelidir. Bununla birlikte tüm biyofertilizerler PGPR içermemektedir.

2.2.2. Biyofertilizer özellikli PGPR türlerinin konukçu bitkilerle etkileşimi

Biyofertilizer özellikli PGPR türlerinin konukçu bitkilerin beslenme durumunu iyileştirme yoluyla faydalı bir etkiye sahip olması için PGPR ile konukçu bitki arasında yakın bir ilişki olması gerekmektedir. Bununla birlikte, PGPR ve konukçu bitki arasındaki yakın ilişki derecesi konukçu bitkinin PGPR türlerini nerede ve nasıl kolonize ettiğine bağlı olarak değişebilir. PGPR ve konukçu arasındaki ilişki rizosferik ve endofitik olmak üzere 2 farklı şekilde kategorize edilebilmektedir (Vessey 2003).

Rizosferik ilişkilerde, PGPR türleri rizosferde, kök yüzeyinde koloni oluşturabilmektedirler (McCully 2001). PGPR türleri dışında hiçbir bakteri bu alanlarda kolonize olamazlar. Bitki, rizosferi oluşturan toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini PGPR türlerinin kolonize olmasına imkan verecek şekilde değiştirir. Bu farklılıklar toprak pH'sında, su potansiyelinde, kısmen O₂ basıncında ve bitki eksüdalarına bağlı sayısız diğer fiziksel ve kimyasal özellik sayesinde ortaya çıkmaktadır (Uren and Reisenauer 1988; Tavaría and Zuberer 1998; Griffiths *et al.* 1999; Revsbech *et al.* 1999; Xu 2000; Vessey 2003; Miransari 2011).

Pekçok rizosferik ilişkide PGPR türleri tam olarak bitki yüzeyindeki çeşitli bitki salgılarına tutunacaktır (Andrews and Harris 2000). Bununla birlikte; bitki yüzeyine tutunan bakteriler arasında en iyi bilinenler *Azospirillum* türleridir (Michiels *et al.* 1991; Steenhoudt and Vanderleyden 2000). Kök yüzeylerinde PGPR türlerinin koloni oluşturma şekilleri tek tipte değildir. Örneğin, *Kluyvera ascorbata* kanola köklerinin yüzeyinin üçte ikisini kolonize etmektedir, ancak kök uçlarının çevresinde bakteri tespit edilememiştir (Ma *et al.* 2001).

Endofitik bakteriler genellikle bitki dokularında bulunarak bitki gelişimlerini ve dolayısıyla büyümeyi güçlendirir. Endofitik bakteriler bitkilerde bitki gelişimini önemli ölçüde destekleyerek konukçu bitki için üreme kaynağı olarak kabul edilmektedir (Kuklinsky-Sobral *et al.* 2004; Luo *et al.* 2011; Miransari 2011; Reinhold-Hurek and Hurek 2011).

Endofitik ilişkilerde, PGPR türleri konukçu bitkilerin içindeki apoplastik boşluklarda besin alımını destekleyici ajanlar olarak bulunur. Hücre içi boşlukları işgal eden endofitlerle ilgili bazı kanıtları olmasına rağmen bu durumla ilgili bilimsel çalışmalara çok az rastlanılmaktadır. Endofitlerin konukçularında kolonileştirilmesini içeren en iyi karakterize edilmiş örnek yaşam baklagillerle *Rhizobium* arasındaki simbiyotik ilişkidir. Mikrosimbiyotik kimyasal çekim, bağlanma, enfeksiyon ve kök nodüllerinin gelişimi oldukça karmaşık ve düzenlenmiş bir süreç olmakla birlikte son zamanlarda yapılan bir

çok çalışmada iyi bir şekilde tanımlanmıştır (Gualtieri and Bisseling 2000; Spaink 2000).

2.2.3. Biyofertilizer olarak PGPR türlerinin etki mekanizmaları

2.2.3.a. Biyolojik azot fiksasyonu

Günümüzde en çok çalışılan ve uzun süredir yararlanılan PGPR türleri; konukçu bitkinin kök nodüllerine yerleştikten sonra azot fikse edebilmelerinden dolayı *Rhizobia* cinsinde yer almaktadır. Baklagillerde kullanılmak üzere ilk ticari rizobiyal inokülanlar 1890'lı yıllarda kullanılmaya başlanılmıştır (Tailor and Joshi 2014). *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Serratia* cinsine ait bakteri türleri bitki rizosferiyle ilişkilidir ve bu bakterilerin bitki gelişimi üzerine yararlı etkileri bulunmaktadır (Egamberdiyeva 2005; Tilak *et al.* 2005). Rizosferdeki bakteri komünitesi gelişimi organik bileşenlerin kalıntılarının doğasına ve konsantrasyonuna bağlıdır (Curl and Truelove 1986).

Rizosferik bakteriyal komüniteler kök kalıntılarındaki (eksuda) mevcut organik bileşiklerin değerlendirilmesinde etkili rol oynar. Bu yüzden birçok bakteri, kök kalıntılarında (eksuda) maksimum fayda sağlamak için kök yüzeyine (rhizoplane) bağlanmaktadır. Böylelikle bitki ve mikroorganizmaların birliktelik ilişkileri evrimin bir sonucunu ortaya koyar. PGPR türleri zirai ürünlerin verim artışlarının sağlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu durum; kimyasal gübre, pestisitler gibi bitki için zararlı etkenlerle yer değiştirmesi nedeniyle bu türleri önemli kılmaktadır (Ashrafuzzaman *et al.* 2009). Azot fikse eden faydalı bakteri ve mikroorganizmalar gibi biyolojik gübrelerin ve teşvik edici ajanların kullanımı kimyasal gübre uygulamalarını ve ürün maliyetini azaltmaktadır. Verimliliğin artırılmasında PGPR türleri, organik gübrelerin kullanımı açısından uygun bir alternatif yöntem olmaktadır ve bu türlerin kullanımı tarım alanlarındaki kirliliği azaltmakla birlikte ekolojik dengeleri de korumaktadır (Ştefan *et al.* 2008). Bu yüzden bitki büyümesini teşvik eden

rizobakterilerin zirai alanlarda kullanımı umut verici bir kaynak olabilmektedir. Bu rizobakterilerin bitkilerin büyümesini ve gelişmesini teşvik eden inokulantlar olabilecekleri bilinmektedir. PGPR türleri veya izolatları, ayrıca gübre besin verimliliğini arttırabilmekte ve kimyasal gübrelerin uygulanma oranlarını azaltabilmektedir (Chaiharn *et al.* 2008; Adesemoye *et al.* 2009).

PGPR izolatlarının biyolojik gübre inokülanı olarak kullanımı pirinç ekiminde faydalıdır. Bu uygulama pirinç gelişimini arttırmakta ve bitki büyümesini teşvik eden diğer özellikleri indüklemektedir. Arazi koşullarında biyolojik gübre olarak nohuta inoküle edilen PGPR türleri, nohutun gelişimine fayda sağlamıştır (Ashrafuzzaman *et al.* 2009).

Günümüzde biyolojik azot fiksasyonunun yılda yaklaşık 180×10^6 metrik ton olduğu tahmin edilmekte ve bu oranın %80'lik kısmının simbiyotik yaşayan, kalan %20'lik kısmının ise serbest yaşayan mikroorganizma türleri tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Atmosferdeki azot rezervinden indirgeme yoluyla toprakların zenginleştirilmesini sağlayan mikroorganizmalar arke ve bakteriler içerisinde gruplandırılır. Bu bakteri gruplarının içerisinde yer alan ve azot fikse eden simbiyotik bakteriler arasında en fazla araştırılan gruplar *Rhizobia* ve *Frankia* cinsleri iken, serbest yaşayan ve azot fikse edenler ise *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* ve *Azotobacter* gibi birçok bakteri grubudur (Graham 1988; Young 1992; Rokhzadi *et al.* 2008). Birçok PGPR bakterisi azot fiksasyonu yapabilme yeteneğine sahip olmasına rağmen bitki gelişimlerine ait etki mekanizmaları hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Azot fikse edebilme yeteneğine sahip bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler içinde konukçu bitkinin uyarılması ve nitrogenaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi gösteren delillere *Azoarcus*, *Beijerinckia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans* ve *Rhizobium* türlerinde rastlanılmaktadır (Antoun *et al.* 1998; Xu 2000; Tailor and Joshi 2014).

1. Azot fikse eden simbiyotik bakteriler

Azot; enzimlerin, proteinlerin, klorofilin, DNA ve RNA'nın hücresel sentezi için

gereklidir ve bu yüzden bitki gelişimi, gıda üretimi ve beslenme için önemli ölçüde rol almaktadır. Baklagillerde nodül oluşumu sayesinde rizobiyal bakteriler tarafından nitrogenaz ile simbiyotik atmosferik azot fiksasyonu gerçekleşir. Bu biyolojik azot fiksasyonu süreci tarımda halihazırda kullanılan azot miktarının %65'ini oluşturmakla birlikte gelecekte sürdürülebilir bitkisel ürünlerin üretim sistemlerinde önem kazanmaya devam edecektir (Matiru and Dakora 2004; Hayat *et al.* 2010). Biyolojik azot fiksasyonun önemli kimyasal reaksiyonları azot fikse eden mikroorganizmaların baklagillerle simbiyotik olarak işbirliği durumunda, atmosferik azot (N_2) elementinin amonyaka (NH_3) dönüşmesiyle meydana gelmektedir (Shiferaw *et al.* 2004).

Rhizobia (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* ve *Sinorhizobium* türleri) kemotaktik olarak flavonoid moleküllerine cevap vererek konukçu baklagillere sinyal gönderir ve yakın ilişkiler kurar. Bu bitki bileşenleri *Rhizobia*'da köklerde mitotik hücre bölünmesini tetikleyen, nodül oluşumuna yol açan nodülasyon (nod) genlerinin ekspresyonunu indükler bu da köklerde mitotik hücre bölünmesini tetikleyen nodül oluşumuna yol açan lipo-kitoooligosakkarit sinyalleri üretir (Dakora 1995; Lhuissier *et al.* 2001; Dakora 2003; Matiru and Dakora 2004; Hayat *et al.* 2010). Nodüller simbiyotik azot fiksasyonu bölgelerinde *Rhizobia* ve baklagil bitkilerinin etkileşimleri sonucu oluşur. Bununla birlikte baklagil bitki köklerinin nodülasyonunu etkileyen; konukçu-mikrosimbiyont uyumu, toprağın fizikokimyasal özellikleri, flavonoidler, polisakkaritler ve hormonlar gibi bilinen ve bilinmeyen birçok biyomolekülün varlığını içeren çok sayıda faktör vardır (Zafar-ul-Hye *et al.* 2007). Bu durum konukçu bitki ile *Rhizobium*'un uyumlu bir suşunun nodül gelişimini başlatıcı olarak kabul edilen moleküler bir etkileşimdir (Murray *et al.* 2007). Rizobiyal istila konukçu bitkinin kontrolü dâhilinde bakterilerin köklere girişiyle gerçekleşir. Bu süreçte; *Rhizobium* türleri kök tüylerinin kıvrılmasıyla oluşturulan bir oyuk içine sıkışır, kök tüyü plazma membranı boşluğunu doldurur ve tüp şeklindeki bir yapı oluşturarak bakterinin bitkiye girişini sağlar. Sonuç olarak; istila kök korteksinde yer alan nodül primordiuma ulaşır ve *Rhizobium*'un salınması sonucunda nodüle dönüşür (Ögütçü 2000; Limpens *et al.* 2003). Bazen bazı rizobiyal kültürler inoküle edilmelerine rağmen bitkide nodülasyon meydana gelmez çünkü bu tür durumlarda kullanılan suşlar,

mutasyon veya tanımlanmamış herhangi nedenden ötürü ekzopolisakkarit eksikliği oluşturur (Van Rhijn *et al.* 2001).

Rhizobium ile baklagiller arasındaki simbiyotik ilişki kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Baklagillerde, *Rhizobium* tarafından gerçekleşen azot fiksasyonu ayrıca baklagil olmayan bitkilere direk olarak aktarıldığında aynı arazide yetişen farklı tahıl ürünlerine fayda sağlamaktadır (Snapp *et al.* 1998). Baklagillerde azot fiksasyonuna ek olarak; *Rhizobia*'da yer alan *Rhizobium* ve *Bradyrhizobiom* türleri bitki gelişimini teşvik eden oksinler, sitokininler, absisik asitler, lumikrom, riboflavin, lipokitoooligosakkararitler ve vitaminler gibi moleküller üretirler (Hardarson 1993; Herridge *et al.* 1993; Keating *et al.* 1998; Hayat and Ali 2004; Hayat *et al.* 2010; Tailor and Joshi 2014). Bu türlerin köklerde kolonizasyonunun ve salınımının bitki gelişimini ve ürün verimini arttıracığı düşünülmektedir (Kloepper and Beauchamp 1992; Dakora 2003; Matiru and Dakora 2004; Hayat *et al.* 2010). *Rhizobia* ve *Bradyrhizobia* diğer PGPR özelliklerinden; fitohormon üretimi, siderofor oluşumu, inorganik fosfat çözünmesi, bitki patojenlerine karşı antogonizma özelliği de içermektedir (Ehteshamul-Haque and Ghaffar 1993; Plessner *et al.* 1993; Abd-Alla 1994; Chabot *et al.* 1996; Arshad and Frankenberger 1997; Avşar 2017).

2. Azot fikse eden nonsimbiyotik bakteriler

Bitki gelişimini teşvik eden bir grup rizobakteri C3 ve C4 bitkileriyle etkileşime girer (Pirinç, buğday, mısır, şeker kamışı ve pamuk) ve önemli ölçüde vejetatif büyüme ile ürün veriminin artışına sebep olurlar (Kennedy *et al.* 2004). *Azotobacter* (*Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chrroococcum*) türleri serbest yaşayan, yeterli miktarda indirgenmiş karbon kaynağı gibi enerji kaynaklarına bağlı heterotrofik diazotroflardır (Kennedy and Tchan 1992). Pirinç kültüründeki aktiviteleri saman uygulamasıyla arttırılabilir. Bu artışın muhtemel sebebi sellobiyoz ve glukoz mikrobiyal olarak parçalanmasıdır (Kanungo *et al.* 1997). *Azotobacter* uygulaması ile pirinç (Yanni and El Fattah 1999), pamuk (Patil and Patil 1984; Anjum *et al.* 2007) ve buğday (Soliman *et al.* 1995; Barassi *et al.* 2000) verimi artmıştır. *Azotobacter*'in aksine *Clostridia* türleri

yalnızca oksijen eksikliğinde azot fikse edebilen zorunlu anaerobik heterotroflardır. *Clostridia* çoğunlukla pirinç topraklarından izole edilmiştir ve bu izolatlar samanlı toprak alanlarına aktarıldıklarında aktivitelerinde ve topraktaki C/N oranlarında da artışa sebep olmuştur (Kennedy and Tchan 1992; Elbadry *et al.* 1999; Kennedy *et al.* 2004).

Hem sera hem de tarla koşullarında *Azospirillum*'un inokülasyonu sonucundan buğday verimine yararlı etkilerinin olduğu bilimsel çalışmaların sonucunda gözlemlenmiştir (Hegazi *et al.* 1998; El Mohandes 1999; Ganguly *et al.* 1999). Azot fikse edebilen *Azospirillum* suşları rizosferdeki bitkilerle yakın bir ilişki halindedir. *Azospirillum* türleri mikroaerobik koşullar altında azot fikse edebilen aerobik heterotroflardır ve otsu bitkilerin rizosferlerinde geniş ölçüde bulunmaktadır (Kennedy and Tchan 1992; Roper and Ladha 1995; Kennedy *et al.* 2004). *Azospirillum* ile bitki birlikteliği farklı konukçu bitkilerin de gelişimini ve verimini arttırmaktadır (Fallik *et al.* 1994). Bitki verimindeki bu artış esas olarak su ve mineral alımının artışıyla kök gelişimine katkı sağlamaktadır (Okon and Labandera-Gonzalez 1994; Okon and Itzigsohn 1995). *Azospirillum* tarafından sentezlenen fitohormonlar, konukçu bitkilerin kök solunum hızını, metabolizmasını ve kök proliferasyonunu etkiler ve bitkilere inoküle edilmesi sonucunda mineral ve su alımını artırır (Okon and Itzigsohn 1995). *A. lipoferum* ve *Azospirillum brasilense* şeker kamışı ve pirinç bitkilerinin köklerinden ve sap kısımlarından *Azospirillum amazonense* ise pirinç bitkisinin kökünden izole edilmiştir (Ladha *et al.* 1982; Pereira *et al.* 1988; James *et al.* 2002).

Çizelge 2.2. Atmosferik azot fikse edebilen PGPR türlerinin konukçu bitkiler üzerindeki ilişkileri (Tailor and Joshi 2014).

PGPR Türü	Konukçuyla İlişkisi	Konukçu Ürün	Referanslar
<i>Azospirillum sp.</i>	Rizosferik	Mısır	Garcia de Salamone <i>et al.</i> 1996
		Pirinç	Malik <i>et al.</i> 1997
		Buğday	Boddey <i>et al.</i> 1986

Çizelge 2.2. (devam)

<i>Azoarcus sp.</i>	Endofit	Süpürge darısı	Stein <i>et al.</i> 1997
<i>Azotobacter sp.</i>	Rizosferik	Mısır	Pandey <i>et al.</i> 1998
		Buğday	Mrkovacki and Milic 2001
<i>Bacillus polymyxa</i>	Rizosferik	Buğday	Omar <i>et al.</i> 1996
<i>Burkholderia sp.</i>	Endofit	Pirinç	Baldani <i>et al.</i> 2000
<i>Gluconacetobacter sp.</i>	Endofit	Süpürge darısı	Isopi <i>et al.</i> 1995
		Şeker kamışı	Boddey <i>et al.</i> 2001
<i>Herbaspirillum sp.</i>	Endofit	Pirinç	James <i>et al.</i> 2002
		Süpürge darısı	James <i>et al.</i> 1997

2.2.3.b. Fosfat çözen bakteriler

Fosfor (P) bitki büyüme ve gelişimi için en önemli temel makro besin elementlerinden birisidir (Ehrlich 1990; Hayat *et al.* 2010). Fosfor toprakta $400\text{--}1,200\text{ mg/kg}^{-1}$ aralığında bulunmaktadır. Fosfor toprakta organik ve inorganik fosfat olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Çözünmeyen fosfat bileşiklerini (hem organik hem de inorganik) bitki tarafından erişebilir bir biçime dönüştürmek bitki verimini artırmada PGPR'lar için önemli bir özelliktir (Igual *et al.* 2001; Rodríguez *et al.* 2006). Toprakta çözünebilir fosfor konsantrasyonu çok düşüktür genelde 1 ppm'den daha azdır. Bitki fosforu genellikle birkaç farklı formda alır, fakat çok büyük bir kısmı HPO_4^{-2} veya $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ formlarında alınmaktadır. Topraktaki fosfat miktarını sabitleme ve çökelme olgusu toprağın pH'sına ve toprak tipine bağlıdır. Yapılan araştırmalar neticesinde organik fosfat kaynaklarında toprağa mikrobiyal fosfat salınımı gözlenmiştir (McGrath *et al.* 1995; Ohtake *et al.* 1996; McGrath *et al.* 1998; Rodríguez and Fraga 1999).

Pseudomonas, *Bacillus* ve *Rhizobium* cinslerine ait suşlar en güçlü fosfat çözenler

arasında yer alırken trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit gibi fosfatlı bileşenlerin fosfat kayaçlarına göre daha fazla fosfat çözünebilir substratlarının olduğu gözlemlenmiştir (Arora and Gaur 1979; Illmer and Schinner 1992; Halder and Chakrabarty 1993; Rodríguez and Fraga 1999; Hayat *et al.* 2010).

Organik asit üretimi özellikle glukonik asit üretimi *Pseudomonas* türleri, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepaci* gibi bakteriler tarafından mineral fosfat çözmede en sık görülen ajanlardır (Rodríguez and Fraga 1999). Fosfat çözebilen suşlar da tanımlanan bir başka organik asit ise *Rhizobium leguminosarum* (Halder *et al.* 1990), *Rhizobium meliloti* (Halder and Chakrabarty 1993) ve *Bacillus firmus*'da (Banik and Dey 1982) ve tanımlanamayan diğer toprak bakterilerinde bulunan 2-ketoglukonik asittir (Hayat *et al.* 2010). *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* suşlarının laktik, izovalerik, izobutirik ve asetik asitlerin karışımını ürettiği keşfedilmiştir. Diğer organik asitler, örneğin glikolik asit, oksalik asit, malonik asit, süksinik asit, sitrik asit ve propionik asit de mikrobiyal fosfat çözücüler olarak tanımlanmıştır (Banik and Dey 1982; Illmer and Schinner 1992; Chen *et al.* 2006).

Toprak ayrıca bitki büyümesi için fosfat kaynağı olan çok sayıda organik substrat içerir. Bu formdaki fosfatın bitki beslenmesinde kullanılabilmesi için inorganik fosfata hidrolize edilmesi gerekmektedir. Çoğu inorganik fosfor bileşiğinin minerilizasyonu fosfataz (Fosfohidrolazlar) (Gügi *et al.* 1991; Rodríguez and Fraga 1999), fitaz (Richardson and Hadobas 1997), fosfonoasetat hidrolaz (McGrath *et al.* 1998), D- α -gliserofosfataz (Skrally and Cameron 1998) ve C-P liyaz (Ohtake *et al.* 1996) gibi enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Çeşitli fosfatazların mısır, arpa ve buğday da fosfataz aktivitesi; iç rizosferde ve nötr toprak pH'sında önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir. Asit fosfatazların önemli bir kısmını eksprese eden toprak bakterileri arasında *Rhizobium* (Abd-Alla 1994), *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* (Thaller *et al.* 1995), cinslerinin suşları olduğu gibi *Pseudomonas* (Gügi *et al.* 1991) ve *Bacillus* (Skrally and Cameron 1998) cinslerini de içermektedir. *Arthrobacter ureafaciens*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Rhodococcus erythropolis* ve *Delftia* türleri, organik asit salgılayarak besiyerinde önemli miktarda trikalsiyum fosfat çözme

kapasiteleri teyit edildikten sonra ilk kez 2006 yılında Chen ve arkadaşları tarafından fosfat çözen bakteri suşları olarak tanımlanmıştır. *Rhizobium* ve simbiyotik olmayan azot fikse edebilen *Azobacter*'lerin fosfat çözünürlüğü hakkında daha fazla çalışma mevcuttur (Halder *et al.* 1990; Abd-Alla 1994; Chabot *et al.* 1996; Kumar *et al.* 2001; Hayat *et al.* 2010). Nohut ve arpa bitkilerinde büyüme ve fosfat miktarını arttırmak için *Mesorhizobium mediterraneum* suşunun etkinliği kontrollü şartlar altında fosfat eklenmiş ve fosfat eklenmemiş toprakta değerlendirilmiştir. Sonuç olarak PECA21 suşunun toprağa trikalsiyum fosfat eklendiğinde bitkilerde fosfor alınımını verimli bir şekilde harekete geçirdiği gözlemlenmiştir. *Rhizobia* suşlarının etkinliği toprağa inoküle edildiğinde sadece fiksasyon potansiyeline dayandırılmamalıdır, çünkü bu bakteriler bitki gelişimini fosfat çözünürlüğü dahil olmak üzere diğer mekanizmalarla da artırabilirler (Peix *et al.* 2001).

Rhizobium'un fosfat çözme aktivitesi NaOH ilavesiyle ortamdan uzaklaştırılan 2-ketoglukonik asit ile ilişkilidir ve bu organizmanın fosfat çözme aktivitesi tamamen ortamın pH'sını düşürme kabiliyetinden kaynaklandığını göstermiştir (Halder and Chakrabarty 1993; Hayat *et al.* 2010). Bununla birlikte simbiyotik nodül bakterilerinin fosfat çözünürlüğünün ayrıntılı kimyasal ve moleküler mekanizmaları araştırılmalıdır. De Freitas ve arkadaşları 1997 yılında yapmış oldukları çalışmaların sonucunda bitki topraklarının rizosferik kısımlarından 111 suş izole etmişler ve bunların 9 tanesinin *in vitro*'da fosfat çözme yeteneklerinin olduğunu gözlemlemişlerdir. Tanımlanan suşlardan bazıları *Bacillus bresvis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymxa*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis* ve *Xanthomonas maltophilia* fosfat çözen bakteriler arasında yer almaktadır. Bunlara ek olarak; *Bacillus* ve *Paenibacillus* türleri toprağa uygulanmış ve bitkilerde fosfor miktarını arttırmıştır (Van Veen *et al.* 1997). Fosfat çözen bakterilerin bitkiler üzerindeki yararlı etkileri çevresel koşullara, bakteriyal suşlara, konukçu bitkiye ve toprak koşullarına bağlıdır (Şahin *et al.* 2004; Çakmakçı *et al.* 2006; Hayat *et al.* 2010). Mikroorganizmaların trikalsiyum fosfatları çözmek için kullandıkları en yaygın mekanizma biyosentez yolu ile ortamı asitlendirmek ve çeşitli organik asitlerin serbest bırakılmasıdır (Rodríguez and Fraga 1999; Igual *et al.* 2001; Delvasto *et al.* 2008; Hayat *et al.* 2010).

Fosfat çözen bakterilerin genetik manipulasyonu bitki büyüme özelliklerini geliştirme yeteneğini arttırmanın başka bir yoludur (Rodríguez and Fraga 1999). Bu hem mineral hemde organik fosfat çözünmesine dahil olan genlerin klonlanmasını ve bunun ardından seçilen rizobakteriyel suşlarda ekspresyonunu içermektedir (Rodríguez *et al.* 2006). Bu çerçevede fosfat alınımı ve taşınımı için ilgili genleri belirlemek ve karakterize etmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Rossolini *et al.* 1998; Shenoy and Kalagudi 2005).

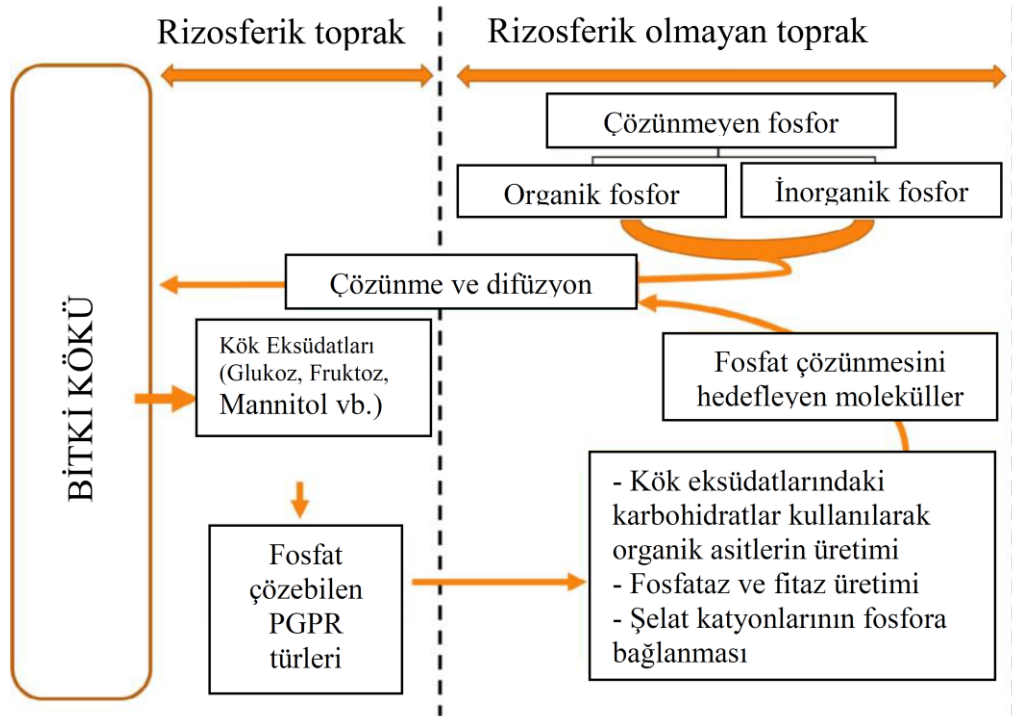
Goldstein ve Liu 1987 yılında gram negatif bir bakteri olan *Erwinia herbicola*'da yapmış oldukları çalışmada fosfat çözme sürecine katılan bir geni ilk kez klonlamışlardır. Bu genin ekspresyonunda *Eschericia coli* HB101'de giberellik asit üretimine izin verilmiş ve hidroksiapatiti çözündürme kabiliyeti kazandırılmıştır. Yine giberellik asit ve mineral fosfat çözme üretiminde yer alan bir başka gen türü (*gabY*) *Pseudomonas*'dan klonlanmıştır (Babu-Khan *et al.* 1995). Dört büyük fosfat metabolik enzimi için genler araştırılmıştır (Valverde *et al.* 1999).

Sitosolik GAPDH nükleer gen *GapC* tarafından kodlanırken, kloroplastik GAPDH, *GapA* ve *GapB* nükleer genleri tarafından kodlanmaktadır. Nükleer *GapN*, sitozolik GAPDH'yi kodlar. PGK, nükleer gen *pgk* tarafından kodlanır (Serrano *et al.* 1993). Bu klonlanmış genler PGPR suşlarının genetik manipulasyonu için önemli bir materyal kaynağıdır. Bazıları toprakta iyi performans gösterebilen asit fosfataz enzimlerini kodlar. Örneğin *Francisella tularensis*'den izole edilen *acpA* geni pH'sı 6'da ve çok çeşitli substrat özgülüğü ile optimum aktiviteye sahip bir asit fosfatazı eksprese eder (Reilly *et al.* 1996). Ayrıca *Morganella morganii*'den izole edilen non-spesifik asit fosfataz sınıf A (*PhoC*) ve sınıf B (*NapA*) kodlayan genlerin daha sonra yapılacak çalışmalarda önemli rol alacağına dair umut verici çalışmalar yapılmaktadır (Thaller *et al.* 1995).

Rizobakteriler arasında yer alan *Burkholderia cepacia*'da fosfataz aktivitesini kolaylaştıran bir gen izole edilmiştir (Rodríguez *et al.* 2000). Bu gen, ortamda çözünür fosfatların yokluğunda sentezi güçlendiren ve hücreye P taşınmasında yer alabilen bir dış zar proteinini kodlar. Ayrıca 2 nonspesifik periplazmik asit fosfataz genlerinin

(*napD* ve *napE*) klonlanması *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* bakterisinde gerçekleştirilmiştir. *Morganella morganii* toprak bakterisinden alınan *napA* fosfataz geni *Burkholderia cepacia* IS-16'ya aktarılmış, suş biyolojik gübre ve geniş aralıklardaki konukçu vektörü olan PRK293 olarak kullanılmıştır. Rekombinant suşun hücre dışı fosfataz aktivitesinde bir artış elde edilmiştir (Fraga *et al.* 2001).

Bitkilerin fitatdan (inositolün birincil kaynağı ve fosfatın büyük miktarlarda depolanmış formları bitki polenleri ve tohumlarında yer alır) doğrudan fosfor elde etme kabiliyeti çok sınırlıdır. Bununla birlikte; *Arabidopsis* bitkilerine fitat uygulanmasının sonucunda genetik olarak fitaz geni ile değiştirildiklerinde bu bitkide büyüme ve fosfor beslenmesi önemli derecede gelişmiştir. Isıya dayanıklı *Bacillus* fitaz genleri (*phy*) DS11 (Kim *et al.* 1998) ve *Bacillus subtilis* VTT E-68013'den klonlanmıştır (Kerovuo *et al.* 1998). *Escherichia coli*'den asit fosfataz/fitaz genleri (*appA* ve *appA2* genleri) izole ve karakterize edilmiştir (Rodríguez *et al.* 1999; Golovan *et al.* 2000). Nötr fitaz genleri *Bacillus licheniformis*'ten klonlanmıştır (Tye *et al.* 2002; Hayat *et al.* 2010).



Şekil 2.1. PGPR türleri tarafından topraktaki fosfor çözünmesinin şematik gösterimi (Goswami *et al.* 2016)

2.2.3.c. PGPR türlerinin toprak streslerinin azaltılmasında kullanımı

Son yıllarda, PGPR türlerinin stres altındaki kullanımı ile ilgili çok ilginç araştırma sonuçları verilmiştir. Örneğin; Glick ve arkadaşları 2003 yılında yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas fluorescences* ve *Pseudomonas putida* gibi PGPR'larda farklı stresler altında bitki büyümesi üzerindeki olumsuz etkilerini bakteriyal ACC deaminaz üretimi yoluyla hafifletebileceğini göstermişlerdir. ACC etilen üretiminin ön şartıdır ve stres koşulları altında bitki büyümesini ve ürün verimini olumsuz etkileyen durumlarda miktarları artar. Dolayısıyla, etilen, stres de dahil olmak üzere farklı koşullar altında bitki büyümesini düzenleyen stres hormonlarından biridir. PGPR tarafından ACC deaminaz üretimi, etilen üretimi için ön şart olan ACC'yi NH_3 ve α -ketobutirata dönüştürebilir ve böylece stres kontrol altına alınabilir. ACC deaminaz ayrıca stres altındaki kök gelişimini artırarak bitki gelişimini de etkiler. Toprak pH'sı, alt-optimal kök bölgesi sıcaklığı ve ağır metaller de dahil olmak üzere bitki büyümesini ve ürün verimini etkileyen çeşitli toprak stres faktörü vardır. Araştırmacılar; *Rhizobium* ile baklagiller arasında gerçekleşen azot fiksasyonuna genistein gibi sinyal moleküllerinin kullanılmasıyla farklı stres faktörlerinin olumsuz etkilerinin hafifletilebileceğini keşfettiler. Genistein, *Bradyrhizobium japonicum*'daki nod genlerini aktive eden soya fasulyesi gibi özel baklagil konukçu bitki tarafından üretilir (Miransari and Smith 2008; Miransari 2011).

Nemli veya kuru iklim koşullarında toprak özellikleri çok fazla değişebilmektedir. Eğer suşlar stres altındaki topraklardan izole edildiğinde, PGPR'ların hafifletici etkileri bitki büyümesi üzerine artış gösterir. Eğer suşlar; tuzluluk, asitlik ya da kuraklığa maruz kalan topraklardan izole edilirlerse, stresi daha etkili şekilde hafifletebilirler (Daei *et al.* 2009; Jalili *et al.* 2009; Miransari 2011). Ayrıca PGPR'nin stres altındaki bitki gelişimini artırabileceği diğer mekanizmalar da vardır: a) kuraklık veya tuzluluk stresinde osmolytes üretiminin artırılması, b) stres ürünlerini katabolize edebilen bitki antioksidanlarının arttırılmış aktiviteleri, c) simbiyotik birliktelik sonucunda PGPR veya bitki tarafından farklı metabolitlerin üretilmesi, d) stres altında bitkilerin hayatta kalmasına yardımcı olabilen, 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaz

üretimi, e) çözünmeyen fosfat ürünlerinin çözünmesi f) siderofor üretimi g) patojenlerin inhibisyonu ğ) stres altında K/Na gibi iyon oranının ayarlanması (Chebotar *et al.* 2009; Miransari 2011).

2.3. PGPR Türlerinin Biyostimulant Olarak Kullanımı

Yeni yeşil teknolojilerin gelişimi kimyasal biyostimulantlar üzerine pek çok araştırma yapılmasına neden olmuştur. Toprak verimliliğinin sürdürülebilir yönetimi, konvansiyonel kimyasal gübrelerin kullanımından kaynaklanan olumsuz etki ve ekolojik tehditler göz önüne alındığında büyük bir endişe kaynağı olmaktadır (Wezel *et al.* 2014). Bu bakımdan biyostimulantlar kimyasal gübrelerin yerini alabilecek alternatif yöntemleri oluşturmaktadır. Biyostimulantlar bitki gelişimini arttırmak için çeşitli maddelerden ve mikroorganizmalardan (mikrobiyal inokülanlar, humik ve fulvik asitler, yosun ekstratları, protein hidrolizatları, aminoasitler) oluşurlar (Calvo *et al.* 2014; du Jardin 2015; Mire *et al.* 2016). Bu ajanlar mahsul verimini en az %5-10 oranında arttırabilirler ve fertilizer (gübre) kullanım verimliliğini en az %5-25 arasında katkı sağlamaktadırlar (European Biostimulants Industry Consortium 2011). 2012 yılında biyostimulantların küresel pazarı ağırlıklı olarak Avrupa'da yer alırken bu alandaki pazar payının 2018 yılına kadar yıllık %12'lik artışla 2,241 milyon Amerikan dolarına ulaşması beklenmektedir (Calvo *et al.* 2014; Mire *et al.* 2016).

Biyostimulanların artan kullanımlarına rağmen ne düzenleyici makamlar ne de bilimsel topluluklar tarafından kabul gören hiçbir tanımı mevcut değildir. Bununla birlikte Avrupa Birliği gübre mevzuatının gözden geçirilmesi ile bir miktar ilerleme kaydedilmiştir. Bu çerçevede yapılan çalışma neticesinde bitki biyostimulantları, herhangi bir madde veya mikroorganizma, kullanıcıya verildiği formda bitkiler için uygulanan, tohum veya kök çevresinde bitki doğal süreçlerini uyarmak amacıyla besin kullanım verimliliğini artırması ve abiyotik streslere toleranslı, besin içeriğine bakılmaksızın veya bu tür maddelerin herhangi bir kombinasyonu ve bu kullanıma yönelik mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Traon *et al.* 2014; Mire *et al.* 2016).

PGPR tabanlı biyostimulantlar, biyofertilizerlerin tarımsal kullanıma yönelik önemli bileşenleridir. Bu ürünler uzun süredir birçok üretici tarafından pazarlanmakta ve pirinç, buğday, mısır ve soya fasulyesi gibi çeşitli tarla bitkilerine uygulanmaktadır. Bunlar ayrıca tropikal, subtropikal ve ılıman meyveler ve sebzeler gibi bahçe bitkilerine de uygulanmaktadır (Pérez-Montaña *et al.* 2014; du Jardin 2015; Mire *et al.* 2016). PGPR tabanlı biyostimulantlar bitki gelişimini uyarmak, bitki besin alımını ve abiyotik stres toleransını arttırmak için kullanımı kolay tarımsal araçlar içerisinde yer almaktadır (Walker *et al.* 2012; Hol *et al.* 2013). Ayrıca konukçu bitkiler ile birlikte faydalı simbiyotik ilişkiler kurarlar. Bazı PGPR tabanlı biyostimulantlar bitkileri biyolojik streslere karşı koruyacak biyokontrol aktivitelerine de sahiptirler (Bhattacharyya and Jha 2012).

Biyostimulantlar tek bir PGPR türü, bir PGPR karışımı veya PGPR ve PGPF (Bitki gelişimini teşvik eden funguslar) karışımı temeline dayalı olarak oluşabilirler. Tek suş ürünleriyle karşılaştırıldığında, farklı karışımlardan oluşan biyostimulantların artan genetik çeşitlilik nedeniyle boş nişlerin çoğuna erişebilir ve kök bölgesine tek suşlardan oluşan biyostimulantlara göre çok daha hızlı kolonize olabilirler. PGPR suşları karışımı olan ürünler farklı bitki gelişimi ve çevresel koşullar altında daha geniş bir potansiyel patojen yelpazesine rekabet edebilmektedir. Buna ek olarak; yapılan son çalışmalar neticesinde PGPR türleri mineralli gübreleri tamamlamakta kullanılır ve böylece kimyasal fertilizerlerin kullanımında da oransal olarak düşüş meydana gelmektedir. Adesemoye ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada PGPR suşları olan *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a ve *Bacillus pumilus* T4'ün arbusküler mikoriza mantarı *Glomus intraradices* suşuyla birlikte kombine bir şekilde inokülasyonunun neticesinde gübre kullanım oranını %25 oranında azalttığını göstermiştir. Bu kombinasyon; bitki gelişimi, verimi ve besin alımını bakımından %100'lük fertilizer (gübre) uygulaması kadar etkilidir (Mire *et al.* 2016).

PGPR türlerinin bitki büyümesini teşvik etme kapasitesi esas olarak çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerini üretme ve azaltma kapasitelerine dayanmaktadır. PGPR türleri tarafından üretilen fitohormonlar (oksinler, sitokininler, gibberellinler, etilen) çoklu

bitki fizyolojik süreçlerini (kök oluşumu ve uzaması, kök tüyü oluşumu) düzenleyebilir (Calvo *et al.* 2014). Örneğin, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Rhizobium* ve *Enterobacter* gibi rizobakteriler, 1-amino siklopropan-1-karboksilat deaminaz salgılanması yoluyla bitki stres hormonu olan etilen üretimini azaltabilir ve böylece bitki büyüme inhibisyonunu önlemektedir (Bhattacharyya and Jha 2012).

Dış kaynaklı (egzojen) PGPR bileşikler (ekzopolisakkaritler ve fitohormonlar) içeren ürünler toprakta spesifik yararlı mikropların büyümesini ve gelişimini arttırmak için geliştirilmiştir (Marks *et al.* 2013). Bununla birlikte, PGPR tabanlı ürünlerin etkinliği hala çeşitli faktörlere bağlıdır. Bitki türleri ve çeşitleri, toprak tipi, çevresel koşullar ve ticari formülasyonları verimliliğin önemli belirleyicileridir (Calvo *et al.* 2014). En iyi PGPR ürünleri genelde konukçu bitkiye özgü yerel suşlardan oluşur, fizyolojik ve genetik uyum için iyi bir kapasite gösterir ve ortak bir yaşam ortamında diğer yerli suşlarla birlikte gelişirler (Reddy *et al.* 1999; Ögütçü 2000; Mäder *et al.* 2011; Araújo *et al.* 2013; Mire *et al.* 2016).

2.3.1. Bitki büyüme teşvik edicilerinin üretiminde PGPR kullanımı

Bitki hormonları, bitkinin çevresine haber verme yeteneğine sahip kimyasal habercilerdir. Hormonlar düşük konsantrasyonlarda bile etkilerini gösterebilen organik bileşiklerdir ve genellikle bitkinin bir bölgesinde sentezlenir ve başka bir bölgesine taşınarak etkilerini gösterirler. Bu şekilde özel hedef dokularla etkileşime girerek büyüme ya da meyve olgunlaşması gibi fizyolojik cevaplara neden olurlar. Her bir cevap genellikle iki ya da daha fazla hormonun birlikte hareket etmesi sonucunda oluşur. Çünkü hormonlar bitki büyümesini teşvik ya da inhibe ederler ayrıca birçok botanikçi tarafından bitki büyüme düzenleyicileri olarak adlandırılmışlardır. Botanikçiler hormonları; oksinler, gibberellinler, etilen, sitokininler ve absisik asit olmak üzere 5 ana grup altında toplamışlardır.

İndol-3- asetik asit (IAA), fitohormon grubunun bir üyesidir ve genellikle oksinlerin en gereklileri olarak tanımlanmıştır. Bitki gelişiminin düzenlenmesinde organogenez,

yönelimsel cevapları (tropic responses) kapsayan hücre genişlemesi, bölünme, farklılaşma ve gen regülasyonu gibi hücresel cevaplarda önemli sinyal molekülü rolü üstlenmektedir. Farklı bakteri türleri, önemli bir fitohormon olan IAA'yı üretme yeteneğine sahiptirler. IAA üreten bakteriler ile bitkiler arasındaki etkileşimler bitkiler açısından patogenezisden fitostimulasyona kadar çok çeşitli olguların ortaya çıkmasına sebep olur (Ryu and Patten 2008; Ashrafuzzaman *et al.* 2009).

Son zamanlarda yapılan birçok araştırma neticesinde IAA fitohormonunun bakterilerdeki sinyal molekülü üzerinde önemli bir rolünün olduğu görülmüş ve bakteriyel fizyolojiyi de etkilediği sonucuna varılmıştır. Toprak ve saf kültürler içerisindeki saf oksinlerin sentezini içeren çok sayıda toprak mikroflorası vardır. Rizobakteriler tarafından sentezlenen potansiyel oksinler etkili PGPR türlerini araştırmada önemli bir araç olarak kullanılmaktadırlar. Oksin, giberellin ve sitokinin gibi fitohormonların üretimi ile PGPR türleri bitki büyüme ve gelişimini etkilemektedirler. Oksinlerin bitki fideleri üzerine olan etkileri konsantrasyonlarına bağlıdır. Düşük konsantrasyon da büyümeyi teşvik ederken, yüksek konsantrasyonda ise inhibe edebilmektedir. Farklı bitki fideleri değişken oksin konsantrasyonuna ve mikroorganizma türlerine farklı yanıt vermektedirler. Toprakta yüksek miktarda oksin, IAA vb. hormonları üreten bakteri suşları buğday ekininin büyümesi ve maksimum verim artışına sebep olur. Hatta düşük miktarda IAA üreten suşlarda da bitki gelişimini teşvik etmektedir. En önemli aktif IAA üretici cinsler arasında *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Sphingomonas* ve *Mycobacterium* cinsleri yer almaktadır. Bunlara ilaveten *Bacillus* ve *Pseudomonas* biyostimulant cinsleri de bu suşlar arasında sayılabilir (Arshad and Frankenberger 1991; Sarwar and Frankenberger 1994; Barazani and Friedman 1999; Khalid *et al.* 2004; Ahmad *et al.* 2005; Mandal *et al.* 2007; Spaepen *et al.* 2007).

Yine bazı mikroorganizmalar oksini L-triptofan gibi uygun bir öncü madde varlığında üretirler. *B. amyloliquefaciens* FZB42'de meydana gelen IAA üretimi, triptofan artışı ile meydana gelmektedir. Tien ve arkadaşları *Azospirillum*'un triptofana maruz kaldığında oksin üretebileceğini göstermişlerdir (Tien *et al.* 1979; Idris *et al.* 2007).

2.3.2. PGPR türleri tarafından üretilen fitohormonlar

Bilinen en yaygın fitohormon sınıfları; oksinler, giberellinler, sitokininler, etilen, absisik asitlerdir. Rizosfer bakterileri bu hormonları üretme potansiyeline sahiptir (Goswami *et al.* 2016). Bu fitohormonlar bitkilerin hücre büyümesi, bölünmesi, köklerdeki simbiyotik ve simbiyotik olmayan büyüme gibi süreçlerde aracılık edebilmektedirler.

2.3.2.a. İndol-3-asedik asit (IAA)

Fitohormonlar, özellikle oksinler bitki gelişiminin ve büyümesinin birkaç aşamasını kontrol ederler. Hücre genişlemesi, hücre bölünmesi, doku farklılaşması ve apikal dominansi oksinlerin bitkilerin gelişimi ve büyümesindeki en belirgin belirtileri arasında yer almaktadır. Mikrobiyal sentez ve oksinlerin bitki üzerindeki temel mekanizmasıyla ilgili yoğun bir şekilde araştırma yapılmaktadır. Oksin, İndol-3- asedik asit (IAA), birkaç PGPR suşu tarafından üretilen önemli bir fitohormon olmakla birlikte IAA üreten rizobakterilere uygulanmasında bitki büyümesini artırdığı iyi bilinmektedir (Vessey 2003; Goswami *et al.* 2016). Öncelikle, IAA'ın bitkilerde hem hızlı (hücre uzamasında artış) hem de uzun vadeli (hücre bölünmesi ve farklılaşması) tepkileri uyardığı bilinmektedir. Uzun süre IAA ile muamele edildiğinde bitkinin köklerinde son derecede iyi bir gelişim olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum ise bitkinin daha iyi besin maddelerini almasına ve sonuç olarak bitkinin genel olarak büyümesine yardımcı olmaktadır.

Rizosferdeki bakteri florasının yaklaşık %80'ni IAA üretebilmektedir ve böylece; bu tip mikroorganizmaların tarla uygulamalarında kullanılması bitkinin içsel olarak IAA seviyesini artırarak bitki büyümesinde belirli bir etkiye sahip olmaktadır. Oksinlerin bütün bitkiyi etkilediği bilinmektedir. Ancak PGPR türleri rizosferde IAA üretmektedir ve bitki kökleri tarafından üretilen IAA, PGPR türleri tarafından üretilen IAA'e nispeten daha etkilidir ve bu nedenle bitki kökleri daha çok etkilenmektedir (Goswami *et al.* 2016).

Rizobakteriler tarafından salgılanan IAA, kök sistemindeki büyüklüğü ve ağırlığı, dallanma sayısı, toprağa temas eden yüzey alanını büyük oranda artırarak etkilemektedir. Bütün bu değişiklikler toprakta meydana gelen besin değişimleriyle ilgili araştırmaların artışına neden olur ve böylelikle bitkilerin besin havuzu ve büyüme kapasitesini geliştirir (Gutierrez-Manero *et al.* 2001). Farklı PGPR'lar IAA sentezi için farklı metabolik yollara sahiptir. IAA bitki ile ilişkili mikroplar vasıtasıyla L-Triptofana bağımlı veya bağımsız yollarla sentezlenir ve 3 L-Triptofana bağımlı yol (yolak) olarak bilinmektedir. Bu PGPR'ların çoğu L-Triptofan kullanmakta ve IAA üretiminde bir öncü madde olarak kök eksüdalarında salgılanmaktadır. L-Triptofana bağımsız yollarla IAA üreten çok az yol (yolak) bilinmektedir, bu yolla IAA üreten en çok çalışılan organizmalardan biri *Azospirillum brasilense*'dir. Bununla birlikte, bu yolla IAA sentezi için kullanılan kesin yol (yolak) ve enzimler hala bilinmemektedir (Jha *et al.* 2012).

2.3.2.b. Sitokininler

Sitokininler mikroorganizmalar tarafından üretilen bir başka bitki fitohormonu sınıfını temsil etmektedirler (Persello-Cartieaux *et al.* 2013). Frankenberger ve Arshad 1995 yılında ayrıntılı bir şekilde oksinlerin, sitokininlerin, giberellinlerin ve absisik asitlerin bitkilere uygulandıklarında bitki büyümesini ve verimini artırdığını gözlemlemiştir. İndol asedik asite benzer bir şekilde sitokininlerin dış kaynaklı olarak bitkilere uygulandığında; hücre bölünmesini artırmasına, kök tüylerinin oluşumundaki artışa, kök uzamasındaki azalışa, sürgün oluşumlarına ve diğer fizyolojik tepkilere cevap vermektedir (Goswami *et al.* 2016).

Çeşitli bitkiler ile ilişkili mikroplarda sitokinin üretimi iyi bir şekilde karakterize edilmiştir. *Pseudomonas*, *Azospirillum* ve *Bacillus* gibi farklı cinslere ait olan bu organizmalar arpa, kanola, fasulye ve *Arabidopsis* gibi çok sayıda bitki türünden izole edilmiştir. Ortiz-Castro, Valencia-Cantero, and López-Bucio 2008 yılında yapmış oldukları çalışmalarının sonucunda *A. Thailana* ve *P. vulgaris* fidelerinin sitokinin üretimi yoluyla büyümesini teşvik eden *Bacillus megaterium* suşunu tanılamışlardır. Bununla birlikte; *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* diğer

farklı bakteri cinslerinin de sitokinin üretme kabiliyetine sahip olduğu bilinmektedir (Alexandre *et al.* 1996; Goswami *et al.* 2016).

En yaygın bulunan sitokinler adenin tipi olanlardır, bunlarda N6 pozisyonundaki adenin zeatin gibi bir izoprenoit veya kinetinde olduğu gibi bir aromatik yan halkayla yer değiştirmektedir. Zeatinler tRNA yolağı ve adenosin monofosfat (AMP) yolağı olmak üzere iki farklı yolak tarafından sentezlenmektedir. tRNA yolağında zeatin, izopentenil tRNA'ların geri dönüştürülmüş bir ürünüdür. AMP yolağındaki zeatin ise izopentenil vericisi dimetilaldifosfat (DMAPP) ve AMP, adenosin difosfat (ADP) veya adenosin trifosfat izopentenil transferazlar vasıtasıyla sentezlenmektedirler. Zeatin bir sitokinin türüdür. PGPR'lar tarafından yaygın olarak üretilmektedir (Goswami *et al.* 2016).

1970'li yılların başından beri sitokininlerin mikroorganizmalar tarafından üretildiği araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır. Philip ve Torrey 1972 yılında yapmış oldukları çalışmaların neticesinde *R. leguminosarum* ve *B. japonicum* 61A68 kültür filtratlarındaki sitokinin benzeri maddeleri rapor etmiş olup daha sonra bu maddeler zeatin olarak tanımlanmışlardır. Upadhyaya, Letham, Parker, Hobart ve Dart 1991 yılında *Rhizobium* suşları olan ANU 240 ve IC 3342 üzerinde yapmış oldukları çalışmanın sonucunda bu suşlarda önemli miktarlarda izopenteniladein (IPA) ve zeatin üretiminin olduğunu göstermişlerdir. García de Salamone, Hynes ve Nelson 2001 yılında yapmış olduğu çalışmada ise sitokininlerin üretimi ile buğday ve turp bitkilerinde *Pseudomonas* G20-18'in büyüme destekleyici etkisini bildirmişlerdir. Daha sonra 2011 yılında; Karnwal ve Kaushik *P. fluorescens* AK1 ve *P. aeruginosa* AK2'nin izopenteniladenin (IPA), dihidroksietazin ribozid (DHZR) ve zeatin ribozid (ZR) üretimini ve pirinç fideleri üzerindeki büyümeye olan katkısını göstermişlerdir. Yapılan çalışmaların neticesinde bugüne kadar bitkilerde 30'dan fazla farklı büyümeyi teşvik eden sitokinin bileşiği bulunmuştur (Goswami *et al.* 2016).

2.3.2.c. Giberellinler

Giberellinler 136 farklı yapısal molekülden oluşan büyük bir fitohormon grubudur.

Yüksek bitkilerde tohum çimlenmesi, kök uzaması, çiçeklenme ve meyve verme gibi birçok gelişim aşamasını etkileyen bir bitki hormonu grubudur. Bugüne kadar birçok bitki, bakteri ve fungus türünden çok sayıda giberellin tanılamaları yapılmıştır. Bunun yanı sıra giberellin üreten, bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler de tanılanmıştır. *Bacillus* suşları tarafından giberellinlerin üretimi nadir olarak görülmektedir ve giberellin üretebilme yeteneğine sahip bilinen suşları *B. pumilus* ve *B. licheniformis* 'tir. Bu büyüme düzenleyici sınıfın ortak yapısı 15-20 karbonlu bir iskelettir. Giberellinlerin belirgin etkisinin nedeni; bu hormonların bitki köklerinden toprak üstü kısımlarına doğru yer değiştirebilmesidir. Bu kısımlardaki etkiler dikkate değerdir ve ayrıca bakteriler oksin ürettiğinde toprak üstü kısımlardaki büyümeyi kolaylaştırmak ve besin maddesi temini için kök sistemini uyarmaktadır (Goswami *et al.* 2016).

Fizikokimyasal yöntemleri kullanarak bakterilerde gibberellin karakterizasyonunu Atzorn ve arkadaşları tarafından 1988 yılında rapor edilmiş olup, *R. meliloti* gnotobiyotik kültürlerinde GA1, GA4, GA9 ve GA20'nin varlığını ortaya koymuşlardır. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi gibi açık fizikokimyasal yöntemleri kullanarak *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum* ve *Bacillus* türlerinde teyit edilmiştir. Giberellerin tanılanması ve miktar belirlenmesi; Spektroskopi, yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi, HPLC vb. yöntemlerle mümkün olabilmektedir (Goswami *et al.* 2016).

Funguslarda ise genel olarak yüksek bitkilere benzer bir yolak izlenmekte olup buna rağmen farklı enzim ve genlere sahiptirler. Bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler tarafından üretilen giberellinlerin bitki üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir ancak bakterilerde olduğu gibi tohum çimlenmesinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmaların neticesinde giberellin üreten fungusların fitopatojen olduğu bildirilmektedir (Goswami *et al.* 2016).

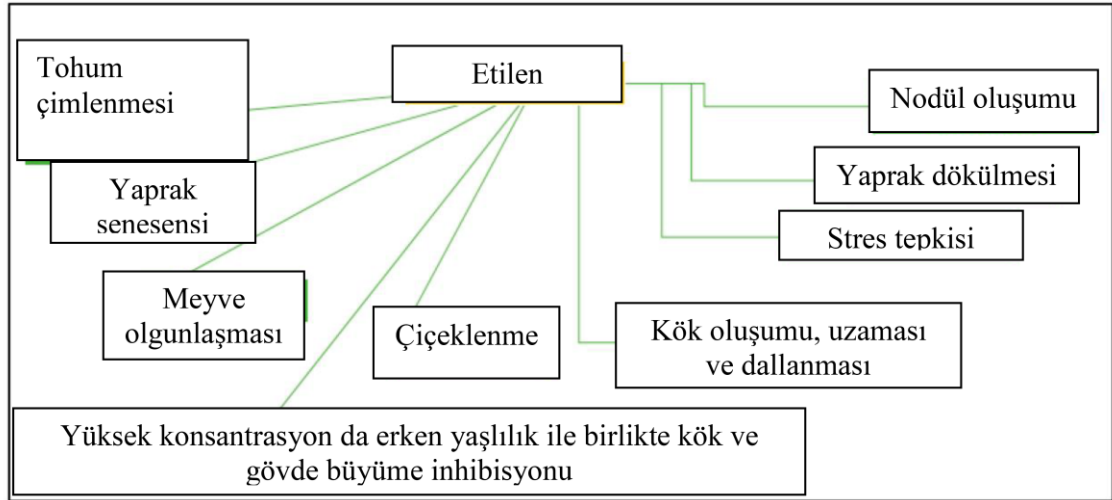
2.3.2.d. Etilen

Etilen, çok çeşitli biyolojik aktivite içeren eşsiz bir fitohormondur. Bu hormon, kök

uzamasını meyvelerin olgunlaşması, yaprakların dökülmesi gibi bitki gelişimi için anahtar rol üstlenen birçok gelişim sürecini uyarmaktadır. Yapılan çalışmalar neticesinde etilenin bir senesens hormonu olarak sınıflandırılmasının nedeni bu hormonun yüksek konsantrasyonlarda salgılanmasında bitki büyümesini engelleyici rolünden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Etilen yüksek konsantrasyonlarda yaprak dökülmesi, kök ve gövde büyümesinin engellenmesi gibi hücresel süreçleri uyararak bitkilerde erken yaşlanmaya sebep olmakla birlikte tarım ürünleri üzerinde olumsuz yönde etki göstermektedir (Goswami *et al.* 2016; Odoh 2017).

Bitkiler; kuraklık, soğuk, sel baskınları, patojen enfeksiyonları ve ağır metallerin varlığı gibi çeşitli çevresel streslere maruz kalma durumuna tepki olarak etilen fitohormonun öncü maddesi olan 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) sentezlemektedir. Stres koşulları altında üretilen yüksek etilen seviyeleri, kök uzaması veya baklagillerdeki azot fiksasyonu gibi süreçleri durdurarak erken yaşlanmaya neden olmaktadır (Goswami *et al.* 2016; Odoh 2017).

Rizosferdeki ACC'nin PGPR türleri tarafından kullanılması bozulma döngüsünü kısaltabilir ve çevresel strese dayanabilecek sağlıklı bir kök sistemini yeniden oluşturabilmektedir. Ayrıca, ACC deaminaz üreten ve IAA sentezleyen bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin, bitki büyümesini kolaylaştırabileceği birçok çalışmada gösterilmektedir. ACC deaminaz enzimi rizobakterilerin temel mekanizmasını oluşturmakla birlikte etilenin degradasyonunda kullanılabilmektedir. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* ve *Rhizobium* cinsleri etilen degradasyonunda kullanılan PGPR türleri arasında yer almaktadır. Örneğin; PGPR ACC deaminaz aktivitelerinin *Brassica napus* üzerinde yapılan çalışmalarda bu bitki üzerinde hayati öneminin olduğu tespit edilmiştir (Goswami *et al.* 2016; Odoh 2017).



Şekil 2.2. Etilen fitohormonun bitkiler üzerindeki etkileri (Vejan *et al.* 2016)

Çizelge 2.3. PGPR türleri tarafından üretilen fitohormonlar (Bhattacharyya and Jha 2012)

Hormon Üretimi	PGPR Suşu	Konukçu Bitki	Referans
IAA üretimi	<i>Aeromonas veronii</i>	Pirinç	Mehnaz <i>et al.</i> 2001
	<i>Agrobacterium sp.</i>	Marul	Barazani and Friedman 1999
	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	Marul	Barazani and Friedman 1999
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Buğday	Kaushik <i>et al.</i> 2000
	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Turp	Antoun <i>et al.</i> 1998
	<i>Comamonas acidovorans</i>	Marul	Barazani and Friedman 1999
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pirinç	Mehnaz <i>et al.</i> 2001
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Turp	Antoun <i>et al.</i> 1998
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Buğday	Timmusk <i>et al.</i> 1999
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soya fasülyesi	Garcia de Salamone <i>et al.</i> 2001
Sitokinin	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Marul	Noel <i>et al.</i> 1996
Giberellin	<i>Bacillus sp.</i>	Kızıl ağaç tohumu	Gutierrez-Manero <i>et al.</i> 2001

2.4. PGPR Türlerinin Biyoprotektant Olarak Kullanımı

PGPR türleri bitki rizosferinde ve toprakta doğal olarak bulunan bitki patojenlerine karşı biyolojik kontrolde önemli bir rol oynamaktadır. Bu türler bakteri, fungus ve nematod hastalıklarını geniş bir spektrum aralığında baskılayabilmektedir. PGPR türleri ayrıca viral hastalıklara karşı da koruma sağlayabilmektedir. Böylece bitki hastalıklarına karşı önlem olarak PGPR kullanımı dünyanın birçok bölgesinde yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Buna rağmen bitki patojenlerinin önemli bir şekilde kontrolü laboratuvar ve sera çalışmalarında gösterilse de arazi uygulamalarında alınan sonuçlarda istikrar sağlanamamıştır (Siddiqui 2006).

PGPR türleri üzerine yapılan çalışmalar neticesindeki son gelişmeler; bu türlerin çeşitliliği, kolonize olma yetenekleri, etki mekanizmaları, formülasyonları ve bitki patojenlerine karşı güvenilir biyokontrol ajanları olarak kullanılma şanslarını arttırmaktadır. Rizobakterilerin bazıları ayrıca haşereyle mücadele etmede de kullanılmaktadır. PGPR türlerinin tarımda en büyük uygulamaları arasında biyofertilizasyon ve patojenlere karşı biyolojik kontrol uygulamaları vardır. *Lolium perenne*'nin rizosferinden izole edilen bakteriler bitki büyümesini teşvik eden bakteriler ve biyokontrol ajanları olarak kullanılabilir. Biyolojik kontrol potansiyelli rizobakterilerin en önemli grubunu *Pseudomonas*'lar oluşturmakta ve bu grubun alt türleri tarım topraklarından yaygın olarak bulunmaktadır. *Pseudomonas*'lar biyokontrol ve büyüme destekleyici ajanlar gibi birçok özelliğe aynı anda sahip olabilmektedir. (Kremer and Kennedy 1996; Shoebitz *et al.* 2007).

Bu türlerin; *in vitro* ortamlarda hızlı bir şekilde gelişmeleri ve birlikte üremeleri, hızlı bir şekilde kök ve tohum salgılarını kullanabilmeleri, rizosferde hızla kolonize olmaları ve üremeleri, biyoaktif metabolitleri geniş bir spektrumda üretmeleri (antibiyotikler, sideroforlar, uçucu maddeler, büyüme teşvik eden maddeler örnek verilebilir), diğer mikroorganizmalarla rekabet etmeleri ve çevresel streslere uyum sağlamaları bu özelliklerinden bazılarıdır. Bu bilgilere ek olarak *Pseudomonas*'lar toprak kökenli patojenlere karşı doğal baskılayıcılardır. Biyokontrol ajanları olarak *Pseudomonas*'ların

en zayıf noktası dinlenme sporları (resting spores) üretmede yetersiz oluşlarıdır (*Bacillus spp.* türlerinin çoğunda olduğu gibi) ve bu durum ticari kullanım için bakteri formülasyonunu zorlaştırmaktadır. Toprak kaynaklı bitki hastalıklarının etkin bir şekilde yok edilmesi için bitki büyüme teşvik edici olan *Fluorescent pseudomonas* alt türleri de bir diğer önemli grubu oluşturur (Weller 1988; Weller *et al.* 2002; Weller 2007).

F. pseudomonas çeşitli biyokontrol ajanları arasında fitopatojen kontrolü için birçok mekanizmayla donatılmıştır ve bitki büyüme gelişimi için yaygın olarak kullanıldığı gibi birçok büyüme teşvik hormonları, hidrojen siyanid, katalaz, çeşitli sideroforlar, antibiyotik üretirler ve fosfat çözebilirler. *Pseudomonas fluorescens* MSP-393 rizobakterisi kıyı ekosistemlerindeki tuzlu topraklarda yetişen pirinç için etkin bir biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır. Garhvali'den izole edilen soğuğa dayanıklı *P. Fluorescens*'in bezelyede potansiyel biyokontrol ajanı olarak bitki büyümesini teşvik etmede rol oynadığı bilinmektedir (Negi *et al.* 2005; Paul *et al.* 2006).

2.4.1. Hidrojen siyanid (HCN) üretiminde PGPR kullanımı

Yabani otlar içerisinde biyokontrol ajanı olarak görev yapan rizobakterilerden *Deleterious rhizobacteria* (DRB), bitki gelişimini baskılamak için kök yüzeyinde kolonize olabilmektedir. Birçok DRB bitkiye özgüdür. Bu bakteriler tarafından üretilen siyanid, toksik özelliklere sahip zararlı bir kimyasaldır. Buna rağmen siyanid metabolik bir inhibitör olarak rol alır. Bakteri, fungus, alg, bitki ve böcekler gibi yüzlerce organizma tarafından avlanmayı ve rekabeti önlemek için sentezlenir ve salgılanırlar. Konukçu bitkiler genel olarak siyanid üreten bakteri suşlarının inokülasyonundan olumsuz etkilenmezler ve konukçuya özgü rizobakteriler biyolojik yabani ot ajanları olarak görev yapmaktadırlar (Suslow and Schroth 1982; Schippers *et al.* 1987; Zeller *et al.* 2007).

Rizosferde *Pseudomonas*'lar tarafından yaygın olarak üretilen bir diğer önemli sekonder metabolit ise hidrojen siyaniddir. Bu da kök metabolizmasına ve gelişimine etki eden

negatif bir gaz olarak bilinmektedir. Yabani otların biyolojik kontrolü için çevresel olarak uyumlu bir potansiyel mekanizmadır. *Pseudomonas* türlerindeki biyokontrol metabolitleri, çevresel kirleticiler, HCN üretiminin farklılıklarına göre yapılan sınıflandırmada, rizosferde *Pseudomonas* (%88.89) ve *Bacillus* (%50) benzerliğinin olduğu tespit edilmiştir (Schippers *et al.* 1990; Ahmad *et al.* 2005; Charest *et al.* 2005; Heydari *et al.* 2008).

2.4.2. Siderofor üretiminde PGPR kullanımı

Demir bütün canlı organizmalarda temel gelişim elementidir. Toprak habitatlarında ve bitki yüzeylerinde demir eksikliği biyolojik olarak rekabeti tetiklemektedir. Demir yönünden fakir topraklarda bitki büyümesini teşvik eden bakteriler düşük molekül ağırlıklı siderofor olarak adlandırılan bileşikler üretirler ve demir iyonunun alınımı için rekabet ederler. Sideroforlar; bakteri, fungus ve bitkiler gibi mikroorganizmalar tarafından salgılanan yüksek afiniteli küçük demir şelat bileşenleridir ve yunancada demir taşıyıcıları anlamına gelmektedir. Birçok siderofor ribozomal olmayan peptitlerden oluşur ve bunun sonucu olarak çoğunun biyosentezi bağımsız gerçekleşmektedir. Sideroforlar ayrıca bazı patojenik bakterilerde demir alınımında çok önemlidirler. Bu moleküller Fe^{+3} bağlayıcıları arasında en güçlü grup olarak yer almaktadır ve bunların arasında *Enterobactin* en iyi bilinenidir. Siderofor üreten izolatların ayrımı Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) tekniğine göre gerçekleşmektedir. İzolatların çoğu gram negatif bakterilerin içerisinde yer alan *Pseudomonas* ve *Enterobacter* cinslerindendir. Gram pozitif bakterilerde ise siderofor üretiminin *Bacillus* ve *Rhodococcus* cinsleri tarafından yapıldığı gözlemlenmiştir (Neilands 1952; Loper and Henkels 1997; Raymond *et al.* 2003; Challis 2005; Miethke and Marahiel 2007; Tian *et al.* 2009).

pH dahil olmak üzere, demir seviyesi, demir iyonlarının farklı formları, diğer iz elementlerin varlığında yeterli miktarda azot, karbon ve fosfor siderofor sentezini modüle eden sayısız çevresel faktörlerdendir. Bakteri gelişiminin yanı sıra siderofor üretimi de; $(NH_4)_2SO_4$ ve amino asitler tarafından uyarılır. Bununla birlikte optimum

siderofor üretimi üre varlığında elde edilir. Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler tarafından üretilen sideroforlar “Krom Azurol S Analizi” vasıtasıyla konvensiyonel olarak tespit edilir (Cattelan *et al.* 1999; Duffy and Défago 1999; Sayyed *et al.* 2005; Sarode *et al.* 2007; Avşar 2017). Bu test sideroforlardan bağımsız olan genel bir analizdir. Sideroforlar çeşitli fungus ve bakteriler tarafından üretilmektedir ve genellikle demir iyonu şelat ligandları yönünden sınıflandırılırlar. Sideroforların büyük grupları arasında fenolatlar, hidroksamatlar ve karboksilatlar (örneğin; sitrik asit türevleri) yer alır. Toprak bakteri izolatlarından *Azotobacter vinelandii* MAC529 ve *B. cereus* UW85 siderofor üretmektedirler ve bu bakteriler zirai verimi arttırmak için etkili PGPR türleri olarak kullanılmaktadır. Çay bitkisinin rizosferinde yer alan *Bacillus megaterium* siderofor üretebilmektedir ve böylece hastalık şiddetini azaltarak bitkinin büyümesini teşvik eder. Şeker kamışı (*Saccharum sp.*) ve çavdar otunun (*Lolium perenne*) endorizosferinden izole ve karakterize edilmiş olan *E.coli*’nin maksimum seviyede siderofor ürettiği ve bitkilerin gelişimine yardımcı olduğu bulunmuştur (Kloepfer 1980; Husen 2003).

2.4.3. PGPR türlerinin antifungal aktivitesi

PGPR türleri fitopatajenlerin proliferasyonunu engelleyerek bitki gelişimini artırır ve dolayısıyla bitki gelişimini desteklemiş olurlar. Bazı PGPR türleri antifungal antibiyotik sentezlerler. Örneğin; *P. fluorescens* tarafından üretilen 2,4-diasetil floroglusinol fitopatojenik fungusların gelişimini inhibe eder. *Fusarium* alt türleri tarafından üretilen fusarik asid PGPR türleri tarafından ayrıştırılır ve bu şekilde antisolgunluk ajanı olarak kullanılır ve patogenezi önler. PGPR türlerinin bir kısmı ayrıca fungal hücreleri parçalayabilecek enzimler üretebilmektedir. Örneğin; *Pseudomonas stutzeri* tarafından üretilen kitinaz ve laminarinaz *Fusarium solani*’nin misellerini parçalar (Mauch *et al.* 1988; Nowak *et al.* 1994).

Son yıllarda *P. fluorescent* türlerinin rizosferde kolonize olma yeteneklerinden dolayı önemli tarımsal mantar hastalıklarına karşı potansiyel biyokontrol ajanı olarak kullanılması tavsiye edilmiştir. Tütün bitkisinin kök çürümesinde, nohutta ve buğdayda

kök çürümesinde, şeker pancarında meydana gelen hastalıklara karşı birçok tarımsal üründe kullanılmaktadır. *P. flourescent* ayrıca pirinç ve şeker kamışı rizosferinde *Rhizoctonia bataticola* ve *Fusarium oxysporum*'a karşı güçlü bir antifungal aktiviteye sahiptir. Yine nohut rizosferinde fitopatogenik funguslara karşı *in vivo* ve *in vitro* koşullarda *Pseudomonas* türlerinin antagonistik etkilere sahip oldukları gözlemlenmiştir (Gaur *et al.* 2004; Reddy and Rao 2009).

2.4.4. Patojenlerin kontrolü

Toprak mikroorganizmaları, toprak çevresini etkileyen çok çeşitli biyokimyasallar üretirler. Toprak patojenlerinin büyümesini ve aktivitelerini olumsuz etkileyen canlı grupları arasında toprak bakterileri ve toprak fungusları yer almaktadır. Örneğin PGPR'lar toprak patojenleri üzerinde olumsuz etkilere neden olabilecek hidrojen siyanürü (HCN) üretirler. Buna ek olarak; toprak mikroorganizmaları bitki direnç sistemini teşvik ederek patojenlere karşı bitki direncini artırabilir (Principe *et al.* 2007; Jalili *et al.* 2009; Miransari 2011). Rizosferdeki toprak mikroplarının varlığı ve farklı bileşiklerin üretimi bitki büyümesini ve direnç sistemini uyarabilir. Bu bitki genlerinin ekspresyon yoluyla; patojenlere karşı bitki direncini etkileyen bazı ürünler veya kök eksüdatları üretebilir. Böylelikle toprak mikrobiyal popülasyonunu ve rizosferdeki aktivitelerini etkileyebilmektedir (Principe *et al.* 2007). Örneğin; Ryu ve arkadaşlarının 2003 yılında yapmış oldukları çalışmada bitkilerdeki sistemik direnç indüksiyonun *Bacillus* türleri varlığında bütanediol ve asetoinin de dahil olduğu çeşitli ucucu bileşenlerinin üretimi yoluyla uyarıldığını göstermişlerdir.

Genellikle, *Pseudomonas* ve *Bacillus* türleriyle ilişkili olan PGPR'ların toprak patojenleri üzerindeki olumsuz etkileri aşağıda gibi sıralanmıştır:

- 1) Antibiyotik bileşiklerinin üretimi (HCN, pirolnitrit, floroglusinol, fenazin, pyoluteorin ve halkalı lipopeptidler) örneğin elektron taşınımını inhibe edebilen,
- 2) Bitki sistemik direnç indüksiyonu,
- 3) Patojenlerin bitki büyümesini baskısı altına alma kabiliyetlerine müdahale etmek

örneğin; patojenler tarafından üretilen tercih edilmeyen degradasyona sebep olan ürünler vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Haas and Défago 2005; Miransari 2011; Qin *et al.* 2011).

2.4.5. PGPR türleri tarafından kitinaz ve glukanaaz üretimi

Biyokontrol ajanları tarafından, toprak kaynaklı patojenlerin kontrol altına alınabilmesi için kullanılan en önemli mekanizmalar arasında hücre duvarını parçalayan enzimlerin üretimi yer almaktadır. PGPR türleri tarafından salgılanan β -1,3-glukanaaz, kitinaz, selüloz ve proteaz gibi hücre duvarını parçalayan enzimler, mantar patojenlerinin hücre duvarını parçalayarak mantar hifleri gelişimi üzerinde doğrudan etki yapmaktadır. Kitinaz, fungal hücre duvarının ana bileşenini oluşturan çözünmeyen lineer bir polimer olan β -1, 4-N-asetilglukozamin, kitini degrade eder. *Paenibacillus* ve *Streptomyces* suşları tarafından sentezlenen β -1,3-glukanaaz, patojenik olan *F. oxysporum*'un mantar hücresi duvarlarını kolaylıkla degrade edebildiği yapılan araştırmalar sonucunda gözlemlenmiştir (Goswami 2016). Benzer bir şekilde *Bacillus cepacia* β -1,3-glukanaaz sentezleyerek, toprak kaynaklı patojenlerden olan *R. solani*, *P. ultimum* ve *Sclerotium rolfsii*'nin hücre duvarlarını tahrip etmektedir. Kitinolitik aktiviteye sahip potansiyel biyokontrol ajanları arasında *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* türleri yer almaktadır. Gram negatif bakteriler arasında ise *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *P. aeruginosa* ve *P. fluorescens*'in kitinolitik aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Goswami *et al.* 2016).

Rizobakterilerin, hücre duvarını parçalayan enzimleri, hedef patojenin hücre duvarlarının yapısal bütünlüğünü etkiler. Someya ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada, güçlü bir biyokontrol suşu olan *S. marcescens* B2'de kitinolitik ve antifungal aktivitelerini toprak kaynaklı olan *Rhizoctonia solani* ve *F. oxysporum* patojenleri üzerinde denenmiştir. Bu suş ile birlikte inoküle edilen fungal patojenlerin misellerinde; hiflerde şişkinlik, hiflerde kıvrılma ve hiflerin uç kısımlarında patlama gibi çeşitli anormallikler gözlemlenmiştir. *Sclerotium rofsii* ve *F. Oxysporum* türlerinin fasülye üzerindeki uygulamalarında hücre duvarını yıkan enzimlerin aktiviteleri de

fitopatonejik enfeksiyonlardan korunmaya örnek olarak verilebilmektedir. Bu nedenle, bu enzimlerin PGPR tarafından üretilmesi mantar patojenlerine karşı biyolojik kontrol maddesi olarak kategorize edilebilir (Goswami *et al.* 2016).

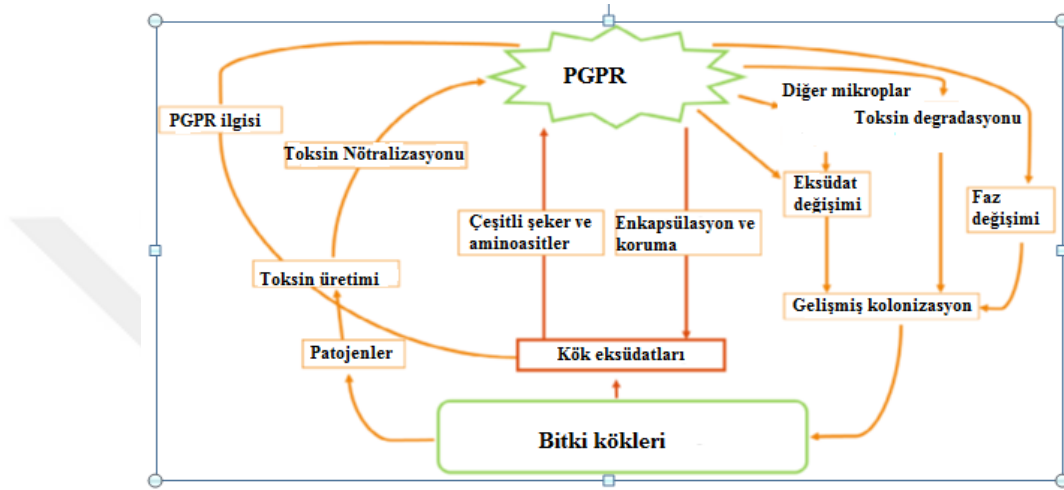
2.4.6. PGPR türleri tarafından antibiyotik üretimi

Tarımsal ürünlerdeki bitki patojenlerine karşı mikrobiyal antagonistlerin kullanılması kimyasal zirai ilaçların alternatifi olarak önerilmiştir. *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerine içeren PGPR'lar, antibiyotik üreten patojen mikroorganizmaların supresyonlarında etkin rol oynamaktadırlar. Bu bakteriyel antagonistler, hücre dışı metabolitlerin salgılanması yoluyla bitki patojenlerinin baskılanmasını zorlamakla birlikte düşük konsantrasyonlarda bile inhibisyona yol açarlar (Goswami *et al.* 2016).

Bacillus cinsine ait bakteriler, çok çeşitli antibakteriyel ve antifungal antibiyotikler üretirler. Subtilin, subtilozin A, TasA ve sublançin de dahil olmak üzere bu bileşikler, ribozomal orijinli olup bunların bazıları ise iyi bilinmektedir ancak bakilisin, klorotetain, mikobasilin, rhizocticins, bakillaen, difficidin ve surfakin, iturin ve fengisin ailelerine ait lipopeptitler ribozomal olmayan peptid sentetazlar veya poliketiz sentatazları tarafından oluşturulur (Leclerc *et al.* 2005). Model organizma olan *B. subtilis* 168 ve bitki köklerinde koloni oluşturabilen *B. amyloliquefaciens* FZB42, çok çeşitli antibakteriyel ve antifungal antibiyotikler üretirler ve bu türlerin antibiyotik biyosentezinde yer alan gen kümeleri tanımlanmıştır (Chang *et al.* 2007). *B. amyloliquefaciens* FZB42'de dokuz gen kümesi (*srf*, *bmy*, *fen*, *nrs*, *dhb*, *bac*, *mln*, *bae*, *dfn*) biyoaktif peptidlerin sentezini yönlendirdiği bilinmektedir (Goswami *et al.* 2016).

Antibiyotikler ayrıca, *Pseudomonas* suşları tarafından üretilmektedir. Bu suşlar arasında *P. fluorescens* ve *P. aeruginosa*'da antibiyotik üretimi gözlemlenmiş olup bu antibiyotikler arasında 2,4 Diasetil Phloroglusinol (DAPG), Fenazin-1-karboksilik asit (PCA), Fenazin-1-karboksamit (PCN), Pyoluteorin (Plt), Pirolnitrin (Prn), OomisinA, Viscosinamide, Butyrolactones, Kanosamine, Zwittermycin-A, Aerugine, Ramnolipidler, Cepaciamide A, Ecomycins, Pseudomonic asit, Azomisin, antitumor

antibiyotikler FR901463, Cepafungins ve antibiyotik karalisin yer almaktadır. Bu antibiyotiklerin bilinen antiviral, antimikrobiyal, böcek ve memeli antifeedant, antihelmintik, fitotoksik, antioksidan, sitotoksik, antitümör ve PGPR aktivitelerinin olduğu bilinmektedir (Goswami *et al.* 2016).



Şekil 2.3. PGPR türleri tarafından antibiyotik üretimi (Goswami *et al.* 2016).

2.5. PGPR Türlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Konvensiyonel yöntemler

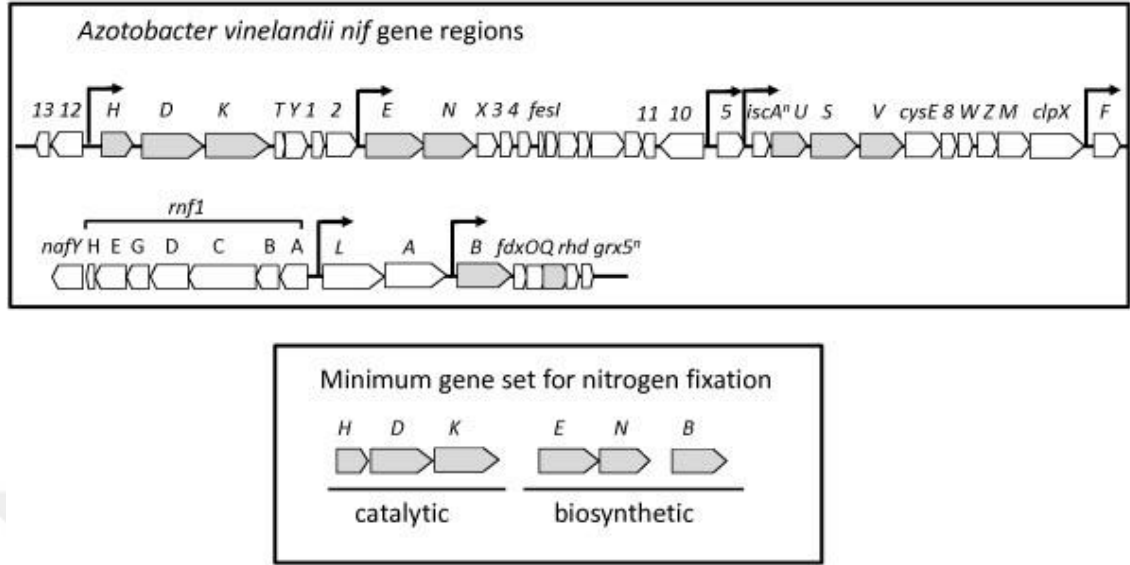
Son yıllarda rizobakterilerle ilgili yapılmış birçok akademik çalışmalar incelendiğinde bugüne kadar azot fiksasyonu, fosfat çözebilme yeteneği, IAA gibi çeşitli bitki büyümesini teşvik edici hormonları üretebilme, siderofor bileşenleri üretebilme gibi bitki büyümesini teşvik edici rizobakteri olma özelliğinin tespit edilmesinde konvensiyonel yöntemler kullanılmış ve bu yöntemler sayesinde birçok bakterinin PGPR özellikleri tespit edilmiştir. Artan ilgi ve çalışmaların sayısına karşın bu yöntemlerin uzun vadede sonuç vermesi, daha kolay, ekonomik, hızlı, güvenilir yeni yöntemlerin geliştirilmesini konu alan çalışmaların yapılmasını tetiklemiştir (Sharan and Nehra 2011; Gopalakrishnan *et al.* 2014; Chauhan *et al.* 2015).

2.5.2. Moleküler yöntemler

Günümüze kadar PGPR türleri üzerine yapılan araştırmaların sayısındaki önemli artış, konvensiyel yöntemlerin yerini alabilecek daha güvenilir, ekonomik, kolay ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Son yıllarda bu ihtiyacın karşılanması için doğrudan PGPR özelliklerinin ortaya çıkmasından sorumlu gen bölgelerini hedef alan PCR temelli moleküler tekniklerin kullanılması en önemli yaklaşımlardan birisi haline gelmiştir. Örneğin; Bruto ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış oldukları çalışmada, çeşitli PGPR türlerinin spesifik gen aileleri incelenmiş ve ACC deaminaz (*acdS*), fosfat çözebilme (*pqqB*, *pqqC*, *pqqD*, *pqqE*, *pqqF*), azot fiksasyonu (*nifD*, *nifH*, *nifK*), IAA üretimi (*ipdc*) ile ilgili çok sayıda gen tanımlanmıştır. Yine literatürdeki benzer birçok güncel çalışmada da PGPR ile ilişkilendirilebilecek çok sayıdaki spesifik genin bilgisine de ulaşmak mümkündür (Spaepen *et al.* 2008; Mashiguchi *et al.* 2011; Bruto *et al.* 2014; Nascimento *et al.* 2014; Won *et al.* 2014; Borland *et al.* 2015; Cho *et al.* 2015; Parsons *et al.* 2015). Buna karşın halen PGPR türlerinin güvenilir, ekonomik, kolay ve hızlı olarak analiz edilmesine olanak sağlayacak yeni moleküler tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5.2.a. Molibdenli nitrogenaz (*Nif*) geni

Molibden nitrogenaz (*Nif*) en çok gruplara ayrılan ve tüm nitrogenaz enzimleri arasında kapsamlı bir şekilde incelenen çeşitidir (Rees and Howard 2000). Molibden nitrogenazın yapısal bileşenlerini kodlayan genler, *nifH*, *nifD* ve *nifK*'dır (Dos Santos *et al.* 2012). Bu yapısal genlerin yanı sıra, diazotroflar arasında korunmuş ve nitrogenazların katalize olabilmelerinde görev alan bir *nif* geni çekirdeği vardır. Bu *nif* geni çekirdeği içerisinde; *nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ* vb. gen grupları yer almaktadır (Zheng *et al.* 1998; Dixon and Kahn 2004; Rubio and Ludden 2008; Dahal 2016).

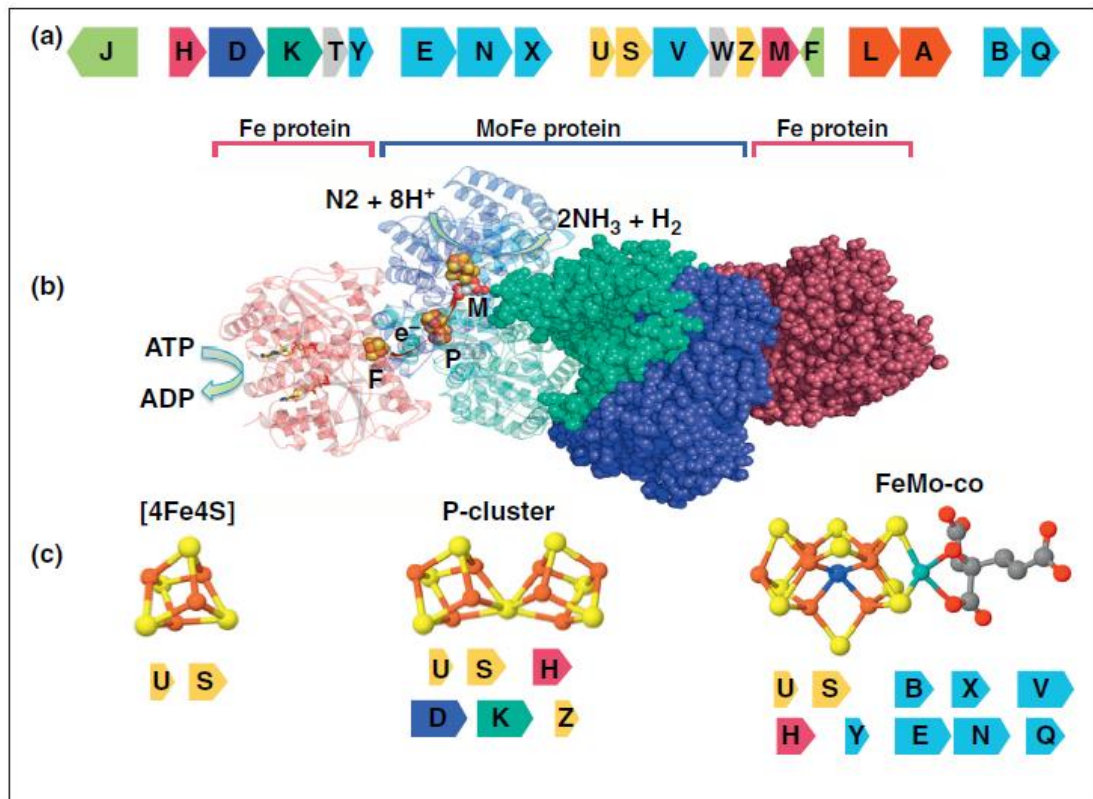


Şekil 2.4. *Azotobacter vinelandii*'de azot fiksasyonu için gerekli minimum *nif* geninin gösterimi (Dahal 2016)

Mo-nitrogenaz iki ayrı oksijenli kararsız metaloproteinden oluşur. Bunlar; *nifD* ve *nifK* tarafından kodlanan $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer yapıda olan MoFe proteini ile ve *nifH* tarafından kodlanan homodimer yapıda Fe proteindir. Bu bileşenlerin her ikisi de oksijen tarafından geri döndürülemez şekilde zarar görür ve katalizlenme işlemi için 2 mol amonyaka dönüştürülen diazot gazının her molü için 16 mol ATP'ye ihtiyaç duymaktadır. Bu enerji harcamaları, substrat indirgemesi için gerekli olan elektron transferi işlemiyle ilişkilendirilir (Dahal 2016).

Nitrogenaz 3 metalli kümeden oluşmaktadır. Bunlardan birtanesi MoFe proteini içerisinde yer alan ve FeMo-co olarak adlandırılan, biyolojide en kompleks heterometal kümelerden biridir. FeMo-co, nitrogen indirgenmesi için katalitik alanı sağlar ve molibden, demir, sülfür, bir merkezi karbon atomu ve bir organik parça olarak homositrat ihtiva eder (Mo Fe₇ S₉ C-homositrat). Geriye kalan 2 metal küme ise; Fe proteini içerisinde yer alan [4Fe-4S] kümesi ve MoFe proteini içerisinde kümelenen P kümesidir (8Fe-7S). Bu iki metal küme Fe proteinden P kümesi vasıtasıyla FeMo-co katalitik alanına bir elektron transfer iletim hattı sağlar. Bu biyokimyasal sürecin karmaşıklığı *Klebsiella oxytoca* gibi bakterilerde düzenleyici genler haricinde nitrogenaz kompleksinin işlevi için çok sayıda *nif* geni gereklidir (Dahal 2016).

İlk bakışta, biyolojik azot fiksasyonu için zorlu fizyolojik gereklilikler düşünüldüğünde özellikle bitki *nif* genlerinin düzenlenmesinde nitrogenazı oksijenden korumak gibi önemli engeller ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte; doğa, siyanobakterilerin yaşam alanlarındaki uyumsuz azot fiksasyon ve oksijenli fotosentez süreçlerini mekansal ve zamansal ayırım yoluyla uzlaştırmayı başarmıştır (Oldroyd and Dixon 2014; Dahal 2016).



Şekil 2.5. Nitrogenazın yapısı ve biyosentezinde gerekli genlerin gösterimi (Oldroyd and Dixon 2014)

Çizelge 2.4. Azot fiksasyonunda görev alan (*nif*) gen ürünleri ve fonksiyonları (Chai 2007).

Nif Geni	Fonksiyonu
Q	Molibdenin nitrogen içerisine yerleştirilmesi
B	FeMo-kofaktör sentezi
A	Pozitif regülasyon
L	Negatif regülasyon
F	Elektron taşıyıcı: flavodoksin
M	Nitrogenaz redüktaz süreci
Z	FeMo proteininin olgunlaşması ve aktivasyonu
W	Olgunlaşma ve aktivasyon; FeMo-proteinin oksijen koruması
V	FeMo-kofaktör sentezi: homositrat-sentaz
S	Homodimerik sistein, desülfüraz, metal küme sentezinde S aktivasyonu
U	FeMo-protein süreci
X	FeMo-kofaktör sentezi ve negatif regülasyon
E	Diazot proteine FeMo-co sentezi ve eklenmesi
Y	MoFe-protein süreci
T	Nitrogenaz olgunlaşması
K	FeMo-protein β alt birimi
D	FeMo-protein α alt birimi
H	Fe-protein alt birimi
J	Elektron transferi: piruvat-flavodoksin oksidoredüktaz

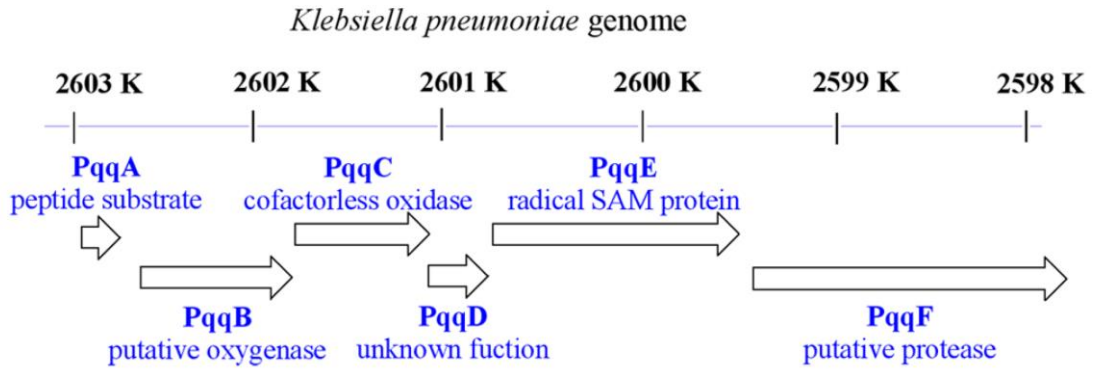
2.5.2.b. Pirolokinolin kinon (Pqq) geni

Pirolokinolin kinon (PQQ) ilk olarak metilotrofik bakterilerde 1979 yılında metanol dehidrogenaz için bir koenzim olarak tanımlanmıştır (Salisbury *et al.* 1979; Mısra *et al.* 2012). PQQ, farklı enzimlerle kovalent bir şekilde etkileşime girer (McIntire 1994) ve PQQ ile etkileşen proteinler ilk olarak kinon proteinler olarak adlandırılmıştır. PQQ dahil olmak üzere kinonlarla etkileşen ve fonksiyonlarını düzenleyen bu proteinler kinon proteinleri grubuna dahil edilmiştir. Bu proteinlerin çoğunluğu bakteriyel dehidrogenazlar olmasına rağmen, çok sayıda ki diğer enzimler için de PQQ temel bir kofaktör olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Bunlar arasında en dikkat çekiçi olanları *E. coli*'de bulunan amin oksidaz/dehidrogenazlar (McIntire 1994; Khairnar *et al.* 2007), *Deinococcus radiodurans*'da bulunan Ser/Thr protein kinazları yer alırken (Rajpurohit and Misra 2010), memeli sisteminde ise 2-aminoadipik 6-semialdehid dehidrogenaz ve AMP'ye bağlanan bir sinyal proteini, fosfopantetin bağlanma domainleri ve 6 tane PQQ bağlanma motifleri yer almaktadır. PQQ çok çeşitli gıdalarda ve diğer kaynaklarda tespit edilmiştir (Kumazawa *et al.* 1995; Mitchell *et al.* 1999). PQQ üzerine yapılan çalışmalar neticesinde hemen hemen tüm katı ve sıvı gıda ürünlerinde 0.19–7.02 ng aralığında bulunmaktadır (Misra *et al.* 2004; Noji *et al.* 2007). PQQ, tüm organizmaların büyümesinde ve gelişiminde önemli rol oynamasına rağmen; yüksek organizmalardaki sentezi açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu organizmalar arasından PQQ ile en çok bilinen canlı grubu mikrobiyal kaynaklı olanlardır.

PQQ sentezinin biyokimyasal yolağı [4C] tirozin ile desteklenmiş ortamda yetiştirilen *Methylobacterium extorquens* AM1'de izlenmiştir (Smidt *et al.* 1991; Junkefer *et al.* 1995). PQQ sentezinin genetiği ise *Acinetobacter calcoaceticus* (Goosen *et al.* 1989), *Enterobacter intermedium* 60-2G (Kim *et al.* 2003), *Gluconobacter oxydans* (Hölscher and Görisch 2006), *Klebsiella pneumoniae* (Meulenberg *et al.* 1992), *M. extorquens* AM1 (Toyama *et al.* 1997) ve *P. fluorescens* CHA0 (Schnider *et al.* 1995) bakterileri üzerinde çalışılmıştır. PQQ sentezinde yer alan gen sayısı, *A. calcoaceticus*'da 4 tane, metilotrofik bakterilerde ve *G. oxydans*'da 6-7 gen arasındadır. PQQ sentezi yapan bakterilerin çoğunluğu bir operonda 6 veya 7 gen (pqqABCDEF/ G) içermektedir. PQQ

biyosentezi bu genlerin kodlamış olduğu birkaç enzimi içerir. Örneğin; *pqqE* geni, PQQ sentaz adı verilen bir düzenleyici enzim tarafından kodlanmaktadır (Goldstein *et al.* 2003). PqqA, tirozin ve glutamat taşıyan, genellikle kaynaştırılmış 24 amino asitten küçük bir peptidi kodlar ve sonraki PQQ dönüşümleri için bir öncü form oluştururlar (Goosen *et al.* 1989). Bu molekül, bir öncü peptid ile bağılı kalır ve yolakta yer alan enzimler tarafından biyosentetik süreçteki daha sonraki bir aşamada ayrılır. PqqA geni ürünü bazı bakterilerde PQQ sentezi için gereksiz olmakla birlikte bu genin kullanılabilirliği PQQ biyosentezinde hız belirleyici bir adım olarak görülebilmektedir.

E. coli, PQQ sentezinde yetersizdir ve bu nedenle, *Erwinia herbicola* (Liu *et al.* 1992), *Pseudomonas cepacia* (Babu-Khan *et al.* 1995), *Rahnella aquatilis* (Kim *et al.* 1998), *E. intermedium* (Rodriguez and Fraga 1999; Kim *et al.* 2003) ve *D. radiodurans* (Khairnar *et al.* 2003) PQQ sentaz geninin klonlanması için konukçu olarak kullanılmışlardır. Transgenik *E. coli*'den üretilen PQQ çözünmeyen kaya fosfatlarını inorganik fosfora çözünebilir hale getirebilir. *E. coli*'de PQQ sentezinde yardımcı olan ve görünüşte bilinen PQQ sentaz genleriyle çok az benzerlik gösteren veya hiç dizi homolojisi benzerliği olmayan farklı bakterilerden çeşitli DNA fragmanları tespit edilmiştir. Bu durum ise farklı mikroorganizmalarda PQQ sentezi ile ilişkili metabolik yollardaki çeşitliliği ortaya koymaktadır. *E. coli*, farklı bakterilerden PQQ sentaz genlerinin, mineral fosfat çözünürlüğünün işlevsel tamamlayıcısı olarak klonlanmada kullanıldığından, mineral fosfat çözünürlüğü aktivitesinde *G. oxidans*'tan klonlanan tüm PQQ sentez operonu *E. coli*'de eksprese edildi ve PQQ sentezi gösterildi. (Yang *et al.* 2010). Son zamanlarda yapılan çalışmalar doğrultusunda PQQ genin diğerk birçok fizyolojik süreçte rol aldığı gösterilmiştir.



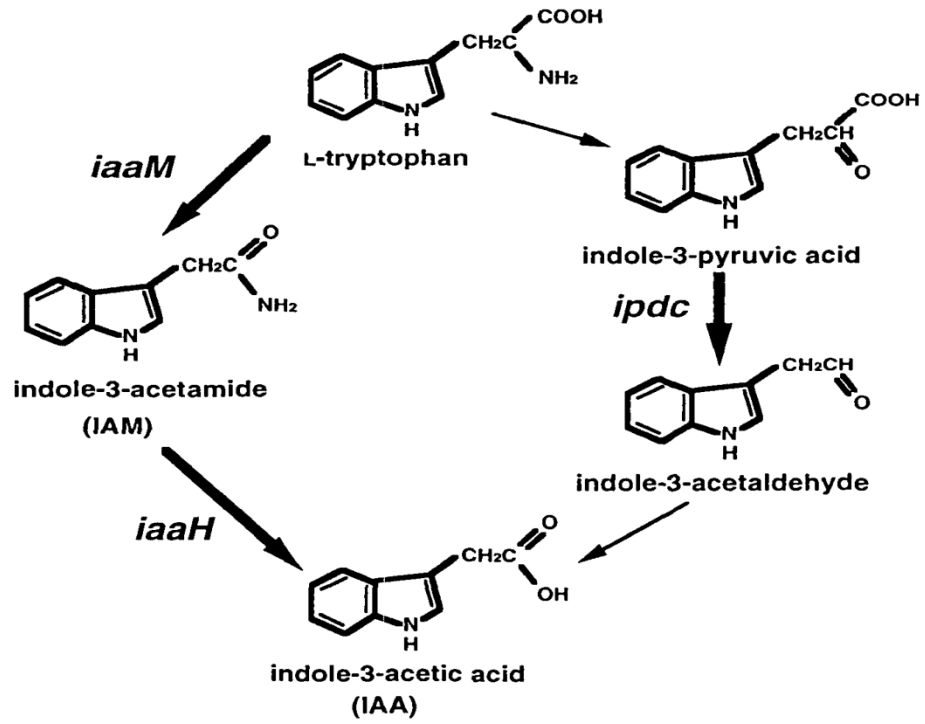
Şekil 2.6. *Klebsiella pneumoniae* operonunda *Pqq* biyosentezi (Klinman and Bonnot 2014)

2.5.2.c. İndol piruvat dekarboksilaz (IPDC) geni

IpdC geni, indol piruvat dekarboksilaz enzimini kodlar ve İndol-3-Piruvat (IPA) yolağındaki ana basamağı katalize eder (Patten and Glick 2002). Bu gen çeşitli bakterilerden klonlanmıştır ve İndol-3-Asetik Asit (IAA) eksikliği bulunan mutantların tespitinde önemli rol almaktadır (Koga *et al.* 1991; Costacurta *et al.* 1994; Zimmer *et al.* 1994; Brandl and Lindow 1996; Carreno-Lopez *et al.* 2000; Yagi *et al.* 2001; Patten and Glick 2002; Ryu and Patten 2008; Malhotra and Srivastava 2008; Fedorov *et al.* 2010; Duca *et al.* 2014). *IpdC* geni ile kodlanmış olan enzim α -keto asit dekarboksilazdır ve bu enzimlerin geniş substrat özgüllüğü bilinmektedir. Bazı bakterilerin indol piruvat dekarboksilazlarının, indolpiruvat için yüksek afiniteye sahip iken; fenilpiruvat, piruvat, benzoil format üzerinde de rol almaktadırlar. Dolayısıyla bu enzimlerin ana rolü IAA'nın üretimi olmayabilir, ancak yolağın bu aşamasını tesadüfen katalize edebilirler (Schütz *et al.* 2003; Phi *et al.* 2008; Patten *et al.* 2012).

IPA yolağı, patojenik olmayan bitki ile ilişkili bakteriler arasında yaygındır ve ayrıca *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* ve *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* gibi fitopatojenlerde var olduğu ileri sürülmüştür (Duca *et al.* 2014). Bu fitopatojenlerden bazılarında IPA yolağının bulunması, karşılık gelen ara ürünlerin tanımlanması veya veya bakteriyel hücrelerin bu yolağın indol türevlerini metabolize etme kabiliyetlerinin tespit edilmesi temelinde dayanmaktadır. Bununla

birlikte IPA yolağında görev alan genleri tanımlamakla birlikte, IAA biyosentezindeki bu genlerle ilgili enzimleri deneysel olarak doğrulamak gerekmektedir (Patten *et al.* 2012; Duca *et al.* 2014).



Şekil 2.7. Prokaryotlarda IAA sentezinin şematik gösterimi (Kawaguchi and Syono 1996)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma süresince kullanılan alet ve cihazların listesi aşağıda verilmiştir.

Buzdolabı	: Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Derin Dondurucu	: Nuaire, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316 PK
Hassas Terazi	: Mettler Toledo, CHINA, AL204
İnkübatör	: Binder, GERMANY, BD53
Manyetik Karıştırıcı	: Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083
Mikrodalga Fırın	: Arçelik, TÜRKİYE, MD592
Mini Karıştırıcı	: IKA, U.S.A., M51, SN 03017581
Otoklav	: Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Saf Su Cihazı	: GFL, GERMANY, 2004
Sıcak Su Banyosu	: Memmert, GERMANY, 854
Steril Kabin	: Esco, SINGAPORE, AC2-4E1
UV/VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, JAPAN, RC 232C
pH Metre	: Hanna, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202
Santrifüj	: Hettich EBA 21, GERMANY
Mikrodalga Fırın	: Beko MD1505, TÜRKİYE
Elektroforez Tankı	: Owl, U.S.A., B2,
Elektroforez Akım Sağlayıcı	: Owl, U.S.A., OSP300-2Q
Jel Görüntüleme Sistemi	: DNR BioImaging Syste ISRAEL MiniBis Pro
Buz Makinesi	: Scotsman ITALY, AC45

QIAxcel Advanced System	: Qiagen, GERMANY
Heating Block	: Daihan Scientific, KOREA, WiseTherm [®] , HB-96
PCR Cihazı	: SensoQquest, GERMANY, Gradient LabCycler, 1123240169
Vortex	: IKA, U.S.A., MS2
Rotator	: GFL, GERMANY, 3025
Otomatik Pipet Setleri	: Eppendorf, GERMANY, 0.1-2.5, 1-10, 10- 100, 20-200, 100-1000 µl

3.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir.

Mikroorganizma Stok Besiyeri

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Yeast extract	5 g
Pepton	10 g
Saf su	800 ml
Gliserol	150 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıdaki maddeler steril bir erlen içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülür. pH'sı 5,8 ayarlanır ve daha sonra 150 ml gliserol eklenerek son hacim 1000 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve kriyovial tüplere 1,5 ml hacimlere bölünür.

Nutrient Agar (NA): Deney bakterilerinin canlandırılması için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Nutrient Agar	28 g

Bu besiyerin hazırlanışında 28 g Nutrient agar hassas terazide tartılarak kaynama sıcaklığına getirilen 1000 ml saf su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde petri kaplarına aktararak besiyerin hazır hale gelmesi sağlanmıştır.

Tryptic Soy Agar (TSA): Deney bakterilerinin canlandırılmasında alternatif besiyeri olarak kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Tryptic Soy Agar	40 g

Bu besiyerin hazırlanışında 40 g Tryptic soy agar hassas terazide tartılarak kaynama sıcaklığına getirilen 1000 ml saf su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde petri kaplarına aktararak besiyerin hazır hale gelmesi sağlanmıştır.

LB Broth: PGPR türlerinin IAA üretimi testi çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Tryptic Soy Agar	40 g

Bu besiyerin hazırlanışında 20 g LB broth hassas terazide tartılarak kaynama sıcaklığına getirilen 1000 ml saf su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüştür ardından

pH'sı 7,4 ayarlandıktan sonra bu besiyeri 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde cam deney tüplerine aktarılmıştır.

Azot Free Medium: PGPR özelliğe sahip olduğu düşünülen izolatların klasik yöntemlerle azot fikse etme potansiyellerini analiz edebilmek için bu besiyeri hazırlanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Sükroz	20 g
FeSO ₄	0,01 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g
NaCl	0,2 g
Na ₂ MoO ₄	0,005 g
KH ₂ .PO ₄	0,5 g
Agar	18 g

Bu besiyerin hazırlanışında yukarıda belirtilen kimyasallar sırasıyla 1000 ml saf su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde petri kaplarına aktararak besiyerin hazır hale gelmesi sağlanmıştır.

Pikovskaya's Agar: PGPR özelliğe sahip olduğu düşünülen izolatların klasik yöntemlerle fosfat çözme potansiyellerini analiz edebilmek için bu besiyeri hazırlanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,21 g
Maya Özü	0,5 g
D-Glukoz	10 g
Ca ₃ O ₈ P ₂	5 g

H ₈ N ₂ O ₄ S	0,5 g
KCl	0,2 g
KH ₂ .PO ₄	0,5 g
MnO ₄ .S	0,0001 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0002 g
Agar	15 g

Bu besiyerin hazırlanışında yukarıda belirtilen kimyasallar sırasıyla 1000 ml saf su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde petri kaplarına aktarılaraq besiyerin hazır hale gelmesi sağlanmıştır.

TE Tamponu: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Tris-HCl	1.2 g
Etilen diamin tetra asedik asit	0.372 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 1.2 g Tris-HCl ve 0.0372 g etilendiamin tetra asedik asit (EDTA) 1000 ml ultra saf su içerisinde çözülür ve oluşan çözeltinin pH değeri 8’e ayarlandıktan sonra 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edilir.

%70’lik Etil Alkol: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Saf etil alkol	700 ml
Ultra saf su	300 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında 700 ml saf etil alkolün hacmi 300 ml steril ultra saf su ile

1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

Liziz Tamponu: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Tris-HCl	1,36 g
EDTA	0,422 g
NaCl	0,664 g
%10'luk SDS Çözeltisi	250 ml
Triton X-100	22,7 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında ilk olarak Tris-HCl ve EDTA 650 ml ultra saf su içerisinde tamamen çözülür ve çözeltinin pH değeri 8'e ayarlanır. Daha sonra pH ayarlaması yapılan çözeltinin üzerine NaCl eklenir ve son hacim 727,3 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir. Çözelti otoklavdan çıkartıldıktan sonra uygun sıcaklığa geldiğinde üzerine 250 ml %10'luk SDS ve 22,7 ml Triton X-100 eklenir. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edilir.

%10'luk SDS çözeltisi: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Sodyum dodesil sülfat	100 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 100 g sodyum dodesil sülfat 800 ml ultra saf su içerisinde çözüldükten sonra son hacim yine ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edilir.

STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) Çözeltisi: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Tris	1,36 g
NaCl	0,422 g
NaCl	0,664 g
%10'luk SDS Çözeltisi	250 ml
Triton X-100	22,7 ml

1,21 g Tris, 1,75 g NaCl ve 3,72 g EDTA saf su içerisinde çözöldü. 1 N HCl ile pH'sı 8 olana kadar titre edildi. Toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edildi.

Proteinaz K: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Steril saf su	1 ml
Proteinaz K	20 mg

1 ml steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K eklenerek iyice çözöldükten sonra - 20°C'de muhafaza edilmiştir.

5 M NaCl çözeltisi: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
Steril saf su	1000 ml
NaCl	292,2 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 292,2 g sodyum klorür 1000 ml ultra saf su içerisinde

iyice çözülür. Hazırlanan çözelti amber şişede, oda sıcaklığında muhafaza edilir

0,5X TBE Tamponu: DNA jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
10X TBE Stok Solüsyonu	50 ml
Steril Distile Su	950 ml

Bu tamponun hazırlanışında 50 ml 10X TBE stok solüsyonu üzerine 950 ml steril distile su eklenir. Hazırlanan tampon +4°C’de muhafaza edilir.

1X TAE Tamponu: DNA jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml için</u>
10X TAE Stok Solüsyonu	100 ml
Steril Distile Su	900 ml

Bu tamponun hazırlanışında 100 ml 10X TAE stok solüsyonu üzerine 900 ml steril distile su eklenir. Hazırlanan tampon +4°C’de muhafaza edilir.

6X Yükleme Tamponu

<u>İçerik</u>	<u>100 ml için</u>
Bromfenol blue	0,1 g
Gliserol	40 ml

0,1 g bromfenol blue, 40 ml gliserol içerisinde çözülür. Çözeltinin toplam hacmi 1X TAE ile 100 ml’ye tamamlanır. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde +4°C’de muhafaza edilir.

Ticari olarak liyofilize halde alınan primerleri (nmol)/0,1 (100 µM/ml) çözmek için katolog bilgileri dahilinde gerekli olan 1XTE 41 buffer miktarı belirlenmiş ve 100 µM/ml'lik stok hazırlanmıştır. Buradan da $C1 \times V1 = C2 \times V2$ formülü kullanılarak, 5 µM/ml lik primer çalışma solüsyonu hazırlanmış ve PCR çalışmasında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir (Adıgüzel 2006; Sezen 2015).

3.2. Yöntem

3.2.1. Toprak bakterilerinin temini ve izolasyonu

Erzurum ve çevresinden farklı noktalardan toplanan toprak örnekleri bitki rizosferinden, yüzeyinden alınarak steril falkon tüplerine aktararak Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Bakterioloji laboratuvarına getirilmiştir. Toprak örnekleri 1 ml veya 1 g olacak şekilde hazırlanarak, 9 ml steril %0,9'luk fizyolojik su içerisinde, 1-2 saat çalkalanarak homojenize edilmiş, bir seri dilüsyon (10^{-5} 'e kadarlık dilüsyon serisi) hazırlanmıştır. Bu dilüsyonların her birinden birer paralel olmak üzere, flora bakterilerinin izolasyonu için, TSA ve NA besiyerlerine yayma ekim yapılarak, 28°C'de bir hafta süresince etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca 1, 3, 5 ve 7. günlerde, petri plaklarında gözlemlenen farklı görünüme sahip bakteri kolonilerine ait kültürler elde edilerek izolasyonları yapılmıştır.

3.2.2. Toprak bakterilerinin çalışma stoklarının hazırlanması ve saklanması

İzole edilen toprak bakterileri nutrient broth besiyerinde $1-2 \times 10^9$ bakteri/ml (O.D.540 – 0,1-0,2) yoğunluk olacak şekilde geliştirildi. Sonra ortama son konsantrasyonu %10-15 olacak şekilde gliserol eklendi ve homojenize edildi. Kültür 1 ml hacimlerde bölünerek steril eppendorf tüplerine aktarıldıktan sonra -87°C'de saklandı.

3.2.3. Konvensiyonel yöntemlerle PGPR türlerinin tespit edilmesi

3.2.3.a. Azot fiksasyonu yapan izolatların belirlenmesi

Azotun bitkilerin kullanımına hazır hale gelmesinin ancak çeşitli mikrobiyal ve fizyokimyasal süreçler sonunda gerçekleştiğinden hareketle PGPR özelliğe sahip olduğu düşünülen izolatların azot fikse etme potansiyelleri, L^{-1} : 20 g sukroz; 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g $CaCl_2$; 0,2 g NaCl; 0,005 g Na_2MoO_4 ; 0,5 g KH_2PO_4 ; 18 g agar ihtiva eden ve azot içermeyen ortam kullanılarak araştırıldı.

3.2.3.b. Fosfatlı bileşenleri çözebilen izolatların belirlenmesi

Topraktaki organik fosfatın bitki tarafından kullanılabilmesi için mineralizasyonu, mineralizasyon için ise organik asitler ve fosforik asitler önemlidir. Bu çerçevede PGPR bakterilerin ürettiği organik asitler fosfat çözmeleri bakımından önemli olup çalışmamızda izolatların fosfat çözebilme potansiyeli, L^{-1} : 10 g glukoz; 5 g $Ca_3(PO_4)_2$; 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,2 g NaCl; 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 g KCl; 0,5 g maya ekstraktı; 0,002 g $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,002 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ihtiva eden Pikovskaya besiyerinde araştırıldı (Nautiyal 1999; Vaikuntapu *et al.* 2014).

3.2.3.c. IAA üreten izolatların belirlenmesi

Bitki büyümesini teşvik eden önemli doğal oksinlerden biri olan indol asetik asit üretimi Vaikuntapu ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapmış oldukları çalışmadaki prosedüre prosedüre göre yapılmıştır. Bu prosedüre göre izolatlar %1 triptofan ihtiva eden LB broth besiyerine inoküle edilerek 28°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonrasında kültürler 6000 g de 30 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantdan 2 ml alınarak 2 damla o-fosforik asit ve 4 ml Salkowski çözücüsü (50 ml of %35 of perklorik asit + 1 ml of 0.5 M $FeCl_3$ solüsyonu) ile karıştırılmıştır. Sonuç olarak, 530 nm de kalorimetrik olarak IAA ölçümü yapılmıştır.

3.3. Konvensiyonel Yöntemlere Alternatif Olabilecek PCR Temelli Moleküler Yöntemlerin Geliştirilmesi

3.3.1. DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan PGPR türlerinin DNA ekstraksiyonu, Sezen 2015 tarafından modifiye edilen izolasyon metoduna göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

- DNA'sı izole edilecek bakteriler Nutrient agar (NA) besiyerine 3 faz halinde ekilerek petriler 28-32°C'ye ayarlı inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- Steril edilmiş, ağzı kapaklı 1,5 ml'lik ependorflara 1000 µl STE (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağlar) tamponu konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri kültürü ilave edilmiştir.
- Tüpler 2500 rpm'de vortekslenerek homojenize olmaları sağlanmıştır.
- Vortekslenen tüpler 10 000 rpm'de 10 dak süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak atılmış ve peletin üzerine tekrar 1000 µl STE tamponu eklenerek, 10 dak 10 000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrar edilmiştir.
- Santrifüj sonrası, oluşan üst faz atılarak peletin üzerine 500 µl STE tamponu ilave edildikten sonra mikropipetle dikkatlice alıp vermek (pipetaj) suretiyle tamponun peletle iyice karışması sağlanmıştır.
- Tüpler 75°C'ye ayarlı su banyosunda 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 15. dakikasında tüpler alınarak 4-5 kez alt üst edilerek tekrar inkübasyona bırakılmıştır.
- Su banyosundan çıkartılan tüplere 50 µl %10'luk SDS (proteinler arasındaki disülfid bağlarını parçalar) ve 7 µl proteinaz K (proteinleri parçalar) eklenmiş ve 40°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat süreyle inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 M olacak şekilde 5M NaCl ve 0,1 hacim %10'luk CTAB/0,7 M NaCl (DNA'yı polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) eklenmiştir.

- Tüpler 65°C'ye ayarlı su banyosunda 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Su banyosundan alınan tüplere eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol (genellikle, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Kloroform proteinleri denatüre ederek, sıvı ve organik fazların ayrışmasını sağlar. İzoamil alkol ise ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek köpürmeyi engeller) ilave edilerek 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı karıştırılmıştır.
- Tüpler 16 000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz yeni steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe 0,1 hacim %10 CTAB/0.7 M NaCl (ortamda bulunabilecek polisakkarit kalıntılarını elemine etmede kullanılır) eklenmiştir.
- 65°C'ye ayarlı su banyosunda tüpler 15 dakika bekletilmiştir.
- Su banyosundan çıkarılan tüplere eşit hacimde 24:1 kloroform:izoamilalkol eklenmiş ve tüpler 15 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı çalkalanmıştır.
- Tüpler tekrar 16 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası oluşan üst faz yine yeni steril bir ependorfa alınmıştır.
- Tüpler üzerine 0,6 hacim izopropanol (DNA'yı bağlayarak, iplikcikler halinde çökmesini sağlar) eklenmiştir. Tüpler -20°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir.
- Buzdolabından çıkartılan tüpler 15 000 rpm de 15 dakika santrifüjlenmiştir.
- Üzerine -20°C'de bekletilen %70 lik etanolden (DNA'yı yıkamak amacıyla kullanılır) 500-600 µl eklenmiş ve 15 000 rpm de 15 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant yavaş ve dikkatlice dökülmüştür.
- Peletin üzerine yeniden %70 lik etanolden 500-600 µl eklenerek, 15 000 rpm de 15 dakika santrifüjenmiştir. Süpernatant dikkatlice dökülerek tüpler ağzı açık bir şekilde etil alkolün uçması, DNA'nın kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2-3 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Tamamen kuruduktan sonra, DNA'lar 50-70 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek, iyice çözünmesi sağlanmış ve üzerlerine 2-3 µl RNase ilave edilmiştir.
- DNA'lar %0,6'lık agaroz jelinde yürütülmüş ve jelde tek parça bant veren örnekler 4°C'ye kaldırılarak sonraki çalışmalar için hazır hale getirilmiştir (Sezen 2015).

3.3.2. DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin temizliği yani protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edilir. Kuvarts küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçülmüş ve elde edilen değer kör olarak kaydedilmiştir. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm'de absorbansı yeniden ölçülmüştür. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulunmuştur. Yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlanarak, A260 ve A280 değerlerine bakılarak $A260 / A280 = 1-1,7$ olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır.

3.3.3. DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu (µg/ml)

DNA konsantrasyonu (µg/ml)=A260 x Seyreltme Faktörü (500) x 50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlenmiştir. DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon (100ng/µl) x İstenen Hacim (200 µl)/Stok DNA Konsantrasyonu (µg/ml) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve bu hesaplamaadan elde edilen değer stok DNA çözeltisinden alınacak miktarı vermiştir. Bu miktar TE çözeltisi ile 200 µl'ye tamamlanarak 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve DNA tüpleri -86°C'de sonraki çalışmalarda kullanılıncaya kadar saklanmıştır (Hündür 2015;Sezen 2015).

3.3.4. Bakteri izolatlarının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Test izolatlarından saflaştırılmış olan genomik DNA'lerden bakteri sistematigi açısından önemli olan 16S rRNA bölgesi evrensel primerler (forward ve reverse primerler) kullanılarak *in vitro* koşullar altında PCR yardımı ile çoğaltılmıştır (Hündür 2015; Sezen 2015).

Reaksiyonun (Master mix'in) hazırlanması

PCR'ı yapılacak her bir örnek için 3 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, %0.01 jelatin pH: 8.3), 0.6 µl dNTP (deoksiniükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM), 3 µl UNI 16S-L (forward ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA), 3 µl 16S-R (reverse ATG GTA CCG TGT GAC GGG GGG TGT GTA), 1.2 µl DMSO, 0.6 µl MgCl₂ (50 µM), 0.3 µM / ml taq DNA polimeraz ve 15.3 µl sdH₂O ile 27 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışıma son olarak 3 µl template DNA (100 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Master mix ve template DNA içeren ependorf tüplerin üzerine buharlaşmayı engellemek amacıyla 15 µl mineral yağ ilave edilmiştir.

PCR programı

PCR için hazırlanan örnekler, 95°C'de 2 dakika denatürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 54 °C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72 °C'de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü cihazına yerleştirildi. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı.

PCR için hazırlanan örnekler, 95°C'de 2dk denatürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 53°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü (termocycler) cihazına yerleştirilmiştir. Seçilen programda hedef bölgelerin amplifikasyonu yapılmıştır.

16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

Kesilen PCR ürünleri QIAxcel Advanced analiz sistemiyle değerlendirilmiştir. 16S rRNA PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin baz dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)

var olan diğerk bakteriyal dizilerle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiş ve gen bankası kabul numaraları alınmıştır (Hündür 2015; Sezen 2015).

3.3.5. PGPR nitelikleri için ilgili gen bölgelerinin belirlenmesi

Çalışmamızın bu aşamasında; konveksiyonel yöntemlerde gözlemlenen; azot fiksasyonu, fosfat çözebilme, IAA üretimine sahip PGPR özellikli bakterilere literatürde ki mevcut primerlerle uygulamalar, PGPR nitelikleri için ilgili gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanıldı.

Çizelge 3.1. PGPR özelliği gösteren ilgili gen bölgeleri

PGPR özelliği	İlgili gen bölgeleri
Azot fiksasyonu	NifA, NifD, NifK NifH
Fosfat çözünme yeteneği	pqqB, pqqC, pqqD, pqqE, pqqF, pqqG,
Oksin sentezi	ipdC,

Çizelge 3.2. Literatürde yer alan primerlerin baz dizilimi

Primer	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	PGPR özelliği
nifH2/nifH1	TGYGAYCCNAARGCNG A	ADNGCCATCATYTCNCC	Azot fikse edebilme
Kadino/Emino	TGYGAYCCIAARGCIGA	GCRTAIAIIGCCATCATYTC	Azot fikse edebilme
F2/R6	TGYGAYCCIAAIGCIGA	TCIGGIGARATGATGGC	Azot fikse edebilme
pqqBCD	TTCAAGATGCTCAGCCA CTG	CGATCTTGTCGATGTTGTG C	Fosfat çözünmesi
PqqAB	TGTGGACCAAACCTGCA TACACTG	GATGCTCATGCCATCGAA	Fosfat çözünmesi

Çizelge 3.2. (devam)

PqqE	GATCGTCCTCGCCTGAG	GATGACACGGGAGTTTCGA	Fosfat
	TT	T	çözünmesi
PqqF	CCAACCTTACCCTCGCCA	CAGCGTTGGCCAAACATAG	Fosfat
	AT		çözünmesi
avbgltx1/	CGCCGGATCCAAAGAC	AGGGAGATCTCACCCGGAA	IAA üretimi
avbipdC1	GCCCATCAGGCGTC	TCCCGAACATG	

3.3.6. *In silico* uygulamalarla çalışmada kullanılacak ilgili bölgelere ait primerlerin tasarlanması

Çalışmamızın bu aşamasında; seçilmiş gen bölgelerine ait primerler, NCBI primer designing tool veri tabanı ile tasarlandı ve bu veri tabanında elde edilen primerler *in silico* olarak bilgisayar ortamında kontrol edildi. Primerlerin forward ve reverse Tm sıcaklıkları, baz sayıları, vb. özellikleri kontrol edilerek uygun primerler tasarlanarak sipariş edilmiştir.

Çizelge 3.3. Tasarlanan primerlerin baz dizilimi

Primer	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	PGPR özelliği
nifA1	GTCGACGTCCGGCTCATATT	GTAGAGCATACCCGACCTGC	Azot fikse edebilme
nifA2	ATACCGCCAAAGTCATGGCA	TCTTGCAAGGAGCGGAATGT	Azot fikse edebilme
nifD1	GCTGCAGTTCACCTCAGACT	TATTTGCGCAGGGAGGTTT	Azot fikse edebilme
nifH3	GTTTTACGGGAAGGGAGGCA	ACCACGTCTCCAAGAACGTC	Azot fikse edebilme
Pqq5	ATGCTGAAGGAAGTCGACGG	GATCCATCCGGAACAACGGT	Fosfat çözünmesi
PqqA2	ACTACGAAGAACGCCCCAAG	CGTTCATTGCGAAAGGCCAA	Fosfat çözünmesi
PqqB1	AATCCAAGCCAAAGCCCGTA	ATTGTGCGCCATCATGTGGGT	Fosfat çözünmesi

Çizelge 3.3. (devam)

PqqB2	AAGCCAAAGCCCGTACTCAA	TGGGTCATGTCGATGTGGTG	Fosfat çözünmesi
PqqF2	GTGTTGTTCTGGCGTCCAATC	GGCCATTTTTAGCTGGGTGC	Fosfat çözümü
İpdc6	TGGGGCTCGATTGGTTACAC	TTCCAGAGCCTTGGTAAGCG	IAA üretimi
İpdc7	GTGGGGCTCGATTGGTTACA	GGGATATCCGCTTTCGGGAG	IAA üretimi

3.3.7. Tasarlanan gen spesifik primerlerle PCR uygulamaları

Spesifik PCR uygulaması

Bakteriyel izolatların genomik DNA'ları kullanılarak literatürdeki ve veritabanından seçilmiş uygun primerler ile ilk etapta spesifik gen bölgelerine ait primerler dizayn edildi. Bu primerlerin ilgili gen bölgelerine ait primerler için PCR optimizasyonları (Tm sıcaklıkları, primer konsantrasyonu gibi) yapılarak ilgili gen bölgelerinin çoğaltılabilirliği kontrol edildi.

3.3.8. Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmamızın bu aşamasında; konvensiyonel yöntemler sonucunda PGPR özellikteki bakteriler tespit edildi. Bu aşamadan sonra konvensiyonel yöntemlere alternatif oluşturabilecek daha hızlı, güvenilir olan moleküler teknikler kullanılarak sonuçların değerlendirilmesi yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Toprak Örneklerinin Alınması ve Bakteri İzolasyonu

Erzurum ve çevresinde yer alan farklı bölgelere ait 15 alan belirlenmiştir. Bu bölgelerde yapılan arazi çalışmaları sonucunda 32 örnek bakteri izolasyonları yapılmak üzere laboratuvara getirilmiştir. Bu örneklerden toplamda 200 bakterinin izolasyonu koloni karakteristikleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Örneklemelerin yapıldığı bölgelere ait konum bilgileri ve örnekleme verileri Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Arazi çalışmasına ait konum ve örnekleme bilgileri

No	Yer Adı	Konum	Örnekleme Sayısı
1	Erzurum – Artvin Yolu 10. Km	40°2'60" Kuzey 41°20'32" Doğu	2
2	Akdağ Köyü Kırsalı	40°6'21" Kuzey 41°20'35" Doğu	2
3	Güzel Yayla Geçidi	40°11'13" Kuzey 41°27'45" Doğu	2
4	Erzurum – Artvin Yolu 50. Km – Mısır Tarlası	40°18'55" Kuzey 41°31'30" Doğu	2
5	Pehlivanlı Köyü – Tarla	40°29'42" Kuzey 41°30'9" Doğu	6
6	Uzundere Girişi	40°31'21" Kuzey 41°32'4" Doğu	1
7	Erzurum – Ağrı Yolu Sürülmüş Tarla	39°58'47" Kuzey 41°27'3" Doğu	3
8	Pasinler	39°59'3" Kuzey 41°42'14" Doğu	2
9	Erzurum Çevre Yolu	39°57'11" Kuzey 41°20'43" Doğu	3
10	Erzurum – Erzincan Yolu – Tarla	39°59'13" Kuzey 40°58'13.0" Doğu	2

Çizelge 4.1. (devam)

11	Aşkale – Yeşil Alan	39°55'23" Kuzey 40°40'28" Doğu	2
12	Erzincan – Erzurum Yolu – Tarla	39°57'1" Kuzey 40°50'30" Doğu	1
13	Kandilli – Kırsal Alan	39°54'58" Kuzey 40°51'53" Doğu	1
14	Kandilli – Tarla	39°56'40" Kuzey 40°52'4" Doğu	1
15	Ilıca – Tarla	40°25'5" Kuzey 41°29'22" Doğu	2

4.2. Moleküler Tanı Sonucu Belirlenen Bakteri Türleri

DNA izolasyonu yapılan bakterilerin 16S rRNA PCR amplifikasyonu sonucunda gen bankasında yer alan 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Bakteri izolatlarına ait bilgiler; Çizelge 4.2’de, 16S rRNA geni kısmi baz sıraları ile Ek 1-34’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Moleküler tanı sonucu belirlenen bakteri türleri

Bakteri Adı	Baz Sayısı	Query Cover	Benzerlik Oranı	Genbank Numarası
<i>Pseudomonas sp.</i> TAGEM15-70-B1	1388	100	99	MG584444
<i>Bacillus megaterium</i> TAGEM15-70-B2	1421	100	100	MG584445
<i>Bacillus toyonensis</i> TAGEM15-70-B3	1402	100	100	MG584446
<i>Acinetobacter bouvetii</i> TAGEM15-70-B4	1401	100	100	MG584447
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> TAGEM15-70-B5	1393	100	100	MG584448
<i>Pantoea sp.</i> TAGEM15-70-B6	1380	100	99	MG584449

Çizelge 4.2. (devam)

<i>Enterobacter cloacae</i> TAGEM15-70-B7	1404	100	100	MG584450
<i>Rhizobium sp.</i> TAGEM15-70-B8	1351	100	100	MG584451
<i>Exiguobacterium sp.</i> TAGEM15-70-B9	1428	100	100	MG584452
<i>Bacillus sp.</i> TAGEM15-70-B10	1423	100	100	MG584453
<i>Pseudomonas sp.</i> TAGEM15-70-B11	1406	100	100	MG685679
<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B12	1273	100	99	MG685680
<i>Bacillus simplex</i> TAGEM15-70-B13	1419	100	100	MG685681
<i>Acinetobacter bouvetii</i> TAGEM15-70-B14	1222	100	99	MG685682
<i>Acinetobacter sp.</i> TAGEM15-70-B15	1083	100	99	MG685683
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> TAGEM15-70-B16	1390	100	100	MG685684
<i>Acinetobacter lwoffii</i> TAGEM15-70-B17	1407	100	100	MG685685
<i>Enterobacter sp.</i> TAGEM15-70-B18	1406	100	99	MG685686
<i>Acinetobacter lwoffii</i> TAGEM15-70-B19	1393	100	100	MG685687
<i>Acinetobacter johnsonii</i> TAGEM15-70-B20	1385	100	100	MG685688
<i>Acinetobacter sp.</i> TAGEM15-70-B21	1403	100	99	MG685814
<i>Enterococcus sp.</i> TAGEM15-70-B22	1180	100	100	MG685815
<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B23	1401	100	100	MG685816
<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B24	1378	100	100	MG685817

Çizelge 4.2. (devam)

<i>Bacillus atrophaeus</i> TAGEM15-70-B25	1398	100	100	MG685818
<i>Bacillus aryabhatai</i> TAGEM15-70-B26	1415	100	100	MG685819
<i>Enterobacter</i> sp. TAGEM15-70-B27	1353	100	99	MG685820
<i>Bacillus atrophaeus</i> TAGEM15-70-B28	1413	100	100	MG685821
<i>Acinetobacter</i> sp. TAGEM15-70-B29	1218	100	99	MG685822
<i>Pseudomonas japonica</i> TAGEM15-70-B30	1404	100	99	MG685823
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> TAGEM15-70-B31	1425	100	100	MG685824
<i>Enterobacter cloacae</i> TAGEM15-70-B32	1358	100	100	MG685825
<i>Exiguobacterium</i> sp. TAGEM15-70-B33	1412	100	100	MG685826
<i>Bacillus</i> sp. TAGEM15-70-B35	1428	100	100	MG685828

4.3. Test Bakterilerine Konvensiyonel Yöntemlerin Uygulanması

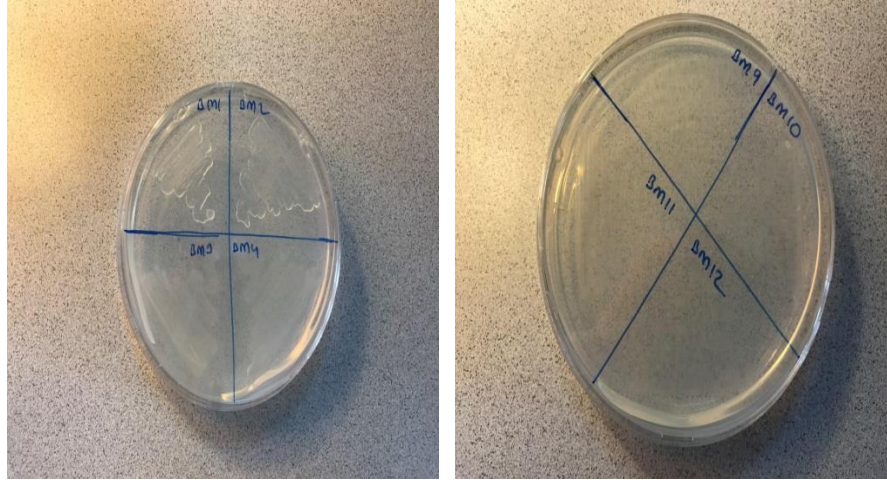
4.3.1. Azot fiksasyonu deneyleri

Moleküler çalışmaların yapılması için seçilen azot fikse edebilen ve azot fikse edemeyen test bakterilerinin bu özellikler yönünden doğrulanması amacıyla yapılan konvensiyonel azot fiksasyonu testlerinin sonuçları Çizelge 4.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. Test bakterilerinin azot fiksasyonu potansiyellerinin konvensiyonel yöntemlerle belirlenmesi

No	Azot Fiksasyonu (+)	Azot Fiksasyonu (-)
1	<i>Pseudomonas</i> sp. TAGEM15-70-B1	<i>Exiguobacterium</i> sp. TAGEM15-70-B9
2	<i>Bacillus megaterium</i> TAGEM15-70-B2	<i>Acinetobacter bouvetii</i> TAGEM15-70-B4
3	<i>Bacillus toyonensis</i> TAGEM15-70-B3	<i>Acinetobacter johnsonii</i> TAGEM15-70-B20
4	<i>Pseudomonas</i> sp. TAGEM15-70-B11	<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B12
5	<i>Acinetobacter</i> sp. TAGEM15-70-B15	<i>Acinetobacter lwoffii</i> TAGEM15-70-B19
6	<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B23	<i>Enterobacter</i> sp. TAGEM15-70-B18
7	<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B24	<i>Enterococcus</i> sp. TAGEM15-70-B22
8	<i>Enterobacter cloacae</i> TAGEM15-70-B32	<i>Acinetobacter</i> sp. TAGEM15-70-B21
9	<i>Exiguobacterium</i> sp. TAGEM15-70-B33	<i>Acinetobacter lwoffii</i> TAGEM15-70-B17
10	<i>Bacillus</i> sp. TAGEM15-70-B35	<i>Bacillus</i> sp. TAGEM15-70-B10

Bu verilerin değerlendirilmesinde kullanılan deneysel gözlemlere ait örnek görüntü de Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Azot fiksasyonu yapabilen ve yapamayan bakterilerin AFM agar besiyeri üzerinde gelişim durumlarının gösterilmesi [(+) solda ve (-) sağda]

4.3.2. Fosfat çözme deneyleri

Moleküler çalışmaların yapılması için seçilen fosfatlı bileşikler çözabilen ve çözemeyen test bakterilerinin bu özellikler yönünden doğrulanması amacıyla yapılan konvensiyonel fosfat çözme testlerinin sonuçları Çizelge 4.4’de özetlenmiştir.

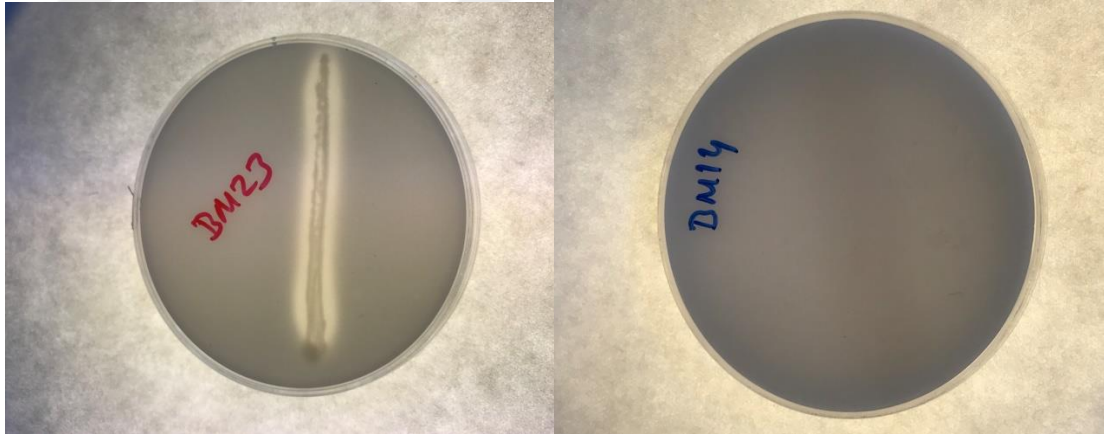
Çizelge 4.4. Test bakterilerinin fosfatlı bileşikler çözme potansiyellerinin konvensiyonel yöntemlerle belirlenmesi

No	Fosfat Çözme (+)	Fosfat Çözme (-)
1	<i>Rhizobium</i> sp. TAGEM15-70-B8	<i>Enterobacter cloacae</i> TAGEM15-70-B7
2	<i>Enterobacter</i> sp. TAGEM15-70-B18	<i>Bacillus megaterium</i> TAGEM15-70-B2
3	<i>Enterococcus</i> sp. TAGEM15-70-B22	<i>Exiguobacterium</i> sp. TAGEM15-70-B9
4	<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B24	<i>Acinetobacter johnsonii</i> TAGEM15-70-B20
5	<i>Bacillus atrophaeus</i> TAGEM15-70-B25	<i>Acinetobacter lwoffii</i> TAGEM15-70-B19

Çizelge 4.4. (devam)

6	<i>Bacillus aryabhatai</i> TAGEM15-70-B26	<i>Bacillus atrophaeus</i> TAGEM15-70-B28
7	<i>Enterobacter</i> sp. TAGEM15-70-B27	<i>Acinetobacter</i> sp. TAGEM15-70-B13
8	<i>Acinetobacter</i> sp. TAGEM15-70-B29	<i>Acinetobacter lwoffii</i> TAGEM15-70-B17
9	<i>Pseudomonas japonica</i> TAGEM15-70-B30	<i>Acinetobacter bouvetii</i> TAGEM15-70-B14
10	<i>Enterobacter cloacae</i> TAGEM15-70-B32	<i>Bacillus</i> sp. TAGEM15-70-B10

Test bakterilerinin fosfat çözme potansiyellerinin değerlendirilmesinde kullanılan deneysel gözlemlere ait örnek görüntü Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Fosfatlı bileşenleri çözebilen ve çözemeyen bakterilerin Pikovskaya’s agar besiyeri üzerinde gelişim durumları ve berrak zon oluşumu.

4.3.3. IAA üretme deneyleri

Moleküler çalışmaların yapılması için seçilen IAA üretebilen ve üretemeyen test bakterilerinin bu özellikler yönünden doğrulanması amacıyla yapılan konvensiyonel IAA üretme testlerinin sonuçları Çizelge 4.5’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. Test bakterilerinin IAA üretebilme potansiyellerinin konvensiyonel yöntemlerle belirlenmesi

No	IAA Üretme (+) Absorbans (OD ₅₃₀)	IAA Üretme (-) Absorbans (OD ₅₃₀)
1	<i>Pseudomonas</i> sp. TAGEM15-70-B1 0,322	<i>Acinetobacter johnsonii</i> TAGEM15-70-B2 0,012
2	<i>Bacillus megaterium</i> TAGEM15-70-B2 0,319	<i>Acinetobacter bouvetii</i> TAGEM15-70-B4 0,088
3	<i>Bacillus toyonensis</i> TAGEM15-70-B3 0,313	<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B12 0,087
4	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> TAGEM15-70-B5 0,420	<i>Bacillus cereus</i> TAGEM15-70-B12 0,064
5	<i>Pantoea</i> sp. TAGEM15-70-B6 0,440	<i>Acinetobacter bouvetii</i> TAGEM15-70-B14 0,076
6	<i>Rhizobium</i> sp. TAGEM15-70-B8 0,364	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> TAGEM15-70-B16 0,097
7	<i>Exiguobacterium</i> sp. TAGEM15-70-B9 0,404	<i>Acinetobacter lwoffii</i> TAGEM15-70-B17 0,082
8	<i>Bacillus</i> sp. TAGEM15-70-B10 0,448	<i>Acinetobacter lwoffii</i> TAGEM15-70-B19 0,078
9	<i>Pseudomonas</i> sp. TAGEM15-70-B11 0,432	<i>Acinetobacter</i> sp. TAGEM15-70-B21 0,084
10	<i>Bacillus</i> sp. TAGEM15-70-B35 0,372	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> TAGEM15-70-B31 0,072

Test bakterilerinin IAA üretebilme potansiyellerinin değerlendirilmesinde kullanılan deneysel gözlemlere ait örnek görüntü de Şekil 4.3’de verilmiştir.

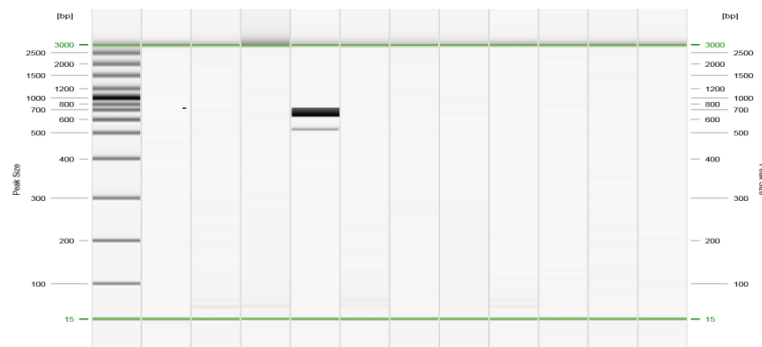


Şekil 4.3. Test bakterilerinin IAA üretebilme potansiyellerinin kolorimetrik olarak incelenmesi

4.4. Test Bakterilerine Moleküler Yöntemlerin Uygulanması

4.4.1. Azot fiksasyonuna yönelik moleküler deneyler

Azot fiksasyonu yönünden konvensiyonel denemelerde (+) ve (–) özellik gösteren test bakterilerinden izole edilen genomik DNA’lar, literatürde toprak bakterilerinin azot fiksasyonu yeteneklerinin araştırılması için önerilen Kadino/Emino, nifH1/nifH2, F2/R6 ve bu çalışmada ilk kez tasarlanan NifA1F/NifA2R primer setleri ile yapılan PCR çalışmaları için kullanılmıştır. Bu çalışmalara ait bulgular Şekil 4.4 – 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Azot fiksasyonu (+) özellikli test bakterilerinin Kadino/Emino primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.4'deki jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda yalnızca *Pseudomonas* sp. TAGEM15-70-B11 kodlu bakteride mevcut Kadino/Emino primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda azot fiksasyonuna yönelik moleküler uygulamalarda azot fikse edebilen 10 bakteri arasından sadece 1 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %10'luk başarı gözlemlenmiştir.



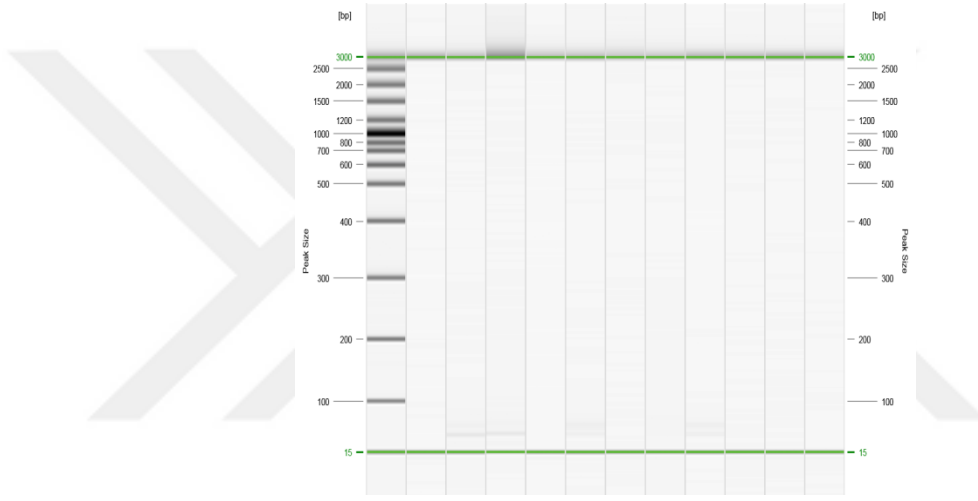
Şekil 4.5. Azot fiksasyonu (-) özellikli test bakterilerinin Kadino/Emino primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.5'de verilen jel görüntüsü değerlendirildiğinde; azot fiksasyonuna yönelik moleküler uygulamalarda azot fiksasyonu (-) 10 bakteriden Kadino/Emino primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde azot fiksasyonu (-) cevap veren örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



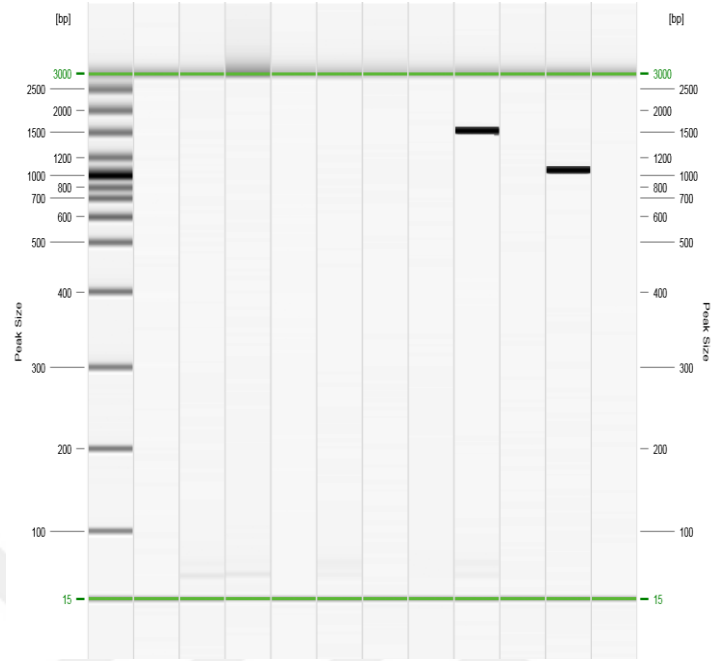
Şekil 4.6. Azot fiksasyonu (+) özellikli test bakterilerinin NifH1/NifH2 primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Yine Şekil 4.6'daki jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda; *Bacillus megaterium* TAGEM15-70-B2, *Bacillus toyonensis* TAGEM15-70-B3, *Pseudomonas* sp. TAGEM15-70-B11, *Acinetobacter* sp. TAGEM15-70-B15, *Bacillus cereus* TAGEM15-70-B23 kodlu bakterilerde mevcut NifH1/NifH2 primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda azot fiksasyonuna yönelik moleküler uygulamalarda azot fikse edebilen 10 bakteri arasından sadece 5 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %50'lik başarı gözlemlenmiştir.



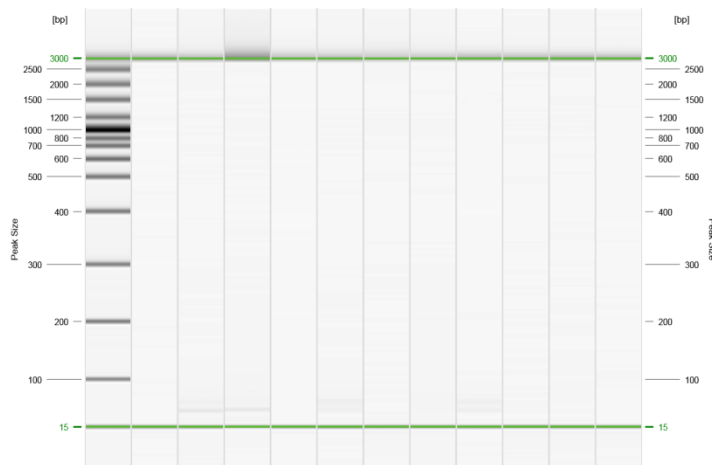
Şekil 4.7. Azot fiksasyonu (–) özellikli test bakterilerinin NifH1/NifH2 primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.7'de belirtilen jel görüntüsünün incelenmesi sonucunda; azot fiksasyonu belirlemeye yönelik moleküler uygulamalarda azot fiksasyonu (–) olan 10 bakteriden NifH1/NifH2 primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde azot fiksasyonu (–) cevap veren örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



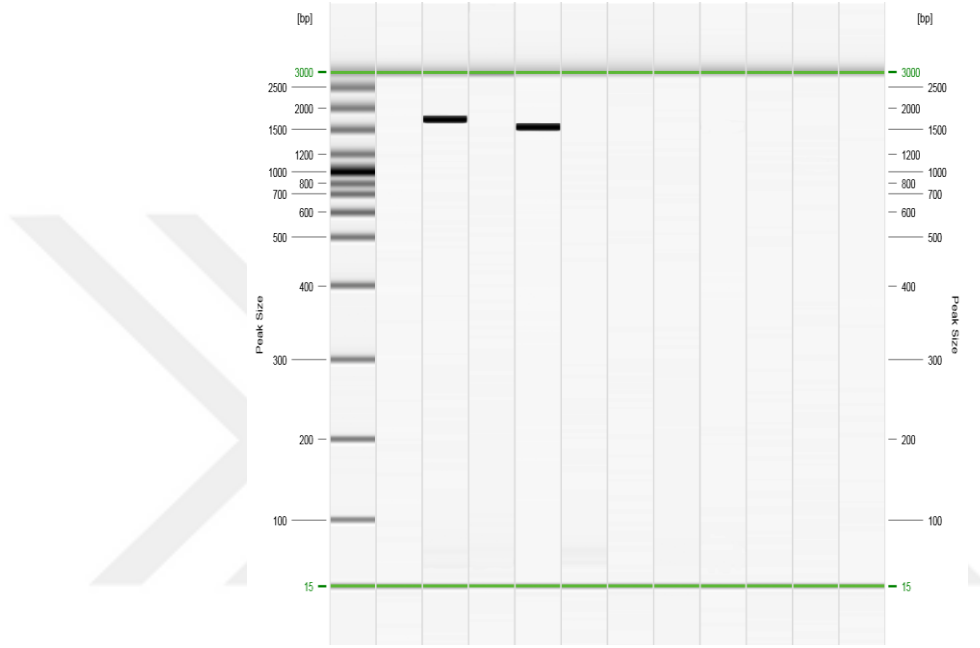
Şekil 4.8. Azot fiksasyonu (+) özellikli test bakterilerinin F2/R6 primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.8’de verilen jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda; *Enterobacter cloaca* TAGEM15-70-B32, *Bacillus* sp. TAGEM15-70-B35 bakterilerde mevcut F2/R6 primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda azot fiksasyonuna yönelik moleküler uygulamalarda azot fikse edebilen 10 bakteri arasından sadece 2 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %20’lik başarı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.9. Azot fiksasyonu (–) özellikli test bakterilerinin F2/R6 primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.9’da verilen jel görüntüsü incelendiğinde; azot fiksasyonuna yönelik moleküler uygulamalarda azot fiksasyonu (-) olan 10 bakteride F2/R6 primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde azot fiksasyonu (-) cevap veren örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



Şekil 4.10. Azot fiksasyonu (+) özellikli test bakterilerinin NifA1F/NifA1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.10’da görülen jel görüntüsü incelendiğinde; *Bacillus megaterium* TAGEM15-70-B2, *Pseudomonas* sp. TAGEM15-70-B11 kodlu bakterilerde mevcut NifA1F/NifA1R primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda azot fiksasyonuna yönelik moleküler uygulamalarda azot fikse edebilen 10 bakteri arasından sadece 2 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %20’lik başarı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. Azot fiksasyonu (–) özellikli test bakterilerinin NifA1F/NifA1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Yine Şekil 4.11’de verilen jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda; azot fiksasyonuna yönelik moleküler uygulamalarda azot fiksasyonu (–) olan 10 bakteride NifA1F/NifA1R primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde azot fiksasyonu (–) cevap veren örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.

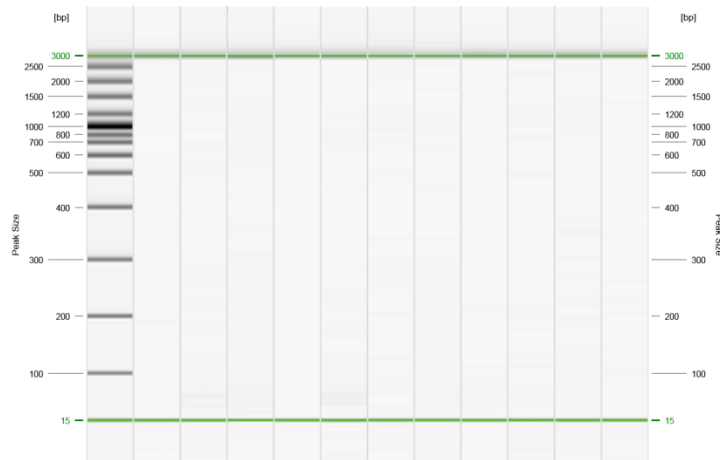
4.4.2. Fosfat çözmeye yönelik moleküler deneyler

Fosfatlı bileşikler çözme yönünden konvensiyonel denemelerde (+) ve (–) özellik gösteren test bakterilerinden izole edilen genomik DNA’lar, literatürde toprak bakterilerinin fosfat çözme yeteneklerinin araştırılması için önerilen PqqBCDF/PqqBCDR, PqqFF/PqqFR ve bu çalışmada ilk kez tasarlanan Pqq5F/Pqq5R, PqqA2F/PqqA2R, PqqB1F/PqqB1R, PqqF2F/PqqF2R primer setleri ile yapılan PCR çalışmaları için kullanılmıştır. Bu çalışmalara ait bulgular Şekiller 4.12 – 4.25’de verilmiştir.



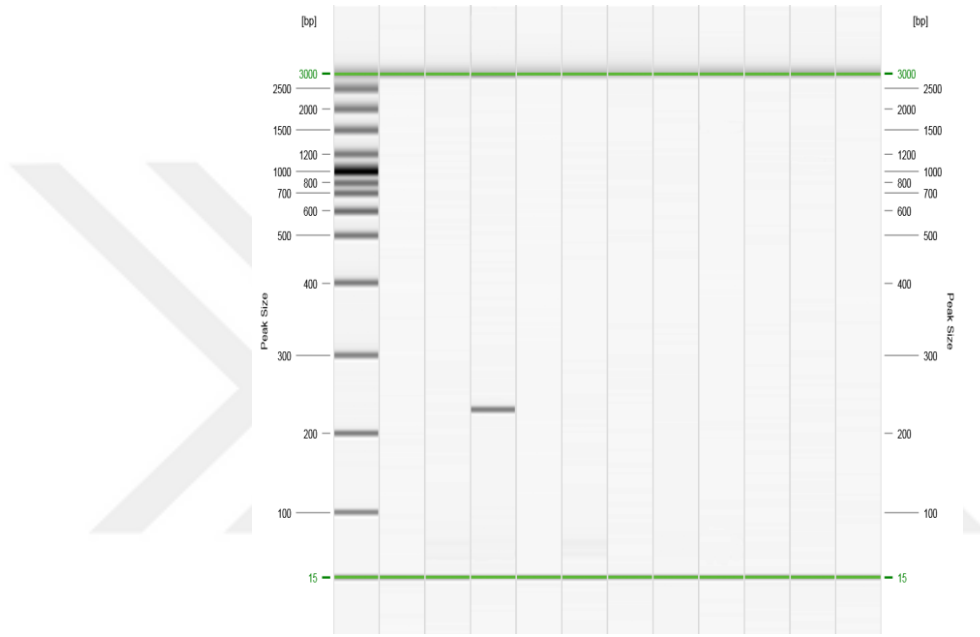
Şekil 4.12. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqBCDF/PqqBCDR primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.12’de görülen jel görüntüsü incelendiğinde; *Bacillus atrophaeus* TAGEM15-70-B25, *Enterobacter* sp. TAGEM15-70-B27 kodlu bakterilerde mevcut PqqBCDF/PqqBCDR primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda fosfat çözme özelliklerini belirlemeye yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği olan 10 bakteriden 2 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %20’lik başarı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.13. Fosfat çözme yeteneği (-) olan test bakterilerinin PqqBCDF/PqqBCDR primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.13'deki jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda; fosfat çözmeye yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği (-) olan 10 bakteriden PqqBCDF/PqqBCDR primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde fosfat çözme yeteneği (-) olan örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



Şekil 4.14. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqFF/PqqFR primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Yine Şekil 4.14'de verilen jel görüntüsü değerlendirildiğinde; *Enterococcus* sp. TAGEM15-70-B22 kodlu bakterileride mevcut PqqFF/PqqFR primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda fosfat çözme özelliklerine yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği olan 10 bakteri arasından 1 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %10'luk başarı gözlemlenmiştir.



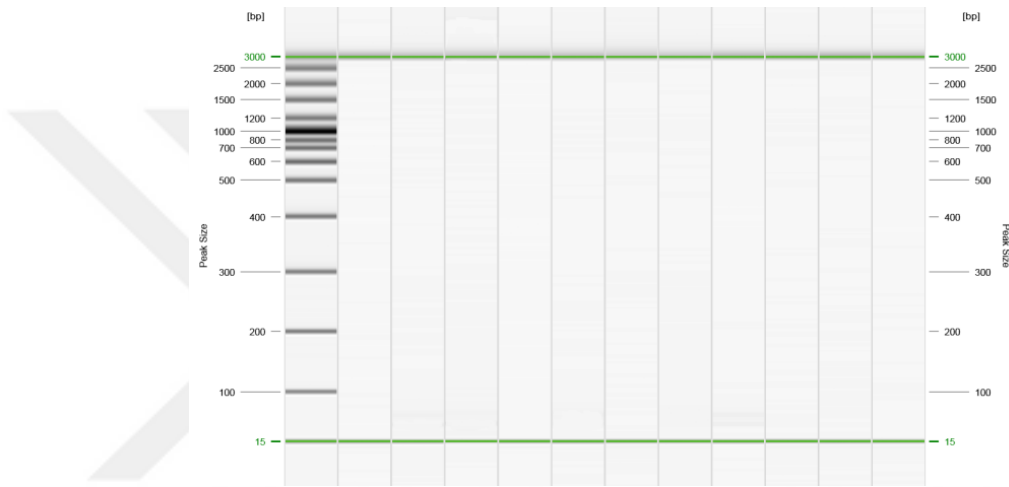
Şekil 4.15. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqFF/PqqFR primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.15’de görülen jel görüntüsü incelendiğinde; fosfat çözmeye yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği (-) olan 10 bakteriden PqqFF/PqqFR primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde fosfat çözme (-) özellikli cevap veren örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



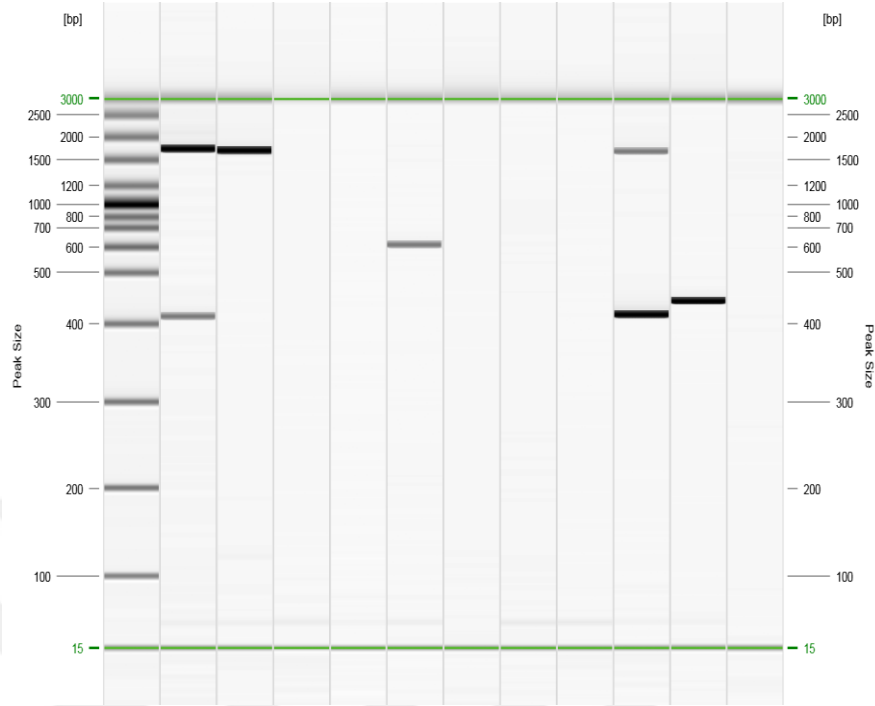
Şekil 4.16. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin Pqq5F/Pqq5R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Yine Şekil 4.16’da verilen jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda; *Acinetobacter* sp. TAGEM15-70-B29, *Pseudomonas japonica* TAGEM15-70-B30 kodlu bakterilerde mevcut Pqq5F/Pqq5R primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda fosfat çözme özelliklerine yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği olan 10 bakteri arasından 2 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %20’lik başarı gözlemlenmiştir.



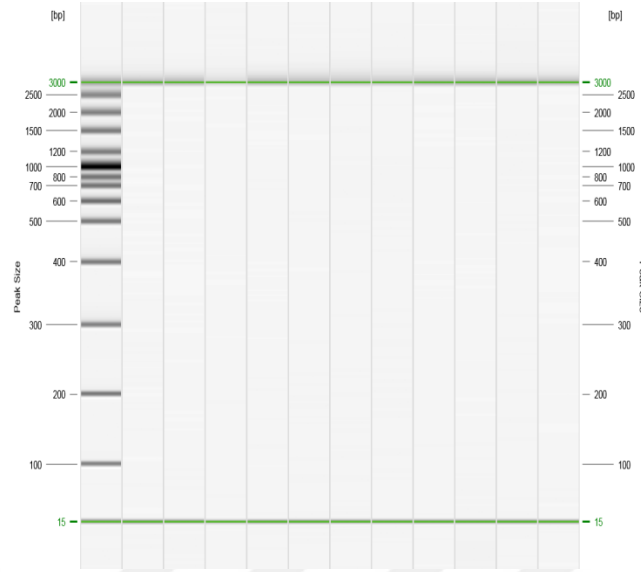
Şekil 4.17. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin Pqq5F/Pqq5R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.17’de verilen jel görüntüsünün incelenmesi sonucunda; fosfat çözmeye yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği (-) olan 10 bakteriden Pqq5F/Pqq5R primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde fosfat çözme yeteneği (-) olan örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



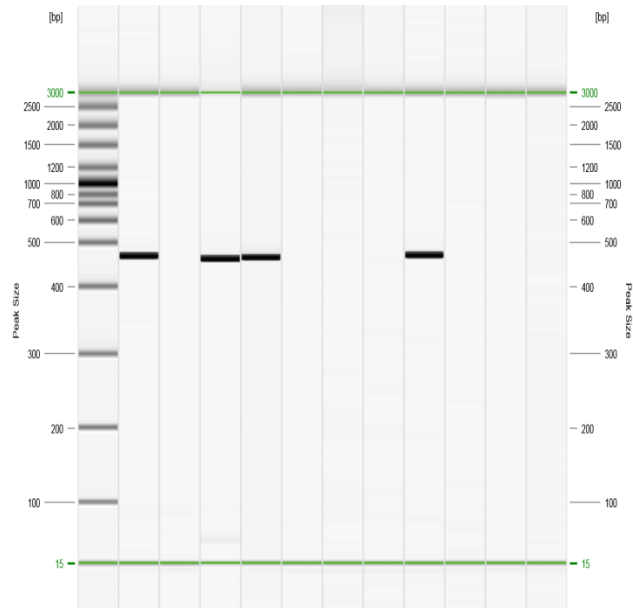
Şekil 4.18. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqA2F/PqqA2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.18 jel görüntüsü değerlendirildiğinde; *Rhizobium* sp. TAGEM15-70-B8, *Enterobacter* sp. TAGEM15-70-B18, *Bacillus atrophaeus* TAGEM15-70-B25, *Pseudomonas japonica* TAGEM15-70-B30, *Enterobacter cloacae* TAGEM15-70-B32 kodlu bakteriler PqqA2F/PqqA2R primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda fosfat çözme özelliklerine yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği olan 10 bakteri arasından 5 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %50’lik başarı gözlemlenmiştir.



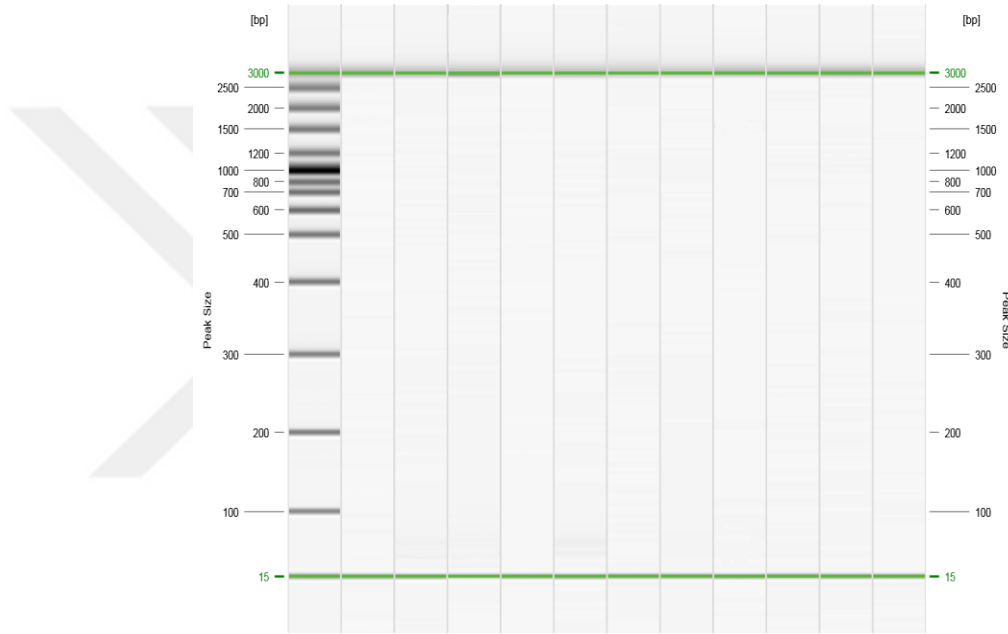
Şekil 4.19. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqA2F/PqqA2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.19’da verilen jel görüntüsü incelendiğinde; fosfat çözmeye yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği (–) olan 10 bakteriden PqqA2F/PqqA2R primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde fosfat çözme (–) olan örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



Şekil 4.20. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqB1F/PqqB1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.20'deki jel görüntüsü değerlendirildiğinde; *Rhizobium* sp. TAGEM15-70-B8, *Enterococcus* sp. TAGEM15-70-B22, *Bacillus cereus* TAGEM15-70-B24, *Acinetobacter* sp. TAGEM15-70-B29 kodlu bakteriler PqqB1F/PqqB1R primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda fosfat çözme özelliklerine yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği olan 10 bakteriden 4 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %40'lık başarı gözlemlenmiştir.



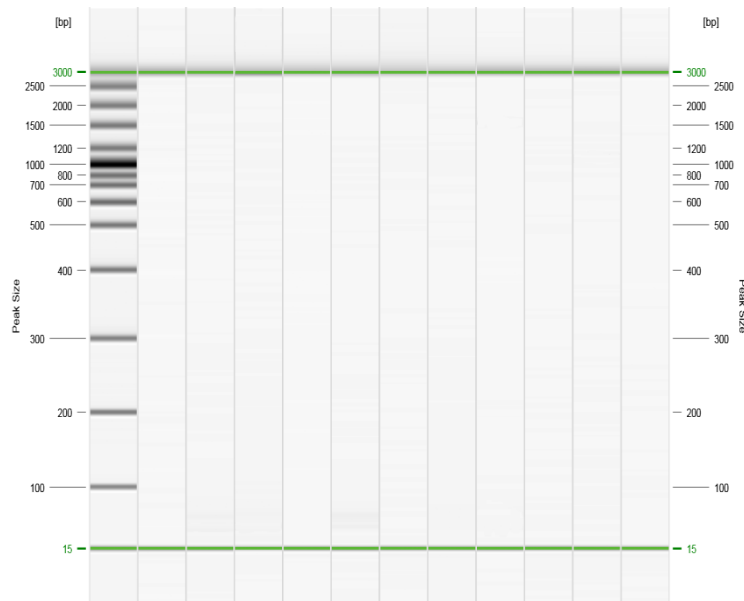
Şekil 4.21. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqB1F/PqqB1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Yine Şekil 4.20'de verilen jel görüntüsü incelendiğinde; fosfat çözmeye yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği (–) olan 10 bakteriden PqqB1F/PqqB1R primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde fosfat çözme yeteneği (–) olan örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



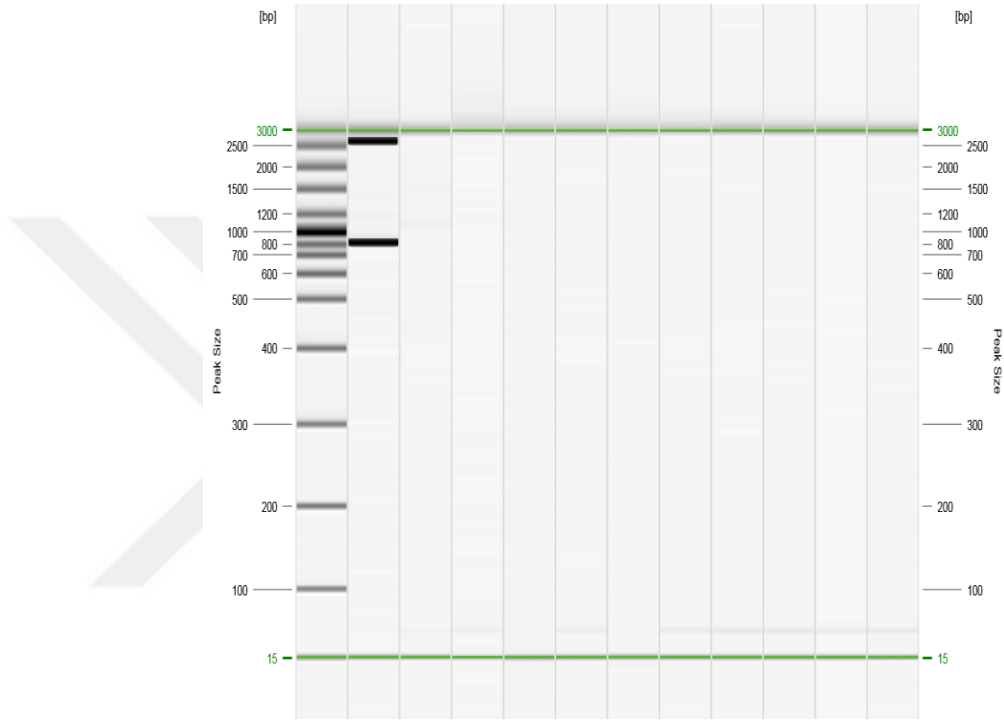
Şekil 4.22. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqB2F/PqqB2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.22'deki jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda; *Enterobacter* sp. TAGEM15-70-B18 kodlu bakteride PqqB2F/PqqB2R primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda fosfat çözme özelliklerine yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği (+) olan 10 bakteri arasından 1 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %10'luk başarı gözlemlenmiştir.



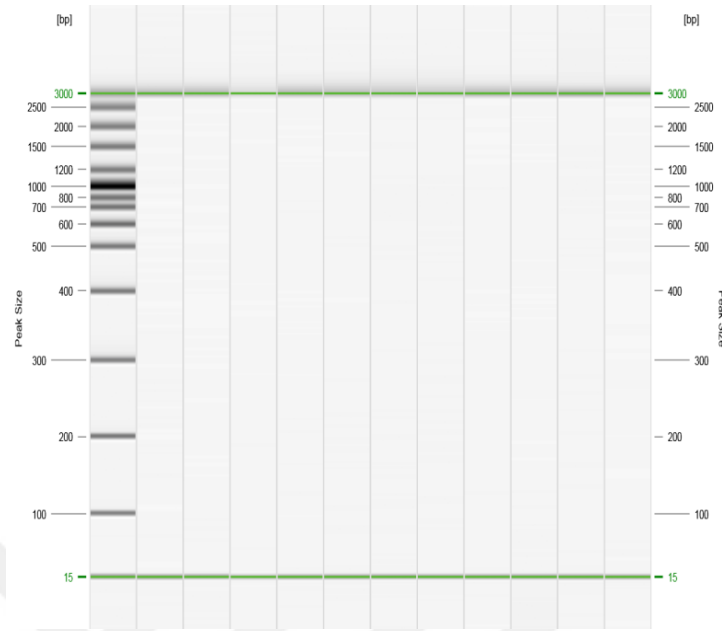
Şekil 4.23. Fosfat çözme yeteneği (-) olan test bakterilerinin PqqB2F/PqqB2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.23’de verilen jel görüntüsü incelendiğinde; fosfat çözmeye yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği (-) olan 10 bakteriden PqqB2F/PqqB2R primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde fosfat çözme yeteneği (-) olan örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.



Şekil 4.24. Fosfat çözme (+) özellikli test bakterilerinin PqqF2F/ PqqF2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.24’de görülen jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda; *Rhizobium* sp. TAGEM15-70-B8 kodlu bakteride PqqF2F/PqqF2R primer seti ile sonuç alınmıştır. Mevcut çalışmamızda fosfat çözme özelliklerine yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme özelliği olan 10 bakteri arasından sadece 1 tanesi cevap vermiş olup bu primer seti için hazırlanan reaksiyonda %10’luk başarı gözlemlenmiştir.

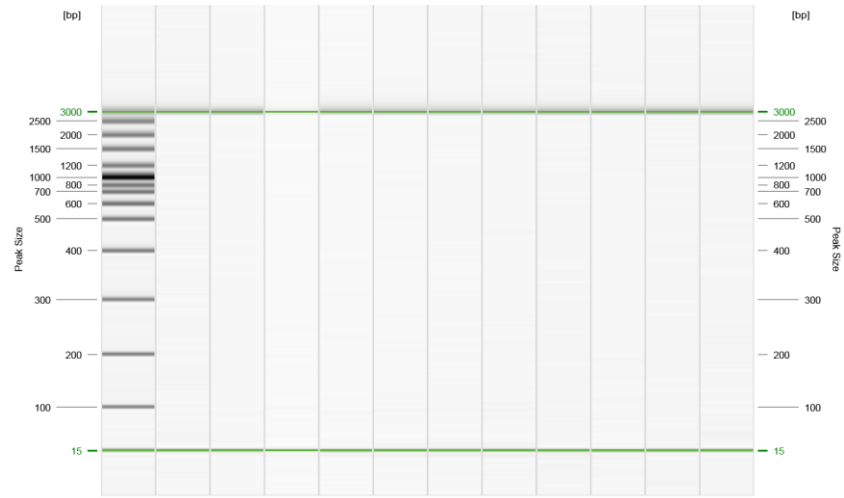


Şekil 4.25. Fosfat çözme yeteneği (–) olan test bakterilerinin PqqF2F/ PqqF2R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.25’deki jel görüntüsü incelendiğinde; fosfat çözmeye yönelik moleküler uygulamalarda fosfat çözme yeteneği (–) olan 10 bakteriden PqqF2F/PqqF2R primer seti ile herhangi bir sonuç elde edilememiştir ve böylelikle konvensiyonel denemelerde fosfat çözme yeteneği (–) olan örnekler moleküler uygulamalarla da teyit edilmiştir.

4.4.3. IAA üretmeye yönelik moleküler deneyler

IAA üretebilme yönünden konvensiyonel denemelerde (+) ve (–) özellik gösteren test bakterilerinden izole edilen genomik DNA’lar, literatürde toprak bakterilerinin IAA üretme yeteneklerinin araştırılması için önerilen avbgltx1F/avbipdc1R, ve bu çalışmada ilk kez tasarlanan ipdc6F/ipdc6R, ipdc7F/ipdc7R, ipdc8F/ipdc8R, primer setleri ile yapılan PCR çalışmaları için kullanılmıştır. Bu çalışmalara ait bulgulara herhangi bir sonuç gözlemlenmemiştir. Şekiller 4.26 ve 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.26. IAA üretme yeteneği (+) olan test bakterilerinin avbgltx1F/avbipdc1R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.26’da verilen jel görüntüsünün değerlendirilmesi sonucunda; avbgltx1F/avbipdc1R primer seti ile konvensiyonel yöntemlerde IAA üretme yeteneği (+) olan bakterilerde moleküler uygulamalar yapılmış olup sonuç alınamamıştır.



Şekil 4.27. IAA üretme yeteneği (+) olan test bakterilerinin ipdc6F/ipdc6R primer seti ile yapılan PCR uygulamalarının amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.27’deki jel görüntüsü incelendiğinde; ipdc6F/ipdc6R primer seti ile konvensiyonel yöntemlerde IAA üretme yeteneği (+) olan bakterilere moleküler uygulamalar yapılmış olup sonuç alınamamıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada artan nüfusla birlikte bu nüfusun beslenmesi için doğru orantılı bir şekilde gıda talebi meydana gelmektedir. Yapılan araştırmalar neticesinde dünya nüfusunun 2050 yılında yaklaşık 9,1 milyar'a ulaşacağı öngörülmekte ve bunun bir sonucu olarak bugüne kıyasla ek iki milyar insan için gıda üretiminin artırılması gerekmektedir. (Wezel *et al.* 2014). Bu ihtiyacın karşılanabilmesi dünya üzerindeki bugünkü mevcut gıda talebinin küresel seviyede %30 oranında artırılması ile mümkün olabilecektir. Teorikte mümkün görünen bu artışın pratik uygulamalara yansıtılması ise oldukça büyük zorlukların üstesinden gelebilmeyi gerektirmektedir. Bu çerçevede; 1943-1970 yılları arasında “Yeşil Devrim” olarak adlandırılan bir akım, meydana gelen bir dizi araştırma, geliştirme ve teknoloji transferi girişimleri ile birlikte sanayileşmiş tarım ürünlerinin kullanılmasını hedeflemiştir. Bu akım; artan nüfus artışına karşı maksimum derecede fazla tarım ürünü üretebilmeyi amaçlamış ve bulunduğu dönem içerisinde tüm dünyaya yayılmıştır (Sharan and Nehra 2011).

Dünyadaki nüfus artışı sonucunda gıda üretimine ihtiyaç duyulunca mevcut tarım yapılabilen alanlardan kimyasal gübrelerin kullanımıyla daha fazla ürün alınabilmesi amaçlanmış ve bu kimyasal gübrelerin kullanımı tarım arazilerinde birim alana düşen tarım ürünü miktarıyla artmıştır. Tarım arazilerindeki kimyasal gübrelerin aşırı kullanımı sonucunda ürün verimi ve üretimi artmış ancak sürdürülebilir toprak verimliliği ve doğal dengeler tehlikeye sokulmuştur. Modern tarım; toprak verimliliğinin kaybedilmesi, iklimsel faktörlerin dalgalanması, patojen ve zararlı kimyasal ürünlerin artması gibi zorluklarla yüz yüze kalmaktadır. Kimyasal gübrelerin aşırı kullanımı sonucunda çevreye vermiş oldukları geri dönüşümsüz zararların anlaşılması ile bu olumsuz tablonun ortadan kaldırılmasını sağlayacak, çevreyle dost ürün miktarı ve kalitesinde artışa sebep olan biyolojik gübrelerin kullanılması ön plana çıkmıştır (Adesemoye *et al.* 2009).

Günümüzde biyolojik gübre formülasyonu geliştirme odaklı araştırmaların en temel unsurlarından birini rizobakteriler oluşturmaktadır. Bitki büyümesini teşvik eden

rizobakteriler (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR), toprakta doğal olarak var olan, yoğun olarak bitki kökleri üzerinde veya çevresinde kolonize olan ve bitkilerin büyümesine veya zararlı ajanlara karşı korunmasına katkı sağlayan toprak bakterileridir. Yapılan çalışmalar, zirai bitkilerin erken gelişme safhalarında PGPR türleri ile inokülasyonu sonucunda, bu bitkilerde kök ve gövde büyümesine bağlı olarak biyokütle artışının meydana geldiğini göstermiştir. Süs bitkilerinin, ağaçların, sebzelerin ve zirai bitkilerin PGPR türleri ile inokülasyonu bitki büyümesinde çok yönlü etkilere sebep olmaktadır. Bu etkiler; çiçeklenmenin, tohum çimlenme oranının, klorofil miktarının, baklagillerde nodül sayısının, bitki sertliğinin, bitki boyunun, fide ağırlığının, dokulardaki besleyici maddelerin artması ve sağlıklı bitki halinin sürdürülmesi gibi çeşitli olguları kapsamaktadır. Bu olguların ortaya çıkışı ve PGPR türlerinin sebep olduğu büyüme, topraktan besin alımı ve ürün verimindeki artışın arka planında çeşitli mekanizmaların rol oynadığı bilinmektedir. Bu mekanizmalara sahip PGPR türlerinin bazıları, azot fikse ederek bitkilerin azot ihtiyaçlarını karşılamaya yardım eder. Yine bazı PGPR türlerinin fosfor, kükürt, demir ve bakır gibi çeşitli besleyici elementlerin bitkiler tarafından kullanılabilir formlarının topraklarda artmasına (biyofertilizer), bitki hormonlarının üretilmesine (biyostimulant) ve diğer yararlı mikroorganizmaların kökler çevresinde kolonizasyonuna, buna karşın zararlı bakteri, fungus ve böcek türlerinin ortamdaki uzaklaştırılmasına (biyoprotektan) sebep olduğu belirlenmiştir (Vessey 2003; Sharan and Nehra 2011; Bhattacharyya and Jha 2012; Vejan *et al.* 2016; Odoh 2017; Yakhin *et al.* 2017).

Tüm bu yararlı özelliklerden dolayı, tarımda kullanılan zararlı kimyasalların (kimyasal gübreler, hormon benzeri ajanlar ve pestisitler) yerini alabilecek PGPR preparatlarının geliştirilmesini amaçlayan çalışmalara olan ilgi artmış, bu preparatların kullanılması sonucu yetiştirilen pek çok zirai ürün dünya pazarında yerini almıştır (Bhattacharyya and Jha 2012).

Bununla birlikte PGPR türlerinin uygulamalardaki etkinlikleri hakkındaki bilgilerin çoğu zirai alanlardan izole edilmiş türlerden oluşmakta ve henüz ıslah edilmemiş doğal alanların bu hususta sahip olduğu potansiyel hakkındaki bilgimiz yetersiz kalmaktadır.

Doğal vejetasyon bölgelerindeki mikrobiyal toplulukların özel olarak kendi konukçularına adapte olma ihtimallerinin yüksek oluşu, belli bir ekosistemi iyileştirmek için kullanılabilecek en uygun biyolojik gübrelerin, yine aynı ekosistemden izole edilecek yerel PGPR türlerini içermesi gerekliliğine vurgu yapmaktadır. Bu durum, besleyici elementler tarafından fakir ve çeşitli stres koşullarına (tuzluluk, sel, elverişsiz iklim şartları, vb.) maruz kalmış toprakların, bu bölgeleri ıslah etmede kullanılabilecek mikroorganizmaları izole etmek için eşsiz kaynaklar olduğuna işaret etmektedir (Reddy *et al.* 1999; Öğütçü 2000; Mäder *et al.* 2011; Araújo *et al.* 2013; Mire *et al.* 2016).

Mevcut yaklaşımlar göz önüne alındığında, yerel kaynaklardan izole edilecek bakterilerden hazırlanacak biyolojik gübre preparatlarının mevcut tarlalarda veya ıslah edilecek doğal alanlarda yurt dışından ithal edilecek preparatlara nazaran daha etkin sonuçlar vereceği ve her toplumun kendi zirai geleceğini güvence altına alabilmesi için benzer çalışmaları kendi ekosistemlerinde uygulamak zorunda kalacağı açıkça görülmektedir (Miransari 2011).

Bu bağlamda ülkemizde de günümüze kadar çok sayıda bilimsel araştırma başarıyla gerçekleştirilmiş ve bu alanda çeşitli gelişmeler kaydedilmiştir. Ancak bu gelişmelerin daha çok bireysel girişimlerle sınırlı kalması, elde edilen bilimsel verilerin şimdiye kadar talep edilen teknolojilere dönüştürülememesi, çeşitli ekosistemlerden elde edilen değerli bakteri türlerinin kolayca ulaşılabilen toplu bir envanteri ve koleksiyonunun bulunmaması, bu çalışmaların hızını ve verimini azaltan önemli engellerdir.

Bu bilgiler çerçevesinde hazırlanan mevcut çalışmamızda öncelikle Erzurum çevresinden bakteri izolasyonları yapılarak tanımlanmış ve bunlar içerisinde PGPR olma potansiyeli bulunduranlar azot fikasyonu, fosfat çözme ve IAA üretme açısından konvensiyonel yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra da elde edilen aktif izolatlarla PGPR seçiminde kullanılabilecek PCR temelli moleküler yöntemlerin uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Günümüzde; bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin araştırılmasında kullanılan en yaygın yöntem konvensiyonel yöntemlerdir. Bu yöntemlerin kullanımıyla PGPR özelliği olan bakterilerin tespiti doğru ve güvenilir bir şekilde yapılabilmektedir. Artan ilgi ve çalışmaların sayısına karşın bu yöntemlerin uzun vadede sonuç vermesi yeni yöntemlerin geliştirilmesini konu alan çalışmaları tetiklemiştir (Vejan *et al.* 2016; Afzal *et al.* 2017).

20. yüzyılın ikinci yarısında, mikrobiyoloji çalışmalarının model mikroorganizmaların davranışlarını laboratuvar koşulları altında anlamaya çalışmak bilim insanlarının odağı haline gelmiştir. Mikroorganizmaların rizosfer ve filosferdeki doğal ve çoğunlukla karmaşık habitatlardaki davranışlarıyla ilgili bilgilerin gün yüzüne çıkartılması bilim insanlarının karşılaştığı oldukları en büyük zorluklar arasında yer almaktadır. Bir mikroorganizmanın belirli bir habitatta davranışlarını anlayabilmek için hangi genleri ekspresyon edildiğini bilmek temel zorunluktur. Çünkü bu genlerin işlevlerinin neler olduğu, gen ürünleriyle nasıl etkileşim kurdukları, bu süreçlerin abiyotik ve biyotik streslere nasıl bağımlı olduğu ve bu davranışlara yol açan özelliklerin nasıl dönüştüğü gen ekspresyonu sonucunda öğrenilen bilgilerdir. Genomiks gibi yeni teknolojilerin kullanımıyla bu soruların gerekli gen çalışmaları neticesinde cevaplandırılabilceği savunulmaktadır. Bu çalışmaların içerisinde yer alan PCR teknolojilerinin gelişimiyle moleküler tekniklerin önemi artmıştır. Karry Mulis tarafından 1983 yılında keşfedilen bu teknik; PubMed gibi veri tabanlarında yer alan bilimsel yayınlar %3'ün de PCR ile ilgili yayınları referans göstermektedir. Bu teknik günümüz de adli tıp, gıda bilimleri, ekolojik saha çalışmaları, zirai uygulamalarda ve tıbbi tanılarda yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR teknolojilerinin etkin kullanımıyla ilgili gelişmeler arasında insan genom projesinde kullanılmış olması ve bu teknolojinin diğer bilimsel alanlarda ne kadar önemli olduğu tespit edilmiştir (Barlet and Stirling 2002).

Bu çerçevede; toprak bakterilerinin PGPR özelliklerinin araştırılmasında PCR temelli moleküler tekniklerin uygulanması konulu çalışmamızın bulguları incelendiğinde; Erzurum ve çevresinden izole edilen toprak bakterilerin önce konvensiyonel yöntemlerle azot fiksasyonu, fosfat çözünmesi ve IAA üretimi gibi PGPR özellikleri

araştırılmıştır. Yapılan bu araştırmaların neticesinde deney grupları her bir PGPR özelliği için negatif ve pozitif gruplar olmak üzere 2 farklı deney grubuna ayrılmış ve her bir grup için konvensiyonel yöntemlerle tespit edilen 10 örnek yer almıştır. Konvensiyonel yöntemlerin ardından bu yöntemlere alternatif olabilecek moleküler yöntemler için azot fiksasyonu, fosfat çözünmesi ve IAA üretimi ile ilgili mekanizmalarda görev yapan genler seçilmiştir. Bu genler; azot fiksasyonunda *nif*, fosfat çözünmesinde *pqq* ve indol üretiminde ise *ipdc* genleri olarak belirlenmiştir. Bu genler ile ilgili yapılan literatür çalışmaları incelenmiş olup literatürde mevcut bulunan primerler konvensiyonel yöntemlerle tespit edilen örnekler üzerinde PCR tekniği ile PGPR özelliği pozitif ve negatif olan her bir parametrede yer alan örnekler üzerinde uygulanmıştır.

Azot fiksasyonu ile ilgili literatür çalışmaları incelendiğinde, bu çalışmalarda yer alan *nif* geni ile ilgili primerlerin (Kadino/Emino, *nifH1/nifH2*, F2/R6) toprak bakterilerine uygulandığında sırasıyla %84, %86, %92 oranında sonuç vereceği öne sürülmektedir (Gaby and Buckley 2012). Bu primerler, konvensiyonel yöntemlerde azot pozitif ve azot negatif örneklerinde yapılan DNA izolasyonunun ardından gerekli PCR optimizasyonları yapıldıktan sonra Erzurum ve çevresinden izole edilen PGPR bakterilerine uygulanmıştır. Bu PCR reaksiyonunda *nif* genine spesifik literatürde yer alan *nifH1/nifH2* primeri azot (+) olan 10 PGPR türüne uygulanmış ve 5 tanesinde sonuç alınmıştır (Şekil 4.6). Bu sonuç bize; literatürde yer alan ve yaklaşık %86 oranında topraktan izole edilen PGPR türlerinde cevap vermesi beklenen bir primerin Erzurum ve çevresinden izole edilen PGPR türlerinde ancak %50 oranında cevap verebildiğini göstermektedir. Azot (-) örneklerde ise *nifH1/nifH2* primeri ise tüm örneklerde negatif sonuç vererek konvensiyonel yöntemlerde azot (-) çıkan örneklerin sonuçlarını moleküler yöntemlerle de desteklemiştir (Şekil 4.7).

Nif geni için literatürden yararlanılan diğer primerler ise F2/R6 ve Kadino/Emino primerleridir. Bu primerlerle yapılan çalışmalarda ise Azot (+) için sırasıyla; %20 ve %10 oranında uygulanan örneklerde cevap verirken, Azot (-) için her iki primerde de

negatif sonuç vererek konvensiyonel yöntemleri doğrulamıştır (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.8, Şekil 4.9).

Nif geni için literatürde yer alan primerlerin yanı sıra çalışma sırasında ise NifA1, NifA2, NifD1, NifH3 primerleri dizayn edilmiş olup aynı örnekler üzerinde uygulanmıştır. Bu uygulamaların sonunda ise NifA1 primer seti Azot (+) için %20 oranında başarı sağlanırken, Azot (-) ise tüm örneklerde negatif sonuç vererek konvensiyonel yöntemleri doğrulamıştır (Şekil 4.10, Şekil 4.11). NifA2, NifD1, NifH3 primer setleri ise örnek bakteri gruplarımıza cevap vermemiştir.

Fosfat çözen bakterilerde *pqq* gen bölgesine ait literatürde yer alan primer setleri PqqBCD, PqqAB, PqqE, PqqF izole edilen PGPR bakterilerine uygulanmıştır (Naveed *et al.* 2015) Bu uygulamaların sonucunda sırası ile PqqBCD primer setiyle fosfat (+) de %20 oranında başarı sağlanırken, fosfat negatiflerde %100 oranında cevap vermiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.13). PqqAB ve PqqE primer setleri ise örnek bakteri gruplarımıza cevap vermemiştir. PqqF primer seti fosfat (+) de %10 oranında başarı sağlanırken fosfat (-) lerde ise tüm örneklerde negatif sonuç vererek konvensiyonel yöntemleri doğrulamıştır (Şekil 4.14, Şekil 4.15).

Fosfat çözen bakterilerde *pqq* gen bölgesi için dizayn edilen Pqq5, PqqA2, PqqB1, PqqB2, PqqF2, primer setleri örnek gruplarımıza uygulanmıştır. Fosfat (+) örneklerde ortaya çıkan sonuçlar sırasıyla, %20, %50, %40, %10 ve %10'dur. Fosfat (-) örneklerde ise tüm örneklerde negatif sonuç vererek konvensiyonel yöntemleri doğrulamıştır (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25).

IAA üretimi gerçekleşen bakterilerde ise *ipdc* gen bölgesine ait literatürde en çok kullanılan primerlerden olan avbgltx1F/avbipdc1R primer seti ve *ipdc* gen bölgesi için dizayn edilen ipdc6F/ipdc6R, ipdc7F/ipdc7R, ipdc8F/ipdc8R, primer setleri örnek gruplarımıza uygulanmıştır. Yapılan PCR denemeleri ve optimizasyon sonucunda gerek literatürde yer alan primer seti gerekse çalışmamız esnasında dizayn edilen primer

setleri konvensiyonel yöntemlerde pozitif olarak sonuç veren örneklere moleküler yöntemlerle cevap vermemiştir (Şekil 4.26, Şekil 4.27).

Sonuç olarak mevcut tez çalışmamız ile azot fiksasyonu, fosfat çözme ve IAA üretme potansiyellerinden en az bir tanesini içeren PGPR özellikli bakteri izolatları yerel kaynaklarımızdan elde edilmiş ve bu özellikleri konvensiyonel yöntemlerle kanıtlanmıştır. Yine çalışmamız çerçevesinde bu bakterilerin moleküler karakterizasyonları yapılmış ve türlerin *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Rhizobium*, *Pantoea* ve *Pseudomonas* cinsleri içerisinde yer aldıkları tespit edilmiştir. Elde edilen bilgiler NCBI – GenBank veri tabanına girilmiş ve bilim dünyası ile paylaşılmıştır (Çizelge 4.2).

Ayrıca mevcut çalışmamızda PGPR özellikleri yönünden olumlu sonuçlar veren izolatlar, PGPR özelliklerin moleküler yöntemlerle belirlenmesi için kullanılabilecek yeni primer setlerinin tasarlanması ve uygunluklarının test edilmesi için kullanılmıştır.

Azot fiksasyonu yönünden etkin olan izolatlarla yapılan deneyler sonucunda en yüksek verimlilik daha önceki literatürlerde yer alan nifH1/nifH2 primer setiyle %50 olarak bulunmuştur. Çalışmada dizayn edilen primer setlerinde ise en yüksek %20 oranında başarı elde edilebilmiştir (Şekil 4.10). Bu sonuçlar literatür verilerinin (%86) çok altında olmasına rağmen (Gaby and Buckley 2012) nifH1/nifH2 primer setinin azot fiksasyonu yapan PGPR türlerinin seçilimi için en yüksek başarıyla kullanılabilecek moleküler araçlar olduğunu göstermektedir.

Fosfat çözme yönünden etkin olan izolatlarla yapılan deneyler sonucunda literatürde en çok önerilen primer setlerinden birisi olan PqqBCD primer setinin başarı oranı %20 ile sınırlı kalmıştır. Uygulanan diğer bilinen primer setlerinin başarı oranı ise %20'nin altında kalmıştır. Bununla birlikte çalışmamız dahilinde ilk kez tasarlanan ve uygulanan primer setleri arasından Pqq5, PqqA2 ve PqqB1'in başarı oranları %20, %50 ve %40 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.18, Şekil 4.20). Dolayısıyla PqqA2 ve PqqB1

primer setleri literatürde yer alan benzerlerinden en az iki kat daha fazla etkinlik göstererek bu setlerin yerini alabilecek niteliktedir.

IAA üretebilen izolatlarla yapılan deneyler sonucunda ise hem literatürde yer alan primer setlerinin hem de çalışmamızda tasarlanan primer setlerinin bölgemizde çalışılan izolatlarla olumlu sonuçlar vermediği açık bir şekilde görülmüştür. Bu durum, bu çalışmalarda kullanılabilecek yeni yöntemlerin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Dolayısıyla mevcut çalışmamızda,

1. İlk kez Erzurum ve çevresinden izole edilen toprak bakterilerinin konvensiyonel yöntemlerle PGPR türlerinin tespit edilmesine alternatif olabilecek moleküler yöntemlerle karşılaştırılması yapılmıştır.
2. Azot fiksasyonu yapan bakterilerde ise *nif* genine ait olan literatürde ki mevcut primerlerin kullanılmasının daha faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.
3. Literatürde yer alan *pqq* gen bölgesine ait primer setlerinin Erzurum ve çevresinden izole edilecek bakterilerde fosfat çözünmesi ile ilgili yapılacak olan moleküler çalışmalarda en az 2 kat daha verimli olabilecek primer setleri ilk kez dizayn edilmiştir.
4. En iyi PGPR ürünleri genelde konukçu bitkiye özgü yerel suşlardan oluşabileceği ve bu suşlara ait PGPR özelliklerini belirlemede bu türlere özgü gen bölgelerinin belirlenmesi PCR temelli moleküler yöntemlerle birlikte çalışmalara ait spesifik primerlerin dizayn edilmesi PGPR türlerinin moleküler tanımları konvensiyonel yöntemlere alternatif oluşturması ve bu çalışmada da ilk kez yapılıyor olması sebebiyle özgünlük ve değer arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd-Alla, M.H., 1994. Solubilization of rock phosphates by and *Bradyrhizobium* and *Bradyrhizobium*. Folia Microbiologica, 39, 53-56.
- Abdel Magid, H.M., Abdel-Aal, S.I., Rabie, R.K., Sabrah, R.E.A., 1995. Chicken manure as a biofertilizer for wheat in the sandy. Journal of Arid Environments, 29, 413-420.
- Adesemoye, A.O., Torbert, H., Kloepper, J., 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. Microbial Ecology, 58, 921-929.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Afzal, I., Igrar, I., Shinwari, Z.K., Yasmin, A., 2017. Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. Journal of Plant Growth Regulation, 81, 399-408.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *Fluorescent pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turkish Journal of Biology, 29, 29-34.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbial Research, 163, 173-181.
- Alexandre, G., Jacoud, C., Faure, D., Bally, R., 1996. Population dynamics of a motile and a nonmotile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motility variation in the rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, 19, 271-278.
- An, R., 2016. Studies on regulation of PQQ dependent phosphate solubilization among rhizosphere dwelling bacteria. University of Kentucky- College of Agriculture, Food and Environment-Doctoral thesis.
- Andrews, J.H. and Harris, R.F., 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annual review of Phytopathology, 38, 145-180.
- Anjum, M.A., Sajjad, M.R., Akhtar, N., Qureshi, M.A., Iqbal, A., Jami, A.R., Hassan, M., 2007. Response of cotton to plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) under different levels of nitrogen. Journal of Agricultural Research, 45(2), 135-143.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R., Lalande, R., 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant and Soil, 204, 57-67.
- Araújo, A.E.D.S., Baldani, V.L.D., Galisa, P.S., Pereirac, J.A., Baldani, J.I., 2013. Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the northeast region of Brazil. Applied Soil Ecology, 64, 49-55.

- Arora, P., Gaur, A.C., 1979. Microbial solubilization of different inorganic phosphates. *Indian Journal of Experimental Biology*, 17, 1258-1261.
- Arshad, M. and Frankenberger, W.T., 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*, 133, 1-8.
- Arshad, M., Frankenberger, W.T., 1997. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in Agronomy*, 62, 45-151.
- Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Ismail, M.R., Hoque, M.A., Islam, M.Z., Shahidullah, S.M., Meon, S., 2009. Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1247-1252.
- Avşar, S., 2017. Yabani baklagil bitkilerinden izole edilen *Rhizobium* spp. türlerinin siderofor üretimi ve melas besi ortamında Poly-β-Hidroksibütirat (PHB) üretim veriminin araştırılması. Ahi Evran Üniversitesi-Fen Bilimler Enstitüsü-Yüksek Lisans Tezi.
- Babu-Khan, S., Yeo, C., Martin, W.L., Duron, M.R., Rogers, R., Goldstein, A.H., 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 972-978.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Dobereiner, J., 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 30, 485-491.
- Banik, S. Dey, B.K., 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and Soil*, 69, 353-364.
- Barassi, C.A., Creus, C.M., Casanovas, E.M., Sueldo, R.J., 2000. Could *Azospirillum* mitigate abiotic stress effects in plants? Auburn University. Web site: <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/brassi>.
- Barazani, O.Z., Friedman, J., 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology*, 25, 2397- 2406.
- Barlet, J.M.S. and Stirling, David., 2002. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*, Part 1, Humana Press, 3-6.
- Bevivino, A., Sarrocco, S., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., Cantale, C., Chiari, L., 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology*, 27, 225-237.
- Bhattacharyya, P. N. and Jha, D. K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Boddey, R.M., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Dobereiner, J., 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by fieldgrown wheat. *Plant Soil*, 95(1), 109-121.
- Boddey, R.M., Polidoro, J.C., Resende, A.S., Alves, B.J.R., Urquiaga, S., 2001. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 889-895.

- Borland, S., Oudart, A., Prigent-Combaret, C., Brochier-Armanet, C., Wisniewski-Dyé, F., 2015. Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. *BMC Genomics*, 833, 1-17.
- Brandl, M.T. and Lindow, S.E., 1996. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4121–4128.
- Bruto, M., Prigent-Combaret, C., Muller, D., Moënné-Loccoz, 2014. Analysis of genes contributing to plant-beneficial function in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. *Nature*, 4, 6261.
- Burr, T.J., Caesar, A.M., Schroll, N., 1984. Beneficial plant bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2, 1–20.
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, 383, 3-41.
- Carreno-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., Baca, B.E., 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular Genetics and Genomics*, 264, 521–530.
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J., 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, 63, 1670–1680.
- Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J., 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2767–2772.
- Chai, Y.H., 2007. Characterization of nitrogen fixation (*nif*) genes from *Paenibacillus polymyxa*. Universiti Sains Malaysia-Master Thesis.
- Chaihan, M., Chunhaleuchanon, S., Kozo, A., Lumyong, S., 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. *KMITL Science and Technology Journal*, 8, 18-23.
- Challis, G.L., 2005. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of non ribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*, 6, 601–611.
- Chandler, D., Davidson, G., Grant, W.P., Greaves, J., Tatchell, G.M., 2008. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability. *Trends Food Science Technology*, 19, 275–283.
- Chang, W.T., Chen, Y.C., Jao, C.L., 2007. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology*, 98, 1224–1230.
- Charest, M.H., Beauchamp, C.J., Antoun, H., 2005. Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 52, 219–227.
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., Sundaram, S. P., 2015. Novel plant growth promoting rhizobacteria-prospects. *Soil Ecology*, 95, 38-53.
- Chebotar, V.K., Makarova, N.M., Shaposhnikov, A.I., Kravchenko, L.V., 2009. Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of biopreparations. *Applied Biochemical Microbiology*, 45, 419–423.

- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34,33-41.
- Cho, S.T., Chang, H.H., Egamberdieva, D., Kamilova, F., Lugtenberg, B., Kuo, C.H., 2015. Genome analysis of *Pseudomonas fluorescens* PCL1751: A Rhizobacterium that controls root diseases and alleviates salt stress for its plant host. *Plos One*, 1371, 1-16.
- Costacurta, A., Keijers, V., Vanderleyden, J., 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 243, 463-472.
- Curl, E.A., Truelove, B., 1986. The Rhizosphere. Advance series in agricultural science, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-Newyork, 288.
- Çakmakçi, R., Dönmez, F., Aydın, A., Şahin, F., 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1482– 1487.
- Daei, G., Ardakani, M., Rejali, F., Teimuri, S., Miransari, M., 2009. Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. *Journal of Plant Physiology*, 166, 617–625.
- Dahal, B., 2016. Diversity of free-living nitrogen fixing bacteria in the badlands of South Dakota. South Dakota State University Master of Science Major in Biological Science-Master Thesis.
- Dakora, F.D., 1995. Plant flavonoids-biological molecules for useful exploitation. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22, 87-99.
- Dakora, F.D., 2003. Defining new roles for plant and rhizobialmolecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytologist*, 158, 39-49.
- Delvasto, P., Valverde, A., Ballester, A., Muñoz, J.A., González, F., Blázquez, M.L., Igual, J.M., García-Balboa, C., 2008. Diversity and activity of phosphate bioleaching bacteria from a high-phosphorus iron ore. *Hydrometallurgy*, 92, 124–129.
- Dixon, R. and Kahn, D., 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 621-631.
- Dos Santos, P.C., Fang, Z., Mason, S.W., Setubal, J.C. Dixon, R., 2012. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC genomics*, 13, 1-12.
- Du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D., Glick, B.R., 2014. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 85–125.
- Duffy, B.K., Défago, G., 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2429-2438.
- Egamberdiyeva, D., 2005. Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168, 94–99.

- Egamberdiyeva, D., 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36, 184–189.
- Ehrlich, H.L., 1990. *Geomicrobiology*, 2nd ed., Dekker. 646 p, New York, USA.
- Ehteshamulhaque, S., Ghaffar, A., 1993. Use of *Rhizobia* in the control of root–rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. *Journal of Phytopathology*, 138 (2), 157–163.
- El Mohandes, M.A.O., 1999. The use of associative diazotrophs with different rates of nitrogen fertilization and compost to enhance growth and N₂-fixation of wheat. *Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo*, 50, 729–753.
- Elbadry, M., El-Bassel, A., Elbanna, K., 1999. Occurrence and dynamics of phototrophic purple nonsulphur bacteria compared with other asymbiotic nitrogen fixers in ricefields of Egypt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 359–362.
- European Biostimulants Industry Consortium, 2011. Position on the revision of Re (EC) 2003/2003, http://www.biostimulants.eu/wpcontent/uploads/2011/12/EBIC_Position_7Options_29Nov2011.pdf, (07.14.2015).
- Fallik, E., Sarig, S., Okon, Y., 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: Okon Y (ed) *Azospirillum*-plant associations. CRC Press, Boca Raton, 77–84.
- Fedorov, D.N., Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A., 2010. Cloning and characterization of indolepyruvate decarboxylase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Biochemistry*, 75, 1435–1443.
- Fraga, R., Rodríguez, H., Gonzalez, T., 2001. Transfer of the gene encoding the *Nap A* acid phosphatase from *Morganella morganii* to a *Burkholderia cepacia* strain. *Acta Biotechnology*, 21, 359–369.
- Gaby, J.C. and Buckley, D.H., 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *Plos One*, 7, 1–12.
- Ganguly, T.K., Jana, A.K., Moitra, D.N., 1999. An evaluation of agronomic potential of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus megaterium* in fibre-legume-cereal system in an Aeris haplaquept. *Indian Journal of Agricultural Research*, 33, 35–39.
- Garcia de Salamone, I.E., Dobereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R.M., 1996. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. *Biology and Fertility of Soils*, 23, 249–256.
- Garcia de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 404–411.
- Gaur, R., Shani, N., Kawaljeet Johri, B.N., Rossi, P., Aragno, M., 2004. Diacetyl phloroglucinol-producing *Pseudomonas* does not influence AM fungi in wheat rhizosphere. *Current Science*, 86, 453–457.
- Goldstein, A., Lester, T., Brown, J., 2003. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochimica Biophysica Acta*, 1647, 266–271.

- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J., Forsberg, C.W., 2000. Characterization and over production of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 59–71.
- Goosen, N., Horsman, H.P., Huinen, R.G., van de Putte, P., 1989. *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 171, 447–455.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C.L.L., Krishnamurthy, L., 2014. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *Biotech*, 5, 355-357.
- Goswami, D., Thakker, J.N. Dhandhukia, P.C., 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Soil and Crop Sciences*, 1-19.
- Graham, P. H., 1988. Principles and application of soil microbiology, 322–345.
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Ebbelwhite, N., Dobson, G., 1999. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 145-153.
- Gualtieri, G. Bisseling, T., 2000. The evolution of nodulation. *Plant Molecular Biology*, 42, 181–194.
- Gutierrez-Manero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F., Talon, M., 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111, 206–211.
- Gügi, B., Orange, N., Hellio, F., Burini, J.F., Guillou, C., Leriche, F., Guespin-Michel, J.F., 1991. Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 173, 3814-3820.
- Haas, D. and Défago, G., 2005. Biological control of soil borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307–319.
- Haiyambo, D. H., Chimwamurombe, P. M., Reinhold-Hurek, B., 2015. Isolation and screening of rhizosphere bacteria from grasses in east Kavango region of Namibia for plant growth promoting characteristics. *Current Microbiology*, 71, 566-571.
- Halder, A.K. Chakrabarty, P.K., 1993. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiology*, 38, 325-330.
- Halder, A.K., Mishra, A.K., Bhattacharyya, P., Chakrabarty, P.K., 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 36, 81-92.
- Hardarson, G., 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil*, 152, 1-17.
- Hayat, R. and Ali, S., 2004. Potential of summer legumes to fix nitrogen and benefit wheat crop under rainfed condition. *Journal of Agronomy*, 3(4) 273-281.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60, 579–598.

- Hegazi, N.A., FayeM, Amin. G., Hamza, M.A., Abbas, M., Youssef, H., Monib, M., 1998. Diazotrophs assoiciated with non-legumes grown in sandy soil. In: Malik KA, Mirza MS, Ladha JK (eds) Nitrogen fixation with non-legumes. Kulwer, Dordrecht, 209–222.
- Herridge, D.F., Marcellos, H., Felton, W.L., Turner, G.L., Peoples, M.B., 1993. Legume N₂ fixation an efficient source of N for cereal production. Nuclear methods in soil-plant aspects of sustainable agriculture, Colombo.
- Heydari, S., Moghadam, P.R., Arab, S.M., 2008. Hydrogen cyanide production ability by *Pseudomonas Fluorescence* bacteria and their inhibition potential on weed. In proceedings “Competition for resources in a changing world: New drive for rural development”: 7- 9 October 2008, Tropentag, Hohenheim.
- Hol, W. H.G., Martijn Bezemer, T., Biere, Arjen., 2013. Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Front Plant Science, 4, 1-9.
- Hölscher, T. and Görisch, H., 2006. Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. Journal of Bacteriology, 188, 7668–7676.
- Husen, E., 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. Indonesian Journal of Agricultural Sciences, 4, 27-31.
- Hündür, S., 2015. Kütahya (Turanocağı ve Ortaocak) manyezit ocaklarından cevher zenginleştirme potansiyeli bulunan bakterilerin ve küflerin izolasyonu ve moleküler karekterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Idris, S.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R., 2007. Tryptophan-dependent production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Molecular Plant-Microbe Interactions 20, 619–626.
- Igual, J.M., Valverde, A., Cervantes, E., Velazquez, E., 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. Agronomie, 21, 561-568.
- Illmer, P., Schinner, F., 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biology and Biochemistry, 24, 389-395.
- Isopi, R., Fabbri, P., Del-Gallo, M., Puppi, G., 1995. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. bicolor with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. Symbiosis, 18, 43–55.
- Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A., Asadi Rahmani, H., Rasuli Sadaghiani, H., Miransari, M., 2009. Isolation and characterization of ACC deaminase producing *Fluorescent pseudomonads*, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. Journal of Plant Physiology, 166, 667–674.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Molecular Plant-Microbe Interaction Journal, 15, 894–906.
- James, E.K., Olivares, F.L., Baldani, J.I., Dobereiner, J., 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. Journal of Experimental Botany, 48, 785–797.

- James, E.K., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, 45, 757–766.
- Jardin, P.D., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14.
- Jha, C.K., Patel, B., Saraf, M., 2012. Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 891–899.
- Joseph, B., Patra, R.R., Lawrence, R., 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Plant Production*, 1, 141–152.
- Junkefer, C., Rhouck, D., Britt, B.M., Sosnick, T.R., Hanners, J.L., 1995. Biogenesis of pyrroloquinoline quinone from 3C-labeled tyrosine. *Methods in Enzymology*, 258, 227–235.
- Kanungo, P.K., Panda, D., Adhya, T.K., Ramakrishnan, B., Rao, V.R., 1997. Nitrogenase activity and nitrogen fixing bacteria associated with rhizosphere of rice cultivars with varying N absorption efficiency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 485–488.
- Kaushik, R., Saxena, A.K., Tilak, K.V.B.R., 2000. Selection of Tn5:lacZ mutants isogenic to wild type *Azospirillum brasilense* strains capable of growing at sub-optimal temperature. *World Journal of Microbiol Biotechnology*, 16, 567–570.
- Kawaguchi, M. and Syono, K., 1996. The excessive production of indole-3-acetic acid and its significance in studies of the biosynthesis of this regulator of plant growth and development. *Plant Cell Physiology*, 37(8), 1043–1048.
- Keating, J.D.H., Chapmanian, N., Saxena, M.C., 1998. Effect of improved management of legumes in a legume-cereal rotation on field estimates of crop nitrogen uptake and symbiotic nitrogen fixation in northern Syria. *The Journal of Agricultural Science*, 110, 651–659.
- Kennedy, I.R. and Tchan, Y., 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. *Plant and Soil*, 141, 93–118.
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A, Kecskes, M.L., 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1229–1244.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkinen, N., Apajalahti, J., 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 2079–2085.
- Khairnar, N.P., Misra, H.S., Apte, S.K., 2003. Pyrroloquinolinequinone synthesized in *Escherichia coli* by pyrroloquinolinequinone synthase of *Deinococcus radiodurans* plays a role beyond mineral phosphate solubilization. *Biochemical and Biophysical Research Community*, 312, 303–308.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A., 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 473–480.
- Kim, C.H., Han, S.H., Kim, K.Y., Cho, B.H., Kim, Y.H., Koo, B.S., Kim, Y.C., 2003. Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a

- phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedium*. *Current Microbiology*, 47, 457–461.
- Kim, K.Y., Jordan, D., Krishnan, H.B., 1998. Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 159, 121–127.
- Kim, Y.O., Lee, J.K., Kim, H.K., Yu, J.H., Oh, T.K., 1998. Cloning of the thermo stable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its over expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters*, 162, 185–191.
- Klinman, J.P. and Bonnot, F., 2014. Intrigues and intricacies of the biosynthetic pathways for the enzymatic quinocofactors: PQQ, TTQ, CTQ, TPQ, and LTQ. *Chemical Reviews*, 114, 4343–4365.
- Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J., 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 1219–1232.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growthpromoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885–886.
- Koga, J., Adachi, T., Hidaka, H., 1991. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 226, 10–16.
- Kremer, R.J. and Kennedy, A.C., 1996. Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds. *Weed Technology*, 10, 601–609.
- Kuklinsky-Sobral, J., Luiz Araújo, W., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., 2004. *Environmental Microbiology*, 6 (12), 1244–1251.
- Kumar, V., Behl, R.K., Narula, N., 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological Research*, 156, 87–93.
- Kumazawa, T., Sato, K., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O., 1995. Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods. *Biochemical Journal*, 307, 331–333.
- Ladha, J.K., Baraquoio, W.L., Watanabe, I., 1982. Immunological technique to identify *Azospirillum* associated with rice. *Canadian Journal of Microbiology*, 28, 478–485.
- Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4577–4584.
- Lhuissier, F.G.P., De Ruijter, N.C.A., Sieberer, B.j., Esselling, J.J., Emons, A.M.C., 2001. Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* nod factors: state of the art. *Annals of Botany*, 87, 289–302.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., Geurts, R., 2003. LysM domain receptor kinase regulating rhizobial nod factor-induced infection. *Science*, 302, 630–633.
- Liu, S.T., Lee, L.Y., Tai, C.Y., Hung, C.H., Chang, Y.S., Wolfram, J.H., Rogers, R., Goldstein, A.H., 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101 nucleotide sequence and probable involvement in

- biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinine. *Journal of Bacteriology*, 174, 5814–5819.
- Loper, J.E., Henkels, M.D., 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 99–105.
- Lugtenberg, B.J., Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., 2002. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Leeuwenhoek* 81, 373–383.
- Luo, S., Wan, Y., Xiao, X., Guo, H., Chen, L., Xi, Q., Zeng, G., Liu, C., Chen, J., 2011. Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1637–1644.
- Ma, W., Zalec, K., Glick, B.R., 2001. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 137–144.
- Mäder, P., Kaiser, F., Adholeya, A., Singh, R., Uppal, H.S., Sharma, A.K., Srivastava, R., Sahai, V., Aragno, M., Wiemken, A., Johri, B.N., Fried, P.M., 2011. Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat–rice and wheat–black gram rotations in India. *Soil Biology Biochemistry*, 43, 609–619.
- Malhotra, M. and Srivastava, S., 2008. An *ipdC* gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 93, 425–433.
- Malik, K.A., Bilal, R., Mehnaz, S., Rasul, G., Mirza, M.S., Ali, S., 1997. Association of nitrogen-fixing, plant promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant Soil*, 194, 37–44.
- Malusá, E. and Vassilev, N., 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology Biotechnology*, 98, 6599–6607.
- Mandal, S.M., Mondal, K.C., Dey, S., Pati, B.R., 2007. Optimization of cultural and nutritional conditions for indol-3-acetic acid (IAA) production by a *Rhizobium* sp. isolated from rot nodules of *Vigna mungo* (L) hepper. *Research Journal of Microbiology*, 2, 239–246.
- Marks, B.B., Megías, M., Nogueira, M.A., Hungria, M., 2013. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express*, 3, 1–10.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y., Kasahara, H., 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 18512–18517.
- Matiru, V.N. Dakora, F., 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield landscape of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 1–7.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T., 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and 3-1,3-glucanase. *Plant Physiology*, 88, 936–942.

- McCully, M.E., 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology* 28(9), 983 – 990.
- McGrath, J.W., Hammerschmidt, F., Quinn, J.P., 1998. Biodegradation of phosphonomycin by *Rhizobium huakuii* PMY1. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 356-358.
- McGrath, J.W., Wisdom, G.B., McMullan, G., Lrakin, M.J., Quinn, J.P., 1995. The purification and properties of phosphonoacetate hydrolase, a novel carbon-phosphorus bond-cleaving enzyme from *Pseudomonas fluorescens* 23F. *European Journal of Biochemistry*, 234, 225-230.
- McIntire, W.S., 1994. Quinoproteins. *FASEB Journal*, 8, 513–521.
- Mehnaz, S., Mirza, M.S., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Bano, A., Malik, K.A., 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Canadian Journal of Microbiology*, 472, 110–117.
- Meulenberg, J.J., Sellink, E., Riegman, N.H., Postma, P.W., 1992. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* operon. *Molecular Genetics and Genomics*, 232, 284–294.
- Michiels, K.W., Croes, C.L., Vanderleyden, J., 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense*, a gram negative nitrogen-fixing bacterium. *Journal of General Microbiology*, 137, 2241–2246.
- Miethke, M. Marahiel, M., 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 413–451.
- Miransari, M., 2011. Soil microbes and plant fertilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 875-885.
- Miransari, M., Smith, D.L., 2008. Using signal molecule genistein to alleviate the stress of suboptimal root zone temperature on soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis under different soil textures. *Journal of Plant Interactions* 3, 287-295.
- Mire, G.L., Nguyen, M.L., Fassotte, B., du Jardin, P., Verheggen, F., Delaplace, P., Jijakli, M. H., 2016. Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 20 (S1), 299-313.
- Misra, H.S., Khairnar, N.P., Atanu, B., Priyadarshini, K.I., Mohan, H., Apte, S.K., 2004. Pyrroloquinoline-quinone a reactive oxygen species scavenger in bacteria. *FEBS Letters*, 578, 26–30.
- Mitchell, A.E., Jones, A.D., Mercer, R.S., Rucker, R.B., 1999. Characterization of pyrroloquinoline quinone amino acid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk. *Analytical Biochemistry*, 269, 317–325.
- Mrkovacki, N. Milic, V., 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Annals Microbiology*, 51, 145–158.
- Murray, J.D., Bogumil, J.K., Shusei, S.H., Satoshi, T., Lisa, A., Krzysztof, S., 2007. A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science*, 315 (5808), 101–104.
- Nascimento, F.X., Rossi, M.J., Soares, C.R.F.S., McConkey, B.J., Glick, B.R., 2014. New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance. *Plos One*, 9, 1-17.

- Nautiyal, C.S., 1999. An ancient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265–270.
- Naveed, M., Sohail, Y., Khalid, N., Ahmed, I., Mumtaz, A.S., 2015. Evaluation of glucose dehydrogenase and pyrroloquinoline Quinine (pqq) mutagenesis that renders functional inadequacies in host plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(8), 1349–1360.
- Negi, Y.K., Garg, S.K., Kumar, J., 2005. Cold-tolerant *Fluorescent pseudomonas* isolates from Garhwal Himalayas as potential plant growth promoting and biocontrol agents in pea. *Current Sciences*, 1, 89–25.
- Neilands, J.B., 1952. A crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (*Ustilago sphaerogena*). *Journal of the American Chemical Society*, 74, 4846–4847.
- Noel, T.C., Sheng, C., Yost, C.K., Pharis, R.P., Hynes, M.F., 1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 279–283.
- Noji, N., Nakamura, T., Kitahata, N., Taguchi, K., Kudo, T., Yoshida, S., Tsujimoto, M., Sugiyama, T., Asami, T., 2007. Simple and sensitive method for pyrroloquinoline quinone (PQQ) analysis in various foods using liquid chromatography/electrospray-ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7258–7263.
- Nowak-Thompson, B., Gould, S.J., Kraus, J., Loper, J.E., 1994. Production of 2, 4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 1064–1066.
- Odoh, C.K., 2017. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolgy. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(5), 123–142.
- Ohtake, H., Wu, H., Imazu, K., Ambe, Y., Kato, J., Kuroda, A., 1996. Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *Resources, Conservation and Recycling*, 18, 125–134.
- Okon, Y. and Itzighson, R., 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology Advances*, 13(3), 415–424.
- Okon, Y. Labandera-Gonzalez, C.A., 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years world-wide field inoculation. *Soil Biology Biochemistry*, 26, 1591–1601.
- Oldroyd, G.E.D. Dixon, R., 2014. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 19–24.
- Omar, M.N.A., Mahrous, N.M., Hamouda, A.M., 1996. Evaluating the efficiency of inoculating some diazotrophs on yield and protein content of 3 wheat cultivars under graded levels of nitrogen fertilization. *Annals of Agricultural Science*, 41, 579–590.
- Öğütçü, H., 2000. Yabani baklagil bitkilerinden izole edilen *Rhizobium* türlerinin kültür bitkilerinde nodül oluşturma ve azot bağlama potansiyellerinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü –Doktora Tezi.
- Pandey, A., Sharma, E., Palni, L.M.S., 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. *Soil Biology Biochemistry*, 30, 379–384.

- Parsons, V.C., Harris, D.M.M., Patten, C.L., 2015. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthesis by branched-chain amino acids in *Enterobacter cloacae* UW5. Federation of European Microbiological Societies, 362, 1-5.
- Patil, P.L. and Patil, S.P., 1984. Uptake of nitrogen by cotton inoculated with *Azotobacter*. J Maharashtra Agric Uni, 9(17), 1–172.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. Canadian Journal of Microbiology, 48, 635–642.
- Patten, C.L., Blakney, A.J.C., Coulson, T.J.D., 2012. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 1–21.
- Paul, D., Dineshkumar, N., Nair, S., 2006. Proteomics of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Pseudomonas fluorescens* MSP-393, subjected to salt shock. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 369-374.
- Peix, A., Rivas-Boyer, A.A., Mateos, P.F., Rodriguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Velazquez, E., 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth. Soil Biology and Biochemistry, 33, 103-110.
- Pereira, J.A.R., Cavalcante, V.A., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1988. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum spp.* and *Herbaspirillum seropedicae*. Plant Soil, 110, 269-274.
- Pérez-Montaño, F.P., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Cubo, T., 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. Microbiological Research, 169, 325-336.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., Robaglia, C., 2003. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. Plant, Cell and Environment, 26, 189–199.
- Phi, Q., Park, Y., Ryu, C., Park, S., Ghim, S., 2008. Functional identification and expression of indole-3-pyruvate decarboxylase from *Paenibacillus polymyxa* E681. Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 1235–1244.
- Plessner, O., Klapach, T., Gueriot, M.L., 1993. Siderophore utilization by *Bradyrhizobium japonicum*. Applied Environmental Microbiology, 59, 1688–1690.
- Principe, A., Alvarez, F., Castro, M., Zachi, L., Fischer, S., Mori, G., Jofr, E., 2007. Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. Current Microbiology, 55, 314–322.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J.H., Xu, L.H., Li, W.J., 2011. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 89, 457–473.
- Rajpurohit, Y.S. and Misra, H.S., 2010. Characterization of a DNA damage inducible membrane protein kinase from *Deinococcus radiodurans* and its role in bacterial radioresistance and DNA strand break repair. Molecular. Microbiology, 77, 1470–1482.
- Rao, D. L. N. and Gill, H. S., 1995. Biomass and biofertilizer production by *Sesbania cannabina* in alkaline soil. Bioresource Technology, 53, 169-172.

- Raymond, K.N., Dertz, E.A., Kim, S.S., 2003. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 3584–3588.
- Reddy, B.P., Rao, K.S., 2009. Biochemical and PCR-RAPD characterization of *Pseudomonas fluorescent* produced antifungal compounds inhibit the rice fungal pathogens *in vitro*. *Electronic Journal of Environmental Agriculture and Food Chemistry*, 8, 1062-1067.
- Reddy, M.V.B., Arul, J., Angers, Paul., Couture, L., 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Food Chem.*, 47(3), 1208-1216.
- Rees, D.C. and Howard, J.B., 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 559-566.
- Reilly, T.J., Baron, G.S., Nano, F., Kuhlenschmidt, M.S., 1996. Characterization and sequencing of a respiratory burst inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 10973–10983.
- Reinhold-Hurek. and Hurek, T., 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion Plant Biology*, 14, 435-443.
- Revsbech, N.P., Pedersen, O., Reichardt, W., Briones, A., 1999. Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere under field and laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 29, 379-385.
- Richardson, A.E., Hadobas, P.A., 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 509-516.
- Rodriguez, H. Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339.
- Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y., 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287, 15-21.
- Rodríguez, H., Rossolini, G.M., Gonzalez, T., Jiping, L., Glick, B.R., 2000. Isolation of a gene from *Burkholderia cepacia* IS-16 encoding a protein that facilitates phosphatase activity. *Current Microbiology*, 40, 362–366.
- Rokhzadi, A., Asgharzadeh, A., Darvish, F., Nour-Mohammadi, G., Majidi, E., 2008. Influence of plant growth promoting rhizobacteria on dry matter accumulation of Chickpea (*Cicer arietinum* L) under field conditions. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 3(2), 253-257.
- Roper, M.M. and Ladha, J.K., 1995. Biological N₂-fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. *Plant Soil*, 174, 211-224.
- Rossolini, G.M., Shippa, S., Riccio, M.L., Berlutti, F., Macaskie, L.E., Thaller, M.C., 1998. Bacterial non-specific acid phosphatases: physiology, evolution, and use as tools in microbial biotechnology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54, 833–850.
- Rubio, L.M. and Ludden, P.W., 2008. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Review of Microbiology*, 62, 93-111.
- Ruzzi, M. and Aroca, R., 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 124-134.
- Ryu, R. and Patten, C.L., 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *American Society for Microbiology*, 190, 1-35.

- Salisbury, S.A., Forrest, H.S., Cruse, W.B., Kennard, O., 1979. A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature*, 280, 843–844.
- Sarode, P.D., Rane, M.P., Chaudhari, B.L., Chincholkar, S.B., 2007. Screening for siderophore producing PGPR from black cotton soils of North Maharashtra. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 1, 96-105.
- Sarwar, M., Frankenberger, W.T., 1994. Influence of L-tryptophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. *Plant and Soil*, 160, 97-104.
- Sayyed, R.Z., Badguzar, M.D., Sonawane, H.M., Mhaske, M.M., Chincholkar, S.B., 2005. Production of microbial iron chelators (siderophores) by *Fluorescent pseudomonads*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 484-490.
- Schippers, B., Bakker, A., Bakker, P., Van Peer, R., 1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing *pseudomonads* on rhizosphere interactions. *Plant and Soil*, 129, 75-83.
- Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P.A. 1987. Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 339-358.
- Schnider, U., Keel, C., Voisard, C., Defago, G., Haas, D., 1995. Tn5-directed cloning of *p* genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0 mutational inactivation of the genes results in over production of the antibiotic pyoluteorin. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3856–3864.
- Schütz, A., Golbik, R., Tittmann, K., Svergun, D.I., Koch, M.H.J., Hübner, G., König, S., 2003. Studies on structure-function relationships of indole pyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2322–2331.
- Serrano, A., Mateos, M.I., Losada, M., 1993. Differential regulation by trophic conditions of phosphorylating and nonphosphorylating NADP(+)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in *Chlorella fusca*. *Biochem Biophysical Research Communications*, 193, 1348-1356.
- Sezen, S., 2015. Afşin-Elbistan linyit iyileştirme teknolojisinde kullanıma potansiyeline sahip mikroorganizmaların izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü – Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Sharan, B.S and Nehra, V., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21, 1-30.
- Shenoy, V.V. Kalagudi, G.M., 2005. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology Advances*, 23, 501–513.
- Shiferaw, B., Bantilan, M.C.S., Serraj, R., 2004. Harnessing the potential of BNF for poor farmers: technological policies and institutional constraints and research need. *Symbiotic nitrogen fixation; prospects for enhanced application in tropical agriculture*, Oxford & IBH, New Delhi.
- Shoebitz, M., Ribaud, C.M., Pardo, M.A., Cantore, M.L., Ciampi, L., Curá, J.A., 2007. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Biochemical Journal*, 41, 1768-1774.
- Siddiqui, Z.A., 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. *PGPR: biocontrol and biofertilization*, Siddiqui, Z.A. Netherland, 111-142.

- Skraly, F.A. Cameron, D.C., 1998. Purification and characterization of a *Bacillus licheniformis* phosphatase specific D-alpha-glycerphosphatase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 349, 27-35.
- Smidt, C.R., Unkefer, C.J., Houck, D.R., Rucker, R.B., 1991. Intestinal absorption and tissue distribution of [14C] pyrroloquinoline quinone in mice. Proceedings of the Society Experimental Biological and Medicine, 197, 27–31.
- Snapp, S.S., Aggarwal, V.D., Chirwa, R.M., 1998. Note on phosphorus and genotype enhancement of biological nitrogen fixation and productivity of maize/bean intercrops in Malawi. Field Crop Research, 58, 205-212.
- Soliman, S., Seeda, M.A., Aly, S.S.M., Gadalla, A.M., 1995. Nitrogen fixation by wheat plants as affected by nitrogen fertilizer levels and nonsymbiotic bacteria. Egypt Journal of Soil Science, 35, 401–413.
- Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M., 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. Critical Reviews in Microbiology, 30, 205–240.
- Spaepen, S., Das, F., Luyten, E., Michiels, J., Vanderleyden, J., 2008. Indole -3- acetic acid – regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. Federation of European Microbiological Societies, 291, 195-200.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. FEMS Microbiology Reviews, 31, 425-448.
- Spaink, H.P., 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annual Review of Microbiology, 54, 257–288.
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, Jos., 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews, 24, 487-506.
- Stein, T., Hayen-Schneg, N., Fendrik, I., 1997. Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. Soil Biology Biochemistry, 29, 969–971.
- Suslow, T.V. Schroth, M.N., 1982. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. Journal of Phytopathology, 72, 111-115.
- Suslow, T.V., Kloepper, J.W., Schroth, M.N., Burr, T.J., 1979. Beneficial bacteria enhance plant growth. Calif Agric, 33, 15–17.
- Şahin, F., Çakmakçı, R., Kantar, F., 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. Plant and Soil, 265, 123-129.
- Ştefan, M., Mihasan, M., Dunca, S., 2008. Plant growth promoting rhizobacteria can inhibit the *in vitro* germination of *Glycine Max* L seeds. Scientific Annals of University "Alexandru Ioan Cuza" Iasi, Section Genetics and Molecular Biology, 3, 105-110.
- Taylor, A.J. and Joshi, B.H., 2014. Harnessing plant growth promoting *Rhizobacteria* beyond nature: A review. Journal of Plant Nutrition, 37, 1534-1571.
- Tavaria, F.K. Zuberer, D.A., 1998. Effect of low pO₂ on colonization of maize roots by a genetically altered *Pseudomonas putida* [PH6(L1019)]. Biology and Fertility of Soils, 26, 43-49.
- Thaller, M.C., Berlutti, F., Schippa, S., Iori, P., Passariello, C., Rossolini, G.M., 1995. Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass polipeptides in members of the family *Enterobacteriaceae*. International Journal of Systematic and Bacteriology, 45, 255-261.

- Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L., Du, B., 2009. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 276-284.
- Tien, T.M., Gaskin, M.H., Hubbell, D.H., 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl Millet (*Pennisetum americanum* L). *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 1016-1024.
- Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N., Pal, K.K., De, R., Saxena, A.K., Nautiyal, C.S., Mittal, S., Tripathi, A.K., Johri, B.N., 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89 (1), 136-150.
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U., Tillberg, E., 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1847-1852.
- Toyama, H., Chistoserdova, L., Lidstrom, M.E., 1997. Sequence analysis of *pqq* genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. *Microbiology*, 143, 595-602.
- Traon, D., Amat, L., Zott, F., du Jardin, P., 2014. A legal framework for PlantBiostimulants and Agronomic Fertiliser Additives in the EU. Ad hoc studyReport by Arcadia International to DG ENTR <http://ec.europa.eu/DocsRoom/documents/5403/attachments/1/translations/en/renditions/native>.
- Tye, A.J., Siu, F.K.Y., Leung, T.Y.C., Lim, B.L., 2002. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *Bacillus subtilis* 168 and *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 190-197.
- Uren, N.C. and Reisenauer, H.M., 1988. The role of exudates in nutrient acquisition. *Advanced Plant Nutrition Journal*, 3, 79-114.
- Vaikuntapu, P.R., Dutta, S., Samudrala, R.B., Rao, R.V.N., Vukanti, Kalam, S., Podile, A.R., 2014. Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated with tomato. *Indian Journal of Microbiology*, 54(4), 403-412.
- Valverde, F., Losada, M., Serrano, A., 1999. Engineering a central metabolic pathway: glycolysis with no net phosphorylation in an *Escherichia coli* gap mutant complemented with a plant *Gap N* gene. *FEBS Letters*, 449, 153-158.
- Van Rhijn, P., Fujishige, N.A., Lim, P.O., Hirsch, A.M., 2001. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* bivar *viciae*. *Plant Physiology*, 126, 133-144.
- Van Veen, J.A., Van Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D., 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 121-135.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability: A review. *Molecules*, 21, 1-17.
- Ventura, W. and Ladha, 1997. Sesbania phosphorus requirements when used as biofertilizer for long-term rice cultivation. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1240-1244.
- Vessey, K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.

- Vimal, S.R., Singh, J.S., Arora, N.K., Singh, S., 2017. Soil-plant-microbe interactions in stressed agriculture management: A review. *Pedosphere*, 27(2), 177-192.
- Walker, V., Couillerot, O., Von Felten, A., Bellvert, F., Jansa, J., Maurhofer, Monika., Bally, R., Moënne-Loccoz, Y., Comte, G., 2012. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. *Plant Soil*, 356, 151-163.
- Weller, D.M., 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 379-407.
- Weller, D.M., 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. 97, 253.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B., Thomashow, L.S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 309-348.
- Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J.F., Ferrer, A., Peigné, J., 2014. Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34 (1), 1-20.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., g, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J., Zhao, Y., 2014. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 18518-18523.
- Xu, H.L., 2000. Soil-root interface water potential in sweet corn as affected by organic fertilizer and a microbial inoculant. *Journal of Crop Production*, 3, 139-156.
- Yagi, K., Chujo, T., Nojiri, H., Omori, T., Nishiyama, M., Yamane, H., 2001. Evidence for the presence of DNA-binding proteins involved in regulation of the gene expression of indole-3-pyruvic acid decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum lipoferum* FS. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65, 1265-1269.
- Yang, X.P., Zhong, G.E., Lin, J.P., Mao, D.B., Wei, D.Z., 2010. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans* *pqqABCDE* gene cluster. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 575-580.
- Yanni, Y.G. El-Fattah, F.K.A., 1999. Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile Delta. *Symbiosis*, 27, 319-331.
- Yasmin, F., Othman, R., Saad, M.S., Sijam, K., 2007. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Journal of Biotechnology*, 6, 49-52.
- Young, J.P.W., 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In *biological nitrogen fixation*, Chapman and Hall New York. Edited by Stacey G, Burris RH, Evans HJ 43-86.
- Zabihi, H.R., Savaghebi, G.R., Khavazi, K., Ganjali, A., Miransari, M., 2010. *Pseudomonas* bacteria and phosphorous fertilization, affecting wheat (*Triticum aestivum* L.) yield and P uptake under greenhouse and field conditions. *Acta Physiol Plant* 33, 145-152.

- Zafar, M., Ahmed, N., Mustafa, G., Zahir, A.Z., Simms, E.L., 2017. Molecular and biochemical characterization of rhizobia. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(2), 373-381.
- Zafar-ul-Hye, M., Zahir, Z.A., Shahzad, S.M., Irshad, U., Arshad, M., 2007. Isolation and screening of *Rhizobia* for improving growth and nodulation of lentil (*Lens culinaris* Medic) seedlings under axenic conditions. *Soil and Environment*, 26(1), 81–91.
- Zaidi, A., Ahmad E., Khan, M. S., Saif, S., Rizvi, A., 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables, Current perspective. *Scientia Horticulturae*, 193, 231-239.
- Zeller, S.L., Brand, H., Schmid, B., 2007. Host-plant selectivity of rhizobacteria in a Crop/Weed Model System. *Plos One*, 2(9), 846.
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., Dean, D.R., 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 13264-13272.
- Zimmer, W., Hundeshagen, B., Niederau, E., 1994. Demonstration of the indolepyruvate decarboxylase gene homologue in different auxin-producing species of the *Enterobacteriaceae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 1072–1076.
- Zodape, S.T., 2001. Seaweeds as a biofertilizer. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 60, 378-382.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Erzurum’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2011’de biyolog olarak mezun oldu. 2012 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2014 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde doktora eğitimine başladı. Bu süre zarfında Fen Fakültesi öğrenci temsilcisi olarak Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan öğrenci konseyinde görev aldı. 25. Dünya Üniversiteler Arası Kış oyunlarında, 13. Avrupa Gençlik Kış Oyunlarında ve birçok ulusal ve uluslararası Avrupa Birliği projelerinde yer aldı.