

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AZOTU FİKSE EDEBİLEN YEREL PSEUDOMONAS SP.
TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE BUĞDAY BİTKİSİ
ÜZERİNDE MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ETKİLERİNİN
GÖSTERİLMESİ

TUĞÇE ARIT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AZOTU FİKSE EDEBİLEN YEREL
PSEUDOMONAS SP. TÜRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE BUĞDAY BİTKİSİ
ÜZERİNDE MORFOLOJİK VE
FİZYOLOJİK ETKİLERİNİN
GÖSTERİLMESİ

TUĞÇE ARIT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ MİNE GÜL ŞEKER

GEBZE
2022

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

LOCAL PSEUDOMONAS SP.
INVESTIGATION OF SPECIES AND
DEMONSTRATION OF MORPHOLOGICAL
AND PHYSIOLOGICAL EFFECTS ON
WHEAT PLANT

TUĞÇE ARIT
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSIST. PROF. DR. MİNE GÜL ŞEKER

GEBZE

2022



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23/12/2021 tarih ve 2021/60 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 05/01/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan TUĞÇE ARIT'ın tez çalışması MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : DR. ÖĞR. ÜYESİ MİNE GÜL ŞEKER

ÜYE

: PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: DR.ÖĞR. ÜYESİ VEYSEL SÜZERER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Prof. Dr. Ümit DEMİR
Gebze Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Buğday fazla tüketilen temel gıda ürünlerinin hammaddesi olması ve hayvan yemi olarak da kullanılması nedeniyle diğer tarım ürünlerine görece önemlidir. Öte yandan verim artışı için kullanılan kimyasal gübreler ekolojik açıdan pek çok çevre sorunu da beraberinde getirmekte, kullanımlarının azaltılmasına yönelik olarak geliştirilen mikrobiyal gübreler ise gittikçe artan bir ilgiye sahiptir.

Bu çalışma, BAP projesi (2018-A-105-04) kapsamında izole edilmiş 134 *Pseudomonas* spp izolatı içinden tasarlanacak mikrobiyal gübre formülasyonları için aday olabilecek, bitki büyümesini teşvik eden, özellikle azot fiksasyonu yönünden güçlü bir izolatın ortaya çıkarılmasını hedeflemiştir.

Tez çalışması kapsamında ilgili 134 izolatın 123 tanesinin siderofor üretebildiği, 49'unun havadaki serbest azotu fikse edebildiği ve bunların 46 tanesinin indol-3 asetik asit üretme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Nihayetinde, Nfb testi ile azotu fikse edebilmeleri yönünden güçlü olan 6 izolat seçilmiş ve bu izolatlar NH₄ üretimi yönünden tekrar test edilerek 3 tanesinin GC analizi ile güçlü azot fikse eden izolatların (sırasıyla 129>131>118) oldukları gösterilmiştir. Bu 3 izolatın rDNA'sı dizlenmiş ve rDNA'lar BLAST analiz kullanılarak NCBI veri bankasındaki veriler ile karşılaştırılarak 118 (%98,38-%98,25), 129 (%99,42 -%%99,28) ve 131(%98,44-%98,30) sırasıyla *P.reidholzensis* ve *P.putida*'ya belirtilen oranlarda benzetilmiştir.

En güçlü azot fikse eden izolat olarak seçilen 129, buğday bitkisi ile saksıda bir araya getirilerek makarnalık buğday bitkisinin (*Triticum durum* L., Eminbey) büyümesi üzerinde 8. ve 16. haftalardaki büyüme aşamaları gözlemlenmiştir. Amonyum nitrat miktarındaki azalmaya (%50) karşın seçilen 129 nolu izolatın 16. haftada gövde kalınlıkları ve kardeşlenme aşamasında oluşan sap sayılarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış oluşturduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas* sp., PGPB, azot, azot fiksasyonu.

SUMMARY

Wheat is relatively important compared to other agricultural products because it is the raw material of basic food products and is used as animal feed. On the other hand, while chemical fertilizers used for yield increase bring ecological environmental problems, interest in microbial fertilizers developed to reduce their use is increasing.

This study targeted to reveal out the best nitrogen-fixing one of 134 *Pseudomonas* spp which is isolated from the BAP project (2018-A-105-04) that could be candidate for future microbial fertilizer formulations

Whitin the scope of the thesis, it was determined that 123 out of 134 isolates were able to produce siderophores, 49 nitrogen fixation, and 46 produce indole-3 acetic acid. Finally, 6 isolates that were strong in terms of nitrogen fixation were selected with the Nfb test. These isolates were retested for NH_4 production. 3 of them were shown to be strong nitrogen-fixing isolates (129>131>118, respectively) by GC analysis. rDNA of these 3 isolates were sequenced. By BLAST analysis, rDNA's were matched with NCBI databank datas and 118 (98.38%-98.25%), 129 (99.42% 99.28%) and 131 (98.44%-98.30%) were likened to *P. reidholzensis* and *P. putida*, respectively.

The growth stages of the wheat (*Triticum durum* L., Emin Bey) combined with the best nitrogen fixing isolate number 129. Productivity parameters were observed at the 8th and 16th weeks. It was determined that the isolate 129 had showed statistically significant increase on stem numbers occurred in 16. week in comparison to control although ammonium nitrate concentration was decreased 50%.

Keywords: *Pseudomonas* sp., PGPB, nitrogen, nitrogen fixation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr üyesi Mine GÜL ŞEKER'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim sırasında desteğini esirgememiş olan değerli hocam Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye,

Her türlü desteklerini ve dostluklarını sakınmayan birlikte güzel anılar biriktirdiğimiz sevgili laboratuvar arkadaşlarım Seray TOPÇU, Mihriban AYDOĞAN, Gülcan AKKÖK, Nida ARSLAN, Sena ACET, Ali SÜNE, İlkay ÜNAL, Nil TÜRKÖLMEZ ve diğer tüm bitki biyoteknolojisi grubu üyelerine,

Tüm süreç boyunca her zaman bana destek olan sevgili ev arkadaşlarım Neslihan EL, Serap SAKARYA ve Buse Nur URAL'a,

Benimle bu yolu paylaşan desteğini ve sevgisini esirgemeyen hem ev hem de laboratuvar arkadaşım sevgili İlkay İLHAN'a

Verdiğim kararlarda yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Eray DÜZEL'e

Beni yetiştiren, hayattaki en büyük destekçilerim çok kıymetli annem Gülfizar ARIT, babam Halim ARIT ve kardeşim Kerim YILMAZ'a

Son olarak 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs programı 2020/1 dönemi bursiyeri olduğum, TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Tarımda Kullanılan Verim Arttırıcılar	5
2.1.1. Kimyasal Azotlu Gübreler	5
2.1.2. Mikrobiyolojik Gübreler	7
2.2. Bitki Büyümesini Teşvik Eden (Plant Growth Promoting-PGP) Bakteriler	9
2.2.1. Bitki-Bakteri İlişkileri Yönünden Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakterilerin Etki Mekanizmaları	10
2.2.1.1. Doğrudan Etki Mekanizmaları	10
2.2.1.2. Dolaylı Etki Mekanizmaları	13
2.2.1. PGP Adayı Olarak Pseudomonaslar	14
2.3. Biyolojik Azot Fiksasyonu	17
2.3.1. Nitrogenaz Enzimi ve Yapısı	18
2.4. Buğday Bitkisi	19
2.4.1. Eminbey (Triticum Durum L.) Makarnalık Buğday Çeşidi	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	
3.1.1. Kullanılan Canlı Materyaller (Mikroorganizmalar)	23
3.1.2. Kullanılan Bitkisel Materyal	23

3.1.3. Çözeltiler	23
3.1.4. Besiyerleri	24
3.1.5. Ayıraçlar	26
3.1.6. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri	27
3.1.7. Kullanılan Kitler	27
3.1.8. Cihazlar	27
3.1.9. Kullanılan Kimyasallar	28
3.2. Yöntem	29
3.2.1. İzolatların PGPB Özelliklerinin Araştırılması	29
3.2.1.1. Siderofor Üretimi Testi	29
3.2.1.2. N Fiksasyonu Testi	30
3.2.1.3. İndol-3 Asetik Asit Oluşumu Testi	30
3.2.1.4. NH ₄ Üretiminin Belirlenmesi	31
3.2.1.5. GC Analizi	31
3.2.2. Moleküler Yöntemler ile Tanımlama	32
3.2.2.1. DNA İzolasyonu	32
3.2.2.2. DNA Miktarının Tayini	32
3.2.2.3. DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi	32
3.2.2.4. PZR ile 16 S rDNA Dizisinin Çoğaltılması	33
3.2.3. Seçilen İzolatın Saksı Deneyleri ile Buğday Bitkisi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	33
3.2.4. İstatistiksel Analizler	35
4. SONUÇLAR	36
4.1. Azot Fikse Etme Kabiliyetine Sahip Türlerin Seçilmesi	36
4.2. İzolatlara Ait Siderofor Üretme Özelliğine Sahip Olanların Tespit Edilmesi	38
4.3. Azot Fikse Ettiği Belirlenen İzolatların İndol-3 Asetik Asit Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi	40
4.4. Seçilen İzolatların NH ₄ Üretiminin Belirlenmesi	41
4.5. Asetilen İndirgeme Deneyi (ARA)	42
4.6. Seçilen İzolatların Tür Bazında Tanımlanması	45
4.6.1. DNA Miktarının Tayini	45
4.6.2. PZR İle 16 S rDNA Dizisinin Çoğaltılması ve Analizi	46

4.7. Seçilen İzolatın Saksı Deneyleri ile Buğday Bitkisi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi Sonuçları	47
5. TARTIŞMA	53
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	71
EKLER	72



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
A	Absorbans
ATP	Adenozin trifosfat
C	Karbon
CFU	Colony forming unit
Cm	: Santimetre
dH ₂ O	Distile su
EDTA	: Etilen diamidin tetraasetik asit
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
G	Gram
GC	Gaz kromatografisi
H	Hidrojen
HCl	: Hidrojen klorür
KOH	: Potasyum hidroksit
L	Litre
LA	: Luria agar
LB	: Luria sıvı besiyeri
M	: Molar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
Mm	: Milimetre
mM	Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Ng	Nanogram
OD	Optical density

<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH	Power of hydrogen
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Rpm	Rounds per minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UV	Ultraviyole



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: PGPR bakterilerin etki mekanizmaları.	10
2.2: Azot fiksasyonu reaksiyonunun şemasal gösterimi.	11
2.3: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolatlarına ait taramalı elektron mikroskopu görüntüleri.	14
2.4: Nitrogenaz enziminin yapısı.	18
2.5: <i>Triticum spp.</i>	20
2.6: Buğday gelişim evreleri, Zadoks skalası.	21
3.1 A-GeneRuler 1 kb DNA Ladder SM0314, B- Fermentas 100-bp Gene Ruler Plus DNA lader SM0323.	27
3.2 Saksı deney planı.	35
4.1 A) <i>P.aeruginosa</i> (kontrol +), B) sterilizasyon kontrolü, C) <i>E.coli</i> (kontrol -), D) <i>S.aureus</i> (Kontrol -).	36
4.2 İzolatların azot fikse etme seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan derecelendirme.	36
4.3 A: <i>P.aeruginosa</i> (kontrol +), <i>S.aureus</i> (Kontrol -); B: Siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu gözlenen bakteri örneklerinden bazıları.	38
4.4 Seçilen izolatların kontrol test bakterisi (<i>P. aeruginosa</i> ATCC15692)'ne görece NH ₄ Üretimi testi sonuçları.	41
4.5 Seçilen izolatların kontrol test bakterisi (<i>P. aeruginosa</i> ATCC15692)'ne görece NH ₄ üretim miktarları.	42
4.6 Standart gaz karışımı pikleri.	43
4.7 Asetilen piki.	43
4.8 Kontrole (<i>K. pneumoniae</i>) görece seçilmiş (118, 129, 131) izolatların nitrogenaz aktivitesi sonucu asetilen gazındaki azalışı gösteren GC sonucu.	44
4.9 Verilen asetilen gazının kontrol ve seçilmiş izolatlar (118,129, 131) tarafından indirgenme grafiği.	45

4.10	PZR ile çoğaltılan 16 S rDNA dizisi jel fotoğrafları. 1: Marker; GeneRuler 1 kb DNA Ladder SM0314 ; 2: Negatif kontrol; 3: 118; 4: 129; 5: 131 numaralı izolatlara ait 16 S rDNA dizisi jel görüntüsü.	46
4.11	8 haftalık buğday bitkilerine ait gövde ve sap boyları.	48
4.12	8 haftalık buğday bitkilerine ait gövde kalınlığı verileri.	49
4.13	16 haftalık bitkilerin gövde ve sarı yaprak sayıları.	50
4.14	16 haftalık buğday bitkileri (Bitkilerin toprak üstü boyları görsellerde daha iyi ayırt edilmeleri için ortalamalarına göre bir çizgi çizilerek fotoğraflara yansıtılmıştır).	51
4.15	16 haftalık buğday bitkilerinin boy uzunlukları.	52



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.	23
3.2 Kullanılan cihazlar ve markaları.	28
3.3 Kullanılan kimyasallar ve markaları.	28
3.4 Tür bazında tanımlama için kullanılan genlere ait primer bilgileri.	33
4.1 İzolatların kontrol test bakterisi (<i>P. aeruginosa</i> ATCC15692)'ne görece N fiksasyon testi sonuçları.	37
4.2 134 izolatların kontrol test bakterisi (<i>P. aeruginosa</i> ATCC15692)'ne görece siderofor üretimi testi sonuçları.	39
4.3 Azot fikse eden izolatların kontrol test bakterisi (<i>P. aeruginosa</i> ATCC15692)'ne görece IAA üretim miktarları.	40
4.4 Seçilmiş izolatların NH ₄ Üretimi.	42
4.5 Nanodrop ölçüm sonuçları.	45
4.6 İzolatların NCBI'a kayıt edildikleri kayıt numaraları ve erişim numaraları ve benzetildikleri <i>Pseudomonas</i> türlerine benzerlik oranları (Bakınız EK 1).	46
4.7 Toprak analizi Sonuçları.	47
4.8 8 haftalık buğday bitkilerine ait gövde ve sap boyları ve gövde kalınlıkları.	48
4.9 16 haftalık bitkilerin sap ve sarı yaprak sayıları.	49
4.10 16.haftada buğday bitkilerinin boy uzunluğu verileri.	52

1.GİRİŞ

Bakteriler biyosferde en yaygın canlı grubu olsa da her yerde aynı yoğunlukta bulunmazlar. Bitki kök çevresinin, boş toprakla kıyaslandığında çok daha yüksek konsantrasyonda bakteri içerdiği bilinmektedir [Carvalhais, et al., 2015]. Tüm bu bakteriyel popülasyonun içinde bitkilerin köklerinden salgılanan maddelerden yararlanan ve bitki büyümesine olumlu etkilere sahip olanlarına, bitki büyümesini teşvik eden bakteriler anlamına gelen “*Plant Growth Promoting Bacteria*” (PGPB) denmektedir [Olanrewaju et al., 2017]. PGPB’ler hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalarla bitki büyümesini destekleyebilir [Glick, 1995]. Rizosferde yaşayan bazı bakterilerin farklı etki mekanizmaları ile bitki gelişimini birçok yönden desteklediği yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur. Böyle bakteriler “*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*” (PGPR) olarak adlandırılırlar. PGPR’ler azot fiske edebilmeleri, hormon üretmesi, fosforu ve ağır metalleri çözebilmesi, mineral ve su alımını artırması, kök gelişimini desteklemesi, bitkide enzim aktivitesini artırması gibi etki mekanizmalarıyla bitki gelişimini teşvik etmektedirler [İmriz vd., 2014]. Rizobakteriler geniş kullanım alanlarına sahip olmalarından dolayı pek çok çalışmaya konu olmaktadır. Bu çalışmalar, rizobakterilerin ağır metallerin detoksifikasyonu [Wani et al., 2010], herbisitlerin parçalanması [Ahemad et al., 2012], tuzluluk toleransı [Mayak et al., 2004], bitki hastalık ve zararlılarının biyolojik mücadelesi [Hynes et al., 2008], bitki tarafından besin elementleri ve minerallerin kullanımının artırılması, fitohormon ve enzim üreterek bitki gelişimini desteklemesi [Ferreira et al., 1987] gibi etkiler üzerinde yoğunlaşmıştır.

PGPB bakterilerin bitki gelişimine etki mekanizmalarından biri de havadaki serbest azotu fiske ederek bitkilerin kullanabileceği formlara getirmektir. Azot elementi tüm canlı yapıların temelinde bulunan nükleik asitler ve proteinler gibi kimyasal bileşenlerin temel yapı taşıdır. Canlılar azotu büyüme ve üreme için gerekli kimyasalları oluşturmak amacıyla kullanırlar. Fakat azot gaz formunda (N_2) iken canlı sistemler tarafından doğrudan kullanılamaz. N_2 gazı canlı sistemlere girmeden önce, iki N elementi arasındaki güçlü 3 kovalent bağ N_2 ’nin indirgenme reaksiyonları ile kırılmalıdır. Azot tespiti (fiksasyonu) olarak adlandırılan bu olay kimyasal veya biyolojik olarak gerçekleşmektedir ve enerji gerektiren bir reaksiyondur [Aslan,1999]. Bitkilerde azot eksikliği tarımda verimin düşmesine neden olur. Toprakta azot

eksikliğinin gözlemlenmesi, çoğu toprakta maksimum bitki verimi elde etmek için gereklidir. Bitkinin ihtiyacı olan azot büyük miktarlarda azotlu gübrelerin kullanılması ile karşılanmaktadır. Ancak, verimin arttırılması için uygulanan kimyasal gübreler toprağın pH'ında asitleşmeye neden olarak toprağın çoraklaşmasına ve uzun vadede ürün kayıplarına neden olmaktadır. Kimyasal gübreler, aynı zamanda üretim süreçlerinde fosil yakıtların kullanılması, atmosfere zararlı gazların salınmasına neden olmaları gibi olumsuz özelliklere de sahiptir [Igiehon and Babalola 2018].

Kimyasal gübrelerin zararları nedeniyle, tarımda kullanılan kimyasal azot gübrelerine alternatif oluşturan bakteriyel gübreler günümüzde giderek yaygınlaşmaktadır. Havanın %78'ini oluşturan azotun biyolojik fiksasyonu nitrogenaz enzim kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir. Nitrogenaz kompleksinin sentezi ve fonksiyonunda rol alan 20 farklı proteini kodlayan *nif* genleri 7 operondan oluşan 20-24kb'lik bir gen kümesi içinde konumlanmıştır. Nitrogenaz enzim kompleksinin aktivitesi *nifD*, *nifK* ve *nifH* genleri tarafından kontrol edilmektedir. Diğer *nif* genleri ise nitrogenaz enziminin gen anlatımının kontrolünden sorumludurlar. Azot fikse eden bakteriler ile ilgili çalışmalarda gen düzeyinde en yaygın ise *nifH* geni bakılmaktadır [Kim et al.,1994; Ram et al., 2013; Ahemad et al., 2014]. Azot fikse edebilen PGPB bakteri türlerinin izolasyonu ve bitkiler üzerindeki etkilerinin araştırılması, mikrobiyal gübrelerin geliştirilmesi için de önemlidir.

Günümüzde birçok PGPB türü bakteri (Rhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium, Allorhizobium, Mesorhizobium, Bradyrhizobium, Frankia türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* vb.) ya biyo-kontrol ajanları ya da biofertilizer (biyogübre) olarak ticari şekilde üretilmektedir [Çakmakçı, 2005]. Birçok PGPB özelliğini bir arada bulundurabilen *Pseudomonas* sp. (PGPB Pseudomonaslar) türlerinin birçoğunun azotu fikse edebilme ve fosfatlı bileşikleri çözebilme yetenekleri oldukça gelişmiştir. Gram negatif ve basil morfolojik özelliklerine sahip bu bakterilerin birçok türünün bitkiler ile uyumlu ve bitki gelişimini teşvik ederek yaşamlarına devam ettikleri bilinmektedir [Suslow and Schroth, 1982; Iswandi et al., 1987; Frommel et al., 1993].

Her geçen gün artan nüfus artışına bağlı olarak, beslenme yönünden gerekli bitkisel ve hayvansal gıdalara olan ihtiyaç hızlı bir şekilde artmaktadır. Bu bağlamda tahıllar özellikle de buğday önemli bir yere sahiptir. Ekiliş alanı ve üretim miktarı bakımından tahıllar içerisinde buğday (*Triticum aestivum* L., *Triticum durum* L.) birinci sırada yer almaktadır [Geçit, 2006].

Buğday dünyada yaklaşık 225 milyon hektar ekim alanına ve 736 milyon ton üretime sahiptir. Dünyada buğday üretimine ayrılan alanın yaklaşık %8-10'unda makarnalık buğday yetiştirilmektedir [Bond and Liefert, 2017]. Ülkemizde buğday yetiştirilen 7,9 milyon hektarlık alanda yaklaşık 19,5 milyon ton üretim yapılmaktadır [Web 1, 2019].

Bitkilerin besin ihtiyaçları 2 ana başlık altında toplanmaktadır; makro ve mikro besin maddeleri. Makro besin maddeleri yeni hücre ve dokuların oluşması, fonksiyonlarını yerine getirmeleri ve eskilerin muhafazası için fazla miktarda gerekli ihtiyaç duyulan maddelerdir. Bunlar azot, fosfor, kükürt, kalsiyum, magnezyum ve potasyumdur. Mikro besin maddeleri ise hücre içindeki önemli yaşamsal süreçler için gerekli olup çok az miktarda ihtiyaç duyulurlar. Bunlar çinko, demir, bakır, mangan, molibden, bor ve klordur. Çok az miktarda ihtiyaç duyulsalar da eksikliklerinde verim kayıpları gözlenir. Azot noksanlığı çeken bitkilerde yapraklarda sararma, bitki boyunda kısılma, kardeş sayısında azalma gözlenir [Bolat ve Ömer, 2017].

Bitkilerin besin ihtiyaçlarını topraktan karşılayamaması durumunda tarımda verim düşüklüğü oluşmaktadır. Verimin artırılması için yaygın olarak kimyasal gübreler kullanılmakta olup kimyasal gübrelerin uzun süreli kullanımında toprak pH'ı değişmekte ve tarım toprakları verimsiz hale gelmektedir. Ayrıca kullanılan gübreler su kaynaklarına karışarak çevre kirliliği de oluşturmaktadırlar. Günümüzde geliştirilen mikrobiyal gübreler, kimyasal gübrelerle kıyasla hem daha çevre dostu hem de daha düşük maliyetli bir alternatif oluşturmaktadır. Kimyasal gübre kullanımının azaltılması yolunda mikrobiyolojik gübre formülasyonları için aday mikroorganizmaların araştırılması önem arz etmektedir [Çakmakçı, 2005].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Tez çalışmasının amacı, 2018-A-105-A-04 no'lu GTÜ BAP projesi kapsamında tarımsal alanlardan izole edilen 134 *Pseudomonas* sp. izolatu içinden azot fikse edebilme yeteneğine sahip olanlarının taranarak, en iyi azot fikse eden izolatu, bir kışlık buğday (*Triticum durum* L EminBey) çeşidinin verimi üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaca yönelik olarak, 134 izolat içinden biyokimyasal testler ile siderofor üretimi, Indol-3-Asetik Asit (IAA) üretimi vb. PGPB özelliklerine sahip, aynı zamanda azot fikse edebilme yeteneği yapılan enstrümental analizler (Gaz

Kromatografisi-GC) ile belirlenen en iyi *Pseudomonas* sp. izolatu, yerli, kışlık, proteince zengin içeriği ile ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen bir çeşit olması sebebiyle tercih edilen makarnalık buğday (*Triticum durum* L. EminBey) eşidi üzerindeki etkileri saksı denemeleri ile kontrollü koşullar altında araştırılmıştır

Bu alışma ile günümüzde kullanımı giderek artan mikrobiyal gübre formülasyonları için aday bakteriler tespit edilerek bir kısmı literatüre kazandırılmıştır (Gl şeker, 2021). Tez alışması sonunda elde edilen yerel *Pseudomonas* sp. suşları, PGPR zellikleri ortaya konmuş ve mikrobiyolojik gübre formülasyonlarının oluşturulmasına aday bakterilerdir. Böylece tarımda verim artışına katkıda bulunan ve geleneksel tarımda uygulanan teknikler ve kimyasal gübre kullanımının yol açtığı ekolojik zararları indirgeyebilme potansiyeline sahip izolatların ortaya konmasına katkı sağlamıştır. Ayrıca yerel bakteriyel gübre formülasyonu çalışmalarının ülkemizde yaygınlaşması için kaynak oluşturma konusunda önerisini sunmuş, tarımda mikrobiyolojik gübre kullanımında dışa bağımlılığı ve ayrıca tarımda kullanılan kimyasalların zararlı etkilerini azaltılması konularında bilgi birikimine destek olmuştur.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Tarımda Kullanılan Verim Arttırıcılar

Küresel iklim değişikliğinin etkilerini çok daha fazla hissedildiği ve pandemi sürecinde yaşanan sosyo-ekonomik hareketliliğin giderek artması ile kontrol edilebilir olmaktan uzaklaştığı son yıllarda, kendi kendine yetebilmenin ülkeler bazında öne çıkması ile gelişmekte olan ülkeler modern tarım anlayışına, çok daha fazla önem vermek zorundadırlar. Tarım alanlarında birim alandan yüksek verim alınması, artan nüfusun besin ihtiyacının karşılanması ve dışa bağımlılığın azaltılması için zorunludur. Bu zorunluluk verim artışı ve zararlı mücadelesinde özellikle mikrobiyolojik gübre uygulamalarının önemini arttırmıştır [Ceritoğlu ve Erman, 2019]. Toprağın yıkanma ve erozyona uğraması gibi nedenlerle tarım toprakları zamanla bitki besin elementleri yönünden fakirleşmektedir [Raun and Johnson, 1999]. Gübreleme, zararlılarla mücadele, işleme, sulama gibi tarım uygulamaları ile tarımsal üretimin en önemli kaynağı olan toprak verimli hale getirilir. Yani toprağın besin maddeleriyle takviye edilmesi (gübrelenmesi) verimliliğinin sürdürebilmesinde önemlidir [Şahin, 2016]. 2030 yılına gelindiğinde yaklaşık 8 milyar olması beklenen dünya nüfusunu besleyebilmek için bugünkü gıda üretiminin %60 oranında artırılması gerekmektedir [Fresco, 2004]. Bu nüfusun büyük bir kısmının şehirlerde yaşamakta olduğu ve kırsal alanlardan şehirlere göçün her geçen gün arttığı düşünüldüğünde artan tüketim hızını karşılayabilecek bir üretim potansiyelinin olmayacağı açıkça anlaşılmaktadır [Kılıç ve Korkmaz, 2012].

2.1.1. Kimyasal Azotlu Gübreler

FAO'nun verilerine göre, dünyada ziraat amaçlı üretilen gübre 192.224.457,06 bin tondur [FAO 2017]. Türkiye bu üretimin 2.644.333,00 tonla %1.38'lik payına sahiptir. 2018 TÜİK verilerine göre ise 10.567,457 ton kimyasal gübre kullanılmakta olup, kullanılan kimyasal gübrenin %68.82'si azotlu gübre, %28.99'u fosforlu gübre ve %2.19'u potasyumlu gübredir. Türkiye'de kimyasal gübre kullanımı, yerli üretiminden çok daha fazladır ve güncel tarım kimyasal gübreye dayalı şekildedir [Yüzbaşıoğlu, 2020].

Azot bitkisel üretimde noksanlığı en sık görülen elementtir. Bu noksanlık baklagiller dışındaki bitkilere azotlu gübrelerin uygulanmasını kaçınılmaz hale getirmektedir. Amonyak kullanılarak yapılan amonyum nitrat, amonyum sülfat, üre ve benzeri yüksek azot içeren kimyasal gübre çeşitleri geleneksel tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır [Eraslan vd., 2010].

Günümüzde ürün miktarını artırmak için uygulanan kimyasal gübrelerin bilinçsiz kullanımındaki artış, ekonomik kayıplara ve tarımda sürdürülebilirliğin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır [Kılıç ve Korkmaz, 2012]. Azotlu, fosforlu ve potasyumlu gübreler bitkisel üretim sisteminde verimi artırabilmek için kullanılan gübrelerin başında gelmektedir. Azotlu gübreler yüksek dozlarda kullanıldıklarında, içme, yüzey ve yeraltı sularında yüksek yoğunlukta nitrat (NO_3^-) ve nitrit (NO_2^-) birikimine yol açarlar. Bu birikim insan sağlığını ve çevreyi tehdit edici düzeylere ulaşabilmektedir [İbrikçi vd., 2000]. Tarımsal uygulamalarda kullanılan gübrelerle beraber NO_3^- miktarı gün geçtikçe artarak toprakta birikmekte ve toprağın yıkanması ile derinlere inmektedir [Korkmaz, 2007]. Toprakta gübre mikroorganizmalar tarafından nitrifikasyonla NO_3^- 'a dönüşür ve yıkanarak taban suyuna ulaşır [Atılğan vd., 2007]. En ideal koşullarda bile toprağa uygulanan azotlu gübrelerin yalnızca % 50'sinin bitkiler tarafından kullanıldığı, % 15-25'inin killi toprakta bulunan organik bileşikler ile birleştiği, % 2-20'sinin buharlaşma yoluyla kaybedildiği ve geri kalan % 2-10'luk kısmının yüzey ve yer altı sularına karıştığı belirtilmektedir. [Korkmaz, 2007].

Sularda yüksek NO_3^- seviyesi, ölü çocuk doğumlarına, düşük doğum ağırlıklarına, çiftlik hayvanlarında düşük ağırlıklara ve canlılığın azalmasına neden olmaktadır [Sönmez vd., 2008]. Ayrıca NO_3^- fazlalığı insanlarda kalp düzensizlikleri, sinir sistemi bozuklukları ve kanser gibi hastalıklara da neden olabilmektedir. İnsan vücudu için toksik olmayan NO_3^- iyonunun indirgenmesi ile oluşan NO^- iyonları, küçük çocuklarda kandaki hemoglobin ile methemoglobine dönüşür ve bu durum oksijenin vücut içerisinde taşınmasını engellemektedir. Su kaynaklarında NO^- birikimi, insan ve hayvan sağlığı üzerinde oluşturduğu ciddi etkiler nedeniyle son yıllarda dikkatle izlenen bir konu haline gelmiştir [Rao and Puttanna, 2000].

Kimyasal azotlu gübrelerin yarattığı olumsuz etkilerden biri de uzun dönem kullanımları sonucu toprağın pH'ında asitleşmeye neden olarak tarım arazilerinin zaman içerisinde verimsizleşmesine neden olmalarıdır [Sönmez vd., 2008].

Azotlu gübrelerin endüstriyel üretimi 100 milyar ABD dolarından fazladır. Çünkü yüksek sıcaklıkta ve basınçta gerçekleştirilen üçlü bağın enerjisel olarak zor indirgenmesi, sınırlı bir kaynak olan fosil yakıtın büyük miktarlarda kullanılmasını gerektirmektedir. Bu durum mali boyutunun yanında üretim sonunda çıkan gazlar (N_2O , CO_2 , CH_4 ve CFCS vb.) nedeniyle de çevre kirliliğine neden olmaktadır [Çakmakçı, 2005].

2.1.2. Mikrobiyolojik Gübreler

İklim değişikliği ve artan nüfus baskısı nedeniyle tarım alanları olumsuz birçok çevresel etkiyle karşı karşıya kalmakta olup bu durum nihayetinde gıda üretiminde yetersizliğe neden olmaktadır. Bu durumun üstesinden gelmek için, artan gıda talebine karşı tarım alanlarına zarar vermeden yeterli gıda üretimini sağlama potansiyeline sahip sürdürülebilir gıda üretimi için yeni mekanizmalar geliştirilmesi gerekliliği literatürde vurgulanmaktadır. Bu bağlamda tarımsal ihtiyacı karşılamada kullanılan mekanizmalardan biri de “*Biyolojik veya Mikrobiyolojik gübreler*”dir [Reddy et al., 1998].

Mikrobiyolojik gübreler, topraktaki önemli besin elementlerini bitki tarafından kullanılamaz formdan biyolojik süreçler yolu ile kullanılabilir forma mobilize edebilen mikrobiyal formülasyonlardır. Ucuz, yenilenebilir ve çevre dostu olmaları nedeniyle mikrobiyolojik gübreler, gıda üretimi ve tarım alanında son on yılda artan bir popülerlik kazanmıştır [McCarty et al., 2017]. Mikrobiyolojik gübreler, kimyasal gübrelerin ve pestisitlerin kullanımının çevre üzerinde oluşturduğu, toprağın tuzluluğunun artması ve tarım alanlarından kimyasalların çevreye yayılımı gibi sorunların çözülmesinde iyi bir alternatif niteliğindedir. Yapılan çalışmalar, kimyasal gübrelerin kullanımını azalttıkları, toprak verimliliğinde iyileşme sağladıkları ve rizosferdeki mikrobiyolojik aktiviteleriyle verimde artış sağladıklarına işaret etmektedir. Tüm bu yanlarıyla mikrobiyolojik gübreler tarımda sürdürülebilirliğin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadırlar [Bloembergen et al., 2000].

Mikrobiyolojik gübreler esas olarak azotu fikse eden, fosfat çözücü, bitki patojenlerine karşı koruma sağlayan ve bitki büyümesini teşvik eden mikroorganizmaları içermektedir [Lucy et al., 2004]. Tarımsal faaliyetler ile bitkiler havadaki serbest azottan yararlanamadıklarından toprakta var olan azotun

yararlanılabilir formlarında eksilmeye yol açmakta ve azotlu gübrelerinin kullanılması verim açısından önemli hale getirmektedir. Fakat günümüzde, tüketici talepleri doğrultusunda önemi artan organik tarım, her türlü girdisinin kimyasal içerikli olmayan kaynaklardan karşılanması temeline dayanması nedeniyle, özellikle kimyasal azotlu gübrelemeyi kısıtlayan bir uygulama olarak göz önüne çıkmıştır. Bu sebeple organik tarımda bitkilerin ihtiyaç duyduğu azotu alternatif ve organik çözümlerle sağlamak önem kazanmıştır. Hayvansal kaynaklı büyük ve küçükbaş hayvan dışkıları, solucan, yarasa gübreleri organik tarımda azot kaynağı olarak kullanılabilir. Ancak bu gübreler temininde doğabilecek sıkıntılara, her sene uygulama zorunluluğuna ve uygulama zorluklarına sahiptir. Ayrıca ilgili gübrelerin bitkilerin kullanabilmesi için ayrıştırıcı araçlara, yani yine mikroorganizmalara ihtiyaç duyması da mikrobiyal gübre kullanımının önemine işaret etmektedir [Burdman et al., 2000]. Tüm bunlara karşı mikroorganizma uygulamaları, toprakta belirli bir popülasyonun oluşturulması ile kendi kendini yenileyebilen bir azot kaynağı olarak sürekli bir çözüm olabilir. Aynı zamanda kimyasal azotlu gübre tüketiminin tarımda üretim maliyetlerini artırmasıyla ortaya çıkan mali yükü azaltmak için uzun vadede kalıcı çözümler ortaya koyabilecek olması mikrobiyolojik gübrelemenin her geçen gün önemini arttırmaktadır [Hubbel and Kidder, 1998].

Mikrobiyolojik gübreler çevre kirliliğinin önlenmesi ve tarımsal sürdürülebilirlik, kaynakların devamlılığının sağlanması, tarımsal maliyetin düşürülmesi, biyolojik azotu fikse eden ve ormancılık ve çevrenin yenilenmesi amaçlarıyla kullanılmaktadır [Jensen and Nielsen, 2003].

Mikroorganizmaların mikrobiyolojik gübre olarak kullanımının sağladığı birçok fayda vardır. Bunlar özetlenecek olursa; mikrobiyolojik gübreler, bitkilere toksik etki göstermez, daha ucuzdur, yeraltı sularını kirlilemez ve toprak asitliğini artırmaz. Bu gübreler, topraktan bitki besin elementlerinin alınımını ve ekonomik kullanımını sağlamakta, bitki büyüme hormonları üreterek bitki gelişmesini arttırmakta ve hastalıkların kontrolünde kullanılmaktadırlar [Çakmakçı, 2005]. Ayrıca gübre üretiminde gerekli olan yüksek miktardaki fosil yakıt kaynaklı enerji mikrobiyolojik gübreler için gerekli değildir [Döbereiner et al, 1993].

2.2. Bitki Büyümesini Teşvik Eden (Plant Growth Promoting-PGP) Bakteriler

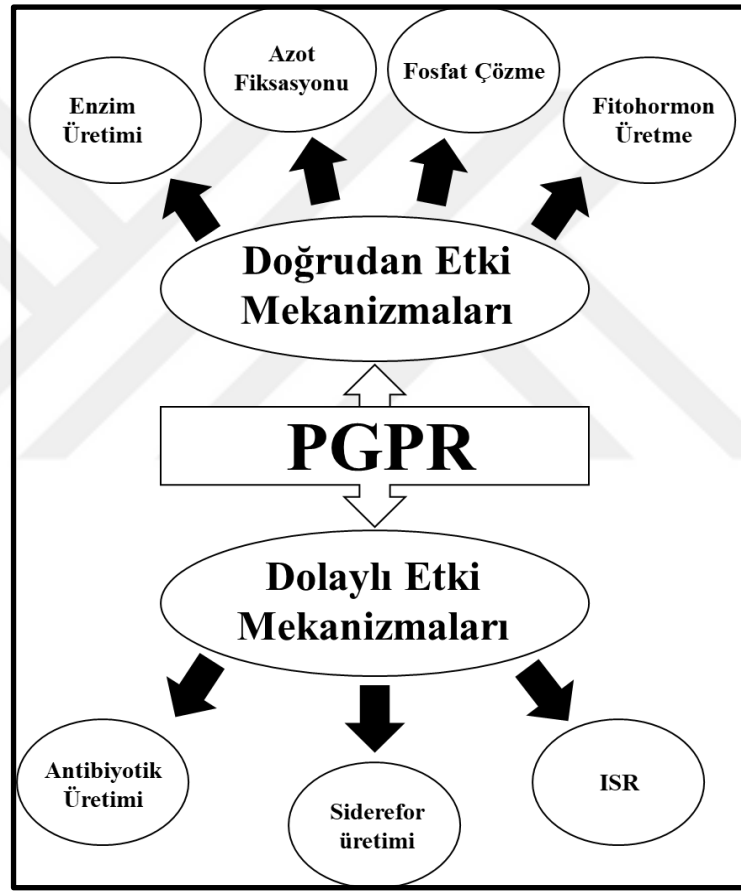
Toprakta özellikle de bitkinin kök çevresinde mikroorganizma yoğunluğu fazladır. Topraktaki pek çok fizyokimyasal aktivitenin gerçekleşmesini sağlayan bu mikroorganizmaların en büyük çoğunluğunu bakteriler oluşturmaktadır [İmriz vd., 2014]. Toprakta mikroorganizma popülasyonunun yoğunlaştığı, bitki köklerini çevreleyen bölgeye rizosfer; bu bölgede kolonize olan bakterilere ise rizobakteri denmektedir. Bitki köklerinden sentezlenen bazı kimyasal bileşikler kök salgıları (eksudatları) olarak bilinmekte olup mikroorganizmalara karşı cezbedici bir etkiye sahiptirler. Kök salgıları bitki çeşidine göre değişiklik gösterebilmekle birlikte aminoasitler, organik asitler, şekerler, vitaminler, pürinler/nükleazlar, amilaz, proteaz, asit/alkalin-fosfataz gibi enzimler ve HCO_3^- , H^+ , CO_2 , H_2 gibi inorganik iyonlar ve gaz molekülleri olarak sıralanabilir [Dakora et al., 2002]. Kök salgıları sayesinde oluşan rizosferdeki mikrobiyal yoğunluk ile artan mikrobiyal aktiviteler sonucunda köklenme etkilenebilmekte ve salgı miktarı da artabilmektedir [Kang et al., 2010].

PGPR uygulamaları ile verim parametrelerinde (yaprak alanı, kök gelişmesi, çimlenme oranı, azot, klorofil ve protein içerikleri, hidrolik aktivite, susuzluğa tolerans ve kök-gövde oranı vb.) artış görülebilmektedir. Bunun yanı sıra yaprakların yaşlanmasında gecikme görülürken, bazı hastalıklara karşı dayanıklılık da sağlanmaktadır. PGPR uygulamaları laboratuvar, sera ve tarla koşullarında gerçekleştirilmektedir. Ancak tarla denemelerinde beklenmeyen koşulların meydana gelmesi, doğru sonuçların alınmasını da zaman zaman zorlaştırmaktadır [Dobbelaere et al., 2001].

Son yıllarda, mikrobiyolojik gübre kullanımı üzerine yoğun araştırmalar yapılmakta olup *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ve *Staphylococcus* Genuslarına ait bakteri türlerinin, *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi bazı fungal türlerin bitkisel gelişmeyi teşvik edici ve artırıcı etkileri üzerine vurgu yapan çalışmalar bulunmaktadır [Bashan and Holguin, 1997; Sudhakar et al., 2000; Çakmakçı ve Oral, 2002].

2.2.1. Bitki-Bakteri İlişkileri Yönünden Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakterilerin Etki Mekanizmaları

Somers et al. (2004), PGPR'leri fonksiyonlarına göre 4 gruba ayırmış ve bunları biyofertilizer grubu (besin elementlerinin bitkinin kullanabileceği forma getiren), bitki stimülatörü grubu (bitki gelişimini teşvik eden), rizoremediatör grubu (organik kirleticileri parçalayarak indirgeyen) ve biyopestisitler olarak adlandırmıştır. Ram et al. (2013) ise PGPR'leri, etki mekanizmalarına göre doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki gruba ayırmışlardır (Şekil.2.1).



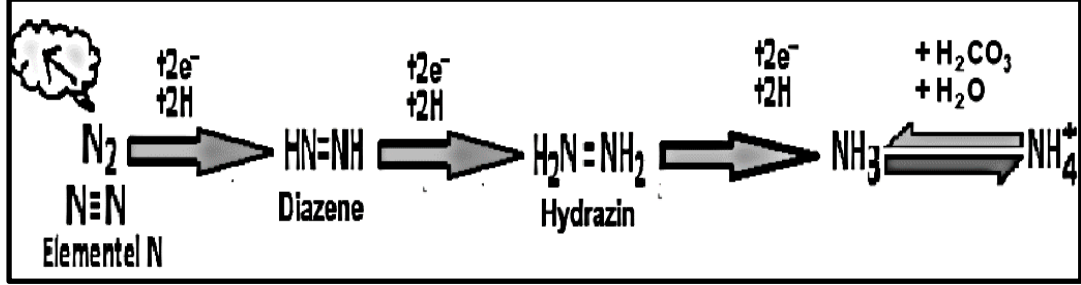
Şekil 2.1: PGPR bakterilerin etki mekanizmaları.

2.2.1.1. Doğrudan Etki Mekanizmaları

- Azot Bağlanması

Azot gaz formunda iken iki azot molekülü arasında üçlü bağ bulunmaktadır. Bazı bakteriler bu üçlü bağı kırarak azot bağlanması (fiksasyonu) olayını gerçekleştirirler ve azotun toprağa geçişini sağlamış olurlar. Daha sonra azot, nitrit

bakterileri tarafından NO_2^- a, NO_2^- ise nitrat bakterileri tarafından NO_3^- lara dönüştürülerek bitkiler tarafından kullanılabilir forma getirilir [Daroub and Snyder, 2012] (Şekil 2.2 [Web 2, 2021]).



Şekil 2.2: Azot fiksasyonu reaksiyonunun şemasal gösterimi.

Azotun bitkilerin yararlanabileceği forma getirilmesi tamamen topraktaki mikrobiyal ve fizyokimyasal aktiviteye bağlı olarak gerçekleşmektedir. Azotu fikse etme yeteneğine sahip olan bakteriler doğada simbiyotik ve simbiyotik olmayan olmak üzere iki grupta toplanmışlardır. [Saxena and Tilak, 1998]. Bitki köklerinde nodül oluşumunu teşvik eden simbiyotik bakterilere; *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* ve *Bradyrhizobium* örnek verilebilir. Simbiyotik olmayan azot bağlayan bakteriler ise *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Gluconacetobacter*, *Diazotrophicus*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Rhodopseudomonas*, *Archomobacter*, *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derrxia Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rhodospirillum* ve *Xanthobacter* olarak sıralanabilir [Dobert et al., 1994; Saxena and Tilak, 1998]

- Fosforun Çözülmesi

Fosfor(P) bitkiler için en önemli ikinci besin elementidir. Fosfor DNA yapılarında bulunması nedeniyle tüm canlılar için önem taşımaktadır. Ayrıca bitkilerde enerji transferi, fotosentez ve karbonhidratların sentezi ve parçalanması gibi metabolik süreçlere katılır. Aynı zamanda kök gelişimini, tohum oluşumunu, erken çiçeklenmeyi ve kardeşlenmeyi de destekler [Rodriguez and Fraga, 1999; Yadav and Verma, 2012; Lacava and Azevedo, 2013]

Fosfor topraktan bitkiler tarafından H_2PO_4^- (monobasic) veya HPO_4^{2-} (dibasic) fosfat anyonları formunda bulunduğunda alabilmektedir. Bununla birlikte, bitkilerin alabileceği fosfor miktarı, topraktaki toplam fosfor miktarına göre (normalde 1 ppm

veya daha az seviyelerde) çok daha düşüktür. Bitkiler fosforu yalnızca çözünür formda alabildiklerinden, toprakta çözünür fosforun yetersiz olması bitki büyümesini sınırlamaktadır [Rodriguez and Fraga, 1999].

Organik asitler ve fosforik asitler toprakta fosforun mineralizasyonu ile bitki kullanımına hazır hale getirilmesini sağlamaktadır. PGPR'lar tarafından üretilen formik asit, laktik asit, tartarik asit, glukonik asit, asetik asit, okzalik asit, fumarik asit ve suksinik asit en bilinen fosfat çözücü organik asitlerdir [Ram et al., 2013].

- Fitohormon Üretimi

Rizobakterilerin, doğrudan bitki gelişimini uyardığı bir diğer yol ise bitki büyümesinde büyük öneme sahip olan indol-3-asetik asit (IAA), sitokinin, giberellin gibi hormonların üretimidir.

IAA yani oksinlerin bitkide kök gelişimi, kök yüzey alanının genişlemesi, hücre bölünmesi, bitkiye besin elementlerinin girişinde bitkiye yardımcı olması gibi etkileri vardır [Ahemad and Khan, 2012]. Ayrıca yüksek IAA konsantrasyonları kök gelişimini engellerken, düşük konsantrasyonlar ise gelişmeyi teşvik eder [Altın ve Bora 2005].

Sitokinin de benzer şekilde bitkide hücre bölünmesi, tohum çimlenmesi, yaprak gelişimi, klorofil akümüasyonu, kök gelişimi, yaşlanmanın gecikmesi gibi fizyolojik ve büyüme işlevlerinde etkili olduğu bilinmektedir [Horemans et al., 1986].

Giberellinler ise dormansi, çimlenme, enzim işlevinin başlatılması, gövdenin uzaması, yaprak ve meyve yaşlanması gibi işlevlerde rol almaktadır [İmriz vd., 2014].

- Enzim Üretimi

Bütün yüksek bitkiler tarafından üretilen etilen ise tohum çimlenmesinde, dokuların farklılaşmasında, ilk çiçeklenmede, kök ve sürgün oluşmasında, kök uzamasında, yan tomurcukların gelişmesinde, çiçek açması ve yaşlanmasında, meyve olgunlaşmasında, meyvelerde hoş koku oluşumundan sorumlu uçucu organik bileşiklerin üretiminde, depo edilen ürünlerin hidrolizinde, yaprak ve meyve dökümü gibi fizyolojik olaylarda etkilidir. Ayrıca bitkide biyotik ve abiyotik stres koşullarında miktarı artmaktadır [Yang, 2009]. Düşük etilen seviyelerinde kök oluşumu ve büyümesi artmakta, kök uzaması uyarılmaktadır, Etilenin yüksek seviyeleri ise kök uzamasını engellemektedir [Pal et al., 2000]. ACC deaminaz enzimi etilen üretiminde belirleyici olan ACC'nin oluşumunu engellemektedir. PGPR bakteriler tarafından

üretilen ACC deaminaz enzimi, etilen seviyesinin düşürülmesini sağlayarak kök uzunluğunu artmasını sağlamaktadır [Ahemad and Kibret, 2013].

2.2.1.2.Dolaylı Etki Mekanizmaları

PGPR'ler toprakta bulunan bitki patojenlerine karşı biyo-kontrol ajanı olma potansiyeline sahiptirler. PGP bakteriler ürettikleri sekonder metabolitler ile bitki hastalık etmenlerini baskılamaktadır. Özellikle PGPR *Pseudomonas* ve *Bacillus* türleri bitki toprak patojenlerinin antagonisti niteliğindedir [Ram et al., 2013].

PGPR bakteriler, kitinaz, Beta-1,3 glukanaz, proteaz, lipaz gibi enzimler ile bitkide uyarılmış dayanıklılığa neden olabilmek ve ayrıca ürettikleri çeşitli antibiyotikler ile bitki için zararlı mikroorganizmaların engellenmesini de sağlayabilmektedirler [Asaka and Shoda, 1996].

Tüm canlı organizmalar azot fiksasyonu, fotosentez, solunum gibi önemli reaksiyonlarda görev alan proteinlerin bileşeni olduğundan demire ihtiyaç duyarlar. Demir toprakta güç çözünen ferrik hidroksit polimerleri halinde bağlı olması nedeniyle serbest iyon halinde sınırlı oranda bulunur. Asidik karakterli topraklarda demir polimerleri çözünür ve yeterli demir iyonu mevcuttur fakat bazik karakterli topraklarda çözünürlüğün düşmesiyle beraber demir iyonu konsantrasyonu azalır ve mikroorganizmalar arasında demir için rekabet doğar [Altın ve Bora 2005].

Demir taşıyıcı anlamına gelen sideroforlar, bakteri, fungus ve bikiler tarafından sentezlenen demir iyonları için yüksek uyuma sahip, düşük moleküler ağırlıkta ve suda çözünebilen moleküllerdir. Sideroforlar topraktaki demir iyonlarını alarak hücre içine bırakırlar [Miethke and Marahiel, 2007] .

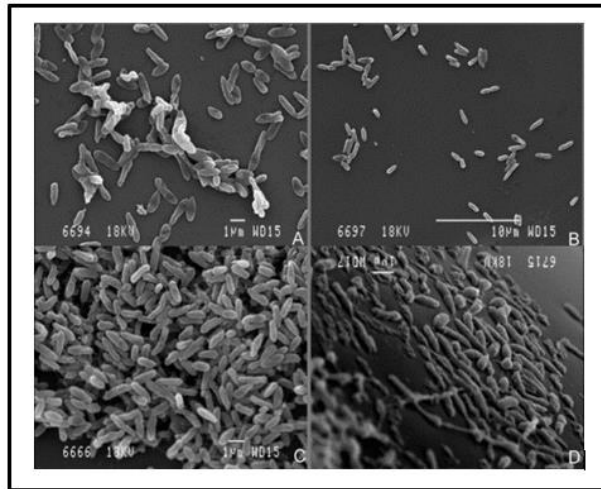
Bitki gelişimini uyaran kök bakterileri tarafından üretilen siderofor, toprakta sınırlı miktarda üretilen demiri şelatlayarak patojen gelişmesini engeller ve böylece biyokontrol yolu ile bitki gelişimine olumlu etki sağlarlar [Altın ve Bora 2005]. Ayrıca birçok bitki biyokontrol PGPB demir-siderofor kompleksini bağlayabilme, alabilme ve daha sonra kullanabilme yeteneğine sahiptir [David et al., 2018].

Siderofor üreten bakterilerin bitkiye sağladığı bir diğer fayda ise zararlı mikroorganizmaların kök gelişimi için zararlı Hidrojen Siyanür (HCN)'ün salgılamasını engellemektir. Bu durum, ortadaki demirin tutunabilirliğine bağlı olan

HCN üretiminin, demire uyumu daha fazla olan sideroforun varlığında gerçekleşmemesine dayanmaktadır [Bakker and Schippers., 1987].

2.2.1. PGP Adayı Olarak Pseudomonaslar

Pseudomonas Genusu, Gram negatif, çubuk şekilli ve çok kamçılı olup proteobakteria sınıfına mensup bakteridir [Şekil 2.3 (Deligianni et al., 2010'dan alınmıştır)]. Bu bakteriler UV ışığı altında floresan ışıma yapmaları nedeniyle floresan Pseudomonas türleri olarak da bilinirler. Suda ve toprakta çok yaygın olarak bulunabilmektedirler. Birçoğu zorunlu aerob olsa da bazı suşları hücresel solunum sırasında son elektron alıcısı olarak NO_3^- kullanabilir. Optimal büyüme sıcaklıkları 25-30°C aralığındadır [Baliah, et al., 2018]. Ayrıca Pseudomonas cinsi, Gram-negatif bakteri türleri arasında en kalabalık Genus'tur [Gomila et al., 2015]. Çok sayıda türe sahip olması bu cinsin, çok çeşitli yaşam alanlarında bulunabilmesini ve metabolik çok yönlülüğünü sağlar [Sitaraman, 2015].



Şekil 2.3: *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarına ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

In vitro ortamda hızlı büyütülebilen ve seri üretilebilen Pseudomonaslar, bir rizobakteri olarak bitki büyümesini teşvik edici ve biyokontrol sağlayan birçok özelliğe sahiptir. Tohum ve kök salgılarını hızla kullanabilmeleri nedeniyle rizosferde çok çabuk kolonileşip çoğalabilirler. Çevresel streslere yüksek uyum sağlayabilen ve diğer mikroorganizmalarla agresif bir şekilde rekabet edebilen bu tür bitki rizosferinde birçok antibiyotik, siderofor ve bitki büyümesini teşvik edici maddeler

üretebilmektedirler. Ayrıca bitkide sistemik direnci indükleyen *Pseudomonas*lar çeşitli mekanizmalarla patojen mikroorganizmaların büyümesini baskırlar [Baliah et al., 2018].

*Pseudomonas*ların PGPR özelliklerine vurgu yapılan literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde; endüstriyel atık su ile sulanmış tarım arazisinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatının biyoremediasyon potansiyeli araştırılmıştır. Çalışma ile buğday bitkisinde biyokütle değişimi, besin alımı, antioksidan enzim aktiviteleri ve oksidatif stres toleransı incelenmiştir. Sonuç olarak, *P. aeruginosa*'nın bitkide besin elementlerinde artışı sağladığı, antioksidan savunma sistemini destekleyerek ve Zn metalinin alımını azaltarak Zn kaynaklı oksidatif strese karşı iyileşme sağladığı ve ayrıca buğday büyümesinin desteklenmesi için ideal bir aday olduğu görülmüştür [Islam et al., 2014].

Diğer bir çalışmada, yerel kaynaklarından izole edilmiş izolatlar arasından su stresine karşı tolerans, PGP özellikleri ve *in vitro* biyofilm oluşturma kabiliyetine göre seçilen ve yeni bulunan bir suş olan *Pseudomonas azotoformans*'ın buğday bitkisinde kuraklık stresine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda ekzopolisakkarit (EPS) üretme, IAA üretme, ACC deaminaz üretme ve fosfat çözme yeteneklerine sahip olan bu suşun buğday bitkisinde kuraklık stresinin hafiflemesinde etkili olduğu, farklı kuraklık seviyelerinde gerçekleştirilen saksı denemeleri ile gösterilmiştir [Ansari et al., 2021] .

Navaz ve Bano tarafından 2020 yılında yürütülen bir diğer çalışma, iki farklı salatalık çeşidi (Amerikan çeşidi, Poinsett 76 ve Desi çeşidi, Sialkot seçimi) üzerinde gerçekleştirilmiş olup, iki PGPR *Pseudomonas* suşu ve Ag-nanopartiküllerin rolünü değerlendirmeyi amaçlamıştır. Ekimden önce salatalık tohumlarının, *Pseudomonas putida* (KX574857) ve *Pseudomonas stutzeri* (KX574858) ile 10⁶ hücre/ml oranında aşılınması ve Ag-nanopartiküller (5ppm), ekimden 27 gün sonra erken vejetatif fazda bitki üzerine püskürtülmesi sonucunda Ag-nanopartiküllerin ve PGPR'nin kombine tedavisinin, yaprakların flavonoid içeriğinde ve bitkilerin yapraklarındaki PAL, SOD ve CAT aktivitelerinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca *Pseudomonas putida*'nın, antioksidan ve savunma enzim aktivitelerini arttırmak için tek başına veya Ag-nanopartiküller ile kombinasyon halinde kullanılabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır [Navaz and Bano, 2020].

Jinxiang sarımsağının mikrobiyomunun incelendiği çalışmada, *Pseudomonas Genusu*'na ait türlerin sarımsak rizosferinde önemli bir PGPR olduğu görülmüş olup,

sarımsak rizosferinden izole edilen altı *Pseudomonas* sp suşu ile oluşturulan sentetik komünitenin de bitki büyümesini teşvik etme kabiliyetine sahip olduğu bildirilmiştir [Zhuang et al., 2021].

Son olarak, *Mesorhizobium* sp ve doğal PGPR *Pseudomonas* sp.'nin birlikte nohut bitkisi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada *Mesorhizobium* sp'nin tek başına aşılması ile karşılaştırıldığında, *Mesorhizobium* sp'nin doğal PGPR *Pseudomonas* sp ile birlikte aşılmasının büyüme ve simbiyotik parametrelerde önemli iyileşme gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma sonuçları doğrultusunda doğal PGPR *Pseudomonas* sp 'nin, sürdürülebilir tarımda düşük girdi prensibi kapsamında nohutta *Mesorhizobium* sp ile birlikte güçlü bir biyo-gübre olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür [Kaur et al., 2015].

Literatürde Biyolojik Azot Fiksasyonu Yapan PGPR *Pseudomonas*lara örnekler:

Mirza et al. (2006), tarafından yürütülen çalışmada tuza dayanıklı bir tür olan Koyu yumak otundan (*Kallar Grass-Leptochloa fusca*) izole edilen *Pseudomonas* sp izolatu, yapılan rrs gen dizisine göre yapılan tanımlama sonucu; ilgili izolatu tanımlanamamış bir deniz bakterisine %99, *Pseudomonas* sp. PCP2'ye %98, kültüre edilemeyen bir bakteriye %98 ve *Pseudomonas alcaligenes*'e %97 oranında benzerlik gösterdiği, ayrıca aynı izolatu *nifH* geninin ise sırasıyla *Azotobacter chroococcum* ve *Pseudomonas stutzeri* türlerine ait *nifH* genleri ile %93 ve %91 dizi benzerliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu izolatu iki pirinç çeşidine aşılmasının ardından, aşılammamış kontrol bitkilerine görece sürgün biyokütlesinde ve/veya tane veriminde artış kaydedildiği bildirilmiştir [Mirza et al., 2006].

Azot fikse eden *Pseudomonas* sp. (H8) ve *Azospirillum lipoferum* (34H) sulak alan princinden izole edilmiş ve aynı prinç çeşidinin fidesinden izole edilen isolatlar ile süspanse edilerek aşılama gerçekleştirilen çalışmanın sonuçlarında, aşılamanın princin erken kardeşlenmesini sağladığı, ayrıca hasatta dane dolum oranını ve bitki başına dane ağırlığını arttırdığı rapor edilmiştir [Watanabe and Lin, 1984].

Tuzlu topraklardan izole edilmesinin ardından morfolojik ve biyokimyasal olarak isolatların *Bacillus* sp ve *Pseudomonas* sp türlerine benzer oldukları tespit edilmiştir. Azot fiksasyonu, fosfat çözünürlüğü, amonyak, indol asetik asit ve hidrojen siyanür üretim aktiviteleri belirlenen isolatlar buğday bitkisinin bitki boyunda, kök uzunluğunda, taze ağırlığında ve kuru ağırlığında artış sağladığı bildirilmiştir [Vimal et al., 2018].

Ayçiçeği bitkisinin kökünden izole edilen başka bir çalışmada; 16S rRNA dizi analizi ile *Pseudomonas* sp olduğu görülen izolat PGPR özellikleri bakımından araştırılmıştır. Bu izolat triptofan ilave edilmiş besiyerinde 23.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indol-3-asetik asit, asetilen indirgeme deneyi ile 44.28 nmol mg^{-1} protein h^{-1} ürettiği gösterilmiştir. Ayrıca nitrojenaz aktivitesi gösterdiği ve besiyerinde 48.80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ üstelik Pikovskaya agarda asetik asit, malik asit ve glukonik asit üretimi ile ortam pH'ını 7'den 3.04'e düşürerek fosforlu bileşikleri çözdüğü, bildirilmiştir. Çalışma sonunda *Pseudomonas* izolatının birden fazla bitki büyümesini teşvik edici özellik içerdiği ve kimyasal (NP) gübrelerin azaltılmış uygulamasıyla ayçiçeği mahsul verimini artırmak için biyogübre üretimi için potansiyel bir aday olabileceği ileri sürülmüştür [Majeed et al., 2018].

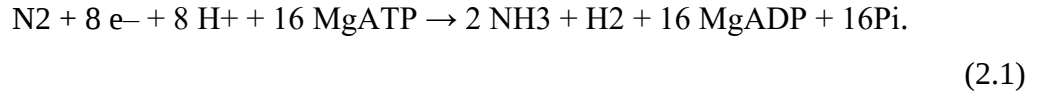
Son olarak soğuğa toleranslı *Pseudomonas* sp izolatının bezelye fidesine *Rhizobium leguminosarum* ile birlikte inoküle edildiği bir diğer çalışmada, nodülasyonun (%156,2) ve bitki biyokütlesinin önemli ölçüde (>%57,) arttığı bildirilmiş olup ko-inokülasyonun, aşılınmamış kontrol bitkilerine göre kök nodüllerinde toplam klorofil içeriğini (%31.5), fizyolojik olarak mevcut demiri (%106.7), toplam demiri (%95.9) ve leghemoglobin konsantrasyonunu (17.5 kat) arttırdığı ayrıca, sürgünlerin N alımını (%66.3), P alımını (%23.3), K alımını (%47.1) ve Zn alımını (2.75 kat) arttırdığı bildirilmiştir [Mishra et al, 2012].

2.3. Biyolojik Azot Fiksasyonu

Nitrojen dünyanın hemen hemen tamamında noksanlığı duyulan ve üretimi sınırlayan temel bitki besin maddesidir. Buna rağmen N_2 gelişme ve üreme için gerekli bileşiklerin oluşumunda biyolojik sistemler tarafından doğrudan kullanılamaz. Uygun bir bitkisel üretim düzeyinin sürdürülebilmesi için sürekli yenilenmesi gerekli olan azot, kimyasal ve biyolojik fiksasyonla toprak-bitki sistemine katılmaktadır [Jensen and Nielsen, 2003].

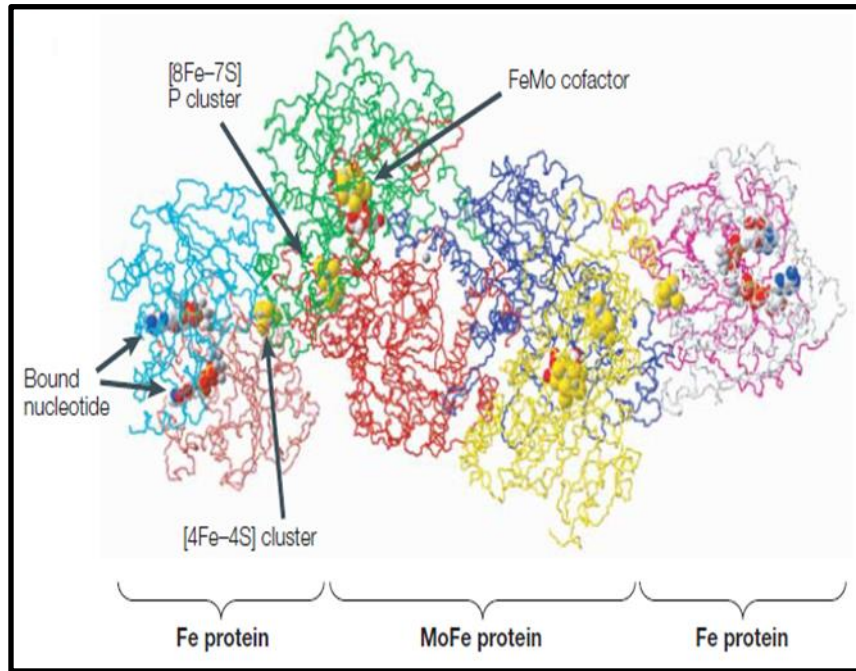
Biyolojik azot fiksasyonu, çeşitli mikroorganizmalar tarafından atmosferik azotun indirgenerek amonyağa dönüşmesidir [Peoples et al., 1995]. Biyolojik azot fiksasyonu (BNF), enzimatik bir reaksiyon olup reaksiyon sonunda oluşan bileşikler, aminoasitlerin ve diğer N içeren moleküllerin biyosentezi için başlangıç moleküllerini

oluşturmaktadır [Bürmann, 2003]. Biyolojik azot fiksasyonuna ait reaksiyon denklemi ise şu şekildedir [Dixon and Kahn, 2004]:



2.3.1. Nitrogenaz Enzimi ve Yapısı

Azot fiksasyonundan sorumlu olan ve Şekil 2.4 ([Dixon and Kahn 2004])’te yapısı gösterilen nitrogenaz enzimi ilk kez 1966’da Bulen ve Lecomte tarafından *Azotobacter vinelandii*’ den izole edilmiştir. [Madigan et al., 1997; Vignais et al., 1985]. Nitrogenazlar enzimi dinitrojenin amonyağa indirgenmesini kataliz eden metalloenzimler olup korunmuş yapısal ve mekanik özelliklere sahiptirler. Nitrogenaz enzimi, adını barındırdığı metal bileşimlerinden alan iki proteinden oluşmaktadır. Büyük heterotetramerik bileşen olan molibden-demir (MoFe) proteini (NIFDK, dinitrojenaz) enzimin katalitik bölgesini içerirken, küçük dimerik bileşen olan demir (Fe) proteini (NIFH, dinitrojenaz redüktaz) ise molibden-demir (MoFe) proteinine, ATP’ye bağımlı bir elektron donörüdür [Rees and Howard, 2000].



Şekil 2.4: Nitrogenaz enziminin yapısı.

Dinitrojenaz (MoFe proteini) 200.000-250.000 Da moleköl ağırlığına sahip olup 2α ve 2β alt birimlerinden oluşmaktadır. İki tip metal merkezi ve elektron transferi sağlayan fosfor demeti (P cluster) içermektedir. Fosfor demeti, $4\text{Fe}^{-4}\text{S}$ 'den, FeMo -kofaktörü $4\text{Fe}^{-3}\text{S}$ ve $\text{Mo}^{-3}\text{Fe}^{-3}\text{S}$ kompozisyonundan oluşmuş iki demetten oluşmaktadır. Bu proteinin temel görevi azotun indirgenmesini kontrol etmektir [Madigan et al., 1997]. MoFe proteini tüm diazotroflarda bulunmaktadır. Fakat bazı organizmalar vanadyum-demir veya demir-demir kofaktörlerini içeren alternatif nitrojenazlar da sentezleyebilmektedirler [Einsle et al., 2002].

Nitrojenaz enziminin bir diğeri bileşeni olan Fe proteini ise 60.000 Da moleköl ağırlığına sahiptir ve birbirine özdeş iki alt üiteden oluşmaktadır. 4Fe ve 4S atomlarını kapsayan bu proteinin düşük potansiyelli elektronları sentezleyerek azot fiksasyonunun devamını desteklediği düşünülmektedir [Madigan et al., 1997; Kim and Rees, 1994]. Ayrıca nitrojenaz enzimini oluşturan iki protein de oksijene son derece duyarlıdır [Seefeldt et al., 2004].

2.4. Buğday Bitkisi

İnsanlık tarihinde buğdayın yeri MÖ 1700 yılına kadar uzanmaktadır [Tanno and Willcox, 2006] (Şekil 2.5; [Web 3, 2021]). Dünyada ilk kültüre alındığı bilinen buğdayın Diyarbakır-Karacadağ'da 10 bin yıl kadar önce kültüre alındığı tahmin edilmektedir. Anadolu'da buğdayın 23 yabani ve 400 den fazla kültüre alınmış çeşidi mevcuttur [Özberk vd., 2016]. Vavilov'un [1987] araştırmalarında 8 gen merkezi belirlemiştir ve bunlardan ikisi Türkiye'de bulunmaktadır. Ülkemizde 11707 bitki taksonu bulunmakta olup bunların yaklaşık %32'si endemiktir. Bunlar içerisinde etkileri bakımından en önemlilerinden biri de buğdaydır [Özberk vd., 2016].

Buğday (*Triticum* spp.) (Şekil 2.5) dünyada olduğu gibi Türkiye'de de stratejik bir bitki konumundadır. Buğday; iklimsel değişimlerden az etkilenir, üretimi, taşıma, depolama ve işlenmesi olayları kolaydır. Yüksek besin değerlerine sahip olup tüm bu sebeplerden dolayı hem insan hem de hayvan beslenmesinde birçok besinin hammaddesidir [Tosun, 1980].



Şekil 2.5: *Triticum* spp..

Ayrıca dünya nüfusunun yaklaşık %35'inin temel besin kaynağını oluşturan buğday, insan beslenmesinde proteinin önemli bir kısmını ve enerji gereksiniminin %20'sini karşılamaktadır. Vitamin ve mineral bakımından çok zengin olmasa da bazı vitaminler ve mikro besin maddeleri için de iyi bir kaynak oluşturmaktadır. Türkiye'de buğday ürünleri tarafından günlük enerji ihtiyacının %40'ı karşılanmaktadır [Özberk vd., 2010].

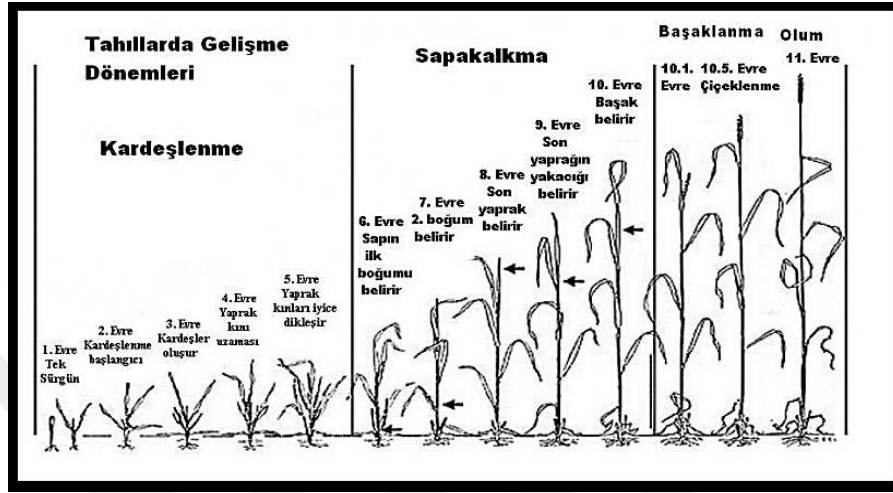
Türkiye'de yıllık buğday üretimi TÜİK verilerine göre 20 milyon ton civarında olup dünya sıralamasında 2019 yılında 10. sırada iken 2021 yılında 11. sırada yer almıştır. FAO verilerine göre 2021 yılı buğday üretimi dünyada 771 milyon tondur ve bu üretimin %66'sı ilk 10 üretici ülke tarafından üretilmektedir (Web 4, 2021; Web 5, 2021)

Günümüzde yaygın olarak üretimi yapılan buğday türleri; hekzaploid ekmeklik buğday, *T. aestivum* L. ($2n=42$, AABBDD) ve tetraploid sert makarnalık buğday *T. durum* Desf. ($2n=28$, AABB)'dir. Tetraploid ($2n=4x=28$, AABB) bitkiler olan makarnalık buğdaylar, kullanım alanları ve kalite özellikleri bakımından hexaploid ($2n=6x=42$, AABBDD) *T. aestivum* ve *T. compactum* buğdaylarından çok farklı ve özel bir konuma sahiptir [Özberk vd., 2010].

Makarnalık buğdayların kullanım şekilleri ülkelere göre değişmektedir. Özellikle Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde makarna çeşitlerinde kullanılmak

üzere üretilirken, Türkiye, Orta Doğu ve Kuzey Afrika gibi ülkelerde makarna üretiminin yanında bulgur, kuskus ve bazı ekmek çeşitlerinin yapımında kullanılmak üzere üretimi yapılmaktadır [Güleç vd., 2010].

Buğday bitkisi gelişimi faklı evrelere sahiptir ve sıcaklığa bağlı olarak gerçekleşmektedir (Şekil.2.6; [Web 3, 2021]).



Şekil 2.6: Buğday gelişim evreleri, Zadoks skalası.

Gelişimin ilk evresi olan çimlenme (Zadoks 00-19) sıcaklığa bağlı olmakla birlikte ekimden 3-15 gün sonra gerçekleşir. Ardından ilk üç yaprağın oluşumuyla bitki fide dönemine (Zadoks 10-19) geçer. 4. yaprağın çıkışı ile bitkide kardeşlenme başlar (Zadoks, 20-29), bitki durumuna, çeşidine ve fizyolojik etmenlere bağlı olarak kardeş sayısı değişiklik göstermektedir. Bir sonraki dönem olan sapa kalkma evresi; yaprak kını dikleşmesi, sapın oluşması, boğum ve boğum aralarının görülmesi olaylarının gerçekleştiği evredir. Kardeşlenme ile sapa kalkma arasındaki devrede, yazlık çeşitlerde yaprak ve kardeşlerin görünüşü dik iken, kışlık buğday çeşitlerinde yapraklar yere paralel görünümündedir. Çimlenme ile sapa kalkma devresinde yazlık çeşitler 6–10 °C arasında sıcaklığa, kışlık çeşitler ise 1–5 °C arasında 5–60 günlük vernalizasyon adı verilen düşük sıcaklık devresine ihtiyaç duyarlar. Vernalizasyonun sonunda bitkide otsu görüntü kaybolur. Bayrak yaprak kınının uzaması, kında şişme, kılçıklı çeşitlerde kılçık ucunun görülmesi ile gebecik evresi (Zadoks, 40-49) gerçekleşir. Gebecik evresini takip eden başaklanma evresi (Zadoks, 50-59), bayrak yaprağının kınından başak ucunun çıkması, başağın kından tamamen kurtulması ile karakterizedir. Çiçeklenme evresinde (Zadoks, 60-69), başağın ortasında ilk anterler

görülür ve başağın üst ve orta kısmına doğru anter çıkışı devam eder. Tanenin şekilsel olarak oluşup tanede süt kıvamının yoğunlaşmasıyla proteinlerin ve az miktarda karbonhidratların birikmesi, süt olum (Zadoks, 70-79) evresinde gerçekleşir. Hamur olum evresinde (Zadoks, 80-89) ise tane içi önce yumuşak-gevşek hamur (boza) kıvamında sonra katı (koyu) hamur kıvamında olur. Zadoks skalasına göre son evre olan fizyolojik olum evresinde (Zadoks, 90-99), tane sadece su kaybeder ve olgunlaşır. Tüm bu evrelerin sonunda buğday bitkisinin gelişimi tamamlanmış olur [Zadoxs et al., 1974].

2.4.1. Eminbey (*Triticum Durum* L.) Makarnalık Buğday Çeşidi

Makarnalık buğday makarna, bulgur, kuskus ve irmik üretiminde kullanılmaktadır. Birim alan veriminin yüksek ve adaptasyon sınırlarının geniş olması nedeniyle ekmeklik buğday, ekim alanlarının büyük kısmını oluşturmaktadır. Makarnalık buğday ise daha özel iklim koşullarına gereksinim duymaması nedeniyle ekmeklik buğdaya görece daha dar ekim alanlarına sahiptir. Türkiye makarnalık buğdayın gen merkezi olması ve ekolojik olarak kaliteli makarnalık buğday üretimine son derece uygun olmasına rağmen, makarnalık buğdaylar 7.3 milyon ha buğday ekim alanının yalnızca 1.2 milyon ha'lık kısmını kapsamaktadır. Son 15 yıla bakıldığında, 2004 yılında 2.1 milyon ha olan makarnalık buğday ekim alanında dramatik bir düşüş gerçekleştiği görülmektedir [Benlioğlu vd., 2020; Bozkurt, 2012; TÜİK, 2019]. Ülkemiz makarnalık buğday yetiştiriciliği için uygun ekolojiye sahip iken kaliteli buğday ihtiyacını ithalat ile karşılamaktadır [Dirik ve Sakin, 2018].

Makarnalık buğdaylardan biri olan Eminbey çeşidi kılçıklı beyaz başak, orta boy, sağlam yapı ve uzamış yumurta biçimindeki tane morfolojik özelliklerini göstermektedir. Aynı zamanda kışlık gelişme tabiatına, yüksek yatmaya dayanıklılığa sahip olmakla birlikte gübreye reaksiyonu iyidir ve uygun azotlu gübreleme ile dönme görülmez. Dane dökmeyen ve harman olma kabiliyeti iyi olan bir çeşit olan Eminbey'in verim potansiyeli 350-750 kg/da'a kadar çıkmaktadır.

Protein kalitesi ve irmik rengi ile makarnalık kalitesi çok iyi olan Eminbey çeşidi makarna sanayinin taleplerini karşılayacak kalitededir. Kışlık gelişme tabiatına sahip olan bu çeşit için İç Anadolu ve Geçit bölgeleri ayrıca benzer yörelerin yarı taban ve taban alanları önerilmektedir [TARIMORMAN, 2021]

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Canlı Materyaller (Mikroorganizmalar)

Tez çalışmasında yapılan testlerde kontrol olarak kullanılan *P.aeruginosa* ATCC 15692, *E.Coli* ATCC 8739, *S.aureus* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC (laboratuvar izoları) hücre hatları GTÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyota Laboratuvarı stoklarından temin edilmiştir. Daha önce 2018-A-105-04 numaralı BAP projesi kapsamında izole edilmiş 134 adet *Pseudomonas* sp. izolatu (Gül-Şeker, 2021) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Bitkisel Materyal

Saksı denemelerinde *Triticum durum* L. Eminbey makarnalık buğday çeşidi kullanılmıştır.

3.1.3. Çözeltiler

Bu çalışma sırasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.

Çözelti	Hazırlanışı
<u>Agaroz Jel</u>	%1 w/v ve %2 w/v olarak iki şekilde tartıldı 1X TAE tamponunda mikrodalgada tamamen berraklaşana kadar kaynatılarak çözüldü. 50 °C’ye kadar soğuduğunda 2 µl redsafe eklendikten sonra jel tırağı takılmış jel tepsisine dökülerek donması sağlandı.
<u>Lizozim</u>	25 mg/µl olacak şekilde tartıldı ve steril dH ₂ O’da eritilerek hazırlandı. Filtreden geçirilerek steril edildi.

Tablo3.1: Devamı.

<u>0,5 M EDTA</u>	73,06 g EDTA (Etilendiamidin tetraasetik asit) tartılarak 300 ml steril dH ₂ O'da çözüldü. pH'sı NaOH ile 8.0'a ayarlandı ve son hacmi 500 ml'ye tamamlandı.
<u>10X TAE tamponu</u>	10 ml 50X TAE tamponundan alındı üzerine 500 ml steril dH ₂ O eklenerek 10X' e seyreltildi.
1X TAE tamponu	100 ml 10X TAE tamponundan 100 ml alındı ve 900 ml steril dH ₂ O eklenerek 1X' e seyreltildi.
<u>1M Tris-HCL</u>	24,228 g Tris tartıldı. 200 ml steril dH ₂ O eklenerek çözüldü. pH' si HCL ile 8.0' a ayarlandı
TE Buffer	100 ml steril dH ₂ O' ye 2 ml Tris-HCL (pH 8.0)'den ve 500 µl EDTA (pH 8.0)' dan eklendi. pH'sı 8.0' a ayarlandı. Üzeri 200ml' ye tamamlandı.
Fizyolojik tuzlu su çözeltisi (FTS)	8,5 gram NaCl 1 litre dH ₂ O ile çözüldü.
Fe-EDTA	3,8 gram Na ₂ H ₂ EDTA.H ₂ O tartılarak 10 ml 1mol/L NaOH ile çözüldü. 2,5 gram FeCl ₃ 6H ₂ O tartılıp üzerine 5 ml dH ₂ O eklenmesinin ardından ısıtılıp nazikçe karıştırılarak çözüldü. Hazırlanan iki solüsyon yavaşça karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmesinin ardından filtre kağıdından süzüldü. Süzüntü alkolle 2 defa yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
%1,64 Fe-EDTA	0,164 gram Fe-EDTA 10 ml dH ₂ O'da çözülerek hazırlandı.
0,2 M KOH	0.5 gram tartılıp son hacmi dH ₂ O ile 50 ml'ye tamamlandı.
%0,5 Bromtimol Mavisi (BTM)	5 mg BTM tartıldı 1ml dH ₂ O eklenerek çözülüp 0,2 M KOH ile son hacim 10 ml'ye tamamlandı

3.1.4. Besiyerleri

LB Sıvı Besiyeri: Caisson firmasından temin edilen LB sıvı besiyerinden 25 gram tartıldı ve 1 litre suda çözüldü. Ardından pH 7'ye ayarlanarak, ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

LB Agar Besiyeri: Caisson firmasından temin edilen LB agardan 40 gram tartılarak 1 litre suda çözüldü. Ardından pH 7'ye ayarlanarak, ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

Peptonlu Su: Merck firmasından temin edilen peptonlu sudan 25,5 gram tartılarak 1 litre suda çözüldü. Ardından pH 7'ye ayarlanarak, ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

NFb Sıvı Besiyeri: 5 gram malik asit, 0,5 gram KH_2PO_4 , 0,2 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gram NaCl , 10 mg biotin, 20 mg pridoxin, 0,2 gram Na_2MoO_4 , 0,235 gram $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,28 gram H_3BO_3 , 0,008 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0 24 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 ml %0,5 Bromtimol Mavis, 4 ml %1,64 Fe-EDTA 100 ml dH_2O ile çözüldü ve 0,2 M KOH ile pH 6,8'e ayarlandı. Son hacim dH_2O ile 1 litreye tamamlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

Nfb Agar Besiyeri: 5 gram malik asit, 0,5 gram KH_2PO_4 , 0,2 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 gram NaCl , 10 mg biotin, 20 mg pridoxin, 0,2 gram Na_2MoO_4 , 0,235 gram $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,28 gram H_3BO_3 , 0,008 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0 24 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 gram agar, 2 ml %0,5 Bromtimol Mavis, 4 ml %1,64 Fe-EDTA 100 ml dH_2O ile çözüldü ve 0,2 M KOH ile pH 6,8'e ayarlandı. Son hacim dH_2O ile 1 litreye tamamlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

CAS Blue Agar Besiyeri: 350 ml besiyeri hazırlandı. Besiyeri aşağıda anlatıldığı şekilde verilen bileşeler ile hazırlanmıştır. Besiyeri hazırlığında kullanılan tüm malzemeler 1 gün öncesinde 6 molar HCl ile yıkandıktan sonra dH_2O 'dan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır.

- Mavi Boya (Blue Dye)
 - Sol 1: 0,06 gram CAS 50 ml ddH_2O içerisinde çözüldü.
 - Sol 2: 0,0027 gram $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 ml 10 mM HCl ile çözüldü.
 - Sol 3: 0,073 gram HDTMA 40 ml ddH_2O ile çözüldü.
 - Sol 1'den 25 ml, Sol 2'den 4,5 ml Sol 3'ten 20 ml plastik şişede bir araya getirildi. Hazırlanan boya solüsyonu 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

- Karışım Solüsyonu

Minimal Media9 (MM9) Stok Solüsyonu: 0,75 gram KH_2PO_4 , 1,25 gram NaCl, 2,5 gram NH_4Cl 25 ml ddH₂O'da çözüldü.

%20 Glikoz Stok Solüsyonu: 2 gram glikoz 10 ml ddH₂O'da çözülmesinin ardından filtre ile steril edildi.

NaOH Stok Solüsyonu: 25 gram NaOH 150 ml ddH₂O'da çözüldü.

Casamino Asit Solüsyonu: 3 gram casamino asit 13,5 ml ddH₂O ile çözüldükten sonra 13,5 ml kloroform içerisinde çözülmüş %3 8-hidroksikinolin eklendi ve +4 °C'de gece boyu inkübe edilerek ekstrakte edildi. İnkübasyonun ardından iki faza ayrılan solüsyondan üst faz ayrılarak kalan kloroformun uzaklaştırılması amacıyla çeker ocakta 1 saat bekletildi. Hazırlanan solüsyon filtre ile steril edildi.

- CAS Hazırlama

262,5 ml dH₂O ile 35 ml MM9 solüsyonunda 11,284 gram pipes çözüldü. Pipes pH5'in altında çözünmediğinden yavaş yavaş pH 6'ya ayarlanarak tamamen çözünmesi sağladı ve pH 6,8'e ayarlandı. 5,25 gram bacto agar solüsyonda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra 10,5 ml steril casamino asit solüsyonundan, 3,5 ml %20 glikoz solüsyonundan eklenerek iyice karıştırıldı. Karıştırma işlemi devam ederken yavaşça 35 ml blue dye solüsyonunun eklenmesinin ardından besiyerinin yapımı tamamlandı. Hazırlanan besiyeri steril petrilere dökülerek kullanıma hazır hale getirildi.

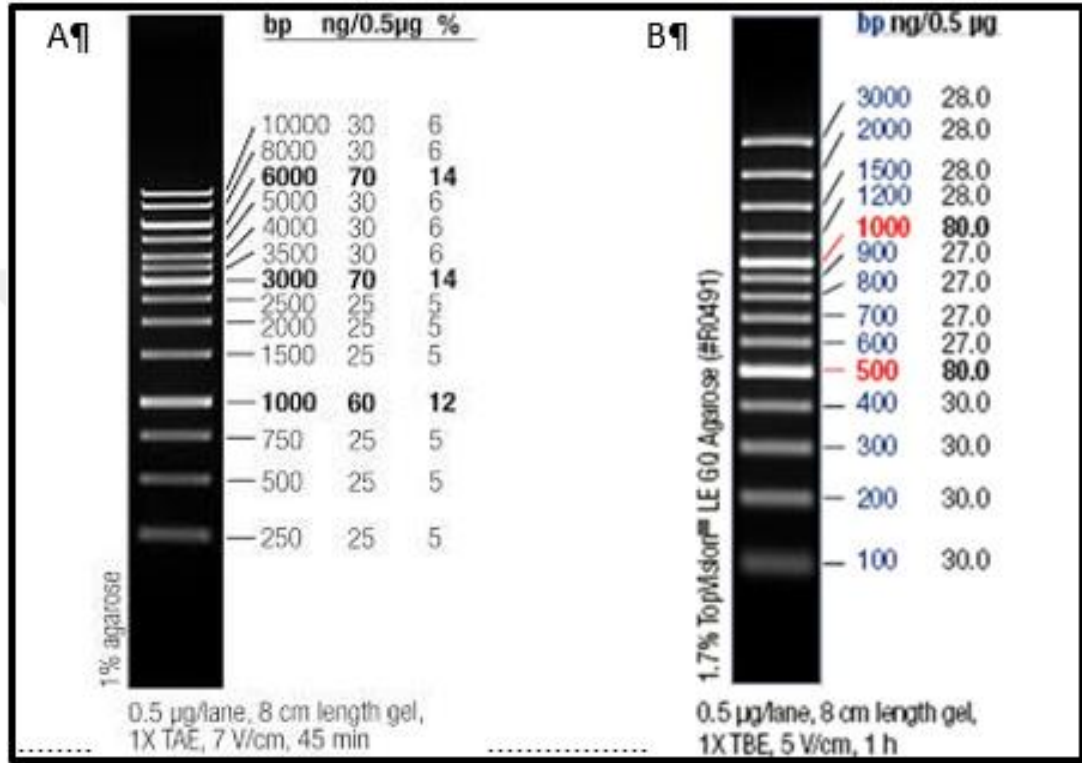
3.1.5. Ayıraçlar

Nessler's reaktifi: Merck firmasından temin edilmiştir.

Salkowski reaktifi: 49 ml %35 HClO_4 'e 1ml 0,5 M FeCl_3 eklenmesi ile hazırlanmıştır.

3.1.6. Kullanılan DNA Moleküler Belirteçleri

Agaroz jel görüntülemeleri için Moleküler DNA Belirteci Fermentas 100-bp Gene Ruler Plus DNA lader (USA) ve Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder (USA) kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: A-GeneRuler 1 kb DNA Ladder SM0314, B- Fermentas 100-bp Gene Ruler Plus DNA lader SM0323.

3.1.7. Kullanılan Kitler

Bu tez çalışmasında DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan Nucleo Spin Microbial DNA İsolation Kit'i Macherey-Nagel firmasından (Düren, GERMANY) temin edilmiştir.

3.1.8. Cihazlar

Bu çalışma sırasında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihaz İsmi	Markası
-80 °C derin dondurucu	Thermo, Forma 86°C ULT Freezer
Steril Kabin	Heraeus, HP48
Masa Üstü Santrifüj	VWR, Microsent 17R
Ultrasantrifüj	Beckman Coulter™ Avanti™ J-30I Centrifuge
35 Masa Üstü Santrifüj	BACKMAN COULTER, Microfuge 22R
Spektrofotometre	BIORAD, Smartspec 3000
Yatay Elektroforez Sistemi	BIO-RAD, Mini-Sab Cell CT
Güç kaynağı	BIO-RAD, PowerPac Basic
Otoklav	HIRAYAMA, HİCLA HVE-50
UV Görüntüleme Cihazı	Vilmer Loumart
UV Görüntüleme Cihazı	Azure Biosystem, c600
BioSpec-nano	UV1800 Shimadzu/Biotech
pH Metre	Hanna Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter
Su banyosu	TECHNE, TE-10A Tempette
Buz makinesi	BAR-LINE BF85
Floresans Spektrofotometre	VARIAN, EClipse
UV Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 530
Mikrodalga Fırın	Samsung
Jel Görüntüleme Cihazı	Biorad

3.1.9. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan kimyasallar ve markaları.

Kimyasal Adı	Markası
Pepton	Merck
LB Sıvı Besiyeri	Caisson
LB Agar Besiyeri	Caisson
NaCl	Merck
MgSO ₄	Merck
Agar	Affymetrix/USB
Tripton	Biolife
Agaroz	Prona
Redsafe	Chembio

Tablo 3.3: Devamı.

L - (-) Malic Acid (C ₄ H ₆ O ₅)	Merck
Lizozim	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma
Trisma-base	Sigma
Na ₂ H ₂ EDTAH ₂ O	Sigma
NaOH	Sigma
FeCl ₃ 6H ₂ O	Sigma
KOH	Zag
Bromtimol Mavisi	Sigma
KH ₂ PO ₄	Merck
MgSO ₄ 7H ₂ O	Merck
Biotin	Sigma Aldrich
Pridoxin	Sigma Aldrich
Na ₂ MoO ₄	Merck
H ₃ BO ₃	Sigma Aldrich
CuSO ₄ 5H ₂ O	Sigma Aldrich
ZnSO ₄ 7H ₂ O	Sigma Aldrich
HDTMA	Merck
NH ₄ Cl	Merck
N-Z Amine (Kazein Hidrolizat)	Sigma
8-hidroksikinolin	Sigma
Kloroform	Sigma Aldrich
Pipes	Appli Chem
D (+) Glucose Monohydrate	Riedel-De Haen
L- Tryptophan	Sigma
Nessler's reaktifi	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
IAA	Sigma Chemicals
Immersion Oil	Merck

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolatların PGPB Özelliklerinin Araştırılması

3.2.1.1.Siderofor Üretimi Testi

Siderofor üreterek demiri şelatlayan bakterilerin tespitinde, demir ile bağ yaptığında mavi/yeşil renk veren CAS/HDTMA kompleksi içeren CAS blue agar

kullanılmıştır. Siderofor gibi güçlü bir şelatör, demiri CAS/HDTMA- Fe kompleksinden ayırdığında renk turuncuya döner (Schwyn and Neiland,1987). Cas blue agar Louden ve ark (2011)'lerinin önerdiği şekilde hazırlanıp, 121°C'ta 15 dk steril edildi. Steril besiyeri aseptik şartlarda petrilere döküldükten sonra izolatlardan iğne uçlu öze ile inokülasyon yapıldı. 30°C'ta 2 günlük inkübasyonun ardından turuncu renk oluşturan izolatlar siderofor üretme özelliğine sahip olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 15692), negatif kontrol olarak *Escherichia coli* (ATCC 8739) kullanıldı.

3.2.1.2. N Fiksasyonu Testi

Bu test ile havada serbest halde bulunan azotu, NH₄ ve türevlerine fikse edebilme yeteneğine sahip olan *Pseudomonas* sp. izolatları tespit edildi. Azot fiksasyonu testi için kullanılan NFb agar besiyeri, azot içermeyen ve pH'a duyarlı bromtimol mavisi içeren bir besiyeridir. Azot fiksasyonu sonunda pH'a duyarlı bromtimol mavisi boyası, oluşan bazik pH'da besiyerinin rengini yeşilden maviye döndürür. Steril NFb besiyeri aseptik şartlarda petrilere dökülüp, petrilere her bir izolat iğne uçlu öze ile inoküle edildi. Pozitif kontrol olarak *P.aureginosa* (ATCC 15692), negatif kontrol olarak *E.coli* (ATCC 8739) kullanıldı. 30°C'ta 7 günlük inkübasyon süresi sonunda mavi renk oluşturan izolatlar pozitif (azot fiksasyonu yapan), mavi renk oluşturmayan izolatlar ise negatif (azot fiksasyonu yapmayan) olarak değerlendirildi.

3.2.1.3.İndol-3 Asetik Asit Oluşumu Testi

Pseudomonas izolatlarının IAA üretimi, Salkowski reaktifi kullanılarak belirlendi (Gordon ve Weber 1951). Luria-Bertani (LB) besiyerinde büyütülen taze kültürler 0,5 OD (optical density) yoğunluğuna geldikten sonra, 100 µg/ ml triptofan ilave edilmiş 5 ml LB broth içeren tüplere %2'lik aşılama ile inoküle edildi. 28 ± 1 ° C'ta 2 gün inkübasyonun ardından 5 dakika süreyle 10.000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatant içerisine eşit hacimde Salkowski reaktifi ilave edildi. Renk oluşturma için 30 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldıktan sonra optik yoğunluk 530 nm'de okutuldu. Aşılınmamış besiyeri, kontrol olarak kullanılmış olup ve IAA üretimi yapan [*P. aureginosa* (ATCC 15692)] (*E.coli* ATCC 8739) ve yapmayan (*S.aureus*)

bakteriler ile sonuçlar karşılaştırılmıştır. Standart eğri, kantifikasyon için 5-100 µg/ml IAA (Sigma Chemicals) ile hazırlanmıştır.

3.2.1.4.NH₄ Üretiminin Belirlenmesi

İzolatlar a ait NH₄ üretiminin tespiti Cappuccino and Sherman'a (1992) göre gerçekleştirildi. Nutrient broth besiyerinde 24 saat büyütülen kültürlerden 0,5 McFarland (yaklaşık 10⁸ CFU/ml) bakteri sayısı ayarlandı. 10 ml Peptonlu suya %2'lik aşılama ile inokülasyon yapıldı. 30°C'ta 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her tüpe 0,5 ml Nessler's reaktifinden eklenerek oluşan renk değişimi ve 530 nm'deki absorbans değerleri kaydedildi. Peptonlu suda (NH₄)₂SO₄'ün 1000ppm, 500ppm, 200ppm, 100ppm ve 50 ppm'lik konsantrasyonları hazırlanarak Nessler's reaktifi örnekler ile aynı şekilde eklenerek 530 nm'deki absorbans değerleri kaydedilmiş ve bu değerler ile standart eğri oluşturulmuştur. Standart eğri kullanılarak izolatlar a ait üretim miktarları hesaplanmıştır.

3.2.1.5.GC Analizi

Nfb agar testi ile en iyi azot fikse ettiği gözlemlenen en az 3 izolatın nitrogenaz aktivitesi gaz kromatografisinde (GC) Gothwall et al., (2008)'nin önerdiği şekilde asetilen indirgeme testi (acetylene reduction assay-ARA) kullanılarak belirlendi. Brom timol mavisi eklenmeden hazırlanan ve steril edilen azotsuz sıvı Nfb besiyerinden steril serum şişeleri içerisine 14 ml eklendi. Luria-Bertani (LB) besiyerinde büyütülen taze kültürlerin yoğunluğu steril fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde 0.5 McFarland'a ayarlanarak serum şişelerindeki 14 ml besiyerine (şişe hacminin 2/3'ü) %10 v/v olacak şekilde inoküle edildi. İzolatlar 30°C'de 72 saat inoküle edildikten sonra 5 ml steril şırınga yardımıyla şişe hacminin %10'u kadar gaz serum şişesi içerisinden çekilerek yerine aynı miktarda asetilen gazı eklendi. İzolatlar bu şekilde çalkalayıcıda 180 rpm'de 24 saat 37°C'de inkübe edildi ve nitrogenaz enzim aktivitesi sonucu asetilen gazının etilene indirgenmesi reaksiyonunun gerçekleşmesi inkübasyon sonunda üretilen etilen miktarı oluşan pikler ile değerlendirildi.

Üretilen etilenin analizi için 5µl numune gazı, bir Propak T kolonu ve H-alev iyonizasyon detektörü ile bağlanan bir Perkin-Elmer otosistem gaz kromatografisine

(Perkin elmer turbo matrix headspace clarus 580 gas chromatography) enjekte edildi. Gaz kromatografi için çalışma koşulları şu şekildedir: Kolon-Porapak T, 6 fitde1/8 inç (yaklaşık 183'e 0.3 cm); taşıyıcı nitrojen gazının akış hızı 30 ml dk⁻¹; kolon sıcaklığı, 60 °C; enjeksiyon ağzı, 110 °C; alev iyonizasyon dedektörü, 120 °C. Tüm deneyler, bir kontrol (yalnızca büyüme ortamı, aşılama yok) ve boş (gazlı büyüme ortamı, aşılama yok) ile birlikte üç kez gerçekleştirildi. Aşılama yapılmayan gazlı büyüme ortamı (NFb besiyeri) negatif kontrol, *K.pneumoniae* pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Moleküler Yöntemler ile Tanımlama

3.2.2.1.DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için seçilen 1 *Pseudomonas* spp. izolatının LB besiyerine 5 ml'lik 24 saatlik taze kültürleri %2 v/v aşılama ile inoküle edildi. 30 °C'ta 24 saat inkübasyonun ardından kültürlerin içinde bulunduğu tüpler, 4500 g'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pelletlerden Nucleo Spin/Microbial DNA Isolation Kit kullanılarak, bakterilerin genomik DNA izolasyonu Nucleo Spin Microbial DNA Isolation kiti (MACHEREY-NAGEL, Germany) protokolünün önerdiği şekilde gerçekleştirildi.

3.2.2.2.DNA Miktarının Tayini

Elde edilen DNA örneklerinin miktar tayini nanodrop cihazında (Thermo Scientific, Nanodrop Lite Spectrophotometer/USA) gerçekleştirildi. Bunun için izole edilen DNA örneklerinden buz üzerinde 1'er µl örnek alınıp ölçüm yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.

3.2.2.3.DNA'nın Agaroz Jelde Yürütülmesi

DNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarılıp aparat elektroforez tankına yerleştirildi. 1X TAE tamponu ile elektroforez tankı dolduruldu. Her bir örnek 1X Loading Dye

içercek şekilde boya ile karıştırıldı ve final hacimde 6 ul örnek kuyucuklara transfer edildi. Örnekler 100V'ta yaklaşık 45 dk yürütülmesinin ardından jel görüntüleme cihazında (Vilber-Lourmat infinity 3026, Fransa) görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.2.2.4. PZR ile 16 S rDNA Dizisinin Çoğaltılması

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lardan 16S rDNA ve rpoD bölgelerinin eldesine ve çoğaltılmasına yönelik olarak hazırlanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu için aşağıdaki Termal Döngü Cihazı reaksiyon karışımı ve programı kullanıldı.

Reaksiyon toplam hacmi 20 µl olacak şekilde; reaksiyon karışımı; 1X Hot FIREPol Blender Master Mix, 0,2 µM F ve R primer çiftleri, kalıp DNA <50 ng ile hazırlandı ve 20 µl ye steril apirojen ampul su ile tamamlandı.

Termal döngü cihazı programı, ön denatürasyon 95 °C'ta 13 dk, denatürasyon 95°C'ta 15 sn, bağlanma Tablo 3.4'te belirtilen derecede 1 dk, uzama 72°C' ta 1 dk ve son uzama 10 dk olacak şekilde toplam 35 döngü olarak gerçekleştirildi.

Elde edilen PZR ürünleri %2 (w/v) lik agaroz jelde yaklaşık 40 dk 90 V'ta yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında (Vilber-Lourmat infinity 3026, France) görüntülendi. Jelde kullanılan uygun belirteçlerle (100 bp DNA Ladder) yaklaşık 1500 baz çiftlik 16S rDNA bölgesinin elde edildiği görülüp her örnek için fotoğraflandı.

Elde edilen PZR ürünlerinin dizilenmesi hizmet alımı yolu gerçekleştirilmiş olup diziler çift yönlü olarak okunarak izolatlara ait 16S rDNA dizisi belirlendi.

Tablo 3.4: Tür bazında tanımlama için kullanılan genlere ait primer bilgileri.

Gen Adı	Primer Adı ve Dizisi	Bağlanma sıcaklığı	Bant Boyutu	Kaynak
16S rRNA	27F GAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R TACCTTGTTACGACTT	58°C	1465bp	Lane (1991)

3.2.3. Seçilen İzolatın Saksı Deneyleri ile Buğday Bitkisi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Saksı denemelerinde kullanılan toprak Gebze Teknik Üniversitesi kampüs arazisinden alınmış olup 1:1 oranında ticari dış mekan toprağı ile karıştırılarak karışım

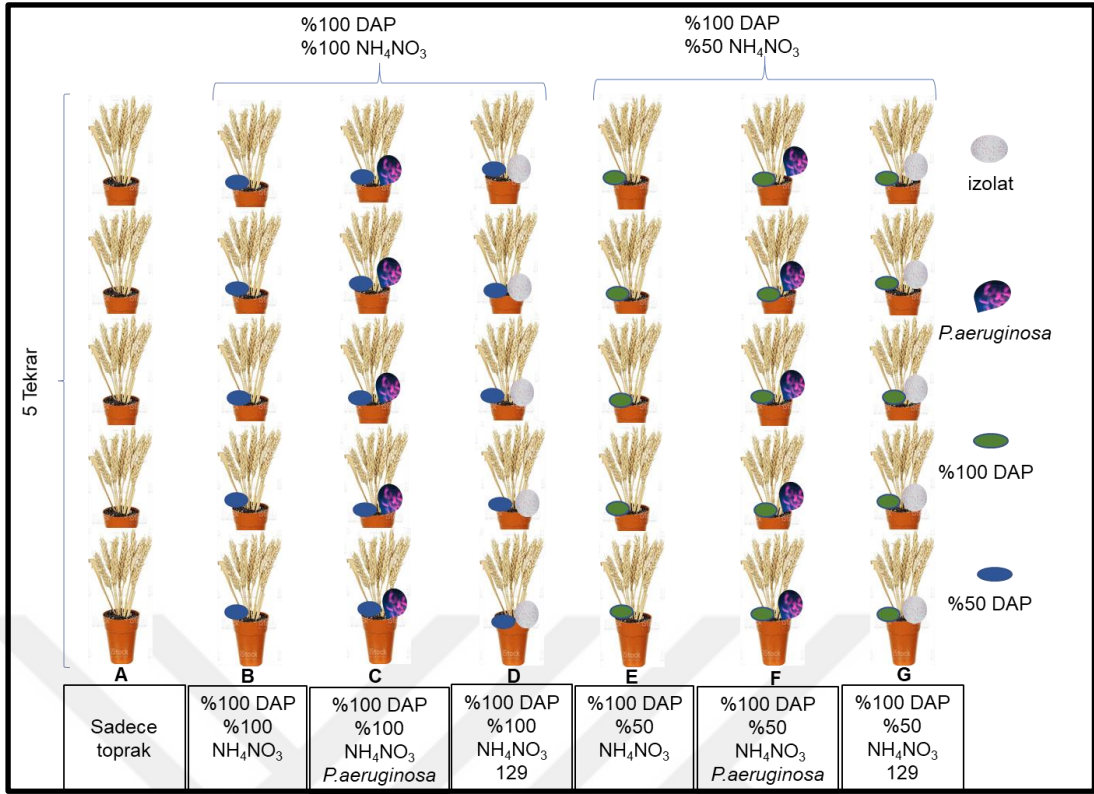
toprak elde edilip ardından drenajın arttırılması amacıyla, karışım toprağı 1:1 oranında kum ile karıştırıldı. Hazırlanan saksı toprağı 121°C’de 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Kullanılan toprak bu aşamadan sonra karıştırılarak 3 farklı örnek alınıp analize gönderilmiştir.

Denemelerde 21cm kenar uzunluğuna ve 30 cm derinliğe sahip 12 lt hacimli kare saksılar kullanıldı. Denemeler makarnalık buğday çeşidi (*Triticum durum* L. Eminbey) ile yapıldı. Eklenecek gübre miktarı saksı büyüklüğüne ve her saksıya eklenen toprak miktarına göre 12kg/da’a göre hesaplandı.

Benzer büyüklüğe sahip tohumlar seçilerek suya koyuldu ve su yüzeyine çıkan tohumlar kullanılmadı. Seçilen tohumlar ekimden hemen önce 1 litre çeşme suyu ve diamonyum fosfat (DAP) gübresi verilmiş toprağın bulunduğu her saksıya 12 adet olacak şekilde, toprağın 2 cm derinliğine tohumlar ekildi. Ardından her tohumun üzerine, 10⁸ CFU/ mL yoğunluğundaki bakteri kültüründen 1 ml eklendi. Sapa kalkma dönemi öncesi her bitki köküne 1ml (10⁸ CFU/ mL) dökülerek ve her bitkinin yaprağına yaklaşık 1ml spreyleme ile bakteri inokülasyonu tekrarlandı. Aşılammamış tohumlar negatif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılacak olan tohumlar ise PGPR özellikleri ile bilinen *Pseudomonas aeruginosa* ile inoküle edildi. Çimlenmenin ardından saksı başına düşen bitki sayısı 7’ye indirilmiştir.

Seçilen izolat ile inoküle edilen tohumların ekilen saksılar, planlandığı şekilde amonyum nitrat (NH₄NO₃) dozunun % 50’si ve %100’ü ile desteklendi. Sadece % 50 amonyum nitrat ve % 100 amonyum nitrat ile desteklenen, bakteri inokülasyonu yapılmayan tohumların ekildiği saksılar kontrol olarak kullanıldı. Tüm saksılara % 100 doz DAP eklendi (Şekil 3.2).

Testler sonucunda belirlenen izolat, saksı denemelerinde buğday bitkisi ile bir araya getirildi. Azot fikse edebilen bakteri ile yapılan saksı denemesi 3 ana gruptan oluşmakta olup aşağıdaki şematize edilmiştir (Şekil 3.2). Bitki üzerindeki morfolojik ve fizyolojik değişimleri işaret eden parametreler 8. (Gövde boyu, sap boyu ve gövde kalınlığı) ve 16. (sap sayısı ve sarı yaprak sayısı) haftalarda takip edilerek kaydedildi.



Şekil 3.2: Saksı deney planı.

3.2.4. İstatistiksel Analizler

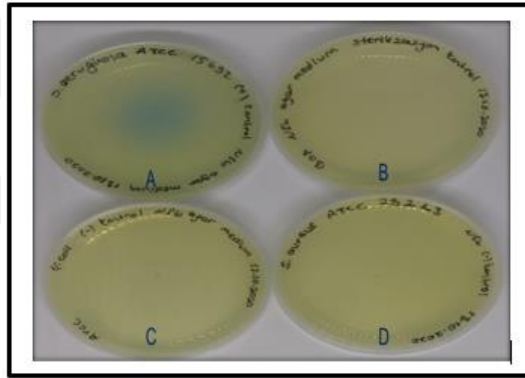
Elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler arasındaki farklar, asgari önemli fark testi (LSD, $P \leq 0.05$) kullanılarak ANOVA ile karşılaştırılmıştır.

4. SONUÇLAR

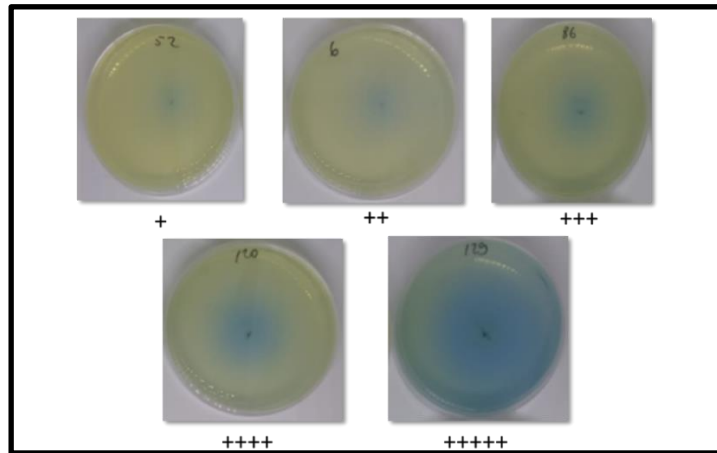
4.1. Azot Fikse Etme Kabiliyetine Sahip Türlerin Seçilmesi

2018-A-105-A-04 no'lu GTÜ BAP projesi kapsamında izole edilmiş olan 134 izolattan 49 tanesinin azot fikse etme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Şekil 4.1'de kontrol suşları olan *P.aeruginosa* (+Kontrol), *S.aureus* (-Kontrol) ve *E.coli* (-Kontrol)'ye ve Şekil 4.2'de bazı izolatlara ait Petri fotoğrafları gösterilmiş olup, oluşan mavi zonlar azot fiksasyonuna işaret etmektedir.

134 izolata ait azot fiksasyonu sonuçları Tablo 4.1'de yer almaktadır.



Şekil 4.1: A) *P.aeruginosa* [Kontrol (+)], B) sterilizasyon kontrolü, C) *E.coli* [Kontrol (-)], D) *S.aureus* [Kontrol (-)].



Şekil 4.2: İzolatların azot fikse etme seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan derecelendirme.

Tablo 4.1: İzolatların kontrol test bakterisi (*P. aeruginosa* ATCC15692)'ne görece N fiksasyon testi sonuçları.

İzolat No	N ₂ Fiksasyonu	İzolat No	N ₂ Fiksasyonu	İzolat No	N ₂ Fiksasyonu
P.a*K(+)	+++	45	-	91	-
S.a*K(-)	-	46	-	92	+++
1	-	47	-	93	-
2	-	48	+	94	++
3	-	49	-	95	+
4	-	50	-	96	+
5	-	51	-	97	+
6	++	52	+	98	-
7	-	53	-	99	++
8	-	54	-	100	++
9	-	55	-	101	++
10	-	56	-	102	+
11	-	57	-	103	-
12	-	58	-	104	-
13	-	59	-	105	++
14	-	60	-	106	-
15	-	61	-	107	-
16	-	62	-	108	-
17	-	63	-	109	-
18	-	64	-	110	++
19	-	65	-	111	++
20	-	66	-	112	+
21	+	67	-	113	+++
22	-	68	+	114	-
23	-	69	-	115	+
24	-	70	-	116	+
25	-	71	-	117	-
26	-	72	-	118	+++
27	+	73	-	119	+
28	+	74	-	120	++++
29	-	75	-	121	+
30	-	76	+	122	+
31	-	77	++	123	+
32	-	78	-	124	+
33	-	79	-	125	+
34	-	80	+	126	+++
35	+	81	-	127	+++
36	-	82	-	128	-
37	-	83	+	129	+++++
38	+	84	++	130	+
39	-	85	-	131	++++
40	-	86	+++	132	+++
41	-	87	-	133	+++

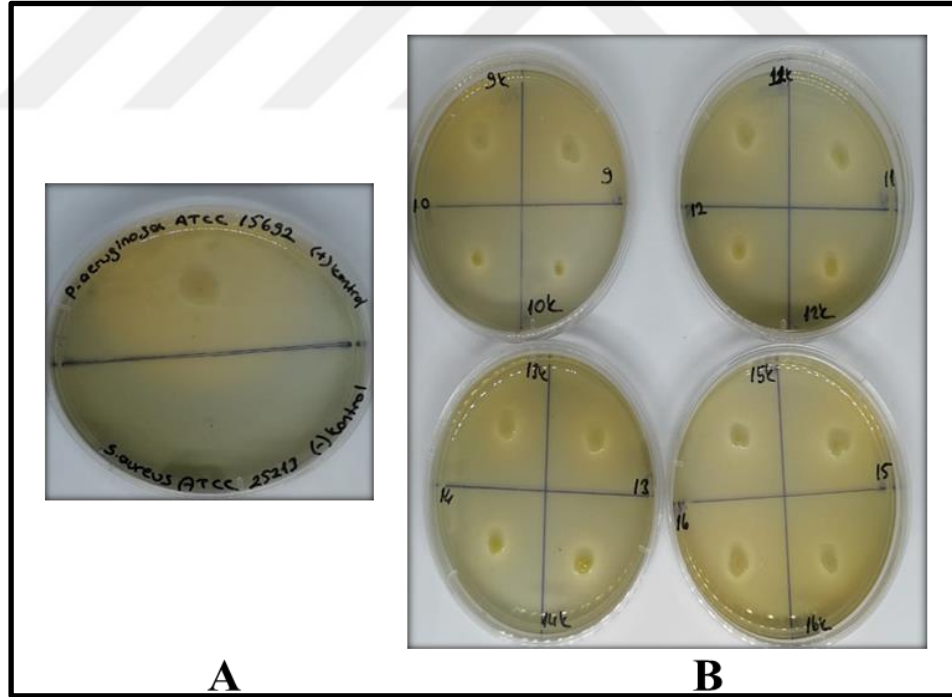
Tablo 4.1: Devam.

42	-	88	+++	134	++++
43	-	89	-		
44	+	90	+		

*P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*; S.a: *Staphylococcus aureus*

4.2. İzolatlara Ait Siderofor Üretme Özelliğine Sahip Olanların Tespit Edilmesi

2 günlük inkübasyon süresinin ardından kontrol suşları olan ve Şekil.4.3.'de gösterilen *P.aeruginosa* (+ Kontrol) ve *S.aureus* (- Kontrol)'a görece izolatlara ait siderofor üretme yeteneği gözlemlenmiştir. Besiyerinde oluşan renk değişiminin boyutuna göre sonuçlar değerlendirilmiş olup 134 izolattan bazılarının ait Petri görüntüleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. 134 izolata ait sonuçlar Tablo 4.2'de gösterildiği gibi olup, 134 izolattan 123 tanesinin siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3: A: *P.aeruginosa* (kontrol +), *S.aureus* (Kontrol -); B: Siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu gözlenen bakteri örneklerinden bazıları.

Tablo 4.2: 134 izolatların kontrol test bakterisi (*P. aeruginosa* ATCC15692)'ne göre siderofor üretimi testi sonuçları.

İzolat No	Siderofor Üretimi	İzolat No	Siderofor Üretimi	İzolat No	Siderofor Üretimi
P.a*K(+)	+++	45	++	91	+
S.a*K(-)	-	46	+	92	+
1	+	47	+++	93	+
2	++	48	++	94	++++
3	+	49	+	95	+++
4	+	50	+	96	++
5	+	51	+	97	++
6	+	52	+	98	+
7	++	53	+	99	++
8	+	54	+	100	++
9	+++	55	+	101	-
10	+	56	+	102	+
11	++	57	+	103	-
12	++	58	+	104	+
13	+++	59	+	105	-
14	+	60	+	106	+
15	++	61	+	107	-
16	+++	62	+	108	-
17	++	63	+++	109	+
18	+++	64	+	110	++
19	++++	65	+	111	+
20	+	66	+	112	++
21	++	67	-	113	+
22	+	68	+	114	++
23	+	69	+	115	++
24	+	70	+	116	++
25	+	71	++	117	++
26	+	72	-	118	+++
27	+	73	+	119	++
28	++	74	+	120	++
29	-	75	+	121	++
30	++++	76	+	122	++
31	+	77	+	123	+
32	+	78	+	124	+
33	+	79	++	125	+
34	++	80	+	126	+
35	+++	81	+	127	+
36	+++	82	++	128	++++
37	+++	83	++	129	+++
38	+++	84	++	130	++
39	++++	85	+++	131	++
40	++++	86	++	132	+

Tablo 4.2: Devamı.

41	-	87	-	133	++
42	++	88	+	134	++
43	+	89	++		
44	++	90	+++		

*P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*; S.a: *Staphylococcus aureus*

4.3. Azot Fikse Ettiği Belirlenen İzolatların İndol-3 Asetik Asit Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi

Azot fikse ettiği tespit edilen 49 izolat IAA üretme yetenekleri bakımından incelenmiştir. 2 günlük inkübasyon sonunda izolatların ürettiği IAA miktarı kalibrasyon eğrisi kullanılarak, ölçülen absorbans değerlerine göre µg/ml olarak hesaplanmıştır. 49 izolat içerisinde 9 tanesinin (koyu renk ile gösterilen izolatlar) pozitif kontrol *P.aeruginosa* 'dan daha fazla üretim yaptığı görülmüştür (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Azot fikse eden izolatların kontrol test bakterisi (*P. aeruginosa* ATCC15692)'ne görece IAA üretim miktarları.

İzolat No	IAA Üretimi (µg/ml)	İzolat No	IAA Üretimi (µg/ml)	İzolat No	IAA Üretimi (µg/ml)
P.a*K(+)	3,28	92	0,95	122	0,83
6	7,50	94	0,28	123	0,70
21	5,39	95	0,79	124	1,80
24	4,17	96	-0,265	125	3,53
27	5,56	97	0,747	126	2,22
28	3,24	99	2,52	127	2,01
35	13,44	100	0,367	129	0,75
44	4,83	101	0,45	130	4,25
48	1,13	102	1,42	131	-0,09
52	2,81	105	1,34	132	1,29
68	2,22	110	2,98	133	1,13
76	2,56	112	0,16	134	1,46
77	2,56	113	0,54		
80	1,59	115	1,50		
83	1,97	116	0,41		
84	1,21	118	3,74		
86	1	119	-0,31		
88	1,25	120	1,97		
90	0,24	121	2,2		

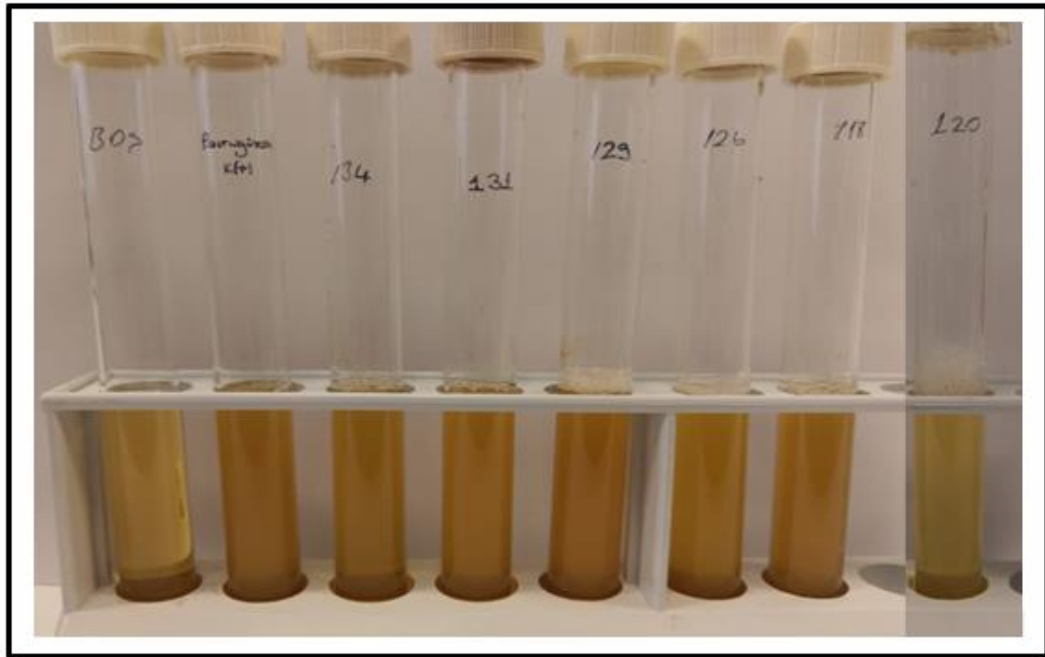
*; P.a: *Pseudomonas aeruginosa*

Azot fikse eden 49 izolattan 46 tanesi bu yeteneğe sahip olmakla beraber 9 tanesi kontrol olarak kullanılan *P.aeruginosa* 'dan daha yüksek IAA üretimi göstermiştir. Bu

deney sonrasında; azot fiksasyonu, IAA üretimi ve Siderofor üretimi yeteneklerine sahip olan 126, 120, 129 ve 134; azot fiksasyonu ve IAA üretimi yeteneğine sahip olan 118; azot fiksasyonu ve Siderofor üretimi yapabilen 131 numaralı izolatlar seçilmiş olup çalışmaya bu izolatlar ile devam edilmiştir.

4.4. Seçilen İzolatların NH₄ Üretiminin Belirlenmesi

Azot fiksasyonu, siderofor üretimi ve IAA üretimi özellikleri göz önünde bulundurularak seçilen 6 izolatın, peptonlu suda 72 saat inkübe edilmesinin ardından amonyum üretim yetenekleri, hem kalitatif hem de kantitatif olarak gözlemlenmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin sarıdan kahverengiye dönmesi amonyum üretimini göstermektedir (Şekil 4.4).

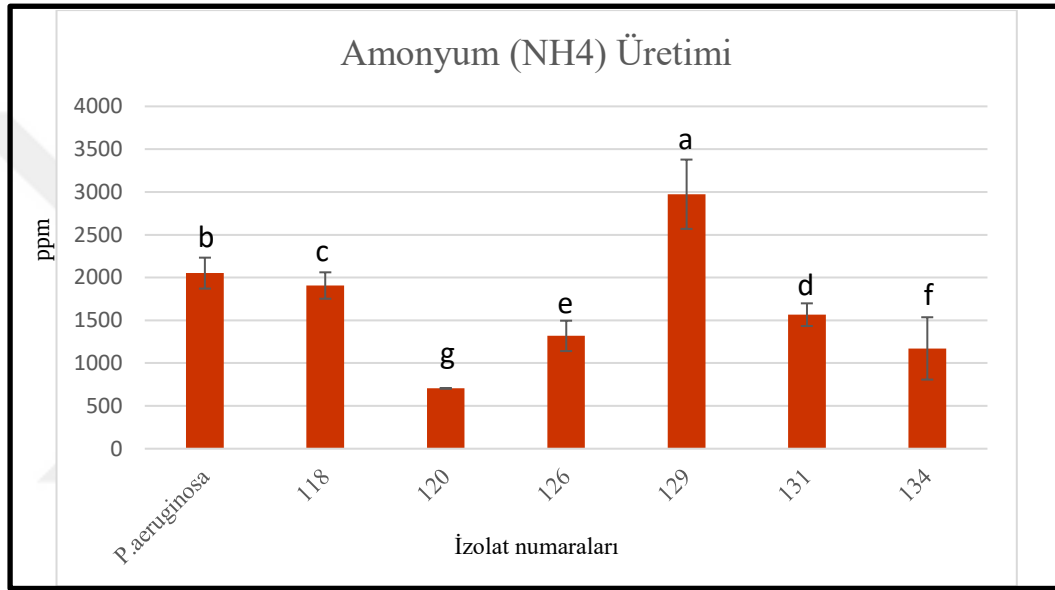


Şekil 4.4: Seçilen izolatların kontrol test bakterisi (*P. aeruginosa* ATCC15692)'ne görece NH₄ üretimi testi sonuçları.

Kalibrasyon eğrisine göre, 530 nm'deki absorbans değerleri kullanılarak ppm olarak hesaplanan üretim Şekil 4.5'te yer alan grafikte verilmiş olup, tüm izolatların NH₄ ürettiğini ve 129 numaralı izolata ait üretimin pozitif kontrol *P.aeruginosa*'dan yaklaşık 1,5 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Seçilmiş izolatların NH₄ üretimi.

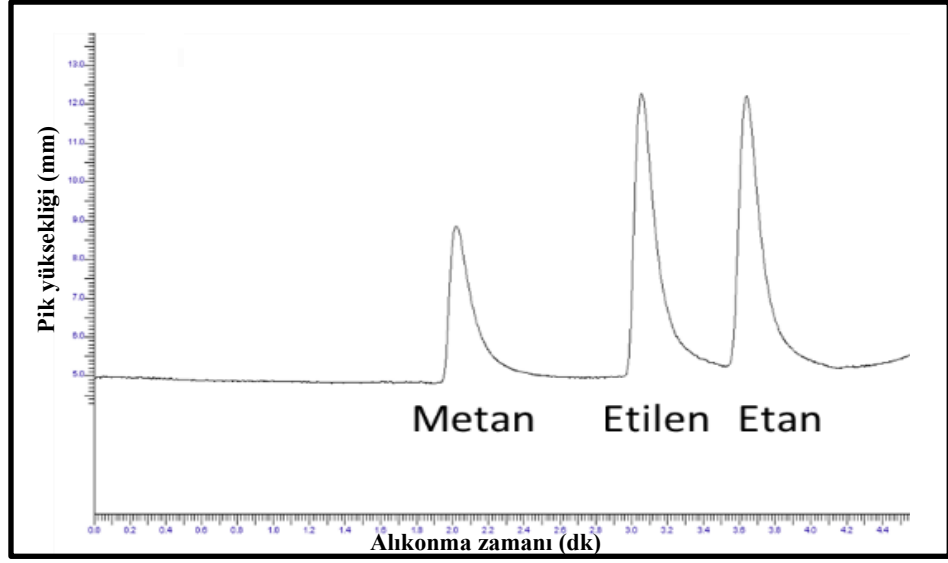
İzolat No	NH ₄ Üretimi (ppm)
<i>P.aeruginosa</i>	2179,75 ±1,25 ^b
118	2013,5±40 ^c
120	704,75±1,25 ^g
126	1318,5±177,5 ^e
129	2973,5±405 ^a
131	1566±132,5 ^d
134	932,25±163,75 ^f



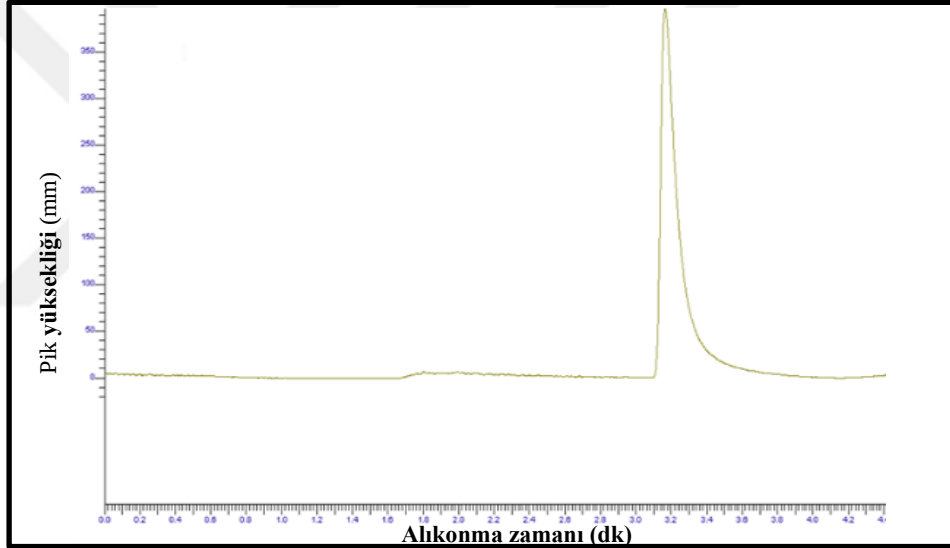
Şekil 4.5: Seçilen izolatların kontrol test bakterisi (*P. aeruginosa* ATCC15692)'ne görece NH₄ üretim miktarları.

4.5. Asetilen İndirgeme Deneyi (ARA)

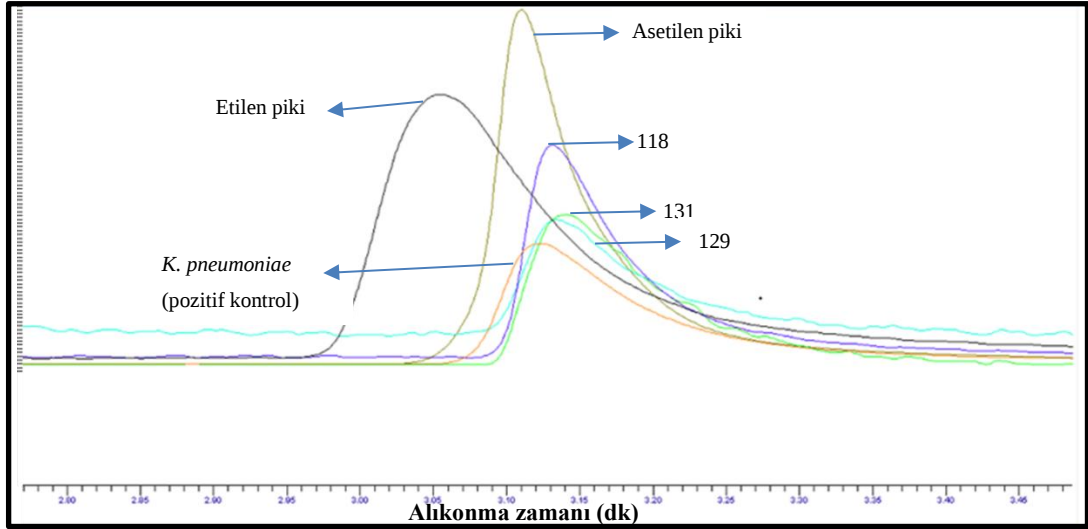
Asetilen-etilen metodu kullanılarak elde edilen sonuçlarda seçilen izolatların nitrogenaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Böylece Petri denemeleri ile (Bkz. Bölüm 4.1) azotu en iyi fikse eden seçilmiş izolatların azot fiksasyon kabiliyetine sahip oldukları Gaz Kromotagrafi cihazı kullanılarak enstrümental analiz ile de desteklenmiştir (Şekil 4.8). GC analizinde kullanılan etilen standardı şekil 4.6'da, asetilen standardı ise şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Standart gaz karışımı pikleri.

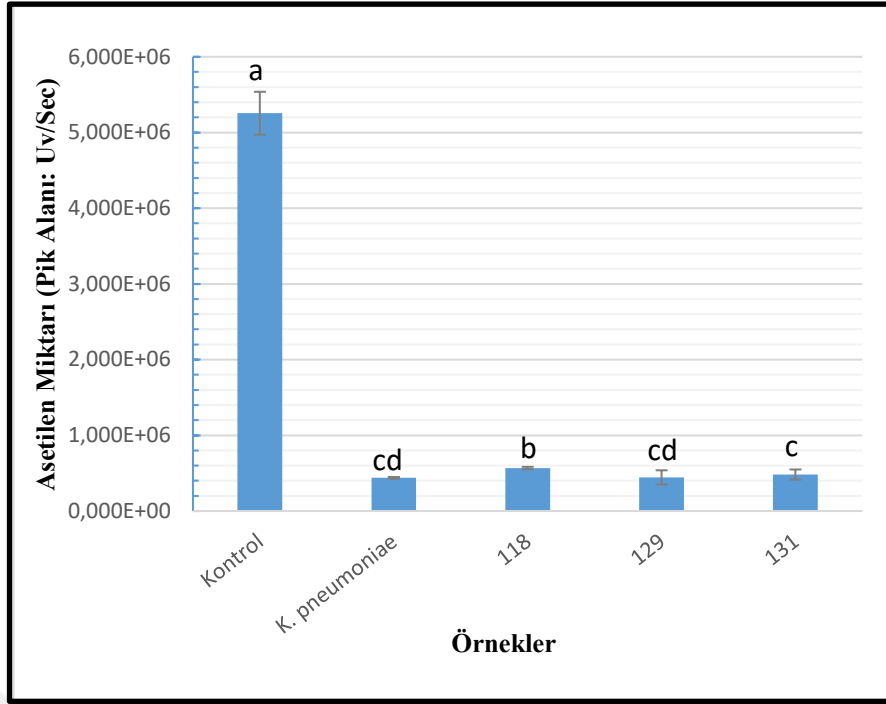


4.7: Asetilen piki.



Şekil 4.8: Kontrole (*K. pneumoniae*) görece seçilmiş (118, 129, 131) izolatların nitrogenaz aktivitesi sonucu asetilen gazındaki azalışı gösteren GC sonucu.

Şekil 4.8’ de yer alan piklerde izolatlara ait piklerin yüksekliğine görece alıkonma zamanları gösterilmektedir. Nitrogenaz enziminin asetilen gazını etilene indirgemesi temel alan ARA deneyi sonucunda GC’de asetilen pikleri elde edilmiş olup, pik alanları analiz edilmiş ve azot fikse ettiği Petri deneyleri ile gösterilen 118, 129 ve 131 numaralı izolatların ortama verilen asetilen gazını indirgediği, ortamdaki asetilen gazındaki azalışın görselleştirilmesi ile açık şekilde görülmektedir. Ortamda bulunan asetilen gazının % 92’sini indirgeyen *K.pneumoniae* (pozitif kontrol) ve 129 numaralı izolat en yüksek indirgeme oranına sahiptir. Bunu 131 numaralı izolat (%91), takip etmekte olup asetilen gazının %89’ini indirgemiş olan 118’ in en az asetilen indirgemesi gerçekleştiren izolat olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Verilen asetilen gazının kontrol ve seçilmiş izolatlar (118,129, 131) tarafından indirgenme grafiği.

4.6. Seçilen İzolatların Tür Bazında Tanımlanması

4.6.1. DNA Miktarının Tayini

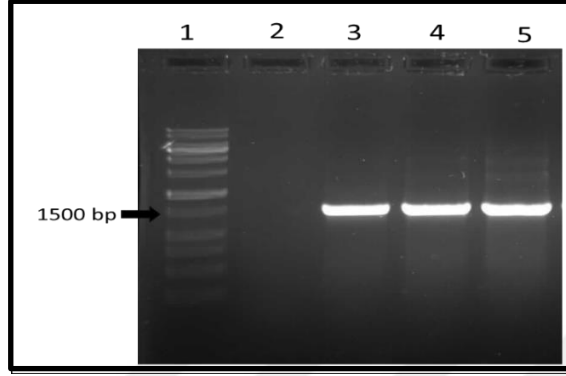
Seçilen 3 izolatın elde edilen DNA örneklerinin miktar tayini için nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Nanodrop Lite Spectrophotometer/USA) kullanıldı. Bunun için izole edilen DNA örneklerinden buz üzerinde 1'er µl örnek alınarak ölçüm yapıldı. Ölçüm sonuçları kaydedildi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Nanodrop ölçüm sonuçları.

İzolat No	118	129	131
Miktar (ng/µl)	38,1	83,3	125,5
A260/280	1,79	1,80	1,83

4.6.2. PZR İle 16 S rDNA Dizisinin Çoğaltılması ve Analizi

16 S rDNA bölgesinin tanımlanmasında kullanılan 27F/1492R evrensel primeri ile yapılan PZR sonucu Şekil 4.10'daki gibidir.



Şekil 4.10: PZR ile çoğaltılan 16 S rDNA dizisi jel fotoğrafları. 1: Marker; GeneRuler 1 kb DNA Ladder SM0314 ; 2: Negatif kontrol; 3: 118; 4: 129; 5: 131 numaralı izolatlar ait 16 S rDNA dizisi jel görüntüsü.

Üç izolatın tür bazında tanımlaması için 27F/1492R primerleri (Lane, 1991) kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltılan 16 S rDNA bölgeleri, hizmet alımı yolu ile gönderilerek, PZR ürünlerinin çift yönlü dizilemesi yaptırıldı. Çift yönlü dizileme sonuçları BioEdit programı kullanılarak birleştirildi ve elde edilen konsensüs diziler, NCBI'a kayıt edilerek erişim numaraları alındı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: İzolatların NCBI veri tabanındaki erişim numaraları ve benzetildikleri Pseudomonas türlerine benzerlik oranları (Bakınız EK 1).

İzolat Numarası	Erişim Numarası	Benzerlik yüzdeki	Benzetilen Mikroorganizma
118	MZ976854.1	%98,38 %98,25	<i>P.reidholzensis</i> <i>P. putida</i>
129	MZ976852	%99,42 % 99,28	<i>P.reidholzensis</i> <i>P. putida</i>
131	MZ976855.1	%98,44 %98,30	<i>P.reidholzensis</i> <i>P. putida</i>

Elde edilen diziler NCBI nükleotit blast programı kullanılarak veri bankası verileri ile karşılaştırıldı ve 3 izolatın da *P.putida* ve *P.reidholzensis* türlerine çeşitli yüzdelerde benzerlik gösterdiği tespit edildi. Blast analizinde 118, 129,131 numaralı

izolatlar sırası ile %98,38, %99,42 ve %98,44 oranında *P.reidholzensis*'e; %98,25, %99,28 ve %98,30 oranında ise *P.putida*'ya benzerlik göstermiştir.

4.7. Seçilen İzolatın Saksı Deneyleri ile Buğday Bitkisi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi Sonuçları

Toprak analiz sonuçları 3 örneğin analizinden gelen değerlerin ortalamaları alınarak Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Toprak analizi sonuçları.

Analiz Adı	Sınır değerler*	Sonuç	Birim
pH	6.50-7.50 (Nötr)	6,975±0,025	
EC	0,92 ms/cm (Türkiye Ort.)	1,076667±0,119	ms/cm
Toplam Tuz	0.00-0.15 (tuzsuz)	0,027333±0,001	%
Su ile Doygunluk	%30-50 (tınlı)	39,96667±1,869	%
Organik Madde	%3.0-4.0 (iyi)	3,45±0,532	%
Kireç (CaCO ₃)	%15.0-25.0 (fazla kireçli)	18,08±1,463	%
P(Fosfor)	>12 kg/da (çok yüksek)	24,46667±5,957	kg/da
K (Potasyum)	>40 kg/da (fazla)	71,9±14,689	kg/da
Azot (N)	%0-1,0 (düşük)	0,147667±0,010	%

*(sınır değerler WEB 6 (2021)'dan alınmıştır).

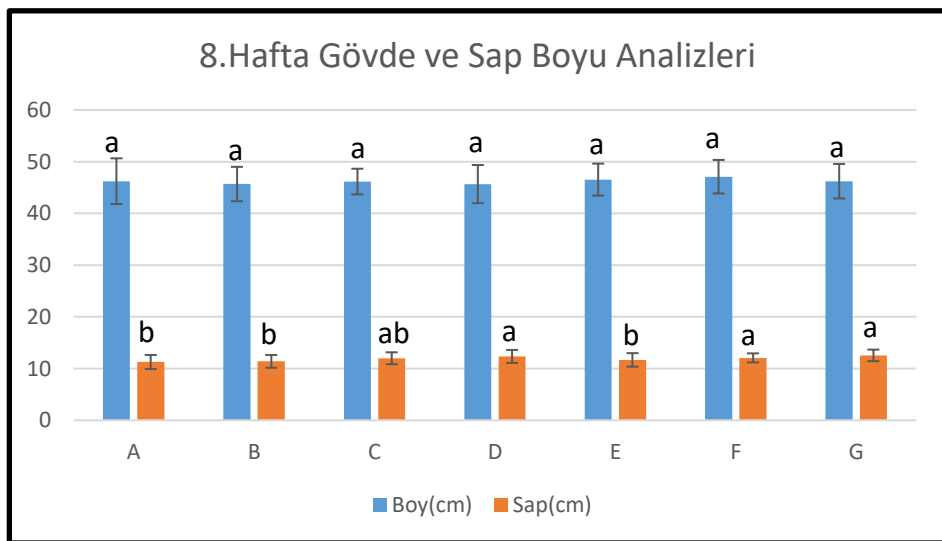
Saksı denemelerinde kullanılan toprak analiz sonuçlarına göre; pH 6,9 ile nötr, 1,07 ds/cm EC değeri ile ülkemiz için belirlenen EC sınır aralıklarında ve ortalama (0,92 ds/cm) ile uyumlu, %0,27 tuzluluk oranı ile tuzsuz, %39,96 su doyumluk oranı ile tınlı toprak, %3,45 toplam organik madde oranı ile iyi seviyede organik madde içeriğine sahip, kireç (CaCO₃) açısından %18,08 ile fazla kireçli, 24,46kg/da fosfor oranı ile çok yüksek fosfor içeriğine sahip, 71,9 kg/da potasyum (K) içeriği ile fosfat içeriği yönünden zengin ancak toplam azot oranı bakımından %0,147 ile kullanılabilir azotça fakir bir toprak olduğu görülmüştür.

Kardeşlenme dönemi öncesinde (8 haftalık) tüm bitkilere ait gövde, sap boyu ve gövde kalınlıkları cm olarak Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8: 8 haftalık buğday bitkilerine ait gövde ve sap boyları ve gövde kalınlıkları.

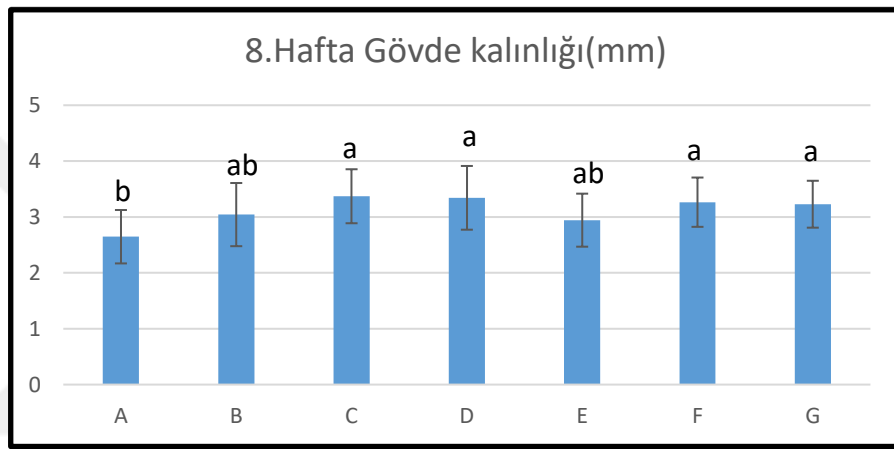
Grup	Gövde Boyu(cm)	Sap Boyu(cm)	Gövde Kalınlığı (cm)
A Kontrol 1 Steril Toprak	46,22±4,42 ^a	11,26±1,36 ^b	2,65±0,47 ^b
B Kontrol 2 (%100 DAP+%100 amonyum nitrat)	45,67±3,325 ^a	11,39±1,23 ^b	3,04±0,56 ^{ab}
C (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+ <i>P.aeruginosa</i>)	46,14±2,48 ^a	11,99±1,15 ^{ab}	3,37±0,48^a
D (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+ 129)	45,66±3,69 ^a	12,34±1,25 ^a	3,34±0,57 ^a
E Kontrol 3 (%100 DAP+%50 amonyum nitrat)	46,53±3,089 ^a	11,67±1,303 ^b	2,94±0,47 ^{ab}
F (%100 DAP+%50 amonyum nitrat+ <i>P.aeruginosa</i>)	47,09±3,239^a	12,06±0,87 ^a	3,26±0,44 ^a
G (%100 DAP+%50 amonyum nitrat+129)	46,21±3,336 ^a	12,54±1,11^a	3,23±0,42 ^a

Elde edilen veriler incelendiğinde, yapılan uygulamalar ile gövde boyları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: 8 haftalık buğday bitkilerine ait gövde ve sap boyları.

Ayrıca 8. haftada bitkilerin gövde kalınlıkları incelendiğinde, bakteri inokülasyonu yapılan grupların (kontrol bakterisi ve 129 no'lu izolat), sırası ile **C** (3,37 cm), **D** (3,34cm), **F** (3,26 cm) ve **G** (3,23 cm)'nin diğer gruplardan yüksek gövde kalınlığına sahip olduğu ve istatistiksel olarak aynı grupta yer aldığı görülmektedir. Bunları ise, çeşitli oranlarda (%100 DAP+%100 Amonyum nitrat ve %100 DAP+%50 Amonyum nitrat) gübre verilen fakat bakteri inokülasyonu yapılmayan kontrol gruplarının [sırasıyla Kontrol 3 **E** (2,94 cm) ve Konrol 2 **B** (3,04 cm)] takip ettiği ve istatistiksel olarak farklı bir grupta yer alan Kontrol 1 “steril toprak [**A** (2,65 cm)]” verilerinin (en düşük gövde kalınlığı) arasında yer almıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: 8 haftalık buğday bitkilerine ait gövde kalınlığı verileri.

Ekimden sonra 16. haftaya ait sap sayısına ilişkin veriler incelendiğinde ise kontrol grupları ile gübre ve bakteri uygulanan grupların arasında istatistiki olarak anlamlı farklar olduğu ve grupların sap sayıları bakımından (C, D ve F) diğer gruplardan ayrıştığı açıkça görülmektedir (Tablo 4.9)

Tablo 4.9: 16 haftalık bitkilerin sap ve sarı yaprak sayıları.

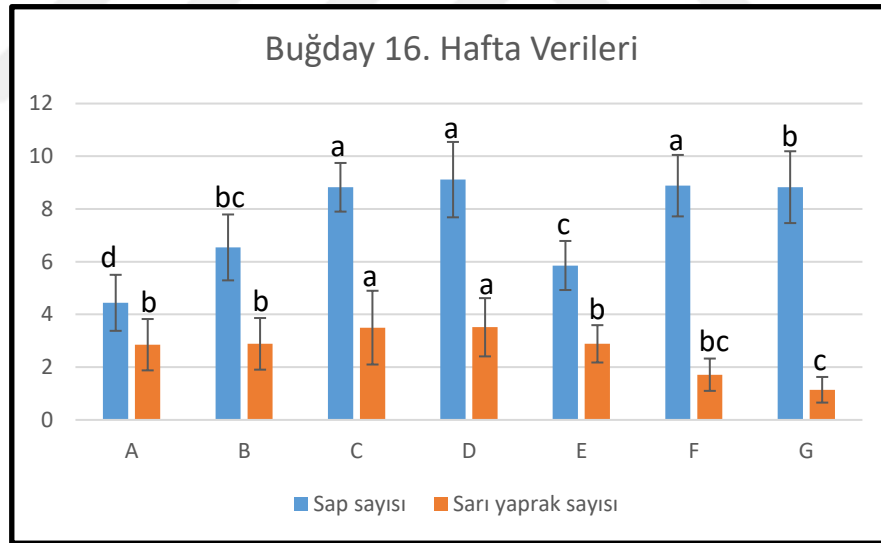
Grup*	Sap Sayısı	Sarı Yaprak Sayısı
A	4,44±1,06 ^d	2,85±0,97 ^b
B	6,54±1,25 ^{bc}	2,89±0,97 ^b
C	8,82±0,92^a	3,5±1,4 ^a
D	9,11±1,43^a	3,5±1,11 ^a
E	5,86±0,93 ^c	2,89±0,71 ^b
F	8,89±1,65^a	1,71±0,61 ^{bc}
G	8,82±1,36 ^b	1,14±0,49 ^c

*:Grupların içeriklerine ilişkin detaylar için BKZ. Tablo 4.6

Buna göre, *P.aeruginosa* ile inoküle edilen gruplar [C (%100 DAP+%100 Amonyum nitrat-8,82 adet) ve F (%100 DAP+%50 Amonyum nitrat-8,89 adet)] ile %100 DAP ve %100 amonyum nitrata ilave olarak 129 no'lu izolat ile inoküle edilmiş grup D (9,11 adet)'nin en fazla sap sayısı ortalaması ile istatistiki olarak aynı grubun içinde yer almışlardır.

Burada dikkat çeken ayrıntı 129 no'lu izolatin %100 amonyum ilavesi yapılmış saksılarda sap sayısını kontrol bakterisine görece pozitif etkilediğidir. %50 amonyum ilavesi yapılmış saksılarda ise söz konusu izolatin kontrol bakterisinin %100 amonyum nitrat katkısı ile aynı etkiyi göstermiş olmasıdır.

Yine 129 no'lu izolat ile inoküle edilmiş G grubu (%100 DAP+%50 amonyum nitrat) 8,82 adet sap ortalaması ile bunları takip etmiştir. 6,54 adet sap sayısı ortalaması ile %100 DAP+%100 amonyum nitrat katkısı verilen B grubu (Kontrol 2), 5,86 adet sap sayısı ortalaması ile %100 DAP+%50 amonyum nitrat verilen E grubu (Kontrol 3) ve en az sap sayısı ortalaması (4,44 adet) A grubu (Kontrol 1) sıralanmıştır. Kontrol 1 beklendiği gibi istatistiki olarak en çok ayrışan grubu oluşturmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: 16 Haftalık bitkilerin sap ve sarı yaprak sayıları.

16. hafta sonunda bitkilerin yapraklarında azot eksikliğinin bir göstergesi olarak sararmalar gözlemlenmiş olmakla birlikte en fazla sarı yaprak 3,5 adet ortalamayla C ve D gruplarında gözlenmiştir. En az sarı yaprak ise 1,14 adet ortalamayla G grubunda sayılmıştır. Bunları F grubu 1,71 adet ile takip etmiştir (Tablo 4.9) (Şekil 4.13).

Saksı denemesinin tüm grupları 16 hafta sonunda fotoğrafları çekilerek görselleştirilmiştir (Şekil 4.14).



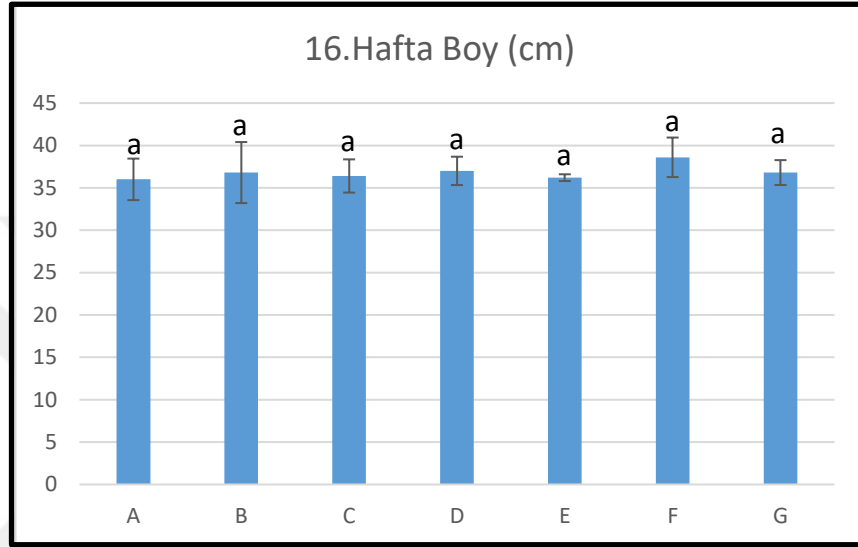
Şekil 4.14: 16 haftalık buğday bitkileri (Bitkilerin toprak üstü boyları görsellerde daha iyi ayırt edilmeleri için ortalamalarına göre bir çizgi çizilerek fotoğraflara yansıtılmıştır).

Saksı seviyesinin üstünde kalan bitki boyları ölçülerek ortalamaları Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10: 16.haftada buğday bitkilerinin boy uzunluğu verileri.

Grup	A	B	C	D	E	F	G
Boy	36±2,45 ^a	36,8±3,6 ^a	36,4±1,96 ^a	37±1,67 ^a	36,2±0,4 ^a	38,6±2,33 ^a	36,8±1,47 ^a

16 haftalık sonuçlara göre bitki boyu açısından henüz istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadığı görülmüştür (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: 16 haftalık buğday bitkilerinin boy uzunlukları.

Yine de uzunluk açısından bakıldığında 129 no'lu izolatın kontrol bakterisi *P. aeruginosa* inoküle edilmiş saksılara görece %100 amonyum nitrat verilen saksılarda (sırasıyla 37,1 cm ve 36,4 cm) daha başarılı bir ortalamaya sahip olduğu görülmektedir.

5.TARTIŞMA

Gıda kıtlığı ve çevre kirliliği geleceğimizi tehdit eden en büyük sorunlardandır. Tarımda verimin arttırılması gıda kıtlığı sorununa çözümde çok kritik olmakla beraber, bu amaca hizmet etmesi amacıyla kullanılan kimyasal gübreler, üretim süreçlerinde kullanılan fosil yakıtlar nedeniyle hava kirliliğine; aşırı kullanımları sonucu su kaynaklarında kirliliklere neden olmaktadır. Ayrıca bilinçsiz kullanıldıklarında tarım arazilerinde, toprağın asitleşmesine neden olarak verimsizleşmesi ile sonuçlanmaktadır [Önal, 2009].

Günümüzde popülerliği ve kullanımı giderek artan mikrobiyolojik gübreler, kimyasal gübrelerin neden olduğu olumsuzluklara karşı iyi bir alternatif niteliğindedir. Üretim süreçlerinde ve kullanımları sonucunda çevre kirliliğine neden olmazlar aynı zamanda tarımda istenen sürdürülebilirliğin sağlanmasında, kullanımları stratejik bir öneme sahiptir. Mikrobiyolojik gübreleri oluşturan bitki ile karşılıklı yarara dayanan bir ilişki içerisindeki PGPR'ler doğada var olan ve çoğu bilinen türlerdir. Mikrobiyolojik gübrelerin tarımda kullanılması ile doğada var olan bitkiye yararlı mikroorganizmaların ortamda artışı sağlanmış olmaktadır [Yayla ve Şenol, 2020].

Bitkiye birçok mekanizma yolu ile fayda sağlayan PGPR'ların izolasyonunun ve karakterizasyonun yapıldığı birçok çalışma [Kumar et al., 2014; Alemneh, 2021; Friedrich et al., 2021; Lihan et al., 2021; Alungal et al., 2021] literatürde yer almaktadır.

PGPR bakteriler arasından birçok *Pseudomonas* suşu, bitki büyümesini teşvik etme ve biyokontrol mekanizmalarının yanı sıra rizosferde kolonileşme ve gelişme yetenekleri ile de büyük ilgi görmektedir. Bu nedenle özellikle PGPR *Pseudomonas*'ların araştırıldığı pek çok çalışmaya literatürde rastlanabilmektedir [Islam et al., 2014; Davit et al., 2018; Meliani and Bensoltane, 2018; Panpatte et al., 2016; Goswami et al., 2015].

Tez çalışması kapsamında tarım arazilerinden izole edilen 134 adet *Pseudomonas* sp. izolatu bitkiye yarar sağlamaları yönünden araştırılmıştır. Öncelikle 134 izolatin azot fiksasyonun yapma kabiliyetine sahip olanları azot içermeyen bir besiyeri olan NFb besiyeri kullanılarak tespit edilmiştir. NFb besiyerinin içermiş olduğu brom timol mavisi boyasının pH'ın bazikleştiği durumlarda maviye dönmesi ile azot fiksasyonu olayında pH'ın bazikleşmesi durumu bağdaşmaktadır. NFb

besiyeri üzerinde oluşan mavi zon çaplarının karşılaştırılması ile oluşturulan Tablo 4.1'deki sonuçlarda 49 izolatın azot fikse etme kabiliyetine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca tüm izolatlar içerisinde en güçlü zon oluşturan izolatın 129 numaralı izolat olduğu görülmüştür (Şekil 4.1). *Pseudomonas* spp, simbiyotik olmayan azot fikse eden bakteriler arasında yer aldığı (Palleroni, 2015) bilinmekte olup 134 bakteriden 49'unun azot fiksasyon yeteneğini göstermesi ilgili Genusun her üyesinin bu özelliğe sahip olamayabileceğinin iyi bir göstergesidir [Li et al., 2017].

Schwyn and Neiland (1987)'in önerdiği şekilde gerçekleştirilen siderofor üretimi testinde Cas-blue agar kullanılmıştır. Bu besiyerinde tek demir kaynağı, besiyerine rengini veren mavi boya ile bağ oluşturduğundan siderofor üretebilen bakterilerin bu demiri şelatlaması sonucu besiyeri rengi mavi-yeşil'den turuncuya dönmektedir (Şekil 4.2). 134 izolattan 123 tanesinin siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Siderofor üretme yeteneği Gram negatif bakterilerde sıkça rastlanan bir özellik olduğundan, izolatlarımızın bu yöndeki özellikleri literatürle uyumlu olarak ortaya konmuştur [Faraldo-Gómez and Sansom, 2003].

Tez çalışmasının asıl konusu azot fiksasyonu olması nedeniyle daha sonraki deneyler azot fikse eden izolatlardan, belirlenen kriterlere sahip olanların seçilmesi ile devam etmiştir.

Bir başka PGPR özelliği olan IAA üretimi yeteneğine sahip olan izolatlar Gordon ve Weber (1951)'e göre spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Azot fikse eden 49 izolattan 46 tanesi bu yeteneğe sahip olmakla beraber 9 tanesi kontrol olarak kullanılan *P.aeruginosa*'dan daha yüksek IAA üretimi göstermiştir. Bu deney sonrasında; azot fiksasyonu, IAA üretimi ve siderofor üretimi yeteneklerine sahip olan 120, 126, 129 ve 134; azot fiksasyonu ve IAA üretimi yeteneğine sahip olan 118; azot fiksasyonu ve siderofor üretimi yapabilen 131 numaralı izolatlar seçilmiş olup sonraki çalışmalara bu izolatlar ile devam edilmiştir.

Bitki için azotun en önemli makro besin elementi olması nedeniyle seçilen izolatların amonyum üretimi özelliklerine de bakılmıştır. Cappuccino and Sherman (1992)'ın önerdiği şekilde gerçekleştirilen spektrofotometrik analiz sonucunda tüm izolatların bu yeteneği gösterdiği ve 118, 129 ve 131 numaralı izolatların en iyi üç izolat olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.5).

Seçilen 3 izolatın da 16S rDNA dizilerinin NCBI verileri ile karşılaştırılması sonucu, *Pseudomonas reidholzensis* ve *Pseudomonas putida*'ya (%99, 42-%98,25

değişen oranlarda, BKZ, Tablo 4.6) benzerlik gösterdiği görülmüştür. Seçilen isolatlar birbirlerine görece yakın bölgelerden izole edilmiştir. 3 izolatin da aynı türlere (*Pseudomonas reidholzensis* veya *Pseudomonas putida*) yakın benzerlik oranlarında benzerlik göstermelerine rağmen, içlerinden birinin (129) azot fiksasyonu ile diğerlerinden ayrışması alt tür olabilecekleri görüşünü öne çıkarmaktadır. Bu aşamada söz konusu iki türün farklı testlerle ayrımının ortaya konması gerekliliği vardır [Garrity et al., 2015].

Azot fiksasyonu nitrogenaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzimin varlığı bakterinin azot fikse etme yeteneğine sahip olduğunu, enzimin aktivitesinin derecesi ise bu yeteneğini ne kadar güçlü gerçekleştirdiğini göstermektedir. Nitrogenaz enziminin, asetilen gazını etilene indirgemesi özelliğini temel alan asetilen indirgeme testi (ARA), nitrogenaz enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Gothwall et al. (2008), önerdiği şekilde gerçekleştirilen deneyde elde edilen GC pikleri yorumlandığında seçilen 3 izolatin da asetilen gazının miktarında azalma sağladığı ve 129 numaralı izolatin ortama verilen asetilen gazının %92'sini indirgediği görülmüştür. Azot fiksasyonu yönünden kantitatif ve kalitatif olarak gerek Petri denemeleri, gerek NH_4 üretimi ve gerekse GC analiz sonuçlarına göre net bir şekilde azotu fikse edebildiği gösterilen 129 no'lu izolat diğer *Pseudomonas* isolatları arasından öne çıkmıştır. Bu sonuç ile 129 numaralı izolatin NFB agar üzerinde oluşturduğu güçlü zon doğrulanmış bu izolatin güçlü derecede azot fiksasyonu yeteneğine sahip olduğu kantitatif olarak da gösterilmiştir (BKZ Şekil 4.9).

Azot fiksasyonu nitrogenaz enzim aktivitesi ile gösteren literatürde pek çok yayın mevcuttur. [Gothwall et al., 2008; Mirza et al., 2006; Li et al., 2016; Vermeiren et al., 1999]. Ayrıca Majeed et al.(2018), tarafından gerçekleştirilen çalışma kapsamında ayçiçeğinden izole edilen *Pseudomonas* sp. izolatinın PGPR özellikleri araştırılmış, izolatin asetilen indirgeme deneyi (ARA) ile $44.28 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$ nitrogenaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiş, ayrıca izolatin indol-3-asetik asit ürettiği ve fosfat çözdüğü belirlenmiştir. İlgili izolatin kimyasal (NP) gübrelerin azaltılmış (%100 ve %50 oranlarında) uygulamasıyla ayçiçeği mahsul verimini artırmak için biyogübre üretimi adına potansiyel bir aday olabileceği ileri sürülmüştür. *Pseudomonas* sp. izolatu ile aşılamanın azaltılmış (yarım) dozda azot ve fosforlu gübre ile birlikte gerçekleştirildiğinde, ayçiçeğinin bitki büyümesini, verimini ve besin alımını önemli ölçüde uyardığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Vimal et al. (2018),

tarafından izole edilen *Pseudomonas* spp. türlerine ait azot fiksasyonu, fosfat çözünürlüğü, amonyak, indol asetik asit ve hidrojen siyanür üretim aktiviteleri belirlenerek buğday bitkisinde mikrobiyal gübre olarak steril toprak içeren saksılarda denenmiştir. Deneme deseni gübre verilmeyen kontrol grubu, sadece çiftlik gübresi verilen 2. kontrol grubu ve çiftlik gübresine ek olarak izolatın verildiği deneme grubu olarak oluşturulmuş olup, ekimden sonraki 29.günde *Pseudomonas* sp. izolatı ile inokülasyonun; bitki boyu, kök boyu, taze ağırlık ve kuru ağırlıkta artış sağladığı bildirilmiştir.

Tüm sonuçlar göz önüne alındığında iyi derecede azot fikse ettiği yapılan deneylerle tespit edilen 129 numaralı izolat saksı denemesinde buğday bitkisi ile bir araya getirilmek üzere seçilmiştir.

Toprak analiz sonuçlarına göre (Tablo 4.7) deneme toprağı; nötr, ülkemiz için belirlenen EC sınır aralıklarında (0,92 ds/cm) ile uyumlu, tuzsuz, tınlı, iyi seviyede organik madde içeriğine sahip, fazla kireçli, çok yüksek fosfor içeriğine sahip, toplam azot oranı bakımından azotça fakir bir toprak olduğu görülmüştür. Bu özellikleri bakımından toprağın iç dinamikleri göz önünde bulundurulduğunda, toplam organik madde azotun sürekli yıkanarak topraktan hızla uzaklaştırılmasını engelleyen bir kaynak olarak önemlidir. Bu açıdan topraktaki azotun en iyi kaynağı yani stoklanmış halidir. Organik maddedeki bağlı azotlu bileşiklerden bitki doğrudan yararlanamasa da aracı mikroorganizmalar vasıtasıyla suda çözünebilir amonyum ve nitratlara dönüştürülerek kullanılabilir hale getirilir [Web 6, 2021]

Bu da tez çalışması kapsamında kurgulanan saksı denemeleri, tez ile ulaşılmak istenen hedefleri açıklamak için doğru bir yaklaşım olmuştur. Özellikle, organik maddece zengin olan deneme toprağının steril edilerek mikroorganizmalardan arı hale getirilmesi kontrol bakterisi (*P.aeruginosa*) ve seçilmiş azotu fikse edebilen 129 no'lu izolatın bitki üzerinde verim analizlerinin ortaya konmasında önemli bir yaklaşım olmuştur. Böylece uygulanan mikroorganizmalar mevcut organik içeriği ve aşağıda tarif edildiği şekilde uygulanan farklı konsantrasyonlardaki azotlu gübreleri kullanma konusunda yardımcı olmaları göz önünde bulundurulmuştur. Organik maddeler toprağa stabil bir yapı kazandırdığından bitki besin maddelerinin çözünürlüğünü iyi yönde etkileyerek bitki tarafından kullanımını kolaylaştırır. Ayrıca nötr toprak pH'sına sahip topraklar havadaki serbest azotu yüksek derecede fikse edebilen mikroorganizmalar için oldukça elverişlidir. Yani toprakta serbest ve simbiyotik yaşayan bakteriler genelde nötr topraklarda daha etkilidirler [Web 7, 2021]. Tez

kapsamında denemelerde kullanılan toprağı pH'sının nötr değerlerde olması da mikroorganizma denemeleri için ideal olduğuna işaret etmektedir.

Ayrıca CaCO_3 açısından kireçli bir toprak olmasına rağmen nötr pH'ya sahip bir toprak olması nedeniyle kirecin bitkilerin kullanabileceğı çözünür hale dönüştürülmeleri güç görünmektedir. Üstelik bu denge toprağın bazikleşmesi yönünden redoks dengelerini değiştireceğı düşünüldüğünde, bu çok ta istenilen bir durum olmayacaktır. Toprağın bazikleşmesi bitkinin su ve Fe alımını tersine değiştireceğinden çok ta istenilen bir sonuç değildir. Bu nedenle DAP ve Amonyum nitrat gübresi ile saksılarımızın desteklenmesi uygun görünmektedir. Böylece toprağın dinamikleri bozulmadan mikroorganizmalar aracılığı ile verilen kimyasal gübrelerin (amonyum nitrat açısından %100 ve %50'lik reçetelerde) kullanımının ve verime yansıtılmasının sonuçları 16. Haftadan itibaren belirgin şekilde olumlu olarak seyretmeye başlamıştır (BKZ Şekil 4.13) .

Buna göre 8 haftalık ve 16 haftalık verim analizleri gözlemlendiğinde; Ekimden sonraki 8. haftada bitkilerin tüm gövdeleri toprak üstünden yaprak ucuna kadar (gövde boyu) ve sadece sap boyları ölçülmüştür. Gövde boyları arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark gözlenmemiş olup sap boylarına bakıldığında kontrol bakterisi ve 129 no'lu izolatın uygulandığı sırasıyla C (%100 DAP, %100 amonyum nitrat), D (%100 DAP,%100 amonyum nitrat), F (%100 DAP, %50 amonyum nitrat), ve G (%100 DAP,%100 amonyum nitrat) gruplarının diğer gruplara görece daha uzun sapa sahip olduğu görülmüştür. Gübre verilmeyen steril toprak içeren A grubu ile B (%100 DAP+%100 amonyum nitrat) ve E (%100 DAP+%50 amonyum nitrat) grupları arasında 8. haftadaki boy ve sap boyu ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken bakteri uygulamasının sap boyunda artış sağlaması 8. haftaya kadar bitkinin toprakta var olan azotu (BKZ Tablo 4.7) kullanarak boy gelişimini desteklediğine, fakat bakteri inokülasyonunun da azottan bağımsız olarak bitkide sap boyunu arttırdığına işaret etmektedir.

Ayrıca 8. Haftada bitkilerin gövde kalınlıklarına bakıldığında ise A grubunun en az gövde kalınlığı gösterdiği görülmüş, gübre verilen fakat bakteri inokülasyonu yapılmayan B (%100 DAP+%100 amonyum nitrat) ve E (%100 DAP+%50 amonyum nitrat) grupları arasında istatistiksel olarak bir fark oluşmamıştır. Bakteri inokülasyonu yapılan tüm gruplarda ise (C, D, F ve G) kendi içlerinde istatistiksel olarak fark göstermemiş ancak B (%100 DAP+%100 amonyum nitrat) ve E (%100 DAP+%50) kontrol (sırasıyla Kontrol 1 ve 2) gruplarından daha kalın gövde oluşumu

sağlamışlardır. Bu durum 8. haftada gübre uygulamasının gövde kalınlığında fark oluşturmaya başladığını ve bakteri uygulamasının da kimyasal gübrelerle ek olarak gövde kalınlığında artışı desteklediğini göstermektedir.

16. haftaya gelindiğinde ise sonuçların verilen gübre oranları ile ilişkili olduğu %100 DAP+%100 amonyum nitrat uygulanan C (+*P.aeruginosa*) ve D (+129 no'lu izolat) ile %100 DAP+%50 amonyum nitrat uygulanan F (+*P.aeruginosa*) gruplarının en fazla sap sayısına sahip olduğu görülmüştür. Bunları 129 numaralı izolatın verildiği %50 amonyum nitrat içeren grup G takip etmiştir (Şekil 4.13). Ayrıca %50 amonyum nitrat verilmiş bakteri izolatını içeren grubun (G), %100 amonyum nitrat verilen kontrol grubuna (B) kıyasla bitkide daha fazla sap oluşumunu sağlaması gelişimin ileriki dönemlerinde bu saplarda oluşacak başaklara ve dolayısıyla da olası verim artışına işaret etmektedir. Bu bağlamda, yüksek gübre maliyetleri düşünüldüğünde %50'lik amonyum nitrat azalışı önemli bir finansal tasarrufa işaret etmektedir. Bu yönüyle elde edilen ilk sonuçlar dikkate değerdir.

16. haftada görülen sarı yapraklar en fazla C (%100 DAP+%100 amonyum nitrat+*P.aeruginosa*) ve D (%100 DAP+%100 Amonyum nitrat+129) gruplarında görülmekle birlikte en az F (%100 DAP+%50 amonyum nitrat+*P.aeruginosa*) ve G (%100 DAP+%50 amonyum nitrat+129) gruplarında görülmüştür. F ve G gruplarında sarı yaprak sayısındaki azalma, kimyasal gübre oranının azaltılması ile birlikte bakteri inokülasyonunun bitkide daha az sarı yaprak oluşumuna destek verdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Literatürde PGPR *Pseudomonas*lar ile yapılan çalışmalara bakıldığında Mirza et al. (2006), tarafından yumak otundan (Kallar Grass) izole edilen *Pseudomonas* sp. izolatının iki farklı pirinç çeşidine aşılandığında biyokütlesinde ve/veya tane veriminde artış kaydedildiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada, Watanabe and Lin (1984) tarafından azot fikse eden *Pseudomonas* sp. ve *Azospirillum lipoferum* pirinçten izole edilmiş ve aynı çeşit pirinç fidesine inoküle edilmiş olup çalışma sonunda inokülasyonun pirincin erken kardeşlenmesini sağladığı, ayrıca hasatta dane dolum oranını ve bitki başına dane ağırlığını arttırdığı rapor edilmiştir.

Buğday bitkisi üzerinde *Bacillus* sp. ve *Pseudomonas* sp. izolatlarının etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, inokülasyonun buğday bitkisinin bitki boyunda, kök uzunluğunda, taze ağırlığında ve kuru ağırlığında artış sağladığı bildirilmiştir [Vimal et al., 2018].

Mishra et al., tarafından 2012 yılında gerçekleştirilen çalışmada ise *Pseudomonas* sp izolatu bezelye fidesine *Rhizobium leguminosarum* ile birlikte inoküle edilmiş ve bakteri inokülasyonunun bitki büyümesine pozitif etki sağladığı yönünde sonuçlar paylaşılmıştır.

Tüm veriler göz önünde bulundurulduğunda tez kapsamında 8. ve 16. haftada elde edilen ilk veriler, 129 numaralı izolatu buğday bitkisinin büyümesinde yukarıda atıflanan yayınlarla uyumlu olarak olumlu etkilerinin var olduğuna işaret etmektedir.

Gelecek Öngörüler ve Sonuçların Değerlendirilmesi:

134 izolat içerisinde seçilerek, 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanarak PGPR özellikleri açısından bireysel özellikleri ortaya konmuş olan 129 no'lu izolat %99,42 *P. reidholzensis*'e ve % 99,28 *P. putida*'ya benzetilmiştir. İlgili izolatu verim analizleri yönünden nihai sonuçlarını tartışmak için buğday bitkisinin hasadını beklemek gerektiği açıktır. Ancak, tezin savunulması sürecine denemelerin bu bölümü yetiştirilememiştir. Tezin yayına dönüştürülmesi sürecinde ilgili verilerin elde edilerek literatüre kazandırılması planlanmıştır.

NCBI verilerine göre *P. reidholzensis* ve *P. putida*'ya yakın oranlarda benzetilen gerek 118, gerek 129 ve gerekse 131 no'lu 3 izolatu da de bu iki türe yakın benzerlik oranlarına (%99,42-%98,25) sahip oldukları görülmektedir. Bu durumda her iki izolata dair ayırt edici, farklı moleküler teknikler kullanarak ileri seviyede tanımlama süreçlerinin tamamlanması da gerekmektedir. Buna göre *rpoD* gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan 70F (ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGN GARATGGGNACNGT), 70R (ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNA CCATYTCYTTYTT) ve 70Fs (ACGACTGACCCGGTACGCATGTA) primerleri [Vaz-Moreira et al., 2012; Yamamoto et al.,2000] ile ileri tanımlama testleri devam etmektedir. Tezin yayınlanması sürecinde bu testlerin tamamlanarak izolatların nihai tanımlanması planlanmıştır.

Gelinen süreçte tez çalışması, konu ile ilgili araştırmacılara ve literatüre yüksek nitelikli PGPR bakterilerin tarımda artan önemine dair olumlu veriler sunmaktadır. Artan gıda talebine yüksek verim ile yanıt verilebilmesi gerektiği açıktır. Bunun için toprağın kimyasının ve iç dinamiklerini koruyacak organik temelli yeni yaklaşımlara ihtiyacımız vardır. Bunların başında kimyasal gübre kullanımını azaltmaya yönelik uygulamalar gelmektedir. Bu bağlamda tezin bir sonraki basamağını, giderek azalan oranlarda kimyasal gübre takviyeleri ile birden fazla ve beraber yaşayabilen

mikroorganizma topluluklarının kullanımının kurgulandığı, yeni denemelerin kurulması olacaktır.



KAYNAKLAR

- Ahemad M., Khan M. S., (2012), "Productivity Of Greengram İn Tebuconazole-Stressed Soil, By Using A Tolerant And Plant Growth-Promoting Bradyrhizobium Sp. Mrm6 Strain." *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1), 245-254.
- Ahemad M., Kibret M., (2014), "Mechanisms And Applications Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Current Perspective", *Journal Of King Saud University-Science*, 26(1), 1-20.
- Alemneh A. A., (2021), "Enhancing The Chickpea-Mesorhizobium Symbiosis Using Beneficial Rhizobacteria" Doktora Tezi, School of Agriculture, Food and Wine.
- Altın N., Bora T., (2005), ".Bitki Gelişimini Uyaran Kök Bakterilerinin Genel Özellikleri ve Etkileri", *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 15(2), 87-103.
- Alungal R. B., Girija D., Gopal K. S., Vijayaraghavan R., Nairindirabai B. V., (2021), "Plant Growth Promoting Actinobacteria From Rhizosphere Soils Of Black Pepper İn Wayanad", *Computational Biology and Bioinformatics*, 9(2), 31.
- Ansari F. A., Jabeen M., Ahmad I., (2021), "Pseudomonas Azotoformans Fap5, A Novel Biofilm-Forming Pgpr Strain, Alleviates Drought Stress in Wheat Plant", *International Journal Of Environmental Science And Technology*, 1-16.
- Asaka O., Shode M., (1996), "Applied Env. Microbiology", 62, 4081-4085.
- Aslan S., (1999), "Dünyada Ne Kadar Mikrop Var", *Bilim Ve Teknik*, Sf, 90.
- Atılğan A., Coşkan A., Saltuk B., Erkan M., (2007), "Antalya Yöresindeki Seralarda Kimyasal Ve Organik Gübre Kullanım Düzeyleri Ve Olası Çevre Etkileri", *Ekoloji*, 15(62), 37-47.
- Backer R., Rokem J. S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Smith D. L., (2018), "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms Of Action, And Roadmap To Commercialization Of Biostimulants For Sustainable Agriculture", *Frontiers in Plant Science*, 9, 1473.
- Bakker A. W., Schippers B. O. B., (1987), "Microbial Cyanide Production İn The Rhizosphere İn Relation To Potato Yield Reduction And Pseudomonas Spp-Mediated Plant Growth-Stimulation", *Soil Biology and Biochemistry*, 19(4), 451-457.
- Baliah N. T., Sheeba P. C., Mallika S., (2018), "Encouraging Effect Of Gibberellic Acid On The Growth And Biochemical Characters Of Green Gram (Vigna Radiata L.)", *Journal Of Global Biosciences*, 7(8), 5522-5529.

Bashan Y., Holguin, G., (1997), “Azospirillum–Plant Relationships: Environmental And Physiological Advances (1990–1996)”, Canadian Journal Of Microbiology, 43(2), 103-121.

Benlioğlu B., Şahin N. K., Birsin M. A., (2020), “Makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) çeşitlerinin doku kültürü parametrelerine tepkisi”, Mediterranean Agricultural Sciences, 33(1), 123-128.

Bloemberg G.V., Wijfjes A. H. M., Lamers G. E. M., Stuurman N., Lugtenberg, B. J. J., (2000), “Simultaneous Imaging Of *Pseudomonas Fluorescens* Wcs 3655 Populations Expressing Three Different Autofluorescent Proteins In The Rhizosphere: New Perspective For Studying Microbial Communities”, Mol. Plant Mic. Int., 13:1170-1176.

Bolat İ., Ömer K. A. R. A., (2017), “Bitki Besin Elementleri: Kaynakları, İşlevleri, Eksik Ve Fazlalıkları”, Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 19(1), 218-228.

Bond J., Liefert O., (2017), “Wheat Outlook”, Usda Economic Research Service, Whs-17b, 1-28.

Borrelli G.M., Deleonardis A.M., Fares C., Platani C., Difonzo N., (2003), “Effects Of Modified Processing Conditions On Oxidative Properties Of Semolina Dough And Pasta”, Cereal Chemistry, 80, 225-231

Bozkurt M., (2012), “Türkiye dünya durum buğdayı üretiminde üçüncü”, Ekmek, Bisküvi ve Makarna Sektörü İhtisas Dergisi, 1, 74-75.

Burdman S., Jurkevitch E., Okon Y., (2000), “Recent Advances In The Use Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgpr) In Agriculture”, Microbial Interactions In Agriculture And Forestry (Volume I), 229-250.

Cappuccino J. G., Sherman N., (1992), “Biochemical Activities Of Microorganisms. Microbiology, A Laboratory Manual”, The Benjamin/Cummings Publishing Co. California, Usa, 188-247.

Carvalhais L. C., Dennis P. G., Badri D. V., Kidd B. N., Vivanco J. M., Schenk P. M., (2015), “Linking Jasmonic Acid Signaling, Root Exudates, and Rhizosphere Microbiomes”, Molecular Plant Microbe Interactions, 28(9), 1049-1058.

Ceritoglu M., Erman, M., (2019, March), “Organik Tarımda Mikrobiyolojik Gübre Kullanımının Önemi”, 6. In International Congress On Mathematics, Engineering, Natural And Medical Sciences (Pp. 8-10).

Çakmakçı R., (2005),” Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakterilerin Tarımda Kullanımı”, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 36(1), 97-107.

Çakmakçı R., Oral E., (2002), “Root Yield And Quality Of Sugarbeet In Relation to Sowing Date, Plant Population and Harvesting Date Interactions”, Turkish Journal Of Agriculture And Forestry, 26(3), 133-139.

Dakora F. D., Phillips D. A., (2002), "Root Exudates As Mediators Of Mineral Acquisition İn Low-Nutrient Environments", Food Security İn Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities, 201-213.

Daroub H. S., Snyder G. H., (2012), "Mineral Nutrition And Plant Disease", Aps Press, Minnesota, Pp.278.

David B. V., Chandrasehar G., Selvam P. N., (2018), "Pseudomonas Fluorescens: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (Pgpr) With Potential Role İn Biocontrol Of Pests Of Crops", In Crop Improvement Through Microbial Biotechnology (Pp. 221-243). Elsevier.

Deligianni E., Pattison S., Berrar D., Ternan N. G., Haylock R. W., Moore J. E., Dooley J. S., (2010), "*Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates Of Similar Rapt Genotype Exhibit Diversity İn Biofilm Forming Ability İn Vitro", Bmc. Microbiology, 10(1), 1-13.

Dirik K. Ö., Sakin M. A., (2018), "Kışlık ve yazlık olarak yetiştirilen bazı makarnalık buğday (*Triticum durum* L.) çeşit ve hatlarının bazı kalite özelliklerinin karşılaştırılması", Gaziosmanpaşa Üni, Ziraat Fak. Der., 35(2), 119-126.

Dixon R., Kahn D., (2004), "Genetic Regulation Of Biological Nitrogen Fixation". Nature Reviews Microbiology, 2(8), 621-631.

Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Okon Y., (2001), "Responses Of Agronomically Important Crops To İnoculation With Azospirillum", Functional Plant Biology, 28(9), 871-879.

Dobert R. C., Breil B. T., Triplett E. W., (1994), "DNA sequence of the common nodulation genes of Bradyrhizobium elkanii and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria", Molecular plant-microbe interactions: MPMI., 7(5), 564-572.

Döbereiner J., Baldani V. L. D., Olivares F. Reis V. M., (1993), "Endophytic Diazotrophs: The Key To Bnf İn Gramineous Plants", Eds. Na Hegazi, M Fayez Y Monib M. Pp: 395-408. Soy. Univ.

Einsle O., Tezcan F. A., Andrade S. L., Schmid B., Yoshida M., Howard J. B., Rees D. C., (2002), "Nitrogenase Mofe-Protein At 1.16 Å Resolution: A Central Ligand İn The Femo-Cofactor", Science, 297(5587), 1696-1700.

Eraslan F., İnal A., Güneş A., Erdal İ., Coşkan A., (2010), "Türkiye'de Kimyasal Gübre Üretim ve Tüketim Durumu, Sorunlar, Çözüm Önerileri ve Yenilikler", Tmmob Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği Vii. Teknik Kongresi, 11, 15.

FAO (2017) Plant production statistics, Food and Agriculture Organization.

Faraldo-Gómez J. D., Sansom M. S., (2003)., "Acquisition Of Siderophores İn Gram-Negative Bacteria", Nature Reviews Molecular Cell Biology, 4(2), 105-116.

Ferreira M. C. B., Fernandes M. S., Döberner J., (1987), "Role Of Azospirillum Brasilense Nitrate Reductase In Nitrate Assimilation By Wheat Plants", Biol. And Ferti. Of Soils, 4: 47-53.

Fresco L. O., (2004), "Fertilizer and The Future", Fao Agriculture Department, Rome.

Friedrich I., Bodenberger B., Neubauer H., Hertel R., Daniel R., (2021), "Down In The Pond: Isolation And Characterization Of A New Serratia Marcescens Strain (Lv3) From The Surface Water Near Frog's Lettuce (Groenlandia Densa)", Plos One, 16(11), E0259673.

Frommel M. I., Nowak J., Lazarovits G., (1993), "Treatment Of Potato Tubers With A Growth Promoting Pseudomonas Sp.: Plant Growth Responses and Bacterium Distribution in The Rhizosphere", Plant and Soil, 150(1), 51-60.

Geçit H. H., (2006), "Makarnalık buğdayda (Triticum durum L.) sulama ve azotlu gübrelemenin verim ve verim öğeleri üzerine etkisi", Journal of Agricultural Sciences, 12(03).

Glick B. R., (1995), "The Enhancement Of Plant Growth By Free-Living Bacteria. Canadian Journal Of Microbiology", 41(2), 109-117.

Gomila M., Peña, A., Mulet, M. M., Lalucat, J., And García-Valdés, E., (2015), "Phylogenomics and Systematics in Pseudomonas", Front. Microbiol. 6:214.

Gordon S. A., Weber R. P., (1951), "Colorimetric Estimation Of Indoleacetic Acid", Plant Physiology, 26(1), 192.

Goswami D., Patel K., Parmar S., Vaghela H., Muley N., Dhandhukia P., Thakker J. N., (2015), "Elucidating Multifaceted Urease Producing Marine Pseudomonas Aeruginosa Bg As A Cogent Pgpr And Bio-Control Agent", Plant Growth Regulation, 75(1), 253-263.

Gothwal R. K., Nigam V. K., Mohan M. K., Sasmal D., Ghosh, P., (2008), "Screening Of Nitrogen Fixers From Rhizospheric Bacterial Isolates Associated With Important Desert Plants", Applied Ecology and Environmental Research, 6(2), 101-109.

Güleç T. E., Sönmezoğlu Ö. A., Yıldırım A., (2010), "Makarnalık Buğdaylarda Kalite ve Kaliteyi Etkileyen Faktörler", GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 27(1), 113-120

Horemans S., Koninck K. D., Neuray J., Hermans R., Vlassak K., (1986), "Production Of Plant Growth Substances By Azospirillum Sp, And Other Rhizosphere Bacteria Symbiosis", Symbiosis, 2, 341-346.

Hubbell D. H., Kidder G., (1998), "Biological nitrogen fixation", Institute of Food and Agriculture Sciences, University of Florida Cooperative Extension Service, EDIS.

Hynes R. K., Leung G. C., Hirkala D. L., Nelson L. M., (2008), "Isolation, Selection, And Characterization Of Beneficial Rhizobacteria From Pea, Lentil, And Chickpea Grown In Western Canada", Canadian Journal Of Microbiology, 54(4), 248-258.

İbrikçi H., Yağbasanlar T., Keklikçi Z., Çakmak İ., Büyük G., Toklu F., Güzel N., (2000), “Çukurova Bölgesinde İnsan Sağlığı ve Çiftçi Ekonomisi Açısından Buğdayda Azot Gübrelemesinin Optimizasyonunu”, Dpt. Kesin Sonuç Raporu. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, Adana.

Igiehon N. O., Babalola O. O., (2018), “Rhizosphere Microbiome Modulators: Contributions Of Nitrogen Fixing Bacteria Towards Sustainable Agriculture”, International Journal Of Environmental Research And Public Health, 15(4), 574.

Islam F., Yasmeen T., Ali Q., Ali S., Arif M. S., Hussain S., Rizvi H., (2014), “Influence Of Pseudomonas Aeruginosa As Pgpr On Oxidative Stress Tolerance In Wheat Under Zn Stress”, Ecotoxicology And Environmental Safety, 104, 285-293.

Islam F., Yasmeen T., Ali Q., Ali S., Arif M. S., Hussain S., Rizvi H., (2014), “Influence Of Pseudomonas Aeruginosa As Pgpr On Oxidative Stress Tolerance In Wheat Under Zn Stress”, Ecotoxicology And Environmental Safety, 104, 285-293.

Iswandi A., Bossier P., Vandenabeele J., Verstraete W., (1987), “Effect Of Seed Inoculation With The Rhizopseudomonad Strain 7nsk2 On The Root Microbiota Of Maize (Zea Mays) And Barley (Hordeum Vulgare)”, Biology And Fertility Of Soils, 3(3), 153-158.

İmriz G., Özdemir F., Topal İ., Ercan B., Taş M. N., Yakışır E., Okur O., (2014), “Bitkisel Üretimde Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakteri (Pgpr)'ler ve Etki Mekanizmaları”, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 12(2), 1-19.

Jensen E. S., Nielsen H. H., (2003), “How Can Increased Use Of Biological N₂ Fixation In Agriculture Benefit The Environment?”, Plant And Soil, 252(1), 177-186.

Kang B. G., Kim W. T., Yun H. S., Chang S. C., (2010), “Use Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Associated With Chickpea (Cicer Arietinum L.)”, Int. J. Plant Prod. 2, 141-152.

Kaur N., Sharma P., Sharma S., (2015), “Co-inoculation of Mesorhizobium sp. and plant growth promoting rhizobacteria Pseudomonas sp. as bio-enhancer and bio-fertilizer in chickpea (Cicer arietinum L.)”, Legume Research-An International Journal, 38(3), 367-374.

Ke X., Feng S., Wang J., Lu W., Zhang W., Chen M., Lin M., (2019), “Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium Pseudomonas stutzeri A1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere”, Systematic and applied microbiology, 42(2), 248-260.

Kılıç R., Korkmaz K., (2012), “Kimyasal Gübrelerin Tarım Topraklarında Artık Etkileri”, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 5(2), 87-90.

Kim J., Rees D. C., (1994), “Nitrogenase And Biological Nitrogen Fixation”, Biochemistry, 33(2), 389-397.

Korkmaz M., (2007), "The Effects Of Leadership Styles On Organizational Health", Educational Research Quarterly, 30(3), 23-55.

Kumar A., Maurya B. R., Raghuwanshi R., (2014), "Isolation And Characterization Of Pgpr And Their Effect On Growth, Yield And Nutrient Content In Wheat (*Triticum aestivum* L.)". Biocatalysis And Agricultural Biotechnology, 3(4), 121-128.

Lacava P. T., Azevedo J. L., (2013), "Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential In Agrobiology System", In Bacteria In Agrobiology: Crop Productivity, 1-44).

Lane D. J., (1991), "16s/23s Rrna Sequencing", Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 115-175.

Li H. B., Singh R. K., Singh P., Song Q. Q., Xing Y. X., Yang L. T., Li Y. R., (2017), "Genetic Diversity Of Nitrogen-Fixing And Plant Growth Promoting Pseudomonas Species Isolated From Sugarcane Rhizosphere", Frontiers In Microbiology, 8, 1268.

Lihan S., Benet F., Husaini A. A. S. A., Apun K., Roslan H. A., Hassan H., (2021), "Isolation And Identification Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria From Sago Palm (Metroxylon Sagu, Rottb.)", Tropical Life Sciences Research, 32(3).

Louden B. C., Haarmann D., Lynne, A. M., (2011), "Use Of Blue Agar Cas Assay For Siderophore Detection", Journal Of Microbiology and Biology Education, 12(1), 51-53.

Lucy M., Reed E., Glick B. R., (2004), "Applications Of Free Living Plant Growth-Promoting Rhizobacteria", Antonie Van Leeuwenhoek, 86(1), 1-25.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker, J., (1997), "Brock Biology Of Microorganisms" (Vol. 11). Upper Saddle River, Nj: Prentice Hall.

Majeed A., Abbasi M. K., Hameed S., Yasmin S., Hanif M. K., Naqqash T., Imran A., (2018), "Pseudomonas sp. AF-54 containing multiple plant beneficial traits acts as growth enhancer of *Helianthus annuus* L. under reduced fertilizer input", Microbiological research, 216, 56-69.

Mayak S., Tirosh T., Glick B. R., (2004), "Plant Growth-Promoting Bacteria Confer Resistance in Tomato Plants To Salt Stress", Plant Physiology and Biochemistry, 42(6), 565-572.

Mecarty S. C., Chauhan D. S., Mecarty A. D., Tripathi K. M., Selvan T., (2017), "Effect of Azotobacter And Phosphobacteria On Yield of Wheat (*Triticum aestivum*)", Vegetos-An International Journal Of Plant Research, 30(2).

Meliani A., Bensoltane A., (2016), "Biofilm-Mediated Heavy Metals Bioremediation in PGPR Pseudomonas", J. Bioremediat Biodegrad, 7(370), 2.

Miethke M., Marahiel M., (2007), "Siderophore-Based Iron Acquisition And Pathogen Control", Microbiol, and Molecular Biol. Reviews, 71(3), 413-451.

Mirza M. S., Mehnaz S., Normand P., Prigent-Combaret C., Moënne-Loccoz Y., Bally R., Malik K. A., (2006), "Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth", *Biology and Fertility of Soils*, 43(2), 163-170.

Mishra P. K., Bisht S. C., Mishra S., Selvakumar G., Bisht J. K., Gupta H. S., (2012), "Coinoculation of *Rhizobium leguminosarum*-PR1 with a cold tolerant *Pseudomonas* sp. improves iron acquisition, nutrient uptake and growth of field pea (*Pisum sativum* L.)", *Journal of plant nutrition*, 35(2), 243-256.

Nawaz S., Bano A., (2020), "Effects Of PGPR (*Pseudomonas* Sp.) And Ag-Nanoparticles On Enzymatic Activity And Physiology Of Cucumber", *Recent Patents On Food, Nutrition & Agriculture*, 11(2), 124-136.

Olanrewaju O. S., Glick B. R., Babalola O. O., (2017), "Mechanisms Of Action Of Plant Growth Promoting Bacteria", *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 33(11), 1-16.

Önal İ., (2009), "Sırtta Taşınan Çay Gübreleme Makinesi Prototipi", *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 5(1), 115-124.

Özberk İ., Atay S., Altay F., Cabi E., Özkan H., Atlı A., (2016), "Türkiye'nin Buğday Atlası", *www-Türkiye. Büyük Postane Cad. No:19, İstanbul. Isbn: 978-605-9903-07-3*.

Özberk İ., Zencirci N., Özkan H., Özberk F., Eser V., (2010), "Dünden Bugüne Makarnalık Buğday Islahı ve Geleceğe Bakış", *Makarnalık Buğday ve Mamulleri Konferansı*, 17-18 Mayıs 2010, 43-66.

Pal K. K., R. Dey D. M. Bhatt, S. M. Chauhan, (2000), "Plant Growth Promoting Fluorescent *Pseudomonads* Enhanced Peanut Growth, Yield And Nutrient Uptake", *Fifth International Pgpr Workshop*, 29 October - 3 November, 2000, Cordoba-Argentina.

Palleroni N. J., (2015), "Pseudomonas. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*", *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-1.

Panpatte D. G., Jhala Y. K., Shelat H. N., Vyas R. V., (2016), "Pseudomonas Fluorescens: A Promising Biocontrol Agent And Pgpr For Sustainable Agriculture", *In Microbial Inoculants In Sustainable Agricultural Productivity Springer, New Delhi*, 257-270.

Peoples M. B., Ladha J. K., Herridge D. F., (1995), "Enhancing Legume N₂ Fixation Through Plant And Soil Management", *In Management Of Biological Nitrogen Fixation For The Development Of More Productive And Sustainable Agricultural Systems*, Springer, Dordrecht, 83-101.

Ram R. L., Maji C., Bindroo B. B., (2013), "Role Of Pgpr In Different Crops-An Overview", *Indian Journal Of Sericulture*, 52(1), 1-13.

Rao E. P., Puttanna K., (2000)., “Nitrates, Agriculture And Environment”, Current Science, 79(9), 1163-1168.

Raun W. R., Johnson G. V., (1999), “Improving Nitrogen Use Efficiency For Cereal Production”, Agronomy Journal, 91(3), 357-363.

Reddy M. P., Rao D. M. R., Verma R. S., Srinath, B., Katiyar, R. S., (1998), “Response Of S 13 Mulberry Variety To Vam İnoculum Under Semiarid Condition”, Indian Journal Of Plant Physiology, 3, 194-196.

Rees D. C., Howard J. B., (2000), “Nitrogenase: Standing At The Crossroads”, Current Opinion in Chemical Biology, 4(5), 559-566.

Rodríguez H., Fraga R., (1999), “Phosphate Solubilizing Bacteria And Their Role İn Plant Growth Promotion”, Biotechnology Advances, 17(4-5), 319-339.

Saxena A. K., Tilak K. V. B. R., (1998), “Free-Living Nitrogen Fixers: Its Role İn Crop Production”, Microbes For Health, Wealth And Sustainable Environment, Malhotra Publ. Co., New Delhi. Edited By Verma Ak, 25-64.

Schwyn B., Neilands J. B., (1987), “Universal Chemical Assay For The Detection And Determination Of Siderophores”, Analytical Biochemistry, 160(1), 47-56.

Seefeldt L. C., Dance I. G., Dean D. R., (2004), “Substrate Interactions With Nitrogenase: Fe Versus Mo”, Biochemistry, 43(6), 1401-1409.

Sitaraman R., (2015), “Pseudomonas Spp. As Models For Plant-Microbe Interactions”, Frontiers İn Plant Science, 6, 787.

Somers, E., Vanderleyden J., Srinivasan M., (2004), “Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet”, Critical Reviews İn Microbiology, 30(4), 205-240.

Sönmez İ., Kaplan M., Sönmez S., (2008), “Kimyasal Gübrelerin Çevre Kirliliği Üzerine Etkileri ve Çözüm Önerileri”, Derim, 25(2), 24-34.

Sudhakar P., Chattopadhyay G. N., Gangwar S. K., Ghosh J. K., (2000), “Effect Of Foliar Application Of Azotobacter, Azospirillum And Beijerinckia On Leaf Yield And Quality Of Mulberry (Morus Alba)”, The Journal Of Agricultural Science, 134(2), 227-234.

Suslow T. V., Schroth M. N., (1982), “Role Of Deleterious Rhizobacteria As Minor Pathogens İn Reducing Crop Growth”, Phytopathology, 72(1), 111-115.

Şahin G., (2016), “Türkiye’de Gübre Kullanım Durumu ve Gübreleme Konusunda Yaşanan Problemler”, Tarım Ekonomisi Dergisi, 22-1.

Şeker M. G., (2021), “Sülfonilüre Grubu Herbisit Kullanılan Tekirdağ Tarım Alanlarından İzole Edilen *Pseudomonas* Türlerinin Karakterizasyonu”, Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 36(1), 10-19.

Tanno K. I., Willcox G., (2006), “How Fast Was Wild Wheat Domesticated?”, Science, 311(5769), 1886-1886.

TARIMORMAN, (2021), Eminbey, Tarım ve Orman Bakanlığı.

Tosun, O., (1980). Tarla Ziraatı, Ders Notu. A.U Zir. Fak. Teksir No: 44.

TUİK, (2019), Bitkisel Üretim İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu.

Vavilov N. I., (1987), “Origin And Geography Of Cultivated Plants”, The University Press, Cambridge.

Vaz-Moreira I., Nunes O. C., Manaia C. M., (2012), “Diversity And Antibiotic Resistance In *Pseudomonas* Spp. From Drinking Water”, Science Of The Total Environment, 426, 366-374.

Verma J. P., Yadav J., Tiwari K. N., (2012), “Enhancement Of Nodulation And Yield Of Chickpea By Co-Inoculation Of Indigenous Mesorhizobium Spp. And Plant Growth-Promoting Rhizobacteria In Eastern Uttar Pradesh”, Communications In Soil Science and Plant Analysis, 43(3), 605-621.

Vimal S. R., Gupta J., Singh J. S., (2018), “Effect of salt tolerant *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth under soil salinity: a comparative study”, Microbiology Research, 9(1), 26-32.

Wani P. A., Khan M. S., (2010), “*Bacillus* Species Enhance Growth Parameters Of Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) In Chromium Stressed Soils”, Food And Chemical Toxicology, 48(11), 3262-3267.

Watanabe I., Lin C., (1984), “Response of wetland rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas* sp.”, Soil science and plant nutrition, 30(2), 117-124.

Web 1, (2019), <https://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/sektorraporlari/hububat2019.pdf>, (Erişim Tarihi: 31/10/2021).

Web 2, (2021), <https://Images.App.Goo.Gl/Xx3vajymdvvgwwuhm8> (Erişim Tarihi: 31/10/2021).

Web 3, (2021), <http://www.tohumcu.org/index.php?page=Galeri&sl=11> (Erişim Tarihi: 31/10/2021).

Web 4, (2021), <https://Arastirma.Tarimorman.Gov.Tr/Bugday,Haziran-2021>. (Erişim Tarihi: 31/10/2021).

Web 5, (2021), <https://Www.Tarimorman.Gov.Tr/Bugem/Belgeler/Ürünmasaları/Buğdaybülteni>, (Erişim Tarihi: 31/10/2021).

Web 6 (2021) <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/TOprakSU%20G%C3%9CBRE%20TAVS%C4%B0YE%20%20Verileri.pdf> (Erişim Tarihi: 31/10/2021).

Web 7 (2021) [https://arastirma.tarimorman.gov.tr/toprakgubre/Belgeler/2018%20Yılı%20Proje%20Raporları/Türkiye%20Topraklarının%20Bazı%20Verimlilik%20ve%20Organik%20Karbon%20\(TOK\)%20İçeriğinin%20Coğrafi%20Veritabanının%20Olusturulması.pdf](https://arastirma.tarimorman.gov.tr/toprakgubre/Belgeler/2018%20Yılı%20Proje%20Raporları/Türkiye%20Topraklarının%20Bazı%20Verimlilik%20ve%20Organik%20Karbon%20(TOK)%20İçeriğinin%20Coğrafi%20Veritabanının%20Olusturulması.pdf) (Erişim Tarihi: 31/10/2021).

Yamamoto S., Kasai H., Arnold D. L., Jackson R. W., Vivian A., Harayama S., (2000), “Phylogeny Of The Genus Pseudomonas: Intragenetic Structure Reconstructed From The Nucleotide Sequences Of GyrB And RpoD Genes The Genbank Accession Numbers For The Sequences Determined In This Work Are: GyrB, D37926, D37297, D86005–D86019 And Ab039381–Ab039492; RpoD, D86020–D86036 And Ab039493–Ab039624”, Microbiology, 146(10), 2385-2394.

Yang J., Kloepper J. W., Ryu C. M., (2009), “Rhizosphere Bacteria Help Plants Tolerate Abiotic Stress”, Trends In Plant Science, 14(1), 1-4.

Yayla Ş. R., Şenol N., (2020), “Tarımda Kullanılan Bazı Mikrobiyal Gübrelerin Eisenia Foetida Deri Dokusu Üzerinde Etkisinin Morfolojik Açından Değerlendirilmesi”, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi, 15(2), 213-223.

Yüzbaşıoğlu R., (2020), “Üreticilerin Kimyasal Gübre Kullanım Bilinç Düzeylerinin İncelenmesi: Tokat Merkez İlçe Örneği”, Turkish Journal Of Agricultural Engineering Research, 1(2), 452-465.

Zadoks J. C., Chang T. T., Konzak C. F., (1974), “A Decimal Code For The Growth Stages Of Cereals”, Weed Research, 14(6), 415-421.

Zhuang L., Li Y., Wang Z., Yu Y., Zhang N., Yang C., Wang Q., (2021), “Synthetic Community With Six Pseudomonas Strains Screened From Garlic Rhizosphere Microbiome Promotes Plant Growth”, Microbial Biotechnology, 14(2), 488-502.

ÖZGEÇMİŞ

Tuğçe ARIT, 2014 yılında Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitime başladı. Lisans eğitimini 2018 yılında tamamladıktan sonra 2019 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime başladı. Halen Yüksek Lisans eğitime devam etmektedir.



EKLER

Ek A: NCBI Veri Tabanındaki Analiz Sonuçları

118 Numaralı izolat										
RID: JTIKUMX101R Job Title: Consensus revers complement Program: BLASTN Database: rRNA_typestrains/16S_ribosomal_RNA (Bacteria and Archaea type strains) Query #1: Consensus revers complement Query ID: 1c1 Query_226927 Length: 1424										
Sequences producing significant alignments:										
Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Pseudomonas reidholzensis strain ID3 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	1785162	2523	2523	100%	0.0	98.39	1531	NR_157777.1
Pseudomonas putida strain NBRC 14164 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2514	2514	100%	0.0	98.25	1462	NR_113651.1
Pseudomonas putida strain ATCC 12633 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2514	2514	100%	0.0	98.25	1492	NR_114479.1
Pseudomonas taiwanensis DSM 21245 strain BCRC 17751 16S...	Pseudomonas ...	NA	1292030	2507	2507	100%	0.0	98.18	1469	NR_116172.1
Pseudomonas oryzae var. habilitans strain L-1 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47885	2507	2507	100%	0.0	98.18	1527	NR_025881.1
Pseudomonas plecoglossicida strain NBRC 103162 16S ribosomal...	Pseudomonas ...	NA	70775	2501	2501	100%	0.0	98.11	1462	NR_114226.1
Pseudomonas plecoglossicida strain FPC951 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	70775	2501	2501	100%	0.0	98.11	1498	NR_024662.1
Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	76759	2495	2495	100%	0.0	98.04	1517	NR_024910.1
Pseudomonas monteilii strain NBRC 103158 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	76759	2492	2492	100%	0.0	97.97	1462	NR_114224.1
Pseudomonas hutereaui strain XMS2 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	2707027	2490	2490	100%	0.0	97.97	1538	NR_165748.1
Pseudomonas japonica NBRC 103040 = DSM 22348 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215104	2479	2479	100%	0.0	97.76	1462	NR_114192.1
Pseudomonas fulva strain NRIC 0180 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47880	2479	2479	100%	0.0	97.83	1484	NR_104280.1
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17804 strain AJ 2129 16...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2479	2479	100%	0.0	97.83	1484	NR_104278.1
Pseudomonas putida strain IAM 1236 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2479	2479	100%	0.0	97.83	1527	NR_043424.1
Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas ...	NA	384676	2479	2479	100%	0.0	97.83	1526	NR_102854.1
Pseudomonas cremoricolorata DSM 17059 = NBRC 16634 strain IAM...	Pseudomonas ...	NA	1215098	2479	2479	100%	0.0	97.83	1484	NR_104279.1
Pseudomonas mossellii strain CFML 90-83 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	78327	2479	2479	100%	0.0	97.83	1513	NR_024924.1
Pseudomonas fulva strain NBRC 16637 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47880	2475	2475	100%	0.0	97.76	1462	NR_113857.1
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17804 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2475	2475	100%	0.0	97.76	1462	NR_113856.1
Pseudomonas cremoricolorata DSM 17059 = NBRC 16634 16S ribosomal...	Pseudomonas ...	NA	1215098	2475	2475	100%	0.0	97.76	1462	NR_113855.1
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17804 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2473	2473	100%	0.0	97.76	1484	NR_040859.1
Pseudomonas alkylphenolica strain KL28 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	237609	2468	2468	100%	0.0	97.69	1453	NR_145644.1
Pseudomonas japonica NBRC 103040 = DSM 22348 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215104	2468	2468	100%	0.0	97.69	1498	NR_040992.1
Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	76759	2466	2466	100%	0.0	97.48	1503	NR_112073.1
Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas ...	NA	384676	2464	2464	100%	0.0	97.55	1515	NR_115336.1
Pseudomonas aestus strain CMA41215 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	1387231	2462	2462	100%	0.0	97.62	1526	NR_169429.1
Pseudomonas donghaiensis strain HYS 16S ribosomal RNA, complete...	Pseudomonas ...	NA	1163398	2451	2451	100%	0.0	97.48	1537	NR_136501.2

Şekil A1.1: 118 numaralı izolata ait 16S rDNA bölgesinin NCBI veri tabanındaki analiz sonuçları.

129 Numaralı izolat									
RID: JTHH7PFV013 Job Title:Consensus revs complement 2018-A-105-A-04/129 Program: BLASTN Database: rRNA_typestrains/16S_ribosomal_RNA 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea type strains) Query #1: Consensus revs complement Query ID: lcl Query_47691 Length: 1380									
Sequences producing significant alignments:									
Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
Pseudomonas reidholzensis strain ID3 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	1785162	2507	2507	100%	0.0	99.42	1531
Pseudomonas putida strain NBRC 14164 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2497	2497	100%	0.0	99.28	1462
Pseudomonas putida strain ATCC 12633 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2497	2497	100%	0.0	99.28	1492
Pseudomonas taiwanensis DSM 21245 strain BCRC 17751 16S...	Pseudomonas ...	NA	1292030	2494	2494	99%	0.0	99.42	1469
Pseudomonas oryzihabitans strain L-1 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47885	2490	2490	100%	0.0	99.20	1527
Pseudomonas plecoglossicida strain NBRC 103162 16S ribosomal...	Pseudomonas ...	NA	70775	2488	2488	99%	0.0	99.34	1462
Pseudomonas plecoglossicida strain FPC951 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	70775	2488	2488	99%	0.0	99.34	1498
Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	76759	2483	2483	99%	0.0	99.27	1517
Pseudomonas hutensis strain XWS2 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	2707027	2479	2479	100%	0.0	99.06	1538
Pseudomonas monteilii strain NBRC 103158 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	76759	2479	2479	99%	0.0	99.20	1462
Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas ...	NA	384676	2471	2471	99%	0.0	99.13	1526
Pseudomonas mosselii strain CFML 90-83 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	78327	2466	2466	99%	0.0	99.05	1513
Pseudomonas japonica NBRC 103040 = DSM 22348 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215104	2462	2462	100%	0.0	98.77	1462
Pseudomonas fulva strain NBRC 16637 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47880	2462	2462	100%	0.0	98.84	1462
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17004 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2462	2462	99%	0.0	98.98	1462
Pseudomonas cremoricolorata DSM 17059 = NBRC 16634 16S ribosom...	Pseudomonas ...	NA	1215098	2462	2462	100%	0.0	98.84	1462
Pseudomonas fulva strain NRIC 0180 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47880	2462	2462	100%	0.0	98.84	1484
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17004 strain AJ 2129 16...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2462	2462	100%	0.0	98.84	1484
Pseudomonas putida strain IAM 1236 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2462	2462	100%	0.0	98.84	1527
Pseudomonas cremoricolorata DSM 17059 = NBRC 16634 strain IAM...	Pseudomonas ...	NA	1215098	2462	2462	100%	0.0	98.84	1484
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17004 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2460	2460	99%	0.0	98.98	1484
Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas ...	NA	384676	2457	2457	99%	0.0	98.83	1515
Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	76759	2457	2457	99%	0.0	98.76	1503
Pseudomonas alkylphenolica strain KL28 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	237609	2451	2451	100%	0.0	98.70	1453
Pseudomonas japonica NBRC 103040 = DSM 22348 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215104	2451	2451	100%	0.0	98.70	1498

Şekil A1.2: 129 numaralı izolata ait 16S rDNA bölgesinin NCBI veri tabanındaki analiz sonuçları.

131 Numaralı izolat									
RID: JVKJYE4013 Job Title: Consensus revers complement 2018-A-105-A-04/131 Program: BLASTN Database: rRNA_typetrains/16S_ribosomal_RNA 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea type strains) Query #1: Consensus revers Query ID: lcl Query_20725 Length: 1413									
Sequences producing significant alignments:									
Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Acc. Len
Pseudomonas reidholzensis strain ID3 16S ribosomal RNA, partia...	Pseudomonas ...	NA	1785162	2497	2497	99%	0.0	98.44	1531
Pseudomonas putida strain NBRC 14164 16S ribosomal RNA, partia...	Pseudomonas ...	NA	303	2488	2488	99%	0.0	98.30	1462
Pseudomonas putida strain ATCC 12633 16S ribosomal RNA, partia...	Pseudomonas ...	NA	303	2488	2488	99%	0.0	98.30	1492
Pseudomonas taiwanensis DSM 21245 strain BCRC 17751 16S...	Pseudomonas ...	NA	1292030	2481	2481	99%	0.0	98.23	1469
Pseudomonas oryzzihabitans strain L-1 16S ribosomal RNA, partia...	Pseudomonas ...	NA	47885	2481	2481	99%	0.0	98.23	1527
Pseudomonas plecoglossicida strain NBRC 103162 16S ribosomal...	Pseudomonas ...	NA	70775	2475	2475	99%	0.0	98.16	1462
Pseudomonas plecoglossicida strain FPC951 16S ribosomal RNA,...	Pseudomonas ...	NA	70775	2475	2475	99%	0.0	98.16	1498
Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA,...	Pseudomonas ...	NA	76759	2470	2470	99%	0.0	98.09	1517
Pseudomonas monteilii strain NBRC 103158 16S ribosomal RNA,...	Pseudomonas ...	NA	76759	2466	2466	99%	0.0	98.01	1462
Pseudomonas hutensis strain XWS2 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	2707027	2464	2464	99%	0.0	98.01	1538
Pseudomonas japonica NBRC 103040 = DSM 22348 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215104	2453	2453	99%	0.0	97.80	1462
Pseudomonas fulva strain NRIC 0180 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47880	2453	2453	99%	0.0	97.87	1484
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17004 strain AJ 2129 16...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2453	2453	99%	0.0	97.87	1484
Pseudomonas putida strain IAM 1236 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	303	2453	2453	99%	0.0	97.87	1527
Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas ...	NA	384676	2453	2453	99%	0.0	97.87	1526
Pseudomonas cremoricolorata DSM 17059 = NBRC 16634 strain IAM...	Pseudomonas ...	NA	1215098	2453	2453	99%	0.0	97.87	1484
Pseudomonas mosselii strain CFML 90-83 16S ribosomal RNA,...	Pseudomonas ...	NA	78327	2453	2453	99%	0.0	97.87	1513
Pseudomonas fulva strain NBRC 16637 16S ribosomal RNA, partial...	Pseudomonas ...	NA	47880	2449	2449	99%	0.0	97.80	1462
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17004 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2449	2449	99%	0.0	97.80	1462
Pseudomonas cremoricolorata DSM 17059 = NBRC 16634 16S ribosom...	Pseudomonas ...	NA	1215098	2449	2449	99%	0.0	97.80	1462
Pseudomonas parafulva NBRC 16636 = DSM 17004 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215114	2447	2447	99%	0.0	97.80	1484
Pseudomonas monteilii strain CIP 104883 16S ribosomal RNA,...	Pseudomonas ...	NA	76759	2442	2442	99%	0.0	97.59	1503
Pseudomonas alkylphenolica strain KL28 16S ribosomal RNA,...	Pseudomonas ...	NA	237609	2442	2442	99%	0.0	97.73	1453
Pseudomonas japonica NBRC 103040 = DSM 22348 16S ribosomal RNA...	Pseudomonas ...	NA	1215104	2442	2442	99%	0.0	97.73	1498
Pseudomonas entomophila L48 16S ribosomal RNA, partial sequence	Pseudomonas ...	NA	384676	2438	2438	99%	0.0	97.59	1515

Şekil A1.3: 131 numaralı izolata ait 16S rDNA bölgesinin NCBI veri tabanındaki analiz sonuçları.