

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Vicia GRUBU BAKLAGİLLERDE RHİZOBİYAL SİMBİYONT SEÇİCİLİĞİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Emine Banu AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı

TEMMUZ 2015
SAMSUN



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Vicia* GRUBU BAKLAGİLLERDE RHİZOBİYAL SİMİYONT SEÇİCİLİĞİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Emine Banu AYDIN
08210567

Tezin Savuma Tarihi : 23 Temmuz 2015

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi
PYO.FEN.1904.12.013nlu Proje ile Desteklenmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

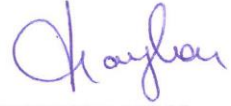
Biyoloji Anabilim Dalında

Emine Banu AYDIN Tarafından Hazırlanan

**Vicia GRUBU BAKLAGİLLERDE RHİZOBİYAL SİMBİYONT
SEÇİCİLİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 23/07/2015 tarihinde yapılan sınav ile
DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.**

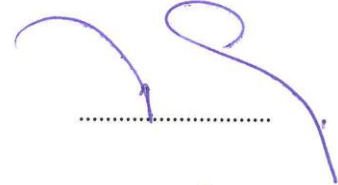
Başkan : Prof. Dr. Kamuran AYHAN
Ankara Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Prof. Dr. İslam GÜNDÜZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Prof. Dr. Erkut PEKŞEN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI
Ordu Üniversitesi



....../....../2015

Prof. Dr. Hüseyin DEMİR

Enstitü Müdürü

Annem ve Babam'a,

ÖNSÖZ

Doktora tezim süresince benden bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman beni motive eden ve takıldığım noktalarda farklı bakış açısıyla yolumu aydınlatan; sadece bir hoca olarak değil aynı zamanda insan olarakta kendisinden çok şey öğrendiğim çok kıymetli hocam Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a,

Laboratuvarını bana açan ve bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. İslam GÜNDÜZ'e;

Tez çalışması boyunca bilgi birikimiyle yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI'ya;

Arkadaşlıklarıyla manevi anlamda bana her zaman destek olan Arş. Gör. Duygu TİRYAKİ DENER, Yrd. Doç. Dr. Kübra ÖZKUL, Arş. Gör. Gülsüm MUMCU, Hilal ALTINKAYNAK, Arş. Gör. Esra KARA, Arş. Gör. Dr. Sadık DEMİRTAŞ'a

Eğitim hayatım boyunca beni manevi ve maddi olarak yanımda olan; bu yolda ilerlememi her zaman destekleyen annem Yüksel KİBAROĞLU ve babam BEŞİR KİBAROĞLU'na;

Bu yorucu yolculukta huzur duraklarım olan hayat arkadaşım Mehmet AYDIN ve kızım Asya AYDIN'a sonsuz teşekkürler.

Temmuz 2015

Emine Banu AYDIN
(Araştırma Görevlisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
KISALTMALAR	xvii
<i>Vicia</i> GRUBU BAKLAGİLLERDE RHİZOBİYAL SİMBİYONT SEÇİCİLİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI	xix
ÖZET.....	xix
INVESTIGATION OF SELECTIVITY OF RHIZOBIAL SYMBIONTS THROUGH MOLECULAR METHODS IN LEGUMES OF <i>Vicia</i> GROUP...	xxi
ABSTRACT	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı.....	3
1.2 Tezin Önemi	4
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Rhizobia.....	5
2.2 <i>Fabaceae</i> (Baklagiller)	10
2.2.1 <i>Vicia faba</i> (Bakla).....	11
2.3 Bakteri-Bitki Etkileşimi.....	12
2.4 Rhizobia Stratejileri	15
2.5 Nodülasyon Genleri ve <i>nod</i> Kutusu.....	16
2.6 Moleküler Yöntemler.....	19
2.6.1 RAPD.....	19
2.6.2 PCR-ITS	20
2.6.3 Filogenetik analizler	21
3. MATERYAL METOT	23
3.1 Çalışmada Kullanılan Rhizobium İzolatları	23
3.2 Nodülasyon Testi İçin İzolatların Gruplandırılması	26
3.2.1 RAPD işlemi sonrası oluşan profillerin gözlemlenmesi.....	26
3.3 Nodülasyon Testi	26
3.3.1 Nodülasyon testi için bakla tohumlarının çimlendirilmesi.....	27
3.3.2 Nodülasyon testi için <i>Rhizobium</i> izolatlarının aktifleştirilmesi.....	27
3.3.3 Nodülasyon testi için bakla fidelerinin dikimi ve bakterilerin aşılması	27
3.3.4 Nodüllerden bakterilerin izolasyonu	28
3.3.4.1 Elde edilen izolatların saklanması.....	28
3.3.5 İzolatlardan Genomik DNA İzolasyonu	28
3.4 Deney Sonucunda Bakteri Suşunun Belirlenmesi	30
3.4.1 ITS-PCR ürünlerinin eldesinde klonlama çalışması.....	30
3.4.1.1 ITS-PCR ürünün saflaştırılması	30
3.4.1.2 ITS-PCR ürünlerinin klonlama için hazırlanması.....	31

3.4.1.3 ITS-PCR ürünlerinin klonlaması için kompetent hücre oluşturma ve transformasyon	32
3.4.1.4 ITS-PCR ürünlerinin elde edilmesi için plazmit DNA izolasyonunun yapılması	32
3.4.2 ITS-PCR ürünlerinin analizi ve yorumlanması	34
3.4.2.1 ITS-PCR ürünlerin polimorfik DNA analizi	34
3.5 <i>nod</i> Kutusu'un Araştırılması	34
3.5.1 <i>nod</i> kutusu-PCR ürünlerinin analizi ve yorumlanması	35
3.5.1.1 <i>nod</i> kutusu-PCR ürünlerin polimorfik DNA analizi	35
3.6 Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	35
3.6.1 %2'lik metafor agaroz	35
3.6.2 1X TBE (Tris - Borik asit - EDTA)	35
3.6.3 GelRed	36
3.6.4 NaOCl (%1'lik)	36
3.6.5 YMB (Yeast mannitol broth)	36
3.6.6 Fide agar	36
3.6.7 Fide besin çözeltisi	37
3.6.8 %1 oranında asitleştirilmiş civa klorür	37
3.6.9 Ringer çözeltisi	37
3.6.10 YMA (Yeast mannitol agar)	37
3.6.11 Gliserol stok (%20)	37
3.6.12 TY (Trypton yeast extract broth)	37
3.6.13 Tris-HCl	38
3.6.14 EDTA (0,5 M) pH 8	38
3.6.15 1X TE (Tris – EDTA) tamponu, pH 8	38
3.6.16 %10'luk SDS (Sodyum dodesil sülfat)	38
3.6.17 Proteinaz K (20 mg/ml)	38
3.6.18 NaCl (5M)	39
3.6.19 CTAB/NaCl (Setil trimetil amonyum bromür/sodyum klorür)	39
3.6.20 Kloroform/izoamil alkol (24:1)	39
3.6.21 %70 Etanol	39
3.6.22 %1'lik Agaroz jel	39
3.6.23 NA (Nutrient agar)	39
3.6.24 LB (Luria broth-Lennox) - ampisillin agar	40
3.6.25 Ampisillin stok solüsyonu	40
3.6.26 LB (Luria broth-Lennox) besiyeri	40
4. BULGULAR	41
4.1 Nodülasyon Testi	41
4.1.1 Nodülasyon testi için izolatların gruplandırılması	41
4.1.2 Nodülasyon testi için bakla tohumlarının çimlendirilmesi	44
4.1.3 Nodülasyon testi için izolatların aktifleştirilmesi	44
4.1.4 Nodülasyon testi için bakla fidelerinin dikimi ve bakterilerin aşılması	46
4.1.5 Nodüllerden bakterilerin izolasyonu ve bakterilerden genomik DNA izolasyonu	48
4.2 Denemelerde Tercih Edilen Bakteri Suşlarının Belirlenmesi	49
4.2.1 ITS-PCR ürünlerin polimorfik DNA analizi	59
4.3 <i>nod</i> Kutusu Analizi	59
4.3.1 <i>nod</i> kutusu-PCR ürünlerin polimorfik DNA analizi	63
5. TARTIŞMA	65
5.1 <i>Rhizobium</i> İzolatlarının Gruplandırılması İçin RAPD-PCR Kullanımı	65

5.2 Nodülasyon Testi Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar.....	65
5.3 Denemelerde Tercih Edilen İzolatın Belirlenmesi	66
5.4 <i>nod</i> Kutusu'nun Bölgesinin İncelenmesi.....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
6.1 <i>Rhizobium</i> İzolatlarının Gruplandırılması İçin RAPD-PCR Kullanımı	71
6.2 Nodülasyon Testi Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar.....	71
6.3 <i>nod</i> Kutusu'nun İncelenmesinden Elde Edilen Sonuçlar	72
6.4 Tez Çalışmasının Etkileri	73
6.5 Öneriler	73
KAYNAKLAR	75
EKLER.....	89
EK A.....	90
ÖZGEÇMİŞ.....	101

ÇİZELGELER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Tanımlanmış <i>Rhizobium</i> türleri.....	8
Çizelge 2.2. Nodülasyonla ilgili genler, bilinen fonksiyonları veya aktiviteleri.....	17
Çizelge 3.1. Laboratuvar kültür koleksiyonumuzdan kullanılan <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar. <i>viciae</i> suşları.....	23
Çizelge 4.1. Deneme 1 uzaklık matriksi.....	51
Çizelge 4.2. Deneme 2 uzaklık matriksi.....	52
Çizelge 4.3. Deneme 3 uzaklık matriksi.....	53
Çizelge 4.4. Deneme 4 uzaklık matriksi.....	54
Çizelge 4.5. Deneme 5 uzaklık matriksi.....	55
Çizelge 4.6. Deneme 6 uzaklık matriksi.....	56
Çizelge 4.7. Deneme 7 uzaklık matriksi.....	57
Çizelge 4.8. Deneme 8 uzaklık matriksi.....	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar. <i>viciae</i> 'nin mikroskop görüntüsü.....	6
Şekil 2.2. Baklagil kökleri tarafından üretilen flavonoid bileşikleri.....	12
Şekil 2.3. Baklagildeki kök nodülünün gelişimi.....	13
Şekil 2.4. 1888'de Beijerinck tarafından yapılan çizim.....	14
Şekil 2.5. Baklagil kök nodülünün modeli.....	14
Şekil 2.6. <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar. <i>viciae</i> 'de <i>nod</i> genlerinin genetik organizasyonu.....	18
Şekil 2.7. 16S-23S bölgesi arasındaki ITS bölgesi.....	21
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan örneklerin haritada dağılımı.....	25
Şekil 4.1. Bütün izolatların M13 primeriyle yapılan RAPD işlemi görüntüsü.....	41
Şekil 4.2. Deneme 1.....	42
Şekil 4.3. Deneme 2.....	42
Şekil 4.4. Deneme 3.....	43
Şekil 4.5. Deneme 4.....	43
Şekil 4.6. Deneme 5.....	43
Şekil 4.7. Deneme 6.....	43
Şekil 4.8. Deneme 7.....	44
Şekil 4.9. Deneme 8.....	44
Şekil 4.10. Bakla tohumlarının çimlenme öncesi (A) ve sonrası (B) durumları.....	44
Şekil 4.11. Mercimek ve bakla bitkilerinin köklerindeki nodüllerden elde edilen <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar. <i>viciae</i> izolatları.....	45
Şekil 4.12. Bezelye bitkisi ve yabancı türlerin köklerindeki nodüllerden elde edilen <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar. <i>viciae</i> izolatları.....	46
Şekil 4.13. Fide agarlı şişeler.....	47
Şekil 4.14. Kurulu deneme 2.....	47
Şekil 4.15. Gelişmekte olan bakla fideleri.....	47
Şekil 4.16. Aktif nodüllere ait örnekler.....	48
Şekil 4.17. Aktif nodülün kesiti.....	48
Şekil 4.18. İzole edilen genomik DNA örnekleri.....	49
Şekil 4.19. Deneme 7'den elde edilen izolatların ITS bölgesinin jel görüntüsü.....	50
Şekil 4.20. Deneme 1 Neighbor Joining ağacı.....	51
Şekil 4.21. Deneme 2 Neighbor Joining ağacı.....	52
Şekil 4.22. Deneme 3 Neighbor Joining ağacı.....	53
Şekil 4.23. Deneme 4 Neighbor Joining ağacı.....	54
Şekil 4.24. Deneme 5 Neighbor Joining ağacı.....	55
Şekil 4.25. Deneme 6 Neighbor Joining ağacı.....	56
Şekil 4.26. Deneme 7 Neighbor Joining ağacı.....	57
Şekil 4.27. Deneme 8 Neighbor Joining ağacı.....	58
Şekil 4.28. BioEdit programında hizalanmış <i>nod</i> kutusu bölgesi.....	59
Şekil 4.29. Sequencher v5.0 programında primerlerin bağlantı yerleri.....	60

Şekil 4.30. Mercimek bitkisinin köklerindeki nodüllerden izole edilen <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar. <i>viciae</i> izolatlarının <i>nod</i> kutusu bölgesi PCR görüntüsü	60
Şekil 4.31. Macrogen Inc.'de dizileme işlemi yapılan BA-1 izolatının NodBox-F primeriyle elde edilen dizisi	61
Şekil 4.32. BioEdit programında kontrol edilip hizalanan <i>nod</i> kutusu bölgesi.....	61
Şekil 4.33. <i>nod</i> kutusu bölgesi Neighbor Joining ağacı	62
Şekil 4.34. Denemelerdeki izolatların <i>nod</i> kutusu-PCR polimorfik DNA bölgeleri	63

KISALTMALAR

16S	: Prokaryotik ribozomların 30S Küçük altbiriminin bir bileşeni
23S	: Prokaryotik ribozomların 50S Büyük altbiriminin bir bileşeni
biovar.	: Biyolojik varyete
bp	: Baz çifti
CTAB	: Setil trimetil amonyum bromür
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
IRLC	: Inverted Repeat Loss Clade
fix	: Nitrojen fiksasyon genleri
ITS	: Internal Transcribed Spacer (Ara transkripsiyon bölgesi)
LB	: Luria broth - lennox
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Moleküler Evrimsel Genetik Analizi)
NA	: Nutrient agar
nod	: Nodülasyon genleri
Nod faktör	: Nodülasyon faktörü
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nif	: Nitrojen fiksasyon genleri
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Random Amplified of Polymorphic DNA (Polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu)
rDNA	: ribozomal DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Sym plazmit	: Simbiyotik plazmit
TBE	: Tris - Borik asit - EDTA
TE	: Tris - EDTA
TY	: Trypton Yeast Ekstrakt
UPGMA	: Unweighted pair group method with averages (Ağırlıklı olmayan çift grup yöntemin algoritması)
YMA	: Yeast Extract Mannitol Agar
YMB	: Yeast Extract Mannitol Broth

***Vicia* GRUBU BAKLAGİLLERDE RHİZOBİYAL SİMBİYONT SEÇİCİLİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi'ndeki bazı illerde (Samsun, Ordu, Amasya, Sinop ve Çorum) yetiştirilen bakla (*Vicia faba* L.), bezelye (*Pisum sativum* L.) ve mercimek (*Lens culinaris* Medik.) gibi baklagillerinden ve yabancı türler kocafig (*Vicia narbonensis* L.) ve mürdümük'ün (*Lathyrus setifolius* L.) kök nodüllerinden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları kullanılmış ve literatürde rapor edildiği üzere *Vicia* grubu içinde rhizobia-baklagil seçiciliğinin olup olmadığının bakla bitkisi kullanılarak test edilmesi amaçlanmıştır. Bakla, bezelye, mercimek ve yabancı türlere ait toplam 26 adet izolat kendi laboratuvar kültür koleksiyonumuzdan kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılacak olan izolatlar ilk olarak nodülasyon testlerinin uygulanması için gruplara ayrılmıştır. Gruplara ayırma işlemi RAPD kullanılarak yapılmıştır.

Nodülasyon testi için bakla, bezelye, mercimek ve yabancı türlerden elde edilen rhizobiyal izolatlar kullanılmış ve azotlu ve azotsuz kontrol çalışmalarının yanı sıra izolatların karışımından oluşan gruplar oluşturulmuştur. Kontrollü ortamda nodülasyon testleri ilk kez bu çalışmada yapılmıştır.

Bakla bitkisinin hangi izolatu seçtiğinin belirlenmesinde RAPD işlemi başarısız olmuş, daha sonra ITS-PCR çalışması yapılmıştır. ITS bölgesi izolatların ayırımında büyük kolaylık sağlamıştır. Elde edilen sonuçlardan *Vicia* grubu içinde genellikle rhizobia-baklagil seçiciliğinin olduğu gösterilmiştir. Rhizobiyal izolatların ayrılmasında ITS dizileme işlemi ilk kez bu çalışmada uygulanmıştır.

Vicia grubu içinde rhizobia-baklagil seçiciliğinin nedeninin NodD proteinin bağlandığı promotor bölgesi olan *nod* kutusu kaynaklı olup olmadığı anlaşılması için tasarlanan özel primerler ile dizileme işlemi yapılmıştır. Elde edilen dizilerin incelenmesi sonucunda, *nod* kutusu bölgesi farklılıklarının izolat tercihinde doğrudan bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*, *Vicia faba*, rhizobia-baklagil seçiciliği, RAPD-PCR, ITS-PCR, *nod* kutusu

INVESTIGATION OF SELECTIVITY OF RHIZOBIAL SYMBIONTS THROUGH MOLECULAR METHODS IN LEGUMES OF *Vicia* GROUP

ABSTRACT

Rhizobium leguminosarum biovar. *viciae* isolates obtained from the root nodules of bean (*Vicia faba* L.), pea (*Pisum sativum* L.), lentil (*Lens culinaris* Medic.), the wild species narbon vetch (*Vicia narbonensis* L.) and brown vetchling (*Lathyrus setifolius* L.) grown in some provinces (Samsun, Ordu, Amasya, Sinop and Corum) in the Central Black Sea Region were used to test if there was the selectivity of the rhizobia-legume in *Viciae* group as reported in the literature in this study. A total of 26 isolates from our laboratory culture collection and belong to bean, pea, lentil and wild species were used.

The isolates were first separated into groups for the implementation of nodulation tests using RAPD.

For nodulation test, rhizobial isolates obtained from broad bean, pea, lentil and wild species were used and the groups consisting of the mixture of isolates as well as control experiments with and without nitrogene were set out. Nodulation tests in a controlled environment were conducted for the first time in this study.

To determine which isolates were choosen by legumes, RAPD was tried first. Whenever it failed, ITS-PCR which has been provided great convenience for the differentiation of isolates were conducted. Our results showed that there was generally the rhizobia-legume selectivity within *Vicia* group. ITS sequencing used to separate the rhizobial isolates were applied for the first time.

Moreover, to see if the cause of rhizobia-legume selectivity was based on *nod* box, promoter region linked to NodD proteins was sequenced using specially designed primers. It was found that sequence differences in *nod* box region have no a direct influence in the selection of isolates.

Key Words:. *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*, *Vicia faba*, rhizobia-legume selectivity, RAPD-PCR, ITS-PCR, *nod* box

1. GİRİŞ

Rhizobia, baklagil bitkileriyle simbiyotik azot fiksasyonu oluşturan toprak bakterilerinin filogenetik olarak çeşitli gruplarına verilen genel bir isimdir (Akçay ve Roughgarden, 2007). Mutualistik ilişkilerden biri olan rhizobia-baklagil ilişkisi insanlar ve ekosistemler için en önemli ekolojik etkileşimler arasında yer almaktadır. Küresel düzeyde simbiyotik olarak üretilen azot miktarının, ticari gübre üretiminden elde edilen azot kadar olduğu düşünülmektedir (Gordon ve diğ., 2001).

Baklagil bitkilerinde azot fikse eden nodüllerin oluşumu, *Rhizobium* ve konukçu baklagil arasında meydana gelen özel seçim ile olmaktadır. Örneğin *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* *Pisum*, *Vicia*, *Lens* ve *Lathyrus* cinsleriyle simbiyotik ilişki oluşturmaktadır (Surin ve Downie, 1988).

Bakteriler baklagil türleri için spesifiktir ve kök nodül yapısının eşsiz bir farklılaşma süreciyle sonuçlanır. Her bir basamak aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Baklagil kökleri flavonoid olarak adlandırılan özel kimyasalları salgılar, bu sinyal molekülleri rizosferdeki rhizobiumları çeker.
2. Flavonoidler aynı zamanda nod faktörleri adı verilen lipokitin oligosakkaritlerin üretimi için rhizobiyal genomda *nod* genlerinin transkripsiyonunu indükler.
3. Bitki kökü, Nod faktörlerinin kimyasal yapısını tanır ve bu lipokitin oligosakkarit moleküller baklagil reseptör kinazlarca alınır. Nod faktörleri bitki saçak köklerini aktive eder ve bu tanıma işlemi bakteri ve baklagil arasında özeldir.
4. Simbiyotik bakteriler saçak kökler üzerine yerleşir ve kök içerisine girerler; bu durum kök enfeksiyonu olarak adlandırılır.
5. Bakteriler bir lipopolisakkarit kapsül üretir. Bu kapsül rhizobiumların bitki savunma sistemini aşp, enfeksiyon ipliği adı verilen yapıyla köke girmesini sağlar.
6. Fitohormonlar kök hücre bölünmesini uyarmak için bakteriler tarafından üretilir ve bitki kökü, nodülü oluşturmak için hızlı bir şekilde büyür.

7. Kök nodül bakterileri düşük azotlu ortama ve nodüldeki azalmış oksijen seviyesine uyum sağlamışlardır. Bazı durumlarda bakteriler yuvarlak hücreler ya da 'Y' biçimindeki hücreler oluşturarak farklılaşır. Bu farklılaşan bakteriler bakteroidlerdir ve bu hücresel birimler azot fiksasyonu için önemlidir (Barton ve Northup, 2011).

van Berkum ve diğ. (1995) yaptıkları rDNA-RFLP çalışmasında bakla bitkisi kök nodüllerinden elde edilen *Rhizobium* izolatlarının, *Pisum sativum* Medik., *V. villosa* Roth, ve *Trifolium* spp. ait bitkilerde bulunanlardan ayırt edilebildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmanın ana düşüncesini bu hipotez oluşturmakta olup; söz konusu rhizobiyal topluluktan bitkinin nasıl seçim yaptığı ve hangi formları seçtiğinin belirlenmesi gereken hususlardandır. Söz konusu seçimin doğru bir şekilde ekolojik faktörler de dikkate alınarak tayini özellikle hem inokulant çalışmaları açısından hem de ülkemizde yaygın bir şekilde üretimi yapılan bu bitkiler açısından önemli sonuçlar doğurabilecek potansiyele sahiptir. Dolayısıyla partner seçimi ile ilgili uygun moleküler yöntemlerin belirlenmesi yukarıda belirtilen yararların sağlanabilmesi açısından önemlidir. Moleküler biyolojide günümüzde yaygın şekilde kullanılmakta olan bazı belirteçler kullanılarak söz konusu yöntemler geliştirilebilir.

Bir tür içindeki izolatlar arasındaki genetik çeşitliliği kolay bir şekilde belirlemek için RAPD kullanılmaktadır (Álvarez-Martínez ve diğ., 2009). Çünkü bu metot oldukça ayırt edicidir ve çok sayıdaki izolata kolaylıkla uygulanabilir (Handley ve diğ., 1998). RAPD, polimeraz zincir reaksiyonu temelli bir tekniktir. DNA dizisindeki değişiklikleri belirlemek için isteğe bağlı primerler kullanılarak yapılır. Dizi varyasyonları çoğaltılan ürünlerin sayısı ve uzunluğuna bağlı olarak ortaya çıkar. Filogenetik ilişkiler RAPD parmak izlerinin istatistiksel analizlerinden oluşturulur (Young ve Cheng, 1998). RAPD'in yakın akraba bakterileri ayırmada kullanışlı olduğu bulunmuştur (Rajasundari ve diğ., 2009).

Rhizobium leguminosarum genomunun kromozomal kısmının 16S ve 23S ribosomal DNA (rDNA) genlerinin arasında yer alan ITS (ara transkripsiyon bölgesi - internal transcribed spacer) kullanılarak rhizobiyal izolatlar karakterize edilmektedir. ITS kromozomal değişiminin bir göstergesi olarak yorumlanabilir (Palmer ve Young, 2000). ITS bölgesi yakın ilişkili taksonomik gruplarda bile büyüklük ve dizi içeriği olarak oldukça çeşitlidir (Gürtler and Stanisich, 1996). Palmer ve Young (2000) PCR-ITS RFLP ve Kwon ve diğ. (2005) PCR-ITS dizileme

yöntemlerini *Rhizobium* izolatların genetik polimorfizmini ortaya çıkarmak için kullanmışlardır.

nodD filogenisi büyük oranda kromozomal lokuslardan bağımsızdır, soy hatları arasındaki çoklu gen transferlerini yansıtmaktadır (Tian ve diğ., 2010). NodD, *nodABC*'nin aktivasyonu için konukçu kökenli olan flavonoidlerle birleşmelidir; aktivasyon işlemi NodD'nin promotor bölgesi *nod* kutusuna bağlanmasını gerektirmektedir (Long, 1989). Bakla ile belirli *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları arasındaki özgünlüğün, nodülasyon testleri ile gösterileceği çalışmalarda; bu özgünlüğün nedenin *nodD* (aktivatör protein) proteininin bağlandığı *nod* operonunun promotor bölgesi olan *nod* kutusu ile ilgi olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir. *nod* kutusu filogenisinin bu bağlamda farklılığı göstermede kullanılabilecek potansiyel belirteç olduğu düşünülmektedir.

1.1 Tezin Amacı

Baklagiller ile rhizobia arasındaki ilişkinin sonucu olarak gerçekleşen simbiyotik azot fiksasyonu sürdürülebilir tarım için oldukça önemli olup küresel azot döngüsüne önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Gübre kaynaklı azot yokluğunda, bakterilerle simbiyotik azot fiksasyonu bitkinin gelişmesini olanaklı kılar. Baklagiller (özellikle de baklagil tohumları) endüstri için besin, yem ve ham madde bakımından zengin bir kaynak olmaları dolayısıyla, fonksiyonel genomik ve biyoteknoloji çalışmalarında hedef haline gelmişlerdir (Udvardi, 2001).

Baklagil-rhizobia etkileşimi belirli ölçülerde özgün olarak gerçekleşmektedir. Bu simbiyozdaki partner seçimi için farklı teoriler öne sürülmektedir (Denison, 2000; West ve diğ., 2002; Simms ve Taylor, 2002; Schwartz ve Hoeksema, 1998). *Vicia* grubu (IRL soy hattı - Cronk ve diğ., 2006) içerisinde bazı Rhizobiyal grupların özellikle tercih edildiği belirtilmektedir. Örneğin aynı gruptan değişik etkinlik seviyesinde farklı izolatlar tercih edilmektedir. Ancak bu konuda kontrollü, özellikle de moleküler seviyede çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu çalışmada *Vicia* tribe içerisinde yer alan bitkilerden ülkemiz için ekonomik önemi olan bakla (*Vicia faba* L.), bezelye (*Pisum sativum* L.) ve mercimek (*Lens culinaris* Medik.) türleri seçilmişlerdir. Bu bitkilerden elde edilen rhizobiyal izolatların bakla bitkisine inoküle edilmesi sonucunda bakla bitkisinin hangi izolat grubunu seçeceği kontrollü deneyler yapılarak test edilecektir. Böylece literatürde de

(Surin ve Downie, 1988) özgün olarak oluştuğu belirtilen rhizobia-baklagil etkileşimi hipotezinin doğruluğu sınanmış olacaktır.

1.2 Tezin Önemi

Dünya genelinde dikkate değer bir miktarda organik azot, kök nodülasyonu oluşturan rhizobiyal bakteriler ve baklagil konukçu bitkiler arasındaki simbiyotik ilişki yoluyla elde edilmektedir. (Simms ve Taylor, 2002; Postgate, (1998)'dan). Yararlı bitki-mikroorganizma etkileşimlerinin farklı bir çeşidi olarak, çoğunlukla sınırlı azotun olduğu ortamlarda yetişen bitkiler azotu simbiyotik azot fiksasyonu ile elde ederler. Bu ilişkide çok sayıda farklı rhizobiyal izolat etkili olmaktadır (Burdon ve diğ., 1999; Simms ve Taylor, 2002).

Rhizobium leguminosarum biovar. *viciae* izolatlarının *Pisum*, *Vicia*, *Lens* ve *Lathyrus* cinsleriyle spesifik olarak simbiyotik ilişki oluşturduğu literatürde belirtilmektedir (Surin ve Downie, 1988). Bu cinsler ülkemiz için önemli olan yemeklik baklagilleri ihtiva etmektedir. Bu çalışma ile seçimle ilgili hipotezin doğrulanmasını ilk defa yapılacak ve özellikle de yemeklik baklagillerin yetiştirilmesinde gerekli olan biyolojik gübrelerde (söz konusu çalışmalarımızın sonunda geliştirilebilecek yöntemler ile) hangi organizmaların kullanılabileceğinin pratik olarak belirlenmesini sağlayabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

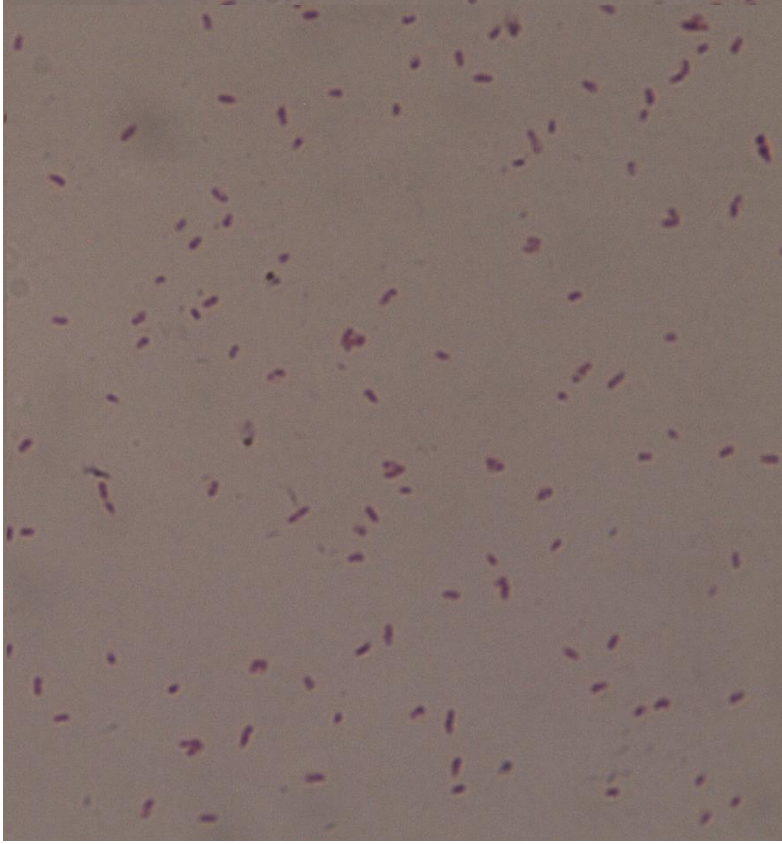
Mutualizm, iki tür arasındaki etkileşimlerin özel bir tipi olup, türler arasında karşılıklı yarar sağlama söz konusudur. Yarar değiş tokuş, bir sunum (bazı besinler) veya bir hizmet (tozlaşma, koruma) olabilir (McGill, 2005). Doğada sık karşılaşılan olaylar olan mutualistik etkileşimler birçok ekosistem için önemli rol oynamaktadırlar (Akçay ve Roughgarden, 2007). Mutualistik ilişkilerden biri olan rhizobia-baklagil ilişkisi insanlar ve ekosistemler için en önemli ekolojik etkileşimler arasında yer almaktadır. Küresel düzeyde simbiyotik olarak üretilen azotun, ticari gübre üretiminden elde edilen azot kadar olduğu düşünülmektedir (Gordon ve diğ., 2001). Rhizobia ve baklagiller arasındaki simbiyotik birliktelik, biyolojik olarak fikse edilen azotun % 80'ini ve dünya genelindeki protein temininin % 25-30'unu karşılamaktadır (McInroy ve diğ., 1999).

Azot, yaşayan organizmaların temel bileşenidir; hem deniz hem de kara ekosistemlerindeki bitkiler tarafından asimile edilmektedir. Sonuç olarak azot, biyosferdeki primer üretimin kontrolünde kritik rol oynamaktadır. Azot, aynı zamanda insanların beslenmelerinde kullandıkları bitkiler için de sınırlayıcı bir faktör olmaktadır (Gruber ve Galloway, 2008). Bununla birlikte bitkiler atmosferdeki gaz halindeki azotu (N_2) kullanamazlar. Bitkilerin azotu absorbe edebilmeleri için azotun önce amonyum (NH_4^+) ya da nitrata (NO_3^-) dönüştürülmesi gerekir. Azot fikse eden bakteriler olarak isimlendirilen bazı bakteriler, azotu (N_2) amonyağa (NH_3) dönüştürerek toprakta depo ederler. Bu işleme azot fiksasyonu adı verilmektedir (Campbell ve Reece, 2008).

2.1 Rhizobia

Tam anlamıyla 'rhizobia' terimi *Rhizobium* cinsi üyelerini ifade etmektedir. Fakat, yıllar içinde bu terim baklagillerle ilişkili olarak nodülasyon ve azot fiksasyonu yapma yeteneğinde olan bakteriler için kullanılır hale gelmiştir (Willems, 2006). Rhizobia, azot fiksasyonu yapmak üzere baklagil köklerinde simbiyoz oluşturan alfa-proteobacteria ve beta-proteobacteria alt grubunda yer alan (Willems, 2006) ve gram

negatif bakterilerdir (Şekil 2.1) (Long, 1996). Bütün rhizobiumlar küçük alt birim (16S) rRNA'nın gen kodu dizisine dayanarak Proteobacteria'nın alfa ve beta altgrubuna yerleştirilmişlerdir (Willems, 2006).



Şekil.2.1. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*'nin mikroskop görüntüsü (büyütme 4x100)

1600'lerin sonlarında Marcelo Malpighi köklerinde gelişmiş nodülleri bulunan baklagilleri resmetmiştir (Barton ve Northup, 2011). 19. yy sonlarında, baklagil bitkilerinin kök nodülleri ile atmosferik azotu asimile ettiği fark edilmiştir. Beijerinck 1888'de kök nodül bakterilerinin izolasyonunu yapmış ve bu bakterilerin azot fiksasyonu sürecinden sorumlu olduklarını açıklamıştır. Bu bakterilere *Bacillus radicola* ismini vermiştir (Beijerinck, 1888; Willems (2006)'dan). Daha sonra, Frank cins ismini *Rhizobium* olarak değiştirmiş ve cins başlangıçta *R. leguminosarum* olarak tek bir türden oluşmuştur (Frank, 1889; Willems (2006)'dan).

20. yy'ın başlarında, farklı bakterilerle çeşitli baklagil bitkilerinin nodülasyon testleri, çapraz-aşılama gruplarının oluşmasına yol açmıştır. Bu deneylerde çapraz aşılama grubu içindeki bir bitkiden elde edilen rhizobiumların, gruptaki diğer tüm bitkilerle nodül oluşturması beklenmiştir (Fred ve diğ., 1932; Willems (2006)'dan). Bu kavram rhizobial taksonomide de kullanılmış, fakat daha sonra güvenilir bir

taksonomik belirteç olmadığı için bu gruplandırmadan vazgeçilmiştir (Wilson, 1944; Graham, 1964; Willems (2006)'dan). 1960'ların başlarında bakteriyologlar nümerik taksonomi çalışmalarında morfolojik, besinsel ve metabolik karakterlerin çeşitliliğini (Graham, 1964; 'tMannetje, 1967; Moffet ve Colwell, 1968; Willems (2006)'dan), serolojiyi (Graham,1963; Vincent ve Humphrey, 1970; Willems (2006)'dan) ve basit DNA karakterlerini (De Ley ve Rassel, 1965; Willems (2006)'dan) kullanmaya başlamıştır. *Rhizobium* ve *Agrobacterium* ilişkisi ortaya çıkarılmıştır ve hızlı ve yavaş gelişen rhizobia olarak net bir ayrım oluşmuştur (Graham, 1964; Willems (2006)'dan), bir diğer grup *Bradyrhizobium* ayrı bir cins olarak yerleştirilmiştir (Jordan, 1982). 1980'lerden itibaren, daha çok genetik karakterin (DNA-DNA ve DNA-rRNA hibritizasyonu, rRNA katalogları, rDNA dizileme) girişiyle rhizobia ve onların ilişkili olduğu diğer bakteri grupları arasında daha fazla çeşitlilik olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durum cins sayısında kademeli bir artışa yol açmıştır (Willems, 2006).

Önceleri kök nodül bakterilerinin sınıflandırılması, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabının birinci baskısında hızlı ve yavaş gelişen mikroorganizmalar olarak iki cins, yani *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* olmak üzere yapılmıştır. Hızlı gelişen rhizobia başlangıçta 3 tür içinde ayrılmıştır: *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* ve *Rhizobium loti* (Rajasundari ve diğ., 2009). 2012 yılında tanımlanmış tür sayısı 44'e çıkmışken (Qin ve diğ., 2012), günümüzde ise bu sayı 86'ya ulaşmıştır (Çizelge 1.1). Bu çalışmanın konusunu oluşturan *Rhizobium leguminosarum* üç biyolojik varyete içermektedir. Bunlar *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* ve *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*'dir (Rajasundari ve diğ., 2009).

Çizelge 2.1. Tanımlanmış *Rhizobium* türleri

<i>R. leguminosarum</i>	Frank, 1889; Willems (2006)'dan
<i>R. radiobacter</i>	Smith ve Townsend, 1907; Young ve diğ. (2005)'den
<i>R. rhizogenes</i>	Riker ve diğ., 1930; Young ve diğ. (2005)'den
<i>R. rubi</i>	Hildebrand 1940; Young ve diğ. (2005)'den
<i>R. galegae</i>	Lindström (1989)
<i>R. vitis</i>	Ophel ve Kerr (1990)
<i>R. tropici</i>	Martinez-Romero ve diğ. (1991)
<i>R. etli</i>	Segovia ve diğ. (1993)
<i>R. giardinii</i>	Amarger ve diğ. (1997)
<i>R. gallicum</i>	Amarger ve diğ. (1997)
<i>R. hainanense</i>	Chen ve diğ. (1997)
<i>R. undicola</i>	de Lajudie ve diğ. (1998)
<i>R. mongolense</i>	van Berkum ve diğ. (1998)
<i>R. huautlense</i>	Wang ve diğ. (1998)
<i>R. larrymooreii</i>	Bouzar ve diğ. (2001)
<i>R. yanglingense</i>	Tan ve diğ. (2001)
<i>R. sullae</i>	Squartini ve diğ. (2002)
<i>R. indigoferae</i>	Wei ve diğ. (2002)
<i>R. loessense</i>	Wei ve diğ. (2003)
<i>R. daejeonense</i>	Quan ve diğ. (2005)
<i>R. lusitanum</i>	Valverde ve diğ. (2005)
<i>R. cellulolyticum</i>	Garcia-Fraile ve diğ. (2007)
<i>R. selenitireducens</i>	Hunter ve diğ. (2007)
<i>R. miluonense</i>	Gu ve diğ. (2008)
<i>R. multihospitium</i>	Han ve diğ. (2008)
<i>R. oryzae</i>	Peng ve diğ. (2008)
<i>R. phaseoli</i>	Ramirez-Bahena ve diğ. (2008)
<i>R. pisi</i>	Ramirez-Bahena ve diğ. (2008)
<i>R. fabae</i>	Tian ve diğ. (2008)
<i>R. alamii</i>	Berge ve diğ. (2009)
<i>R. tibeticum</i>	Hou ve diğ. (2009)
<i>R. mesosinicum</i>	Lin ve diğ. (2009)

Çizelge 2.1 (devam). Tanımlanmış *Rhizobium* türleri

<i>R. alkalisoli</i>	Lu ve diğ. (2009)
<i>R. endophyticum</i>	López-López ve diğ. (2010)
<i>R. kunmingense</i>	Shen ve diğ. (2010)
<i>R. soli</i>	Yoon ve diğ. (2010)
<i>R. aggregatum</i>	Kaur ve diğ. (2011)
<i>R. rosettiiformans</i>	Kaur ve diğ. (2011)
<i>R. pusense</i>	Panday ve diğ. (2011)
<i>R. herbae</i>	Ren ve diğ. (2011a)
<i>R. vignae</i>	Ren ve diğ. (2011b)
<i>R. vallis</i>	Wang ve diğ. (2011)
<i>R. phenanthrenilyticum</i>	Wen ve diğ. (2011)
<i>R. sphaerophysae</i>	Xu ve diğ. (2011)
<i>R. borbori</i>	Zhang ve diğ. (2011a)
<i>R. tubonense</i>	Zhang ve diğ. (2011b)
<i>R. pseudoryzae</i>	Zhang ve diğ. (2011c)
<i>R. halophytocola</i>	Bibi ve diğ. (2012)
<i>R. naphthalenivorans</i>	Kaiya ve diğ. (2012)
<i>R. cauense</i>	Liu ve diğ. (2012)
<i>R. grahamii</i>	López-López ve diğ. (2012)
<i>R. mesoamericanum</i> (	López-López ve diğ. (2012)
<i>R. nepotum</i>	Pulawska ve diğ. (2012a)
<i>R. skierniewicense</i>	Pulawska ve diğ. (2012b)
<i>R. helanshanense</i>	Qin ve diğ. (2012)
<i>R. leucaenae</i>	Ribeiro ve diğ. (2012)
<i>R. taibaishanense</i>	Yao ve diğ. (2012)
<i>R. petrolearium</i>	Zhang ve diğ. (2012)
<i>R. freirei</i>	Dall'Agnol ve diğ. (2013)
<i>R. halotolerans</i>	Diange ve Lee (2013)
<i>R. pongamiae</i>	Kesari ve diğ. (2013)
<i>R. paknamense</i>	Kittiwongwattana ve Thawai (2013)
<i>R. endolithicum</i>	Parag ve diğ. (2013)
<i>R. subbaraonis</i>	Ramana ve diğ. (2013)

Çizelge 2.1 (devam). Tanımlanmış *Rhizobium* türleri

<i>R. calliandrae</i>	Rincón-Rosales ve diğ. (2013)
<i>R. mayense</i>	Rincón-Rosales ve diğ. (2013)
<i>R. jaguaris</i>	Rincón-Rosales ve diğ. (2013)
<i>R. tarimense</i>	Turdahon ve diğ. (2013)
<i>R. qilianshanense</i>	Xu ve diğ. (2013)
<i>R. paranaense</i>	Dall'Agnol ve diğ. (2014)
<i>R. flavum</i>	Gu ve diğ. (2014)
<i>R. pakistanensis</i>	Khalid ve diğ. (2014)
<i>R. lemnae</i>	Kittiwongwattana ve Thawai (2014)
<i>R. straminoryzae</i>	Lin ve diğ. (2014)
<i>R. populi</i>	Rozahon ve diğ. (2014)
<i>R. laguerreae</i>	Saïdi ve diğ. (2014)
<i>R. smilacinae</i>	Zhang ve diğ. (2014a)
<i>R. rhizoryzae</i>	Zhang ve diğ. (2014b)
<i>R. metallidurans</i>	Grisson ve diğ. (2015)
<i>R. capsici</i>	Lin ve diğ. (2015)
<i>R. lentis</i>	Rashid ve diğ. (2015)
<i>R. binae</i>	Rashid ve diğ. (2015)
<i>R. bangladeshense</i>	Rashid ve diğ. (2015)
<i>R. alvei</i>	Sheu ve diğ. (2015)
<i>R. anhuiense</i>	Zhang ve diğ. (2015a)
<i>R. oryzicola</i>	Zhang ve diğ. (2015b)

2.2 *Fabaceae* (Baklagiller)

Fabaceae (Baklagiller) 18.000'den fazla türün bulunduğu büyük ve çeşitlilik gösteren gelişmiş bir bitki familyasıdır (Sprent, 2001; Brewin (2004)'den). *Orchidaceae* (Orkidegiller) ve *Asteraceae* (papatyagiller)'nin ardından en büyük üçüncü çiçekli bitki ailesidir (Haider ve diğ., 2012). Baklagillerin ayırıcı özelliği gram negatif kök nodül bakterlerinin çeşitli gruplarıyla azot fiksasyonu yapma yeteneğidir (Spaink ve diğ., 1998; Brewin (2004)'den). Yaklaşık olarak bütün baklagil türlerinin %90'dan fazlasında *Rhizobium* izolatlarınca nodül oluşturulur (Sprent, 2001; Brewin (2004)'den).

Rhizobium nodülasyon davranışı *Fabaceae* veya baklagil ailesi ile sınırlıdır. Bu familya içinde bakterilerin her bir tür, suş veya biyolojik varyeteleri konukçu bitkilerin sınırlı bir grubunda nodül oluşturmaktadır (Long, 1996). *Fabaceae* familyası içerisinde bulunan *Vicia* cinsi IRL soy hattında (IRLC - inverted repeat loss clade) yer almaktadır. Bu soy hattı, ekonomik olarak önemli *Vicia* grubu cinslerini barındırır; bu cinsler *Vicia*, *Lens*, *Pisum*, *Trifolium*, *Medicago*, *Cicer* ve *Galega*'dır (Cronk ve diğ., 2006).

Baklagil bitkilerinde azot fikse eden nodüllerin oluşumunun, *Rhizobium* ve konukçu baklagil arasında meydana gelen özel seçim ile olmaktadır. *Rhizobium Ieguminosarum* biovar. *viciae* örneğin *Pisum*, *Vicia*, *Lens* ve *Lathyrus* cinsleriyle simbiyotik ilişki oluşturmaktadır (Surin ve Downie, 1988).

2.2.1 *Vicia faba* (Bakla)

Vicia cinsi Orta Doğu'da dağılım gösteren ekonomik olarak önemli birçok yiyecek ve yem baklagil türünü ihtiva etmektedir (Maxted, 1995). Baklanın kökeni ve kültürleştirilmesi hakkında birçok görüş vardır: Cubero (1973, 1974) kökenin merkezinin yakın doğu olduğunu kabul eder ve bu merkezden dört farklı bölgeye yayılış olmuştur: (1) Avrupa'ya, (2) Kuzey Afrika kıyılarından İspanya'ya, (3) Nil'den Etopya'ya, (4) Mezopotamya'dan Hindistan'a. Diğer bir dağılım merkezinin ise Afganistan ve Etopya'da olduğu iddia edilmiştir. Fakat Ladizinsky (1975) baklanın kökeninin Orta Asya'da olduğunu bildirmiştir. Bir diğer görüşe göre ise kökenin merkezi Güneydoğu Avrupa ve Güneybatı Asya'dır (Muratova, 1931; Maxted (1995)'den; Maxted, 1995).

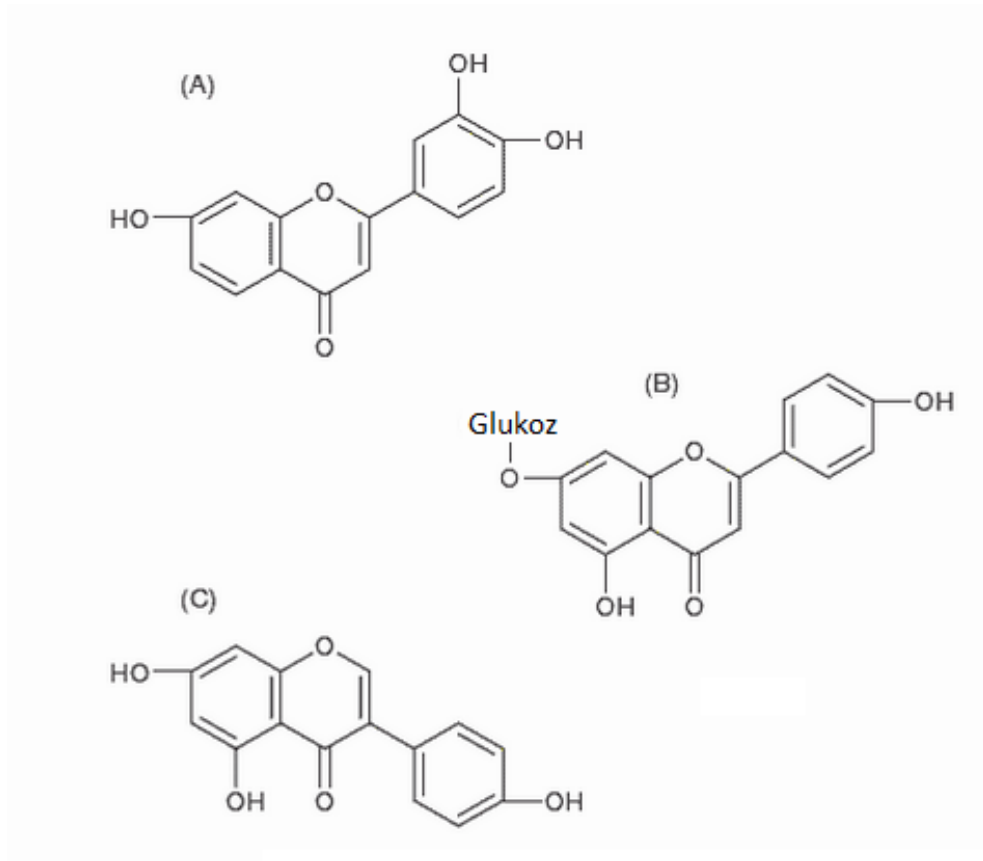
Bakla dünyadaki en eski tarım ürünlerinden biridir. Bakla tarafından gerçekleştirilen azot fiksasyonu daha sonraki tarım ürünleri için toprak azotunun artmasını sağlar. Aynı zamanda 150-300 kg N ha⁻¹ serbest azot fikse etme potansiyeli bulunduğu için yeşil gübre olarak da kullanılır. İyi bir lisin ve levodopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)) kaynağıdır. Dopaminin öncüsü olan levodopa Parkinson hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanılabilir. Aynı zamanda yüksek tansiyonun kontrolüne yardımcı olur (Singh ve diğ., 2012).

van Berkum ve diğ. (1995) yaptıkları rDNA-RFLP çalışmasında bakla bitkisi kök nodüllerinden elde edilen *Rhizobium* izolatlarının, *Pisum sativum* Medik., *V. villosa* Roth, ve *Trifolium* spp. ait bitkilerde bulunanlardan ayırt edilebildiğini göstermişlerdir.

2.3 Bakteri-Bitki Etkileşimi

Bitki ve *Rhizobium* arasındaki etkileşim nodülasyonun meydana gelmesi için gereklidir ve rhizobia nodülasyon genleri konukçu spesifikliğini belirlemede etkindir (Surin ve Downie, 1988). Konukçu bitkiden yapılan izolasyon populasyon yapısının tamamı hakkında bir fikir verir, çünkü bazı rhizobiumlar baklagillerde nodül yapamazlar ve bu izolatların toplam rhizobianın önemli bir bölümünü oluşturduğu rapor edilmiştir (Laguerre ve diğ., 1993).

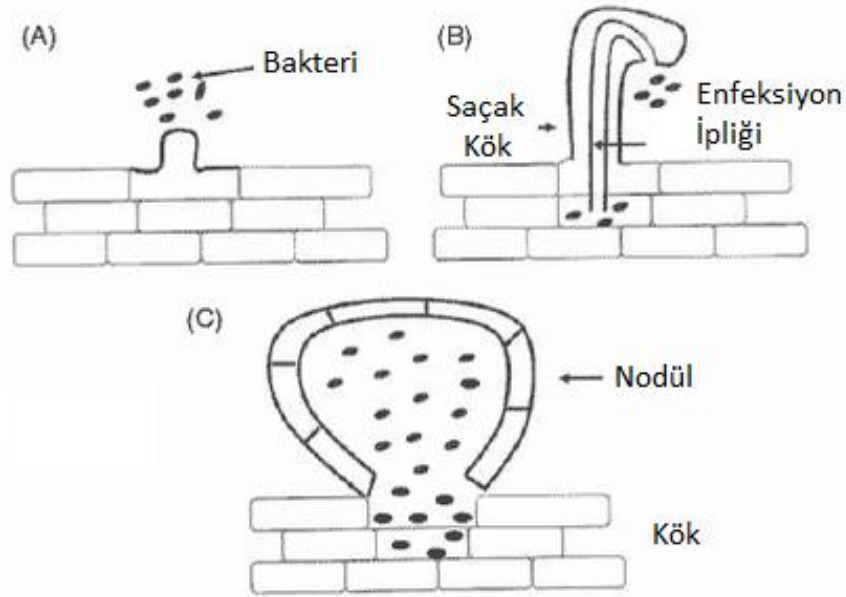
Yabani baklagiller ve simbiyontlarının tuzluluk, şiddetli kuraklık ve yüksek sıcaklık gibi aşırı çevre koşullarına toleransları çevre bilimcilerin dikkatini çekmiştir. Doğal olarak gelişen baklagillerin simbiyotik rhizobiumları bu koşullar altında başarıyla etkili simbiyozlar oluşturabilmektedirler (Zahran, 2001).



Şekil 2.2. Baklagil kökleri tarafından üretilen flavonoid bileşikler; bu flavonoidler rhizobiumların *nod* genleri ile etkileşime geçerler. (A) Yonca (alfalfa) kökleri tarafından salgılanan flavon veya luteolin; (B) üçgül (clover) kökleri tarafından salgılanan flavon glukozid veya apigenin; (C) soya fasulyesi köklerinden salınan izoflavon veya daidzein (Barton ve Northup, 2011).

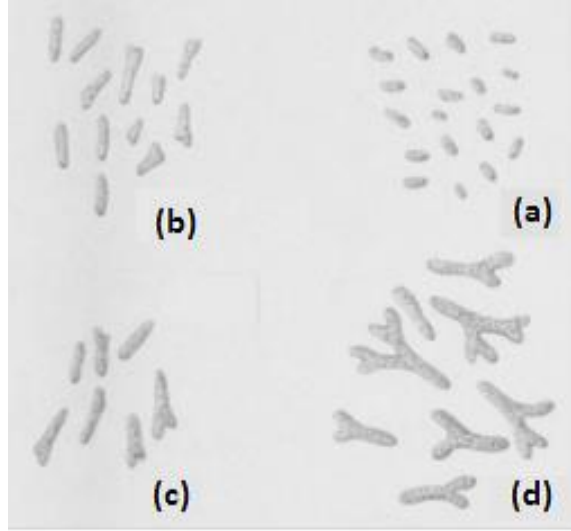
Bitki genellikle sinyal olarak bir flavonoid (Şekil 2.2) üretir (Long, 1996), bu organik bileşikler türler arasında değişiklik gösterir (Moschetti ve diğ., 2005). Bu sinyal bakteride gen ekspresyonunu uyarır. Bakteri daha sonra bitkide erken nodül gelişimini tetikleyen bir sinyal molekülü sentezler (Long, 1996). Bakteri bitki köklerinde nodül olarak bilinen organın oluşumunu teşvik eder (Oke ve Long, 1999).

Baklagil nodül gelişimi sırasında, konukçu hücreleri ile bunların simbiyotik partnerleri bitki-mikrobiyal hücre arabiriminde moleküler etkileşimin yeni formlarının gelişimine yol açan ardışık bir metamorfoz geçirir (Brewin, 1991). Rhizobia tarafından doku ve hücre kolonizasyonu, enfeksiyon ipliğinin bazı formları ile ilişkilidir (Şekil 2.3). Enfeksiyon ipliği, bitkinin hücre dışı matriksine gömülü ve bitki hücre duvarı materyaliyle sınırlandırılmış istilacı bakteri kolonları olarak tanımlamaktadır (Brewin, 1998).



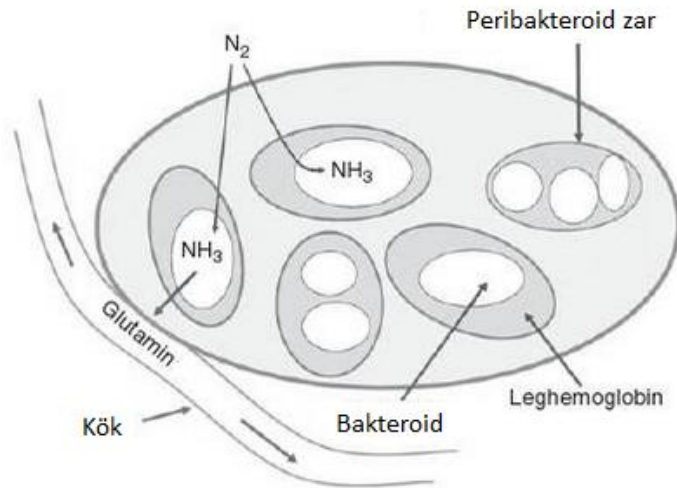
Şekil 2.3. Baklagildeki kök nodülünün gelişimi: (A) bakterileri etkileyen bir kimyasalın saçak köklerden salgılanmasıyla bir dizi olayın başlaması; (B) kök korteksinin içerisine bakterilerin taşınması için oluşturulan bir enfeksiyon ipliği; (C) nodül yapısının meydana gelişi (Barton ve Northup, 2011).

Nodül içindeki bakteriler bakteroid adıyla farklılaşmış formda yaşam sürerler (Schlaman, 1992; Schlaman ve diğ. (1998)'den). Bakteroid farklılaşması (Şekil 2.4) ilk olarak 1888'de Beijerinck tarafından bakterilerin çubuk şeklinden Y şeklindeki hücrelere dönüşümü olarak tanımlanmıştır (Oke ve Long, 1999).



Şekil 2.4. 1888’de Beijerinck tarafından yapılan çizim, bakteroid farklılaşması süresince morfolojik değişimler gösterilmektedir. Hücreler bir *Vicia sativa* nodülünün kesitlerinden alınan çizimlerdir. En genç hücreler (a) çubuk biçimindedir, bunu (b) ve (c) izler, sonunda en yaşlı hücreler (d) Y-biçimindeki bakteroid şeklini alırlar (Oke ve Long, 1999).

Konukçu bitkinin içindeki bu bakteroidler atmosferik azotu amonyağa indirgeyerek azot fiksasyonu yaparlar (Şekil 2.5). Etkili nodül oluşturan bakteri suşlarının yeteneği belli konukçu bitkilerle (genellikle baklagiller familyasından bitkilerle) sınırlıdır. Örneğin *Vicia* ve *Pisum* türleri *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* için konukçu bitkilerdir (Schlaman, 1992; Schlaman ve diğ. (1998)’den). Azotun bu kullanılabilir formu besinler karşılığında bitkiyle değiş tokuş edilir (Oke ve Long, 1999).



Şekil 2.5. Baklagil kök nodülünün modeli. Bir ya da daha fazla bakteroid içeren nodül simbiozomları azot fikse eder (Barton ve Northup, 2011).

Nitrogenaz enzimi oksijene duyarlıdır, nodüldeki leghemoglobin azot fiksasyonuna olanak vermek amacıyla serbest oksijen seviyesini düşürür. Azot fiksasyonu ürünü olarak glutamin üretilir, bu amino asit protein sentez bölgelerine saçak kökleri aracılığıyla transfer edilir. Simbiyotik birliğin kurulması, çoğunlukla bakteri ve baklagil arasında yüksek seviyede spesifiktir. Fakat bazı toprak rhizobiumları birkaç baklagil türünde nodül oluşturabilir ve bu durum farklı rhizobiumlar arasında Sym plazmitteki Nod faktörlerinin lateral gen transferine dayanabilir (Barton ve Northup, 2011).

2.4 Rhizobia Stratejileri

Rhizobia stratejileri, mutualistik azot fiksasyonundan parazitik (fiksasyon yapamayan) formlara kadar çok çeşitli tiplerde karşımıza çıkmaktadır (Friesen ve Mathias, 2010). Bitkiler ve toprak mikroorganizmaları arasındaki besin kazanma simbiyozları bitki evrimi ve ekosistem fonksiyonları bakımından kritik öneme sahiptir. Partner seçimi ve partner bağlılığı karşılıklı haberleşme ile ilişkili bir mekanizmadır ve teorik olarak azot fikse edemeyenler ile de mutualizme izin verilir (Simms ve Taylor, 2002). Dinamik bir süreç olan partner seçimi rhizobiumların yeteneklerini de etkilemektedir. Bitkiler simbiyozun ilk dönemlerinden itibaren yararlı rhizobiyal sinyalleri tanıyarak gelişirler (Heath ve Tiffin, 2009). Konukçu bitki yararlı rhizobiayı daha büyük nodül büyüme oranıyla ödüllendirir (Friesen ve Mathias, 2010). Baklagillerin bazı yararlı olmayan rhizobiayı cezalandırdığı ve kabiliyetlerini azalttığı gösterilmiştir, fakat bu yaptırımlar tüm rhizobia-baklagil simbiyozlarında etkili olmamaktadır (Sachs ve Simms, 2008). Cezalandırma mekanizması nodüler rhizobiyal yaşam gücünün düşmesini ve/veya nodül erken yaşlanmasını içerebilmektedir (Marco ve diğ., 2009). Rhizobia-baklagil simbiyozunda önemli genotip x genotip etkileşimleri tespit edilmiştir. Genotip, azot ve biyotik bağımlılık ilişkisinin kalitesi bakımından genetik varyasyonun devamına katkıda bulunabilmektedir (Heath ve Tiffin, 2007). Türler ve genotiplerin uygunluğunun önemli rol oynamasıyla birlikte, suşların çevresel koşullara adaptasyonu da partner seçiminde önemlidir (Rangin ve diğ., 2008). Lektinlerin ve özellikle de onların karbonhidrat bağlı domainlerinin rhizobia-baklagil simbiyozunda önemli rolleri bulunmaktadır (Baimiev ve diğ., 2005). Rhizobia ile baklagil konukçuları arasındaki moleküler tanıma sinyalleri, bu simbiyotik ilişkide partnerin

kalitesini belirlemektedir (Denison, 2001). Bitki ve nodülleri arasındaki biyokimyasal görüşmelerin bir sonucu olarak mutualizm ortaya çıkmakta ve bunun sonucunda yararlı *Rhizobium* suşları bitki tarafından ödüllendirilmektedir (Akçay ve Roughgarden, 2007; Akçay ve Simms, 2011).

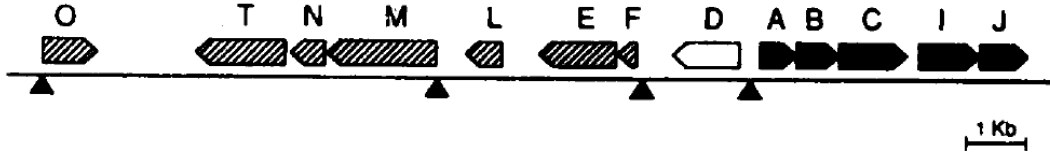
Şu ana kadar mutualistik etkileşimlerin nasıl geliştiği ve doğal seleksiyon tarafından nasıl korunduğu konusundaki bilginiz sınırlı kalmıştır. Bu problem üç çerçeve içinde çalışılmıştır: evrimsel oyun teorisi (Denison, 2000; West ve diğ., 2002), market teorisi (partner seçimi; Simms ve Taylor, 2002) ve ticaret avantajı modelleri (Schwartz ve Hoeksema, 1998). Hem evrimsel oyun teorisi hem de market teorisi yaklaşımları mutualizme nasıl zorlanıldığına odaklanırken, ticaret avantajı modelleri yarar değiş tokuşunun hangi şartlar altında avantajlı olduğunun önceden belirlenmesini amaçlamaktadır (Akçay ve Roughgarden, 2007). Rhizobia-baklagil ilişkisindeki partner seçimi bir çok araştırmacı tarafından farklı teorilerle açıklanmaktadır; Simms ve Taylor (2002) market modeli adını verdikleri teorilerinde bir partner, potansiyel partnerler marketinden seçilen bireylerin bir alt kümesiyle alışveriş yapmayı seçtiğini varsaymaktadır. Partner seçimini rhizobia-baklagil ilişkisinde evrimsel süreklilikle açıklamışlardır. West ve diğ. (2002), rhizobia için azot fiksasyonun evrimsel olarak kararlı olduğunu söylemektedir. Kiers ve diğ. (2003), nodüllerin performanslarına göre ödüllendirildiklerini öne sürmektedirler.

2.5 Nodülasyon Genleri ve *nod* Kutusu

Baklagil bitkilerinde rhizobia tarafından oluşturulan kök nodül yapısı simbiyoz veya Sym plazmit olarak isimlendirilen büyük bir plazmit üzerinde bulunan genlerin kontrolü altındadır. NodD ile uyumlu olarak bitki flavonoidleri *nod* genlerinin (Çizelge 2.2) ekspresyonunu uyarmaktadır. NodD proteini pozitif transkripsiyon aktivatörü olarak görev yapar. Tüm indüklenebilir *nod* genleri ve operonlarının önünde yer alan *nod* kutusuna bağlanır (Şekil 2.6). Oldukça korunmuş DNA dizisine sahip olan *nod* kutusu *nod* gen ekspresyonunda cis-acting düzenleyici element gibi görev yapmaktadır (Moat, 2002). de Maagd ve diğ. (1989) restriksiyon bölgelerinin klonlanmasıyla *nod* kutusu bölgesinin dizi analizini yapmışlardır.

Çizelge 2.2. Nodülasyonla ilgili genler, bilinen fonksiyonları veya aktiviteleri (Moat, 2002)

İsim	Fonksiyon ya da aktivite
<i>nodD</i>	Pozitif transkripsiton aktivatörü: bütün indüklenabilir operonların önünde yer alan <i>nod</i> kutusuna bağlanır
<i>nod</i> kutusu	Oldukça korunmuş DNA dizisi; <i>nod</i> genlerinin ekspresyonunun <i>cis</i> -acting düzenleyici elementi
<i>nodA</i>	N-Açiltransferaz
<i>nodB</i>	Oligokitin deasetilaz
<i>nodC</i>	Oligokitin sentaz
<i>nodFEL</i>	Çekirdek lipooligosakkarite açıl eklenmesi
<i>nodH</i>	Çekirdek lipopolisakkarit yerine başka atom ilavesi
<i>nodI</i>	Nodülasyonun etkisini ve enfeksiyon ipliğinin gelişimi ile ilgili
<i>nodJ</i>	Nodülasyonun etkisini ve enfeksiyon ipliğinin gelişimi ile ilgili
<i>nodM</i>	Fruktoz-6-fosfat:glutamin amidotransferaz
<i>nodP</i>	Sülfat + APS (adenil sülfat) → PAPS (3—fosfoadenil sülfat)
<i>nodQ</i>	Çekirdek lipopolisakkarit yerine başka atom ilavesi
<i>nodS</i>	N-metiltransferaz
<i>nodU</i>	6-O-Karbamoiltransferaz
<i>nodX</i>	Çekirdek lipopolisakkarit yerine başka atom ilavesi
<i>nodZ</i>	6-O-Fukosiltransferaz
<i>noeA</i>	Sülfürltransferaz
<i>noeC</i>	Çekirdek lipopolisakkarit yerine başka atom ilavesi
<i>noeI</i>	2-O-Metiltransferaz
<i>noeJ</i>	Mannoz-1-fosfat guaniltransferaz
<i>noeL</i>	GDP-Mannoz-4,6-dehidrataz
<i>noeK</i>	Fosfomannoz mutaz
<i>nolL</i>	O-açiltransferaz
<i>nolO</i>	Karbamoiltransferaz
<i>nolK</i>	Fukoz sentaz



Şekil 2.6. *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*'de *nod* genlerinin genetik organizasyonu. Genler, transkripiyonları yönüne göre okla gösterilmiştir. Yaygın *nod* genleri siyah oklarla, konukçu spesifik *nod* genleri gölgeli oklarla belirtilmiştir. *nodD* geni ise beyaz ok ile gösterilmiştir. Siyah üçgenlerle *nod* kutularının pozisyonları belirtilmektedir (Schlaman, 1992; Schlaman ve diğ. (1998)'den).

Nodülasyon genlerinin promotor dizisi, iyi bilinen -10 ve -35 veya -70 kutularını içeren bakteriyal promotorla homoloji göstermez. Bu durumla bağdaşarak *E. coli* RNA polimerazın rhizobiyal nodülasyon gen promotorunu tanımadığı bulunmuştur (Fisher ve diğ., 1987). Fakat birçok nodülasyon geninin önünde yer alan *nod* kutusu konsensus DNA dizisinin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Rostas ve diğ., 1986; Schofield ve Watson, 1986; Spaink ve diğ., 1987a; Schlaman ve diğ. (1998)'den).

nod kutusu konsensüs dizisi sırasıyla 2 ve 6 bp ile ayrılmış (korunmamış diziler – çekirdek konsensüs dizileri) 7, 8 ve 26 bp korunmuş modüllerden oluşmaktadır. Genellikle 26 bp modülün 1 ila 13 bp aşağısında daha az korunmuş AT(T)AG dizisi tanımlanabilir. Bu bölgenin G oranı oldukça değişkendir. *nod* kutusuna komşu olan diğer DNA dizisi korunmuş değildir. *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*'de benzersiz olan NodD proteini, çok yüksek düzeyde benzer (korunmuş) fakat aynı olmayan *nod* kutuları ile etkileşime girer (Schlaman ve diğ., 1998).

Nodülasyon genlerinin, bitki konukçuların spesifik enfeksiyonunu ve nodülasyonunu kontrol ettiği belirtilmiştir (Zhang ve diğ., 2000). Nodülasyon (*nod*) ve nitrojen fiksasyon (*nif* veya *fix*) için gerekli olan bakterial genler hızlı gelişen *Rhizobium* türlerinde büyük Sym (simbiyotik) plazmitlerde yer almaktadır (Schofield ve Watson, 1986; Schlaman ve diğ. (1998)'den). *Rhizobia* nodülasyon genlerinin çoğu bakteri bir kültür ortamında geliştirildiğinde sessiz olarak transkribe edilmektedir (Long, 1996).

nodD allelleri çoğunlukla *nod* gen kümesi içinde yerleşmiş olup, birbirleriyle %70-90 hibritizasyon benzerliği paylaşırlar. Fonksiyonel *nodD* geni bulunmayan mutantlar *nod* regulonunu açamazlar ve böylelikle konukçu bitkide nodül

oluşturamazlar (Györgypal, 1991). *nodD* geni *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*'de tek kopya olarak bulunmaktadır (Schlaman ve diğ., 1998).

Rhizobium spp.'nin moleküler tiplendirilmesinde genomun simbiyotik komponent belirteci olan nodülasyon gen bölgesi (*nodD*) kullanılmaktadır (Laguerre ve diğ., 2003; Depret ve Laguerre, 2008; Aoki ve diğ., 2010). *nodD* filogenisi büyük oranda kromozomal lokuslardan bağımsızdır, soy hatları arasındaki çoklu gen transferlerini yansıtmaktadır (Tian ve diğ., 2010).

2.6 Moleküler Yöntemler

2.6.1 RAPD

DNA amplifikasyonu için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı analizler, farklı organizmaların sistematik ve evrimsel eğilimlerine yeni bakış açıları kazandırmıştır. Fakat PCR teknolojisi kullanılarak çeşitli organizmaların genetik analizi yapılması için, primerlerin dizayn ve sentezinin yapılmasına ve bunların yapılabilmesi için de organizmaların genom nükleotid dizilerinin ön bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sınırlamanın çözümü, RAPD'dir (da Cunha Galvão ve Lages-Silva, 2008).

Random Amplification of Polymorphic DNA (Polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu) yani RAPD bir PCR reaksiyonu tipidir. Fakat DNA segmentleri rastgele çoğaltılır (Kumar ve Gurusubramanian, 2011). RAPD analizleri genetik çeşitlilik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler belirteç olarak tanımlanmıştır (Williams ve diğ., 1990). Hedef gen için DNA dizisi bilgisine ihtiyaç yoktur. Primerler dizide herhangi bir yere bağlanabilir, fakat bağlanılan yerin neresi olduğu belirli değildir (Kumar ve Gurusubramanian, 2011). RAPD genel olarak yakın akraba bakteri izolatları arasındaki farklılığı değerlendirmek için kullanılır (Busse ve diğ., 1996).

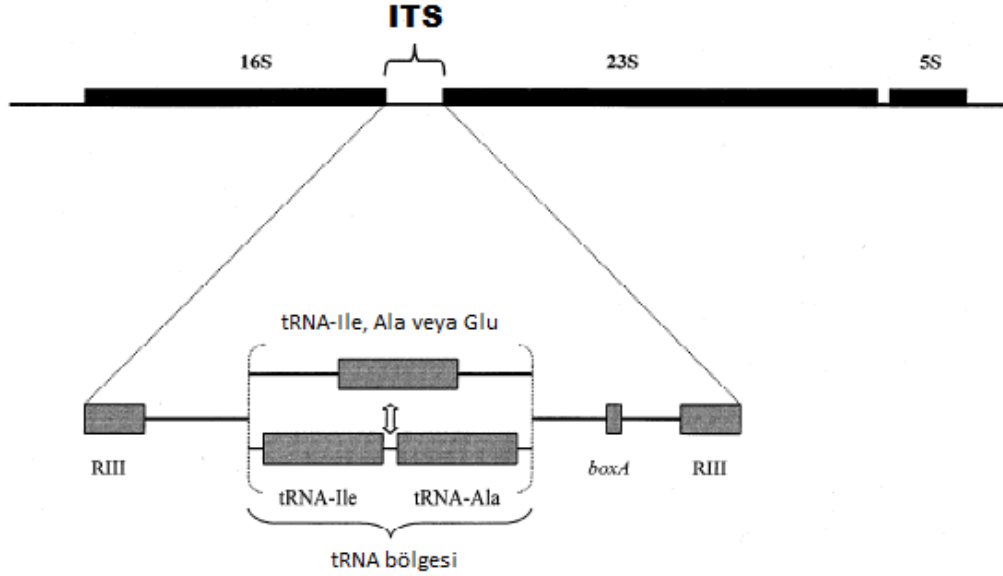
Rhizobia suşları RAPD parmakizi yöntemi kullanılarak çalışılmıştır; bu teknik genetik polimorfizmin ortaya çıkarılması için sıklıkla kullanılmaktadır (Paffetti ve diğ., 1996; Handley ve diğ., 1998; Young ve Cheng, 1998; Coutinho ve diğ., 1999; Sikora ve Redžepović, 2003; Hameed ve diğ., 2004; Moschetti ve diğ., 2005; Rajasundari ve diğ., 2009). RAPD profilleri genetik polimorfizmin araştırılması için yeni yöntemler sağlamaktadır (Rajasundari ve diğ., 2009).

RAPD analizlerinin temel dezavantajı komünitelerin profillerinin istatistiksel karşılaştırılmaları için yeterli bant elde etmek amacıyla çok sayıda primer ile PCR reaksiyonlarının yapılmasıdır (Franklin ve diğ., 1999). Diğer bir dezavantajı ise farklı laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirlik problemidir. Çünkü elde edilen profiller primer dizisi, kalıp DNA'nın konsantrasyonu ve kalitesi, tamponun bileşimi, kullanılan Taq polimeraz gibi birçok değişkene bağlıdır (da Cunha Galvão ve Lages-Silva, 2008).

2.6.2 PCR-ITS

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) in vitro DNA senteziyle özel DNA dizilerinin çoğaltılmasını sağlamaktadır. Yöntemin özelliği çoğaltılacak olan hedef dizinin, her bir ucunu tanıyan baz çiftleri yani, sentetik oligonükleotid primerlerin kullanılmasıdır. PCR, tanıya yönelik olarak birçok geleneksel yöntemle karşılaştırıldığında bazı avantajlar sunmaktadır. Bunlar; teknik yüksek duyarlılığa sahiptir, radyoaktif proplar kullanmadan kompleks bir karışımda tek bir hedef molekül belirlenebilir, hızlı ve çok yönlüdür (Henson ve French, 1993).

Rhizobiyal ITS bölgesindeki değişken diziler, korunmuş iki tRNA dizisi dışında tüm bölge boyunca dağılmıştır (Şekil 2.7). ITS bölgeleri yüksek dizi varyasyonu ortaya koymaktadır (%24-100) (Kwon ve diğ., 2005). ITS bölgesi yakın ilişkili taksonomik gruplarda bile büyüklük ve dizi içeriği olarak oldukça çeşitlidir (Gürtler ve Stanisich, 1996). PCR-ITS yöntemi rhizobia suşlarının genetik polimorfizminin ortaya çıkarılması için kullanılmaktadır (Palmer ve Young, 2000; Kwon ve diğ., 2005)



Şekil 2.7. 16S-23S bölgesi arasındaki ITS (ara transkripsiyon bölgesi - internal transcribed spacer) bölgesi (García-Martínez ve diğ., 1999)

2.6.3 Filogenetik analizler

Evrimsel bir ağaç, türlerin çeşitlenmesi sırasında açığa çıkan olay örüntüsünü ve bazı durumlarda da zamanlamasını tanımlar. Soy hatlarının ortaya çıkış sırasını kaydeder ve hangi organizmaların daha yakın, hangilerinin ise daha uzak akraba olduklarını belgeler. En yakın akraba taksonların en fazla ortak özelliğe sahip olması, evrimsel akrabalık ilişkisi oluşturulmasının temel mantığıdır (Freeman ve Herron, 2009). Diziler arasındaki evrimsel ilişkiler bir ağaçtaki dış dallar gibi dizilerin yerleşimiyle tasvir edilir. Ağacın iç kısımlarındaki dallanma ilişkisi farklı dizilerin benzerlik derecesini gösterir. İki dizi ne kadar benzer ise dış dallarda komşu olarak yer alabilirler ve aynı dala katılabilirler (Mount, 2001).

Maksimum tutumluluk (parsimoni), uzaklık ve maksimum olasılık (likelihood) metotları, bir grup dizi içerisindeki çeşitliliğin belirlenmesi için en iyi açıklama olan evrimsel ağaç veya ağaçların oluşturulmasında genel olarak kullanılırlar (Mount, 2001).

Maksimum tutumluluk (parsimoni) dizilerde incelenen varyasyonu belirlemek için adım sayısını en aza indirerek evrimsel ağacı (veya ağaçları) tahmin eder. Bu nedenle, bu metot aynı zamanda minimum evrimsel metot olarak da adlandırılır. Her bir hizalanmış pozisyon için, filogenetik ağaçlar en küçük oranda evrimsel değişikliğe ihtiyaç duyar. Bu analiz dizi hizalamasında her bir pozisyon için devam

eder. Sonunda bu ağaçlar en az miktardaki değişiklikle üretilir. Bu metot küçük ve oldukça benzer yapıdaki diziler için kullanılır, onlar için en uygundur (Mount, 2001).

Uzaklık  l  m  iki takson veya iki gen arasındaki farklılık derecesidir (Forey ve diğ., 1992). İki taksonun genetik uzaklıklarının matrisini ağaca dönüştürür (Felsenstein, 1988). Uzaklık verisinden bir filogeni hesaplamak için; bilgisayar programları, sonuç ağacına en benzer formların birbirlerine yakın oldukları biçimde taksonları k melendirir (Freeman ve Herron, 2009). ‘Komşu’ olarak adlandırılan dizi çiftlerinin baz değişikliği çok az miktardadır. Ağaçta bu diziler bir düğümü veya aynı atasal pozisyonu paylaşırlar (Mount, 2001). Tercih edilen ağaç taksonlar arasında toplam uzaklığı en aza indiren ağaçtır (Freeman ve Herron, 2009). En popüler iki uzaklık metodu UPGMA ve Neighbor Joining’dır. Her ikisi de algoritmik metotlardır (Hall, 2004).

Maksimum olasılık metodunda karakter değişiminin olasılıklı modeli kullanılır (Başbüyük ve diğ., 2000). Bu metot maksimum tutumluluk metoduna benzerlik gösterir. Fakat maksimum benzerlik metodu farklı soylarda mutasyon oranları bakımından değişken olan ağaçları değerlendirmek için ek bir potansiyele sahiptir. Böylece metot oldukça farklı diziler arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmada kullanılabilir, bu durumda maksimum tutumluluk metodu kullanışlı değildir (Mount, 2001).

Bootstrap (seç-bağla) belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiğini değerlendiren bir tekniktir (Felsenstein, 1985). Bootstrap testinde bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Bootstrap tahmininde bir dal ne kadar çok kez çıkarsa, bu dalın gerçekte var olduğu konusunda güvenimiz artmaktadır (Freeman ve Herron, 2009). Bootstrap desteğinin %70 veya daha büyük olması genellikle doğru filogeni ile ilişkilendirilir (Hillis ve Bull, 1993).

3. MATERYAL METOT

3.1 Çalışmada Kullanılan Rhizobium İzolatları

Bu çalışmada, Orta Karadeniz Bölgesi'ndeki bazı illerde (Samsun, Ordu, Amasya, Sinop ve Çorum) yetiştirilen bakla (*Vicia faba* L.), bezelye (*Pisum sativum* L.), mercimek (*Lens culinaris* Medik.) ve yabani türler kocafig (*Vicia narbonensis* L.) ve mürdümüğü (*Lathyrus setifolius* L.) kök nodüllerinden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları kullanılarak, literatürde rapor edildiği üzere *Vicia* grubu içinde rhizobia-baklagil seçiciliğinin olup olmadığı bakla bitkisi kullanılarak test edilmesi amaçlandı. Bakla, bezelye, mercimek ve yabani türlerden daha önce elde edilen izolatlar kendi laboratuvar kültür koleksiyonumuzdan kullanıldı (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Laboratuvar kültür koleksiyonumuzdan kullanılan *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* suşları

Bitki	İzolat No	İl	Lokalite	Literatür
Mercimek (<i>Lens culinaris</i> Medik.)	BA-1	Samsun	Ladik	Aydın, Yayınlanmamış*
	BA-2	Samsun	Bafra	Aydın, Yayınlanmamış*
	BA-3	Amasya	Merzifon	Aydın, Yayınlanmamış*
	BA-4	Amasya	Merzifon	Aydın, Yayınlanmamış*
	BA-5	Amasya	Gümüşhacıköy	Aydın, Yayınlanmamış*
	BA-6	Amasya	Gümüşhacıköy	Aydın, Yayınlanmamış*
	BA-7	Sinop	Merkez	Aydın, Yayınlanmamış*
	BA-8	Çorum	Osmancık	Aydın, Yayınlanmamış*

Çizelge 3.1 (devam). Laboratuvar kültür koleksiyonumuzdan kullanılan *R. leguminosarum* biovar. *viciae* suşları

Bitki	İzolat No	İl	Lokale	Literatür
Bakla (<i>Vicia faba</i> L.)	CTG-23	Ordu	Bolaman	Gürkanlı, 2010
	CTG-35	Samsun	Merkez	Gürkanlı, 2010
	CTG-40	Samsun	Vezirköprü	Gürkanlı, 2010
	CTG-59	Sinop	Boyabat	Gürkanlı, 2010
	CTG-68	Sinop	Erfelek	Gürkanlı, 2010
	CTG-301	Amasya	Gümüşhacıköy	Gürkanlı, 2010
	CTG-303	Amasya	Taşova	Gürkanlı, 2010
	CTG-308	Ordu	Mesudiye	Gürkanlı, 2010
Bezelye (<i>Pisum sativum</i> L.)	CTG-1	Ordu	Merkez	Gürkanlı, 2010
	CTG-13	Ordu	Akkuş	Gürkanlı, 2010
	CTG-74	Sinop	Ayancık	Gürkanlı, 2010
	CTG-110	Samsun	Kavak	Gürkanlı, 2010
	CTG-114	Sinop	Durağan	Gürkanlı, 2010
	CTG-202	Samsun	Yakakent	Gürkanlı, 2010
	CTG-203	Amasya	Gümüşhacıköy	Gürkanlı, 2010
	CTG-205	Amasya	Merkez	Gürkanlı, 2010
Kocafiğ (<i>Vicia narbonensis</i> L.)	SmVn-2	Samsun	Merkez	Gürkanlı, Yayınlanmamış*
Mürdümük (<i>Lathyrus setifolius</i> L.)	SmLs-1	Samsun	Merkez	Gürkanlı, Yayınlanmamış*

*Örneklerin 16S rDNA dizileri çalışılarak türler *Rhizobium leguminosarum* olarak teşhis edildi ve *nodA* gen bölgeleri incelendiğinde biovar. *viciae* oldukları gösterildi.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan örneklerin haritada dağılımı

3.2 Nodülasyon Testi İçin İzolatların Gruplandırılması

İzolatların gruplandırılması için M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') primeri ile RAPD yapıldı (Rivas ve diğ., 2006). RAPD işleminde kullanılan PCR protokolü Rivas ve diğ. (2006)'dan modifiye edilerek uygulandı. Bu reaksiyon 15 µl toplam hacim için örnek başına 10,55 µl ddH₂O, 1,5 µl 10x Sigma Taq Polimeraz Tampon (MgCl₂ ilaveli), 0,9 µl 10 mM Sigma dNTP, 0,9 µl 20 pmol M13, 0,15 µl 5 U/µl Sigma Taq Polimeraz ve 1 µl DNA konuldu. PCR protokolü Thermal Cyclers'da (Primus 25) aşağıdaki program uygulanarak yapıldı.

94 ⁰ C	4 dk	⇒	Başlangıç denatürasyonu
95 ⁰ C	1 dk	}	30 döngü
45 ⁰ C	1 dk		
72 ⁰ C	2 dk		
72 ⁰ C	7 dk	⇒	Son sentez

3.2.1 RAPD işlemi sonrası oluşan profillerin gözlemlenmesi

RAPD işleminden sonra, PCR ürünün varlığını saptamak için; %2'lik metafor agaroz (Bkz. 3.6.1) jel soğuduktan sonra, içinde 1X TBE (Bkz. 3.6.2) tamponu konulan elektroforez setine (Scie-Plas) yerleştirildi. PCR ürünü yüklenirken 15 µl PCR ürünü, 0,5 µl GelRed (Bkz. 3.6.3), 3,5 µl 6x Yükleme Tamponu (%0,25 ksilensiyanol, %0,25 bromofenol mavisi ve % 40 sukroz) ve 2 µl ddH₂O olacak şekilde karışım hazırlandıktan sonra jelin oyuklarına yükleme yapıldı. Yükleme işleminden sonra jel 80 voltda 2 saat yürütüldü (Consort). Yürütme işlemi bitince jelin görüntülenmesi için jel UV transillüminatöre (Vilber Lourmat) yerleştirildi.

3.3 Nodülasyon Testi

Nodülasyon testi üç tekrarlı olarak hazırlandı. Her bir deney serisinde nodülasyon şişelerine 5 farklı bitkiden elde edilen rhizobiyal suşlar inoküle edildi. Hazırlanan denemeler rhizobiyal suşların RAPD işleminde oluşan profillerine göre hazırlandı. Çakışmanın olmadığı profilleri veren organizmalar aynı deney serisi içerisine alındı. İki kontrol çalışması, bir adet pozitif kontrol çalışması ve asıl çalışmanın yapıldığı denemeler aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- Herhangi bir rhizobiyal izolatın bulunmadığı kontrol çalışması,

- Herhangi bir rhizobiyal izolatın bulunmadığı ve azotlu kontrol çalışması,
- Denemeye alınan her bir izolattan sadece bir tanesinin yer aldığı pozitif kontrol çalışması,
- Denemeye alınan 5 izolatın (bakla, bezelye, mercimek izolatlarından birer tane ve yabancı tür örnekleri) karışımının yer aldığı deney denemeleri.

3.3.1 Nodülasyon testi için bakla tohumlarının çimlendirilmesi

Amasya arşın bakla tohumları çimlendirilmeden önce yüzey sterilizasyonu işlemi yapıldı. Sterilizasyon işlemi için %1'lik NaOCl'de (Bkz. 3.6.4) üç dakika tohumlar bekletildikten sonra beş seri steril saf sudan geçirildi.

Hazırlanan steril kurutma kağıtlı nemli petri ortamında, steril tohumlar 25°C'de karanlıkta çimlendirildi (Somasegaran ve Hoben, 1985).

3.3.2 Nodülasyon testi için *Rhizobium* izolatlarının aktive edilmesi

Teste tabi tutulacak olan izolatlar YMB besiyerinde (Bkz. 3.6.5) karanlık ortamda 28°C'de 2 gün bekletilerek aktive edildi (Somasegaran ve Hoben, 1985).

3.3.3 Nodülasyon testi için bakla fidelerinin dikimi ve bakterilerin aşılması

Nodülasyon testi Vincent (1970)'de belirtilen esaslara göre yapıldı. Bunun için:

- 200 ml hacmindeki şişelerin içerisine hacmin yarısı kadar fide agar (Bkz. 3.6.6) konularak şişenin ağzı bir alüminyum folyo ile kapatıldı.
- Alüminyum folyo üzerinde, fideyi tüpe yerleştirmek için ve fide besin çözeltisi (Bkz. 3.6.7) takviyesi yapabilmek için iki delik açıldı ve bu delikler pamuk ile kapatıldı. Oluşturulan bu düzenek 121°C'de 1 atm.'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve daha sonra besiyerinin yatık olarak donması için uygun bir açıda 24 saat eğik olarak bekletildi.
- Yüzey sterilizasyonu yapılan ve çimlendirilen bakla tohumlarının kökleri tüpün ağız kısmındaki folyonun deliğinden içeriye girecek şekilde tüplere yerleştirildi ve şişenin içerisine fide besin çözeltisi eklendi.
- Nodülasyon testi için test edilmek istenen bakteri süspansiyonlarından şişelere 1 ml ilave edildi.
- Bitkilerin köklerinin ışık almaması için şişeler alüminyum folyo ile kaplandı. Her biri 3 kez tekrarlandı.

- Bu şekilde oluşturulan denemeler iklim odasında 25°C’de, 10 saat karanlık ve 14 saat aydınlık ışıklanma periyodunda aktif kök nodülleri oluşuncaya kadar (20-30 gün) bekletildi.

3.3.4 Nodüllerden bakterilerin izolasyonu

Nodülasyon testine tabi tutulan üç tekrarlı deney setlerindeki örneklerin her birinden üçer tane sağlıklı ve aktif (pembe renkli, düzgün görünümlü) nodül seçilerek izolasyona tabi tutuldu. Nodüllerden bakteri izolasyonu Somasegaran ve Hoben (1985) ve Elkan (1987)’de belirtilen yöntemlere göre yapıldı. Bunun için:

- Nodüller akan suyun altında yıkanarak fide besin çözeltisinden arındırıldı ve daha sonra kurutma kağıdına alınarak kurutuldu.
- Nodüller %95’lik etanolde yaklaşık 10 saniye bekletilip yüzey sterilizasyonu için asitleştirilmiş civa klorürde (Bkz. 3.6.8) 3-5 dakika yüzdürüldü.
- Yüzey sterilizasyonu yapılan nodüller, sterilantın fazlasının uzaklaştırılması için 5 steril saf su serisinden geçirildi.
- Nodüller bir pens ile steril ringer çözeltisi (Merck, Darmstadt, Almanya – Bkz. 3.6.9) içeren tüpler içerisinde ezildi ve bir öze yardımı ile içerik YMA (Bkz 3.6.10) ortamına çizgi plaka yöntemi ile aşılandı.
- Petriler 28°C de 2-7 gün inkübe edildi ve koloniler saf kültüre alındı.

3.3.4.1 Elde edilen izolatların saklanması

Nodüllerden bakteri izolasyonu ardından saf kültüre alınan izolatlar YMB besiyerinde 28°C 225 rpm hızda karanlıkta 24-48 saat geliştirildikten sonra %20 gliserol (Bkz. 3.6.11) ortamında stoklandı.

3.3.5 İzolatlardan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için Temizkan ve Arda (2004)’da belirtilen yöntem modifiye edilerek yapıldı. Bunun için;

- Bakteriler steril cam tüpler içerisinde bulunan 5 ml TY besiyerine (Bkz. 3.6.12) aşılandı ve 24-48 saat 225 rpm hıza ayarlı çalkalayıcıda 28°C’de geliştirildi.
- İnkübasyon süresi sonunda bakteri kültüründen 2 ml alınıp bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı ve 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenip bakterilerin çökmesi sağlandı.

- Üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı ve mikro santrifüj tüpüne 1 ml ddH₂O eklenerek iyice vortekslendi. Tekrar 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı sonra pellet 567µl TE (Bkz. 3.6.15) tamponu içerisinde tekrar çözüldü.
- Tüpün içerisine 30 µl %10’luk SDS (Bkz. 3.6.16) ve 5 µl 20 mg/ml’lik proteinaz K (Bkz. 3.6.17) çözeltisinden eklenerek karıştırıldı ve 37 °C’de 1 saat bekletildi.
- Süre sonunda tüplere 110 µl 5 M NaCl (Bkz. 3.6.18) çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. Daha sonra tüplere 65°C’de ısıtılmış CTAB/NaCl (Bkz. 3.6.19) çözeltisinden 80 µl eklenip karıştırıldı ve 65°C’de 10 dakika bekletildi.
- Tüplere, içerisindeki sıvı ile eşit hacimde kloroform/izoamil alkol 24:1(Bkz. 3.6.20) eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra tüpler 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi.
- Üstte kalan faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp üzerine eşit hacimde fenol\kloroform\izoamil alkol 25:24:1 (Amresco, Ohio, ABD) eklendikten sonra tüp alt üst edilerek karıştırıldı. Karıştırılan tüpler 10.000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlendi.
- Üstte kalan faz tekrar dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0.6 hacim izopropanol (Ambresco, Ohio, ABD) eklenerek 3-4 dakika boyunca çok yavaş bir şekilde alt üst edildi.
- Tüpler 12.000 rpm hızda 10 dakika santrifüjlenerek DNA çöktürüldü.
- Tüplerdeki DNA 200 µl %70’lik etanol (Bkz. 3.6.21) ile yıkanıp ve tüpler 12.000 rpm hızda 10 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı, DNA tamamen kuruyuncaya kadar tüpler ağzı açık bir şekilde desikatörde bekletildi.
- Tüplere 30 µl steril ddH₂O eklenerek DNA’nın tamamen çözünmesi sağlandı ve elde edilen DNA’lar +4°C’de bir gece bekletildikten sonra -20°C’de muhafaza edildi.

İzole edilen genomik DNA’lar görüntülenmek üzere, 3 µl genomik DNA 0,3 µl GelRed ve 2,7 µl ddH₂O ile beraber %1’lik agaroz jeldeki (Bkz 3.6.22) kuyucuğa yüklendi ve 80V’da yeteri kadar koşuruldu. DNA bantları UV transillüminatör kullanılarak görüntülendi.

3.4 Deney Sonucunda Bakteri Suşunun Belirlenmesi

Denemelerden elde edilen nodüllerdeki bakterilerin hangileri olduklarının anlaşılması için M13 primeriyle RAPD işlemi yapıldı. Yapılan RAPD işlemi sonucunda izolatlar için daha önce elde edilen bant profilleri oluşturulamadığı ve anlamlı sonuç elde edilemediği için, tercih edilen *Rhizobium* suşunun hangisi olduğunu belirlemek üzere PCR-ITS çalışması yapıldı.

Denemede kullanılan izolatlar ve denemelerden elde edilen 9 nodüldeki bakterilerin ITS bölgelerinin çoğaltılması için R16-1 (5'-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3' - Invitrogen) ve R23-3R (5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3' - Invitrogen) primerleri kullanıldı (Kwon ve diğ., 2005). Bu reaksiyon 50 µl toplam hacim için örnek başına 36,75 µl ddH₂O, 5 µl 10x Thermo Scientific Taq Polimeraz Tampon, 3 µl 25 mM Thermo Scientific MgCl₂, 1 µl 10 mM Sigma dNTP, 1,5 µl 20 pmol R16-1, 1,5 µl 20 pmol R23-3R, 0,25 µl 5 U/µl Thermo Scientific Taq Polimeraz ve 1 µl DNA konuldu. PCR protokolü Kwon ve diğ. (2005)'den alınarak aşağıdaki gibi uygulandı.

94 ⁰ C	5 dk	⇒	Başlangıç denatürasyonu
94 ⁰ C	1 dk	}	35 döngü
58 ⁰ C	1 dk		
72 ⁰ C	2 dk		
72 ⁰ C	10 dk	⇒	Son sentez

PCR işlemi sonucu oluşan ürünlerden 3 µl alındı; üzerine 2,7 µl ddH₂O ve 0,3 µl GelRed ilave edilerek %1'lik agaroz jele yüklendi. Jel 80 voltda 30 dakika yürütülerek UV transillüminatörde gözlemlendi.

3.4.1 ITS-PCR ürünlerinin eldesinde klonlama çalışması

Mercimek bitkisinin kök nodülünden elde edilen BA-1 izolatının ITS-PCR verisinin elde edilmesi işleminde klonlama çalışması yapıldı. Bu işlem için öncelikle PCR ürünü saflaştırıldı.

3.4.1.1 ITS-PCR ürününün saflaştırılması

Qiagen QIAquick PCR Purification kiti kullanılarak PCR ürünleri saflaştırıldı. Bunun için:

- Steril ependorf içine 1 hacim PCR ürününe karşılık kit içerisindeki PB tamponundan 5 hacim ilave edilip, karıştırıldı. Karışım yine kit içerisindeki 2 ml'lik QIAquick spin kolona aktarıldı.
- DNA'nın membrana bağlanması için 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken çözelti uzaklaştırıldı ve koleksiyon tüpü tekrar yerleştirildi.
- Filtre üzerine kit içerisindeki PE tamponundan yıkama amacıyla 750 µl konularak tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon kısmında kalan çözelti tekrar döküldü.
- Koleksiyon tüpü yeniden takıldı ve kolonun iyice kuruması için 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonunda kolon kısmı tüpten çıkarılarak steril başka bir 1.5 ml'lik ependorfa yerleştirildi.
- Yine kit içerisindeki EB tamponu kolon kısmına 50 µl ilave edilerek 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda koleksiyon tüpü atıldı. Ependorf ise etiketlenerek -20°C'de saklandı.

Ependorf tüpündeki saf PCR ürünün varlığını saptamak amacıyla, %1'lik agaroz jelin kuyucuklarına; 3 µl saf PCR ürünü, 1 µl 6X Yükleme Tamponu, 0,3 µl GelRed ve 1,7 µl ddH₂O olacak şekilde yapılan karışımlar konularak yürütüldü ve UV transillüminatörde saf PCR ürünün varlığı doğrulandı.

3.4.1.2 ITS-PCR ürünlerinin klonlama için hazırlanması

Bu işlem için Thermo Scientific CloneJET™ PCR Cloning Kit #K1231 kullanılarak ligasyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı:

- Steril bir ependorf içersine, kit içerisindeki 2X Reaksiyon tamponu'ndan 10 µl, saflaştırılmış DNA ürününden 1,5 µl, ddH₂O'dan 5,5 µl ve kit içerisindeki DNA Blunting (kütleştirme) enziminden 1 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı.
- Karışım kısa süre vortekslendi ve 3-5 saniye santrifüjlendi.
- 5 dakika 70°C'de karışım inkübe edildi.
- Ardından kısa bir süre buzda soğutuldu.
- Ligasyon karışımına vektör ve ligaz ilavesi yapıldı. Bunun için kit içerisindeki pJET1.2/küt klonlama vektöründen (50 ng/µl) 1 µl ve kit içerisindeki T4 DNA ligazdan 1 µl ilave edildi.

- Karışım kısa süre vortekslendi ve 3-5 saniye santrifüjlendi.
- Ardından 5 dakika oda sıcaklığında (22°C’de) inkübe edildi.

3.4.1.3 ITS-PCR ürünlerinin klonlaması için kompetent hücre oluşturma ve transformasyon

Klonlama çalışması için kompetent hücre oluşturma aşaması, Thermo Scientific TransformAid Bacterial Transformation Kit#K2710’uyla yapıldı. Bunun için:

- *Escherichia coli* DH5α suşu NA (LabM, Lancashire, İngiltere - Bkz. 3.6.23) besiyerinde 37°C’de 1 gece inkübe edildi.
- Alınan tek bir bakteri kolonisi kit içerisindeki 2 ml C-medium’da 37°C’de çalkalayıcıda bir gece inkübe edildi.
- Bir gece inkübe olmuş olan kültürden 150 µl, önceden ısıtılmış olan 1,5 ml C-medium’a aktarıldı. Çalkalayıcı ortamda 37°C’de 20 dakika inkübe edildi.
- 1 dakika 10.000-12000xg’de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
- Tüpe 300 µl kit içerisindeki T-solüsyonu (T sol. A ve T sol. B’nin 1’e 1 karıştırılması ile oluşturuldu ve buzda bekletildi) eklendi ve karıştırıldı. 5 dakika buzda bekletildi.
- 1 dakika 10.000-12.000xg’de santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı.
- Tüpe 120 µl T-solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Ardından 5 dakika buzda bekletildi.
- Ligasyon karışımından 2,5 µl yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 2 dakika buzda soğutuldu.
- Tüpün içerisine 50 µl kompetent hücre eklendi, karıştırıldı ve 5 dakika buzda inkübe edildi.
- Ardından 37°C’de en az 20 dakika ısıtılmış olan LB-ampisillin agar (Bkz. 3.6.24) besiyerlerine aşılama yapıldı. 37°C’de bir gece inkübe edildi.
- Oluşan koloniler ayrı ayrı NA besiyerine aktarılıp 37°C’de inkübe edildi.

3.4.1.4 ITS-PCR ürünlerinin elde edilmesi için plazmit DNA izolasyonunun yapılması

Klonlama çalışmasından elde edilen bakteri suşlarından plazmit DNA’nın eldesi için Fermentas GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit #K0503 kullanıldı:

- LB (Bkz. 3.6.26) besiyerinde bir gece 37°C’de çalkalayıcılı ortamda inkübe olan izolatlardan 1,5 ml alınarak 8.000xg’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü.
- Pellet halindeki hücreler, kit içerisindeki Resuspansiyon solüsyonundan 250 µl alınarak yeniden süspanse edildi. Vortekslenerek hücrelerin iyice süspanse olması sağlandı.
- Kit içerisindeki Lisiz solüsyonundan 250 µl solüsyon üstüne eklendi ve solüsyon vizkoz ve hafifçe şeffaf oluncaya kadar tüp 4-6 kez ters yüz edilerek iyice karıştırıldı.
- Kit içerisindeki Nötralizasyon solüsyonundan 350 µl eklendi ve tüp derhal 4-6 kez ters yüz edilerek iyice karıştırıldı.
- Ependorf 5 dakika 12.000xg’de santrifüj edildi.
- Yavaşça boşaltarak veya pipetleyerek süpernatant kit içerisindeki GeneJet spin kolonuna transfer edildi.
- 1 dakika 12.000xg’de santrifüj edildi. Filtreden geçen kısım atıldı ve kolon aynı koleksiyon tüpüne tekrar yerleştirildi.
- GenJet spin kolonuna kit içerisindeki Wash solüsyonundan (Etanol ilaveli) 500 µl ilave edildi. 30-60 saniye 12.000xg’de santrifüj edildi ve filtreden geçen kısım atıldı. Kolon aynı koleksiyon tüpüne tekrar yerleştirildi.
- Tekrar 500 µl Wash solüsyonu (Etanol ilaveli) ile 30-60 saniye 12.000xg’de santrifüj işlemi yapıldı.
- Filtreden geçen kısım atıldı ve kalıntı Wash solüsyonunu uzaklaştırmak için ek 1 dakika 12.000xg’de santrifüj yapıldı.
- GeneJet kolonu yeni bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Kit içerisindeki Elution Buffer’dan 50 µl alınarak GeneJet Spin kolonunun ortasına eklendi. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 2 dakika 12000xg’de santrifüj yapıldı.
- Filtre atıldı. Plazmit DNA etiketlenerek -20°C’de saklandı.

Ependorf tüpündeki plazmit DNA varlığını saptamak amacıyla, %1’lik agaroz jelin kuyucuklarına; 3 µl plazmit DNA, 1 µl 6X Yükleme Tamponu, 0,3 µl GelRed ve 1,7 µl ddH₂O olacak şekilde yapılan karışımlar konularak yürütüldü ve UV transillüminatörde plazmit DNA varlığı doğrulandı.

3.4.2 ITS-PCR ürünlerinin analizi ve yorumlanması

Denemelerde kullanılan izolatların ve elde edilen 9 nodüldeki bakterilerin ITS bölgelerinin PCR ürünleri dizileme işlemi için MacroGen Inc. Hollanda firmasına gönderildi. MacroGen Inc. Hollanda firmasından gelen diziler Chromas Lite (v2.1 - Technelysium Pty. Ltd.) programında kontrol edilip, BioEdit (Hall, 1999) programında birleştirildikten sonra; her bir denemedeki örnekler kendi içinde hizalandı. Hizalanan örnekler için Mega6 (Tamura ve diğ., 2013) programında 10.000 bootstrap ile Neighbor Joining ağaçları (Saitou ve Nei, 1987) ve uzaklık matriksleri (Jukes ve Cantor, 1969) oluşturuldu.

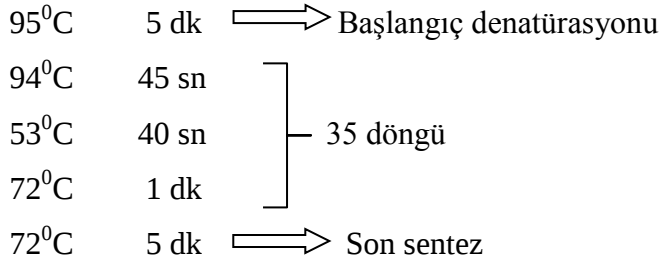
3.4.2.1 ITS-PCR ürünlerin polimorfik DNA analizi

Denemelerde kullanılan test izolatlarının ITS bölgesinin PCR ürünleri ele alınarak; nodülasyon testlerinde nodül oluşumu için tercih edilen izolatlarda, tercih edilmeyen izolatlara göre farklılık olup olmadığının anlaşılması için BioEdit programında benzer bölgeleri çıkartılarak polimorfik bölgeleri incelendi.

3.5 *nod* Kutusu'un Araştırılması

Denemelerde tercih edilen mikroorganizmaların tercih edilme özgülüğünün bulunmasında; özgülüğün *nodD* gen ürünü olan NodD proteinin bağlandığı *nod* kutusu bölgesindeki farklılıklardan kaynaklanıp kaynaklanmadığının araştırılması için kullanılan izolatların *nod* kutusu bölgesi çoğaltıldı. Bu işlem için NodBox-F (5'-AGCTCCCGTCTCTGCATG-3' - Alpha DNA) ve NodBox-R (5'-GTGGTCCGAAGCTTCCAG-3' - Alpha DNA) primerleri kullanıldı. Bu reaksiyon 50 µl toplam hacim için örnek başına 31,75 µl ddH₂O, 5 µl 5x GoTaq Polimeraz Tampon (Promega - yükleme tamponu ilaveli), 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP, 1,5 µl 20 pmol NodBox-F, 1,5 µl 20 pmol NodBox-R, 0,25 µl 5 U/µl GoTaq Polimeraz (Promega) ve 1 µl DNA konularak gerçekleştirildi.

nod kutusu bölgesinin çoğaltılması için PCR protokolü optimize edildi ve Thermal Cycler'da aşağıdaki program uygulanarak çoğaltıldı.



PCR işlemi sonucu oluşan ürünlerden 3 µl alınıp, 0,3 µl GelRed ilave edilerek %1'lik agaroz jele yüklendi. Jel 80 voltda 30 dakika yürütülerek, PCR ürünü UV transillüminatörde gözlemlendi.

3.5.1 *nod* kutusu-PCR ürünlerinin analizi ve yorumlanması

Dizileme işlemi için PCR ürünleri Macrogen Inc. Hollanda firmasına gönderildi. Macrogen Inc. Hollanda firmasından gelen diziler Chromas Lite programında kontrol edilip, BioEdit programında birleştirildikten sonra hizalandı. Hizalanan örnekler için Mega6 programında Neighbor Joining (bootstrap 10000) ağacı oluşturuldu.

3.5.1.1 *nod* kutusu-PCR ürünlerin polimorfik DNA analizi

Denemelerde kullanılan test izolatlarının *nod* kutusu bölgesinin PCR ürünleri ele alınarak; nodülasyon testlerinde nodül oluşumu için tercih edilen izolatlarda, tercih edilmeyen izolatlara göre farklılık olup olmadığının anlaşılması için BioEdit programında benzer bölgeleri çıkartılarak polimorfik bölgeleri incelendi.

3.6 Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

3.6.1 %2'lik metafor agaroz

%2 lik metaphor agaroz için 2 g metafor agaroz (Lonza Rockland, ABD) tartıldıktan sonra 100 ml 1X TBE tamponu (Bkz. 3.6.2) içerisinde ısıtılarak eritildi. Bir miktar soğutulduktan sonra elektroforez tablasına dökülerek donması beklendi (Khbaya ve diğ., 1998).

3.6.2 1X TBE (Tris - Borik asit - EDTA)

10X TBE hazırlamak için 108 g Trisma baz (Ambresco, Ohio, ABD), 55 g Borik asit (Merck, Darmstadt, Almanya) ve 40 ml 0,5 M EDTA pH:8 (Bkz. 3.5.12) ddH₂O ile 1000 ml tamamlanıp otoklavlandı (Maniatis ve diğ., 1982). Karışım 1/10 oranında sulandırılarak kullanıldı.

3.6.3 GelRed

GelRed (10000x Biotium-Hayward, CA, ABD) stoğu 1/20 oranında ddH₂O ile sulandırılarak kullanıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edildi.

3.6.4 NaOCl (%1'lik)

Nodülasyon testinde kullanılacak konukçu bitki tohumlarının yüzey sterilizasyonu NaOCl (%1'lik) ile yapıldı. Sterilantı hazırlamak için ticari olarak satılan çamaşır suları %5 konsantrasyonda kabul edilip ve %1'lik olacak şekilde steril ddH₂O ile sulandırıldı.

3.6.5 YMB (Yeast mannitol broth)

10 g mannitol (Merck, Darmstadt, Almanya), 0,5 g K₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya), 0,2 g MgSO₄.7H₂O (Merck, Darmstadt, Almanya), 0,1 g NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya) ve 0,5 g Maya ekstraktı (LabM, Lancashire, İngiltere) ddH₂O ile 1000 ml tamamlanıp, ortamın pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra; cam tüplere besiyerlerinden her tüpte 5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Tüpler 121°C de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi (Elkan, 1987).

3.6.6 Fide agar

Nodülasyon testlerinde fidelerin geliştirilmesi Jensen ortamı kullanıldı (Vincent, 1970). Jensen ortamını hazırlamak için 1 g CaHPO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya), 0,2 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 0,2 g NaCl ve 0,1 g FeCl₃ (Merck, Darmstadt, Almanya) ve 950 ml ddH₂O ile çözüldü.

Ortam hazırlandıktan sonra içerisine iz element çözeltilerinden % 0,05 (g/l) H₃BO₃ (Merck, Darmstadt, Almanya), % 0,05 (g/l) MnCl₂ (Carlo Erba, İtalya), % 0,005 (g/l) ZnCl₂ (Aklar Kimya, Türkiye), % 0,005 (g/l) Na₂MoO₄ 2H₂O (Merck, Darmstadt, Almanya), % 0,005 (g/l) CuSO₄ (Carlo Erba, İtalya) ve 10 ppm CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Almanya)'den 1'er ml ilave edildi ve pH'sı 6,8'e ayarlandı. 15 g agar ilave edildikten sonra ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı. Ortam ısıtılarak agarın erimesi sağlandı. Besiyeri nodülasyon testlerinin yapılacağı şişelere aktarıldıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

3.6.7 Fide besin çözeltisi

Fide besin çözeltisi 3.6.6'da açıklanan fide agarın içeriğinden agarın çıkartılması ile hazırlandı. Azotlu fide besin çözeltisi için, fide besin çözeltisi içerisine %0,05 (g/l) KNO_3 (Kimetsan, Türkiye) ilavesi yapıldı (Vincent, 1970).

3.6.8 %1 oranında asitleştirilmiş civa klorür

1 g civa (Carlo Erba, İtalya) ve 5 ml konsantre HCl (Merck, Darmstadt, Almanya) ddH₂O ile 1000ml'ye tamamlandı (Elkan, 1987).

3.6.9 Ringer çözeltisi

Stoktan alınan bir ringer tableti 500 ml ddH₂O'da çözülerek; 121°C'de 1 atm.'da 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Steril ringer çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.6.10 YMA (Yeast mannitol agar)

YMB ortamına 15 g/l oranında agar eklenerek hazırlandı (Elkan, 1987). Steril edilen besiyerinin sıcaklığı 50°C'ye düştükten sonra steril kabin (Nüve LN090) içerisinde steril petri kaplarına yaklaşık 30'ar ml olacak şekilde döküldü. İçerisinde besiyeri olan petriler düz bir zeminde bırakılarak katılaşmaları sağlandı.

3.6.11 Gliserol stok (%20)

İçerisinde %80'lik 375 µl gliserol (Merck, Darmstadt, Almanya) bulunan steril vidalı tüplere, YMB ortamında geliştirilen kültürlerden 1125 µl alınarak aktarıldı. Tüpler vortekslenerek karıştırıldıktan sonra, 1 saat oda sıcaklığında bekletildi ve -20°C'deki derin dondurucuda saklandı.

3.6.12 TY (Trypton yeast extract broth)

6 g tripton (LabM, Lancashire, İngiltere), 3 g maya ekstraktı ve 0,89 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ suyla 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra hazırlanan ortamın pH'sı 6,8 e ayarlandı. Cam tüplere 5 ml'er olacak şekilde dağıtıldıktan sonra tüpler 121°C de 1,5 atm'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi (Ditta ve diğ., 1987).

3.6.13 Tris-HCl

100 ml 1 M Tris-HCl hazırlamak için 12,11 gram Tris baz (Sigma, Steinheim, Almanya) 80 ml ddH₂O içerisinde çözündü ve konsantre HCl kullanılarak pH'ı 8'e ayarlandı. Hacim 100 ml tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edildi. Çözelti 121°C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi (Sambrook ve Russell, 2001).

3.6.14 EDTA (0,5 M) pH 8

100 ml 0,5 M EDTA çözeltisi için, 14,6 gram EDTA (Sigma, Steinheim, Almanya) 80 ml ddH₂O içerisinde çözündü, NaOH (Merck Darmstadt, Almanya) granülleri çözelti içerisine eklenerek pH 8'e ayarlandı. Hacim ddH₂O ile 100 ml tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edildi. Çözelti 121°C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi (Durmaz ve diğ., 2001).

3.6.15 1X TE (Tris – EDTA) tamponu, pH 8

100 ml 10X TE tamponu hazırlamak için 2 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8.0 (Bkz. 3.6.12) ve 0,2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 (Bkz. 3.6.13), 97,8 ml ddH₂O ile karıştırıldı ve tampon 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. 1X TE tamponu hazırlamak için stok 1/10 oranında sulandırıldı (Sambrook ve Russell, 2001).

3.6.16 %10'luk SDS (Sodyum dodesil sülfat)

100 ml % 10'luk SDS çözeltisi hazırlamak için 10 gram SDS (Amresco, Ohio, ABD) tartılarak ddH₂O ile üzeri 100 ml'ye tamamlandı ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak tamamen çözünmesi sağlandı (Temizkan ve Arda, 2004).

3.6.17 Proteinaz K (20 mg/ml)

0,02 gram proteinaz K (Promega, Madison, WI, ABD) tartılarak 1X TE tamponu ile 1 ml'ye tamamlandı. Proteinaz K vortekslenip iyice çözündükten sonra 100 µl'lik paylara ayrıldı ve -20°C'de muhafaza edildi. Proteinaz K oldukça hassas olduğundan mümkün olduğu kadar taze hazırlanıp kullanılmaya özen gösterildi.

3.6.18 NaCl (5M)

100 ml 5M NaCl çözeltisi hazırlamak için, NaCl'den 29,22 g tartılarak üzeri ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.6.19 CTAB/NaCl (Setil trimetil amonyum bromür/sodyum klorür)

100 ml CTAB/NaCl çözeltisi hazırlamak için 4,1 gram NaCl tartılarak 80 ml ddH₂O içerisinde çözüldü. Bu çözeltinin içerisine 10 gr CTAB (Sigma, Steinheim, Almanya) eklendikten sonra 65°C'ye kadar ısıtıldı ve karıştırılarak CTAB'ın çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözelti ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı (Temizkan ve Arda, 2004).

3.6.20 Kloroform/izoamil alkol (24:1)

100 ml kloroform/izoamil alkol karışımı hazırlamak için 96 ml kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya) ve 4 ml izoamil alkol (Amresco, Ohio, ABD) karıştırıldı.

3.6.21 %70 Etanol

100 ml % 70'lik etanol karışımı hazırlamak için 70 ml saf etanol (J.T. Baker, Deventer, Hollanda) içerisine 30 ml ddH₂O ilave edildi.

3.6.22 %1'lik Agaroz jel

%1'lik agaroz için 1 g agaroz tartıldıktan sonra 100 ml 1X TBE tamponu içerisinde ısıtılarak eritildi. Bir miktar soğutulduktan sonra elektroforez tablasına dökülerek donması sağlandı.

3.6.23 NA (Nutrient agar)

Hazır NA (Oxoid, Hampshire, İngiltere) ortamından 28 g tartılarak hacim ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı. Besiyeri 121°C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Steril edilen besiyerinin sıcaklığı 50°C'ye düştükten sonra steril kabin içerisinde steril petri kaplarına yaklaşık 30 ml olacak şekilde döküldü. İçerisinde besiyeri olan petriler düz bir zeminde bırakılarak katılaşmaları sağlandı.

3.6.24 LB (Luria broth-Lennox) - ampisillin agar

10 g tripton, 5 g maya ekstrakt ve 5 g NaCl, ddH₂O ile 800 ml'ye tamamlandı. pH' 7,0'a ayarlanan besiyeri içerisine 15 g agar ilave edildikten sonra; besiyeri ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı. Besiyeri 121°C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Besiyeri steril edildikten sonra soğumaya bırakıldı. Besiyeri sıcaklığı 55°C'ye düştükten sonra steril kabin içerisinde, besiyerine ampisillin stok solüsyonundan (50 mg/ml - Bkz. 3.6.24) 2 ml ilave edildi ve besiyeri karıştırıldı. Steril kabin içerisinde steril petri kaplarına dökülen besiyeri, düz bir zeminde soğumaya bırakıldı (Thermo Scientific TransformAid Bacterial Transformation Kit#K2710).

3.6.25 Ampisillin stok solüsyonu

2,5 g ampisillin sodyum tuzu (Sigma, Steinheim, Almanya) ddH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı. Filtreden geçirilerek steril edilen antibiyotik, 4°C'de saklandı.

3.6.26 LB (Luria broth-Lennox) besiyeri

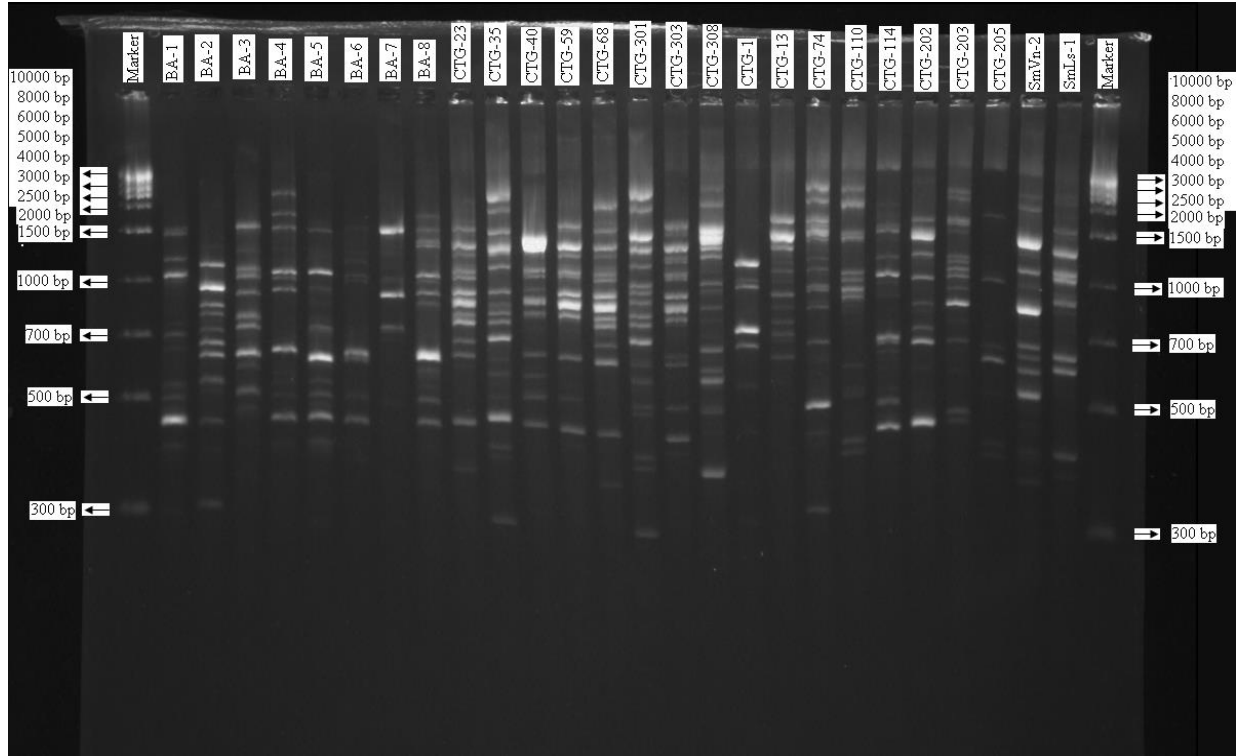
10 g tripton, 5 g maya ekstrakt ve 5 g NaCl, ddH₂O ile 900 ml'ye tamamlandı. pH 7,0'a ayarlanan besiyeri ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı. Cam tüpler içerisine 5 ml olarak şekilde dağıtılan besiyeri 121°C'de 1,5 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi (Thermo Scientific TransformAid Bacterial Transformation Kit#K2710).

4. BULGULAR

4.1 Nodülasyon Testi

4.1.1 Nodülasyon testi için izolatların gruplandırılması

Nodülasyon testinde kurulacak olan denemelerin belirlenmesi için M13 primeriyle izolatların hepsine RAPD işlemi yapıldı. Oluşan ürünler %2'lik metafor agarozda yürütüldükten sonra görüntüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bütün izolatların M13 primeriyle yapılan RAPD işlemi görüntüsü

RADP işlemi sonucu ortaya çıkan bantlar dikkate alınarak, izolatlar deneme düzenekleri için sekiz gruba ayrıldı:

Deneme 1: BA-1 (mercimek) – CTG-35 (bakla) – CTG-13 (bezelye) – SmVn-2 (kocafiğ) – SmLs-1 (mürdümük) (Şekil 4.2)

Deneme 2: BA-2 (mercimek) – CTG-23 (bakla) – CTG-74 (bezelye)- SmVn-2 (kocafiğ) – SmLs-1 (mürdümük) (Şekil 4.3)

Deneme 4: BA-3 (mercimek) – CTG-59 (bakla) – CTG-203 (bezelye)- SmVn-2 (kocafiğ) – SmLs-1 (mürdümük) (Şekil 4.4)

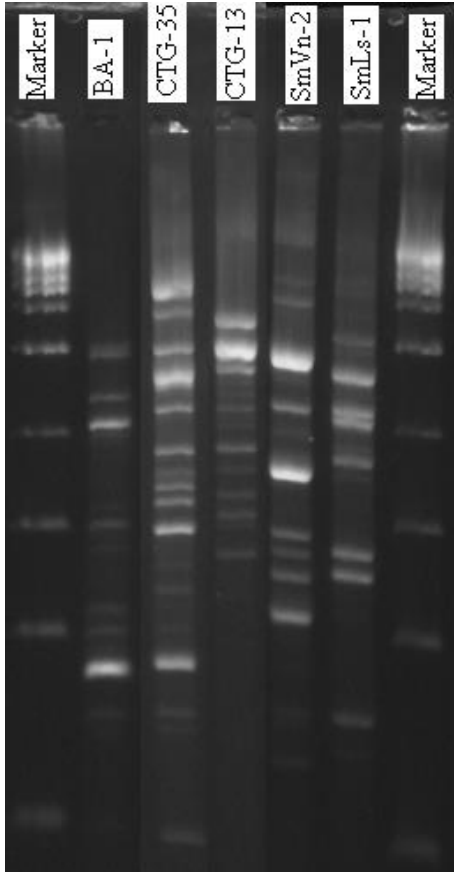
Deneme 4: BA-4 (mercimek) – CTG-40 (bakla) – CTG-1 (bezelye)- SmVn-2 (kocafiğ) – SmLs-1 (mürdümük) (Şekil 4.5)

Deneme 5: BA-5 (mercimek) – CTG-301 (bakla) – CTG-110 (bezelye)- SmVn-2 (kocafiğ) – SmLs-1 (mürdümük) (Şekil 4.6)

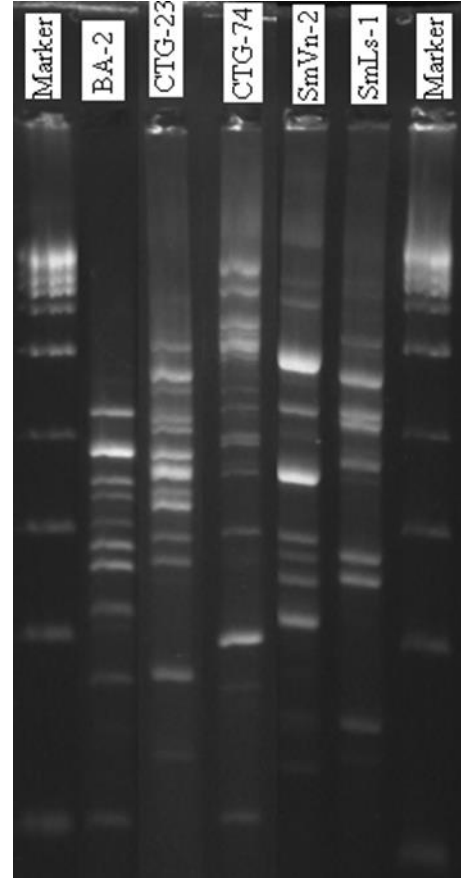
Deneme 6: BA-6 (mercimek) – CTG-68 (bakla) – CTG-202 (bezelye)- SmVn-2 (kocafiğ) – SmLs-1 (mürdümük) (Şekil 4.7)

Deneme 7: BA-7 (mercimek) – CTG-303 (bakla) – CTG-114 -(bezelye) SmVn-2 (kocafiğ) – SmLs-1 (mürdümük) (Şekil 4.8)

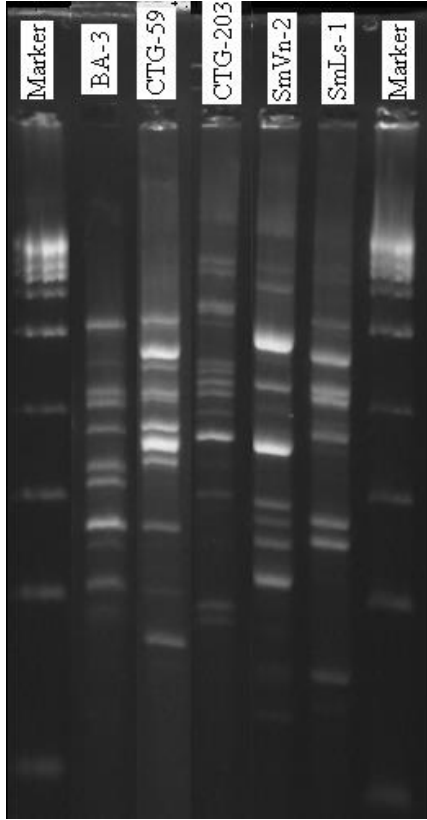
Deneme 8: BA-8 (mercimek) – CTG-308 (bakla) – CTG-205 (bezelye)- SmVn-2 (kocafiğ) – SmLs-1 (mürdümük) (Şekil 4.9)



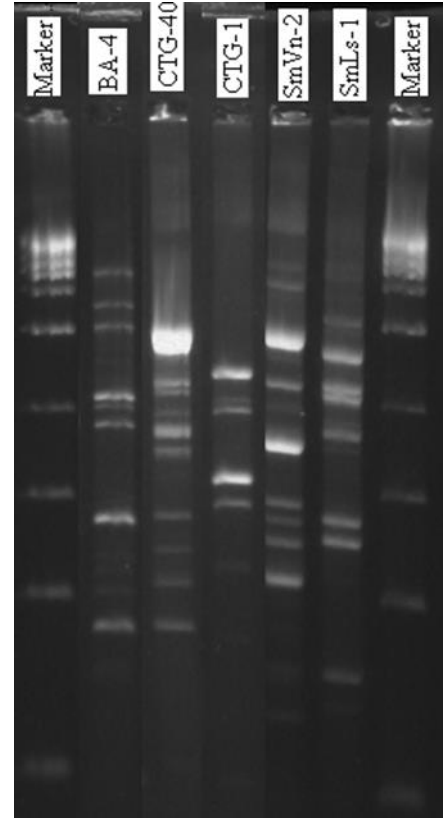
Şekil 4.2. Deneme 1



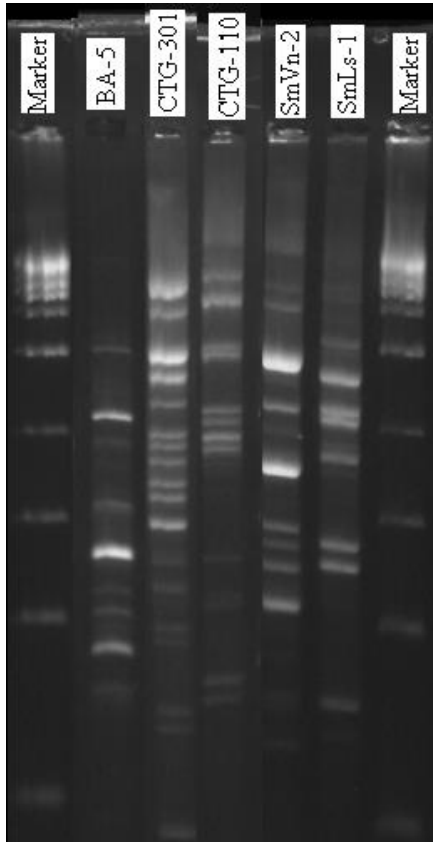
Şekil 4.3. Deneme 2



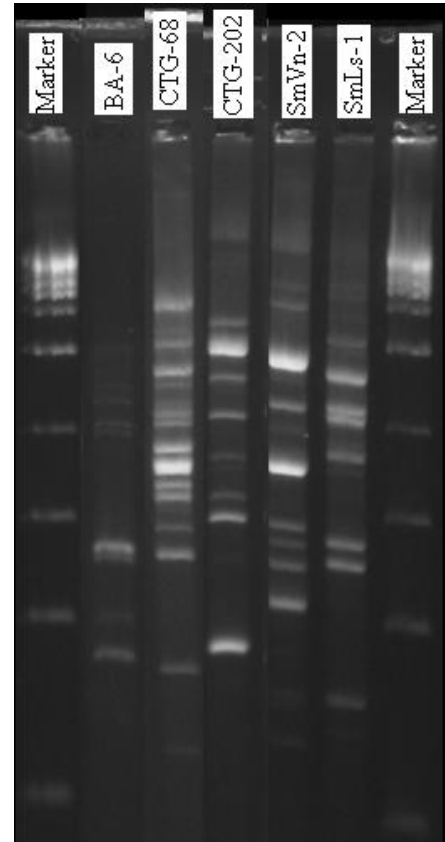
Şekil 4.4. Deneme 3



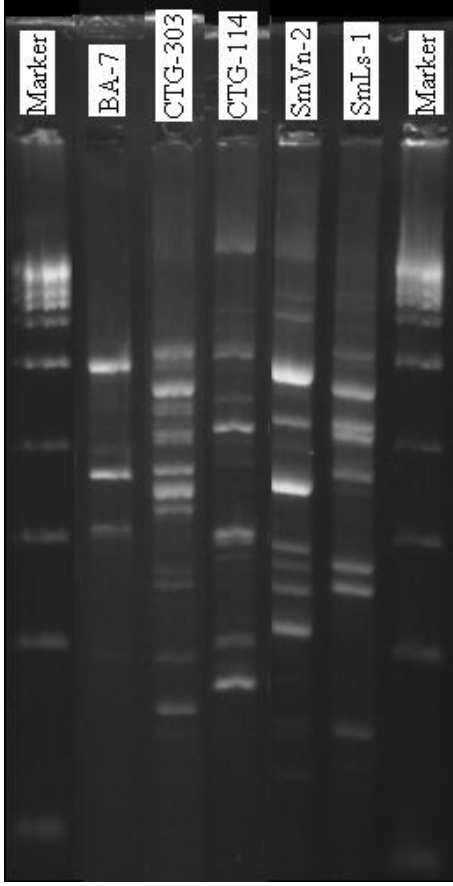
Şekil 4.5. Deneme 4



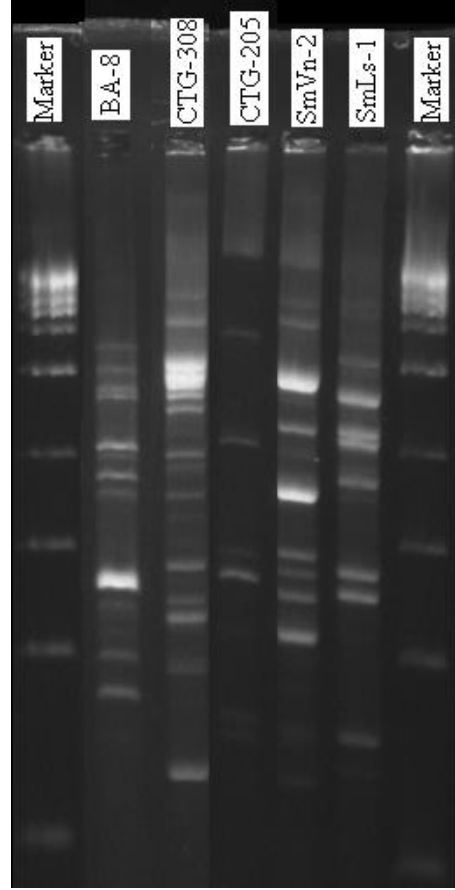
Şekil 4.6. Deneme 5



Şekil 4.7. Deneme 6



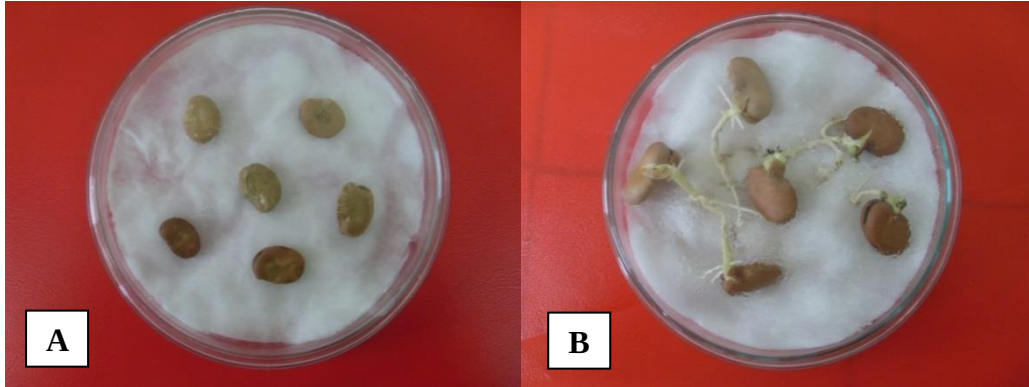
Şekil 4.8. Deneme 7



Şekil 4.9. Deneme 8

4.1.2 Nodülasyon testi için bakla tohumlarının çimlendirilmesi

Nodülasyon testlerinin başlatılması için bakla tohumları çimlendirildi (Şekil 4.10). Çimlendirme işlemi 10-15 gün arasında sürdürüldü.

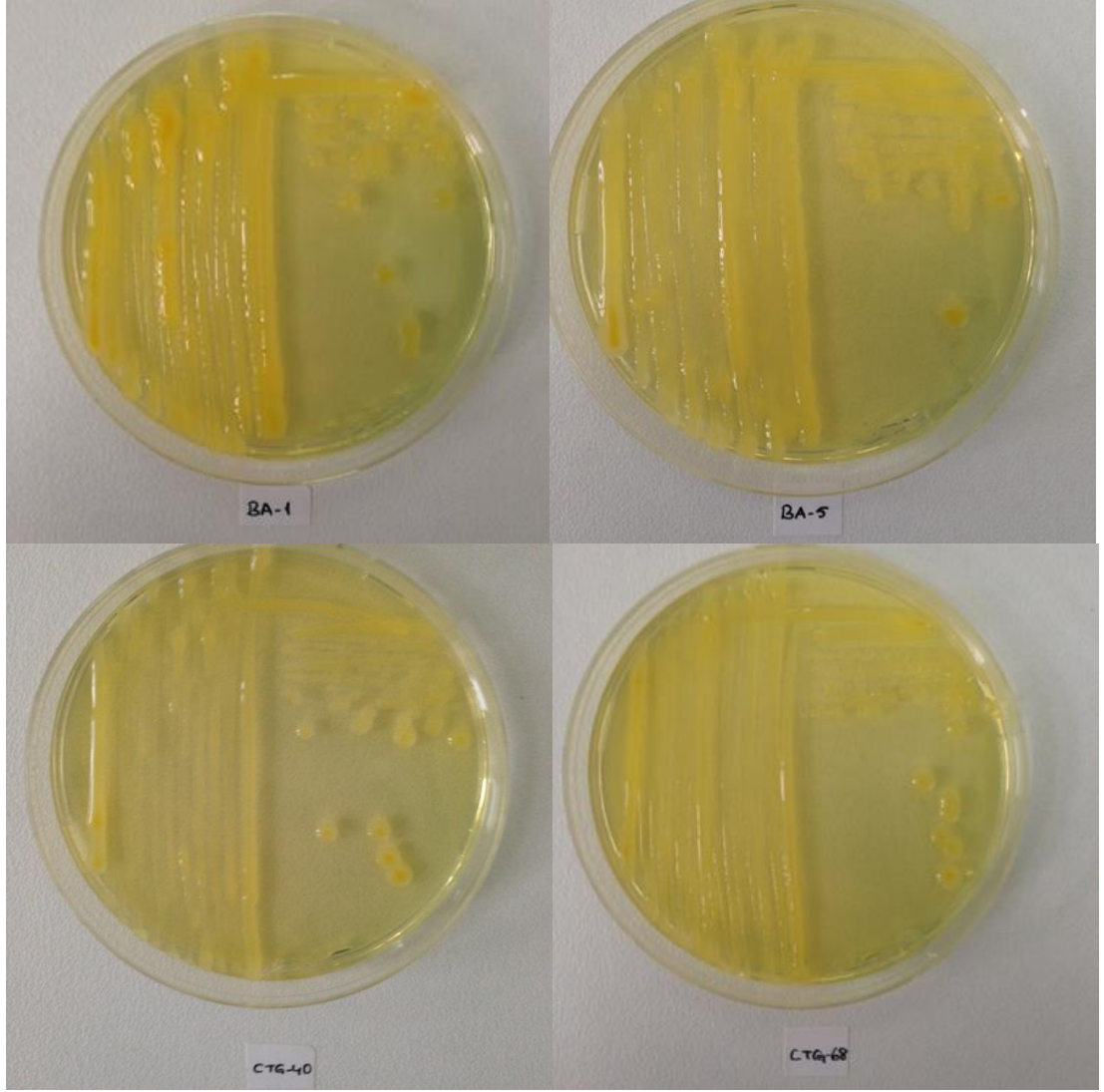


Şekil 4.10. Bakla tohumlarının çimlenme öncesi (A) ve sonrası (B) durumları

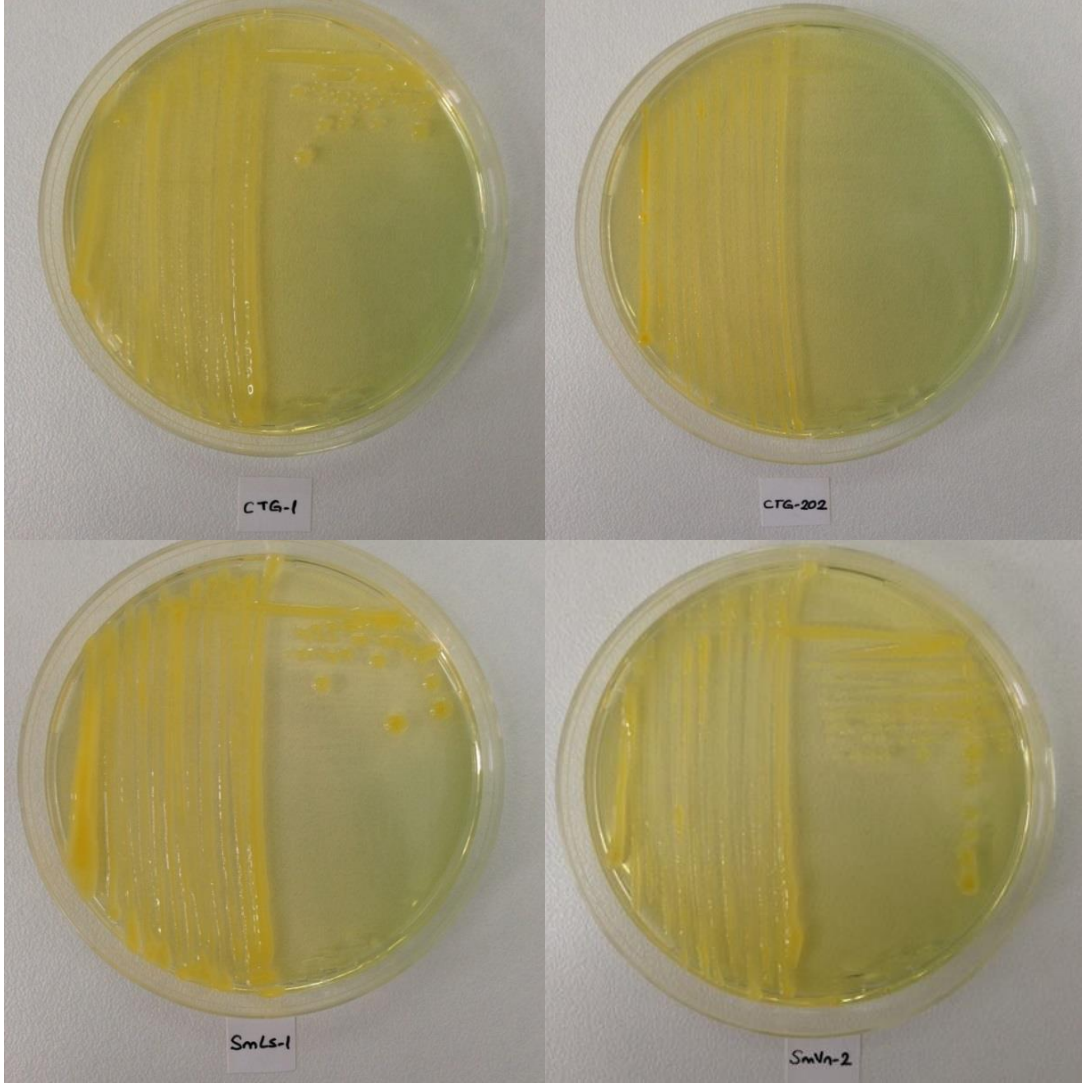
4.1.3 Nodülasyon testi için izolatların aktifleştirilmesi

Nodülasyon testleri için oluşturulan denemelerde ve pozitif kontrol denemelerinde kullanılmak üzere izolatlar YMA besiyerinde tekrar aktifleştirildi (Şekil 4.11 ve 4.12). Aktifleşen izolatlar nodülasyon testinde kullanılmak üzere YMB besiyerinde

geliştirildi. YMB besiyerinde geliştirilen mikroorganizmalar %20'lik gliserolde stoklandı.



Şekil 4.11. Mercimek ve bakla bitkilerinin köklerindeki nodüllerden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları



Şekil 4.12. Bezelye bitkisi ve yabancı türlerin köklerindeki nodüllerden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları

4.1.4 Nodülasyon testi için bakla fidelerinin dikimi ve bakterilerin aşılama

Hazırlanan fide agarlı şişelere (Şekil 4.13) bakla fideleri dikildi; her bir pozitif kontrol örneği ve her bir denemede bulunan izolatlar için üç tekrarlı olarak hazırlandı ve 1 ml alınarak aşılama yapıldı (Şekil 4.14). Herhangi bir rhizobiyal izolatın bulunmadığı kontrol çalışması ve herhangi bir rhizobiyal izolatın bulunmadığı ve azotlu kontrol çalışması için düzenek hazırlandı. Bakla fidelerinin köklerinin kurumaması için fide besin çözeltisi şişelere eklendi.



Şekil 4.13. Fide agarlı şişeler



Şekil 4.14. Kurulu deneme 2

Bitki gelişimi göz önüne alınarak, bitkinin gelişimini düzgün bir şekilde devam ettirebilmesi için belli aralıklarla şişelerin içine fide besin çözeltisi eklendi. Meyve oluşumu gerçekleşinceye kadar bitki gelişimi devam ettirildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Gelişmekte olan bakla fideleri

Bakla bitkilerinin gelişiminin tamamlanmasının ardından; denemeye alınan her bir izolattan sadece bir tanesinin yer aldığı pozitif kontroller ve denemeye alınan beş izolattan (bakla, bezelye, mercimek bitkisinin köklerindeki nodüllerden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatlarından birer tane ve yabancı türlerin köklerindeki nodüllerden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları) karışımının yer aldığı asıl denemeler için bakla bitkisi köklerinden her bir tekrardan üç adet olmak üzere her bir gruptan dokuz aktif nodül alındı (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



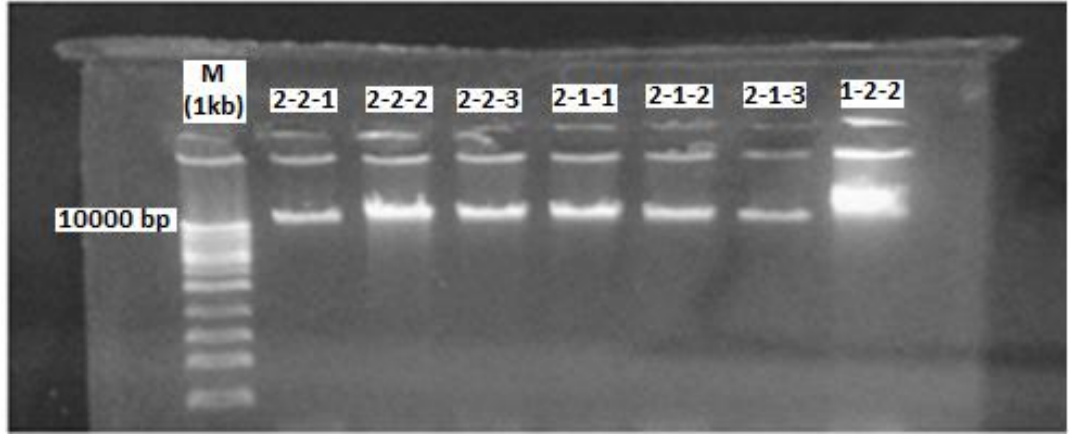
Şekil 4.16. Aktif nodüllere ait örnekler



Şekil 4.17. Aktif nodülün kesiti

4.1.5 Nodüllerden bakterilerin izolasyonu ve bakterilerden genomik DNA izolasyonu

Köklerden alınan aktif nodüllerin bakteri izolasyonu Elkan (1987) ve Somasegaran ve Hoben (1985) de belirtilen yöntemlere göre yapıldı. Elde edilen bakterilerin DNA izolasyonu için Temizkan ve Arda (2004)'da verilen yöntem modifiye edilerek uygulandı. İzole edilen genomik DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.18)



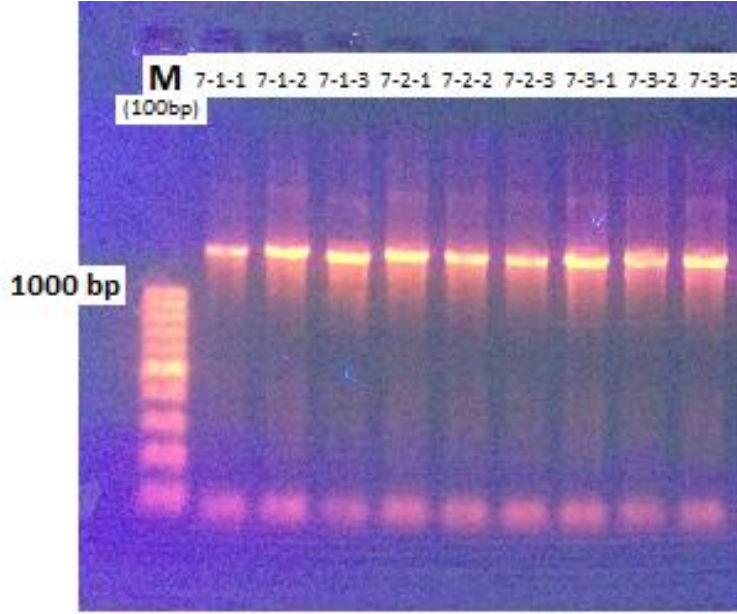
Şekil 4.18. İzole edilen genomik DNA örnekleri

4.2 Denemelerde Tercih Edilen Bakteri Suşlarının Belirlenmesi

Herhangi bir rhizobiyal izolatın bulunmadığı kontrol çalışmasında bakla bitkisi fidelerinin meyve oluşturmamış ve gövde yapılarının oldukça zayıf kaldığı bulundu. Herhangi bir rhizobiyal izolatın bulunmadığı ve azotlu kontrol çalışması ise ortama dışardan azot verildiği için bakla bitkisi fidelerinin gelişimi normal seyrinde devam etti.

Denemeye alınan her bir izolatın sadece bir tanesinin yer aldığı pozitif kontrol çalışmasında pozitif kontrollerin hepsi ayrı ayrı bakla bitkisinde nodül oluşturdu. Böylece mikroorganizmaların hepsinin bakla bitkisinde nodül oluşturabildiği gösterildi.

Tez çalışmasının asıl konusunu oluşturan sekiz denemede kullanılan izolatların (bakla, bezelye, mercimek köklerindeki nodüllerden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatlarından birer tane ve yabancı türlerin köklerindeki nodüllerden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları) ve tüm denemelerden elde edilen nodüllerdeki izolatların genomik DNA'ları M13 primeri kullanılarak RAPD işlemiyle çoğaltıldı. RAPD ürünleri %2'lik metafor agarozda gözlemlendiğinde daha önce gruplandırma için oluşturulan profillerin oluşmadığı görüldü. RAPD işlemi birçok defa tekrarlanmasına rağmen anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Bu nedenle tercih edilen bakteri suşunun belirlenmesinde daha stabil sonuç vereceği beklenen ITS gen bölgesinin kullanılmasına karar verildi. PCR işleminden sonra ITS bölgesi çoğaltılan ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.19).

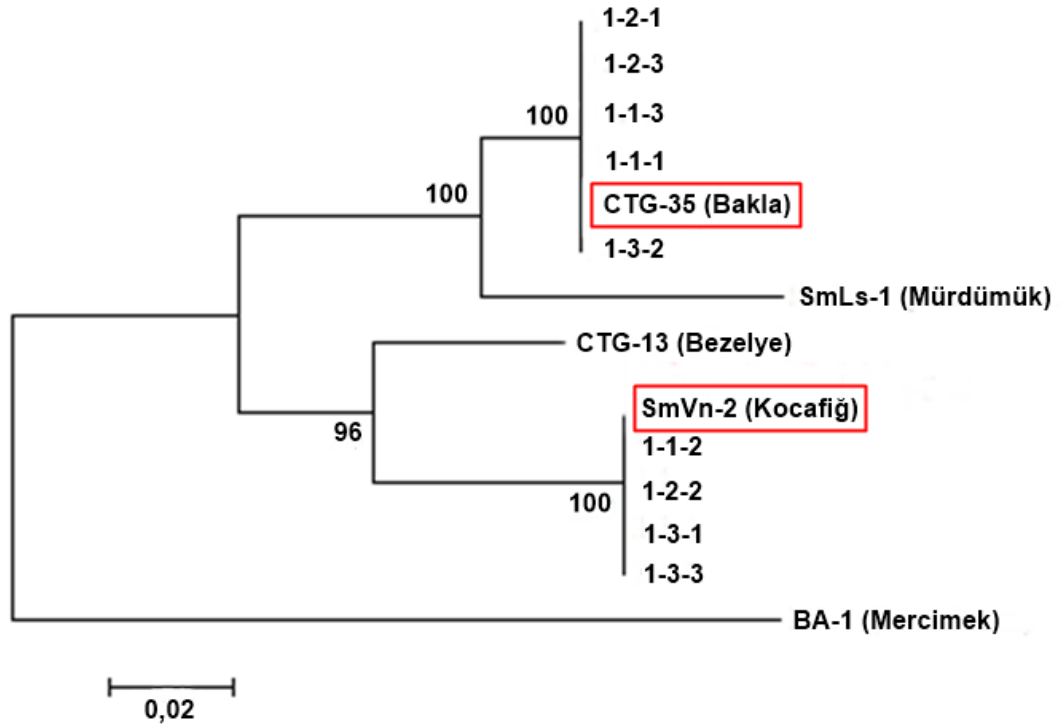


Şekil 4.19. Deneme 7’den elde edilen izolatların ITS bölgesinin jel görüntüsü

Mercimek bitkisinden elde edilen *Rhizobium* izolatı BA-1’nin ITS bölgesi ürünü agaroz jelde yürütülüp görüntülendiğinde, ürünün çift bant oluşturduğu gözlemlendi. PCR protokolü ve PCR içeriğinde değişiklik yapılmasına karşın çift bant oluşumu devam etti. Ürün bant kesme ve dizileme işlemlerinin yapılabilmesi için Macrogen Inc. Hollanda firmasına gönderildi. Macrogen Inc. firmasından gelen diziler incelendiğinde dizilerin temiz olmadığı görüldü; tekrar okuma yapılmasına karşın dizilerde düzelme olmadı. BA-1’den temiz ITS dizisi elde edebilmek için bölgenin klonlama çalışması yapıldı. Klonlama işlemi sonucu elde edilen ürünler Macrogen Inc. firmasında gönderildi ve sonuç olarak yine temiz ürün elde edilemedi. BA-1 ITS ürünü, dikkatli bir şekilde kontrol edildikten sonra nodülasyon testi sonuçlarının incelenmesi için kullanıldı.

Elde edilen diğer PCR ürünleri, dizileme işleminin yapılması için Macrogen Inc. firmasına gönderildi. Macrogen Inc. firmasından gelen diziler BioEdit programında kontrol edilip, birleştirilip, hizalandıktan sonra; Mega6 programında Neighbor Joining (bootstrap 10000) ağaçları (Şekil 4.20-27) ve uzaklık matrisleri (Çizelge 4.1-8) oluşturuldu.

Bir denemeye eklenen 1 bakla, 1 bezelye, 1 mercimek ve 2 yabancı tür (kocafiğ ve mürdümük) kökündeki nodülden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* örneğinin kullanıldığı her bir denemede oluşan seçim sonuçları incelendiğinde;

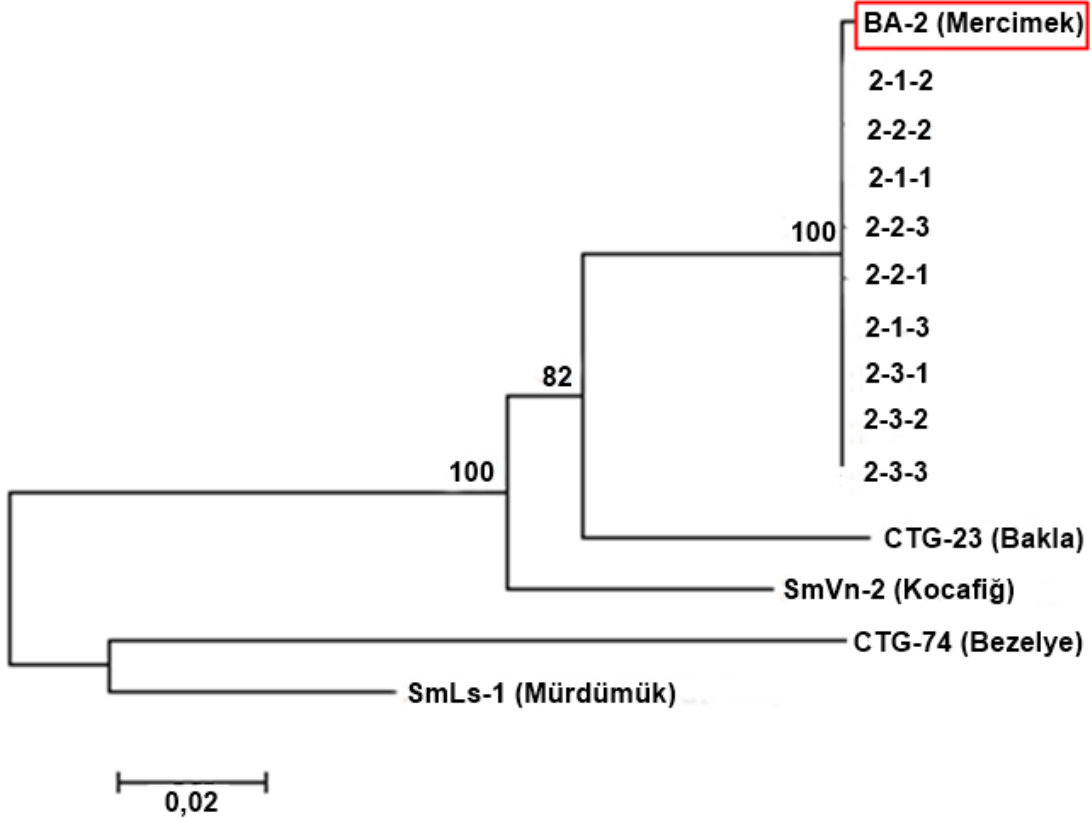


Şekil 4.20. Deneme 1 Neighbor Joining ağacı (1-1-1: deneme 1, 1.tekrar, 1. nodül)

Deneme 1’de (Şekil 4.20) bakla bitkisinin beş kök nodülünden (1-1-1, 1-1-3, 1-2-1, 1-2-3, 1-3-2) bakla bitkisi izolatu CTG-35 elde edilirken, dört kök nodülünden (1-1-2, 1-2-2, 1-3-1, 1-3-3) yabancı tür kocafiğ izolatu SmVn-2 elde edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Deneme 1 uzaklık matrisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.BA-1														
2.CTG-35	0,22													
3.CTG-13	0,20	0,11												
4.SmLs-1	0,24	0,01	0,15											
5.SmVn-2	0,24	0,11	0,07	0,15										
6.1-1-1	0,22	0,00	0,11	0,06	0,11									
7.1-1-2	0,24	0,11	0,07	0,15	0,00	0,11								
8.1-1-3	0,22	0,00	0,11	0,06	0,11	0,00	0,11							
9.1-2-1	0,22	0,00	0,11	0,06	0,11	0,00	0,11	0,00						
10.1-2-2	0,24	0,11	0,07	0,15	0,00	0,11	0,00	0,11	0,11					
11.1-2-3	0,22	0,00	0,11	0,06	0,11	0,00	0,11	0,00	0,00	0,11				
12.1-3-1	0,24	0,11	0,07	0,15	0,00	0,11	0,00	0,11	0,11	0,00	0,11			
13.1-3-2	0,22	0,00	0,11	0,06	0,11	0,00	0,11	0,00	0,00	0,11	0,00	0,11		
14.1-3-3	0,24	0,11	0,07	0,15	0,00	0,11	0,00	0,11	0,11	0,00	0,11	0,00	0,11	

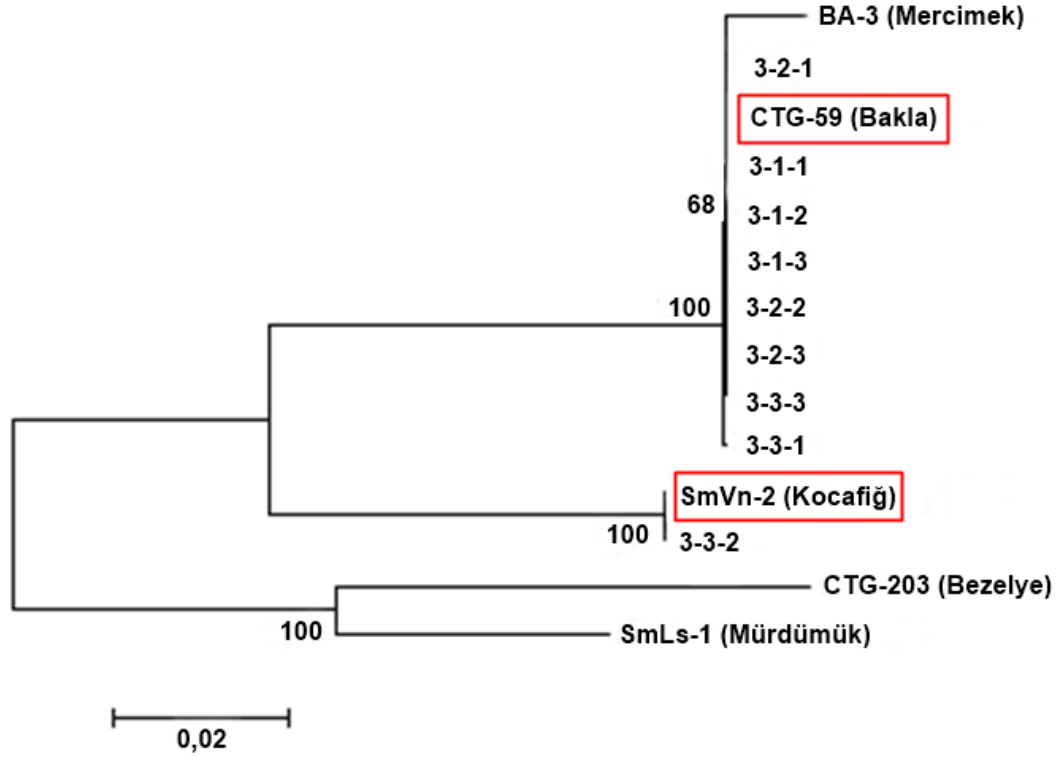


Şekil 4.21. Deneme 2 Neighbor Joining ağacı

Deneme 2’de (Şekil 4.21) bakla bitkisinin dokuz kök nodülünün hepsinden (2-1-1, 2-1-2, 2-1-3, 2-2-1, 2-2-2, 2-2-3, 2-3-1, 2-3-2, 2-3-3) mercimek izolatı BA-2 elde edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Deneme 2 uzaklık matrisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.BA-2														
2.CTG-23	0,08													
3.CTG-74	0,24	0,23												
4.SmLs-1	0,17	0,16	0,14											
5.SmVn-2	0,08	0,10	0,21	0,17										
6.2-1-1	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08									
7.2-1-2	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08	0,00								
8.2-1-3	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08	0,00	0,00							
9.2-2-1	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08	0,00	0,00	0,00						
10.2-2-2	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00					
11.2-2-3	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00				
12.2-3-1	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
13.2-3-2	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
14.2-3-3	0,00	0,08	0,23	0,17	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

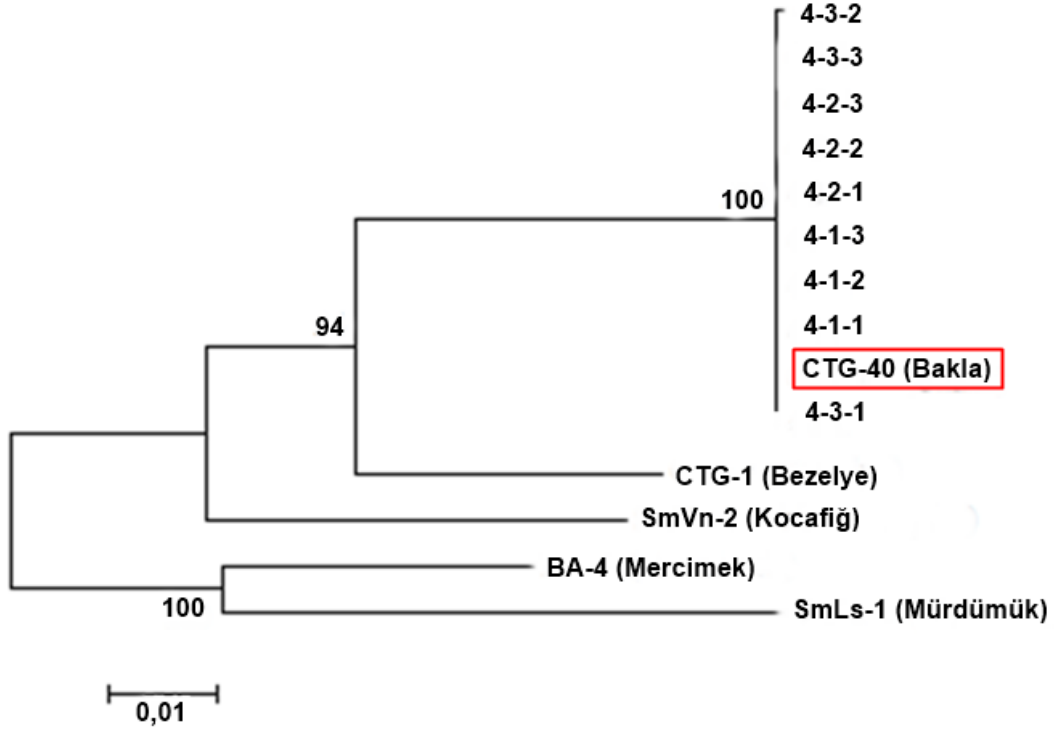


Şekil 4.22. Deneme 3 Neighbor Joining ağacı

Deneme 3’de (Şekil 4.22) bakla bitkisinin sekiz kök nodülünden (3-1-1, 3-1-2, 3-1-3, 3-2-1, 3-2-2-, 3-2-3, 3-3-1, 3-3-3) bakla izolatu olan CTG-59 elde edilirken, bir kök nodülünden (3-3-2) yabancı tür kocafiğ izolatu olan SmVn-2 elde edildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Deneme 3 uzaklık matrisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.BA-3														
2.CTG-59	0,01													
3.CTG-230	0,19	0,18												
4.SmLs-1	0,15	0,14	0,08											
5.SmVn-2	0,11	0,10	0,14	0,17										
6.3-1-1	0,01	0,00	0,18	0,14	0,10									
7.3-1-2	0,01	0,00	0,18	0,14	0,10	0,00								
8.3-1-3	0,01	0,00	0,18	0,14	0,10	0,00	0,00							
9.3-2-1	0,01	0,00	0,18	0,14	0,10	0,00	0,00	0,00						
10.3-2-2	0,01	0,00	0,18	0,14	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00					
11.3-2-3	0,01	0,00	0,18	0,14	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00				
12.3-3-1	0,01	0,00	0,18	0,14	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
13.3-3-2	0,11	0,01	0,14	0,17	0,00	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		
14.3-3-3	0,01	0,00	0,18	0,14	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	

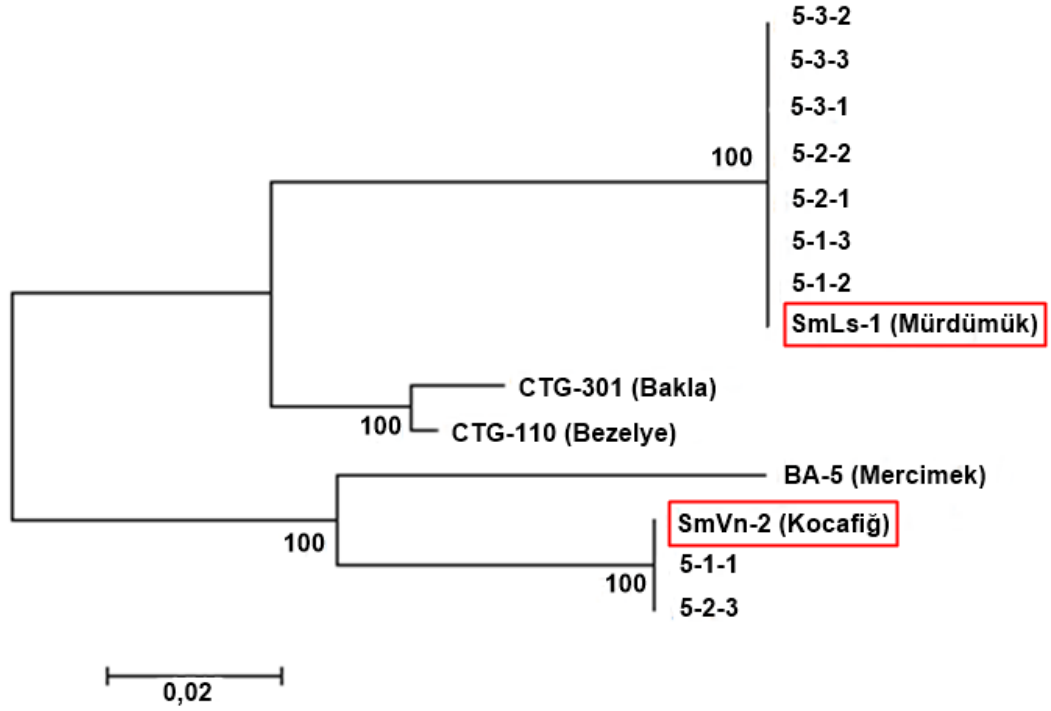


Şekil 4.23. Deneme 4 Neighbor Joining ağacı

Deneme 4’de (Şekil 4.23) bakla bitkisinin dokuz kök nodülünün hepsinden (4-1-1, 4-1-2, 4-1-3, 4-2-1, 4-2-2, 4-2-3, 4-3-1, 4-3-2, 4-3-3) bakla bitkisi izolatu olan CTG-40 elde edildi (Çizelge 4.4) .

Çizelge 4.4. Deneme 4 uzaklık matrisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.BA-4														
2.CTG-40	0,12													
3.CTG-1	0,11	0,07												
4.SmLs-1	0,09	0,14	0,14											
5.SmVn-2	0,10	0,10	0,07	0,13										
6.4-1-1	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09									
7.4-1-2	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09	0,00								
8.4-1-3	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09	0,00	0,00							
9.4-2-1	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09	0,00	0,00	0,00						
10.4-2-2	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00					
11.4-2-3	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00				
12.4-3-1	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
13.4-3-2	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
14.4-3-3	0,12	0,00	0,07	0,14	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

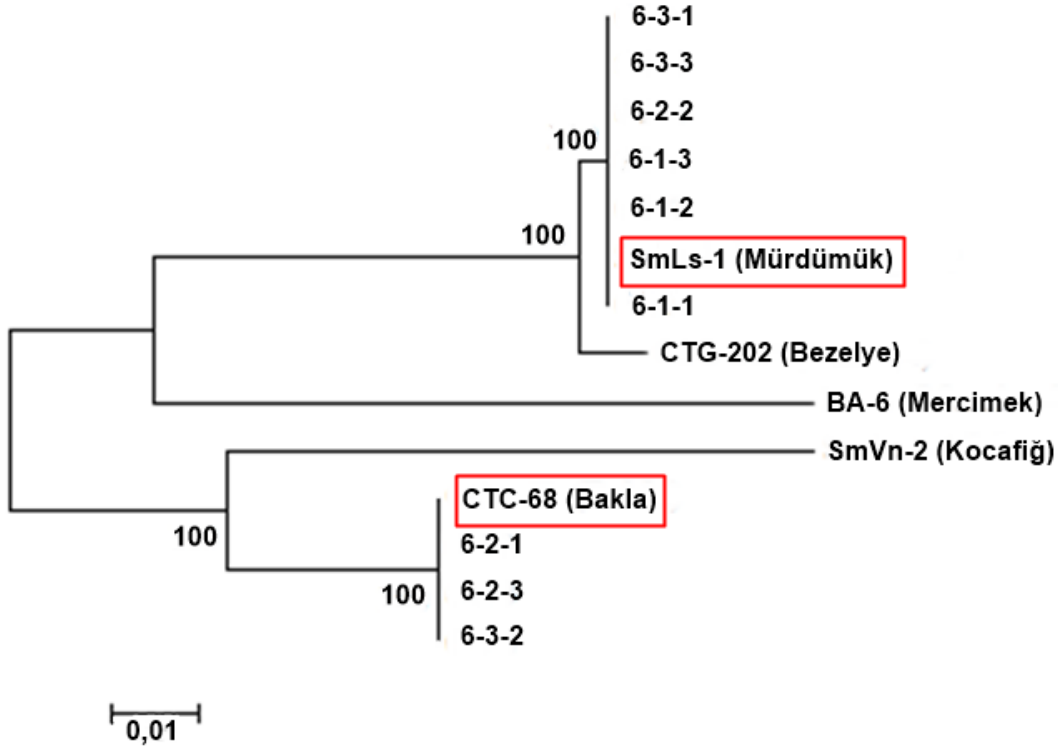


Şekil 4.24. Deneme 5 Neighbor Joining ağacı

Deneme 5’de (Şekil 4.24) bakla bitkisinin yedi kök nodülünden (5-1-2, 5-1-3, 5-2-1, 5-2-2, 5-3-1, 5-3-2, 5-3-3) yabancı tür mürdümük izolatu SmLs-1 elde edilirken, iki kök nodülünden (5-1-1, 5-2-3) yabancı tür kocafiğ izolatu olan SmVn-2 elde edildi (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Deneme 5 uzaklık matrisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.BA-5														
2.CTG-301	0,14													
3.CTG-110	0,14	0,01												
4.SmLs-1	0,17	0,08	0,08											
5.SmVn-2	0,09	0,13	0,12	0,16										
6.5-1-1	0,09	0,13	0,12	0,16	0,00									
7.5-1-2	0,17	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16								
8.5-1-3	0,17	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16	0,00							
9.5-2-1	0,17	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16	0,00	0,00						
10.5-2-2	0,17	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16	0,00	0,00	0,00					
11.5-2-3	0,09	0,13	0,12	0,16	0,00	0,00	0,16	0,16	0,16	0,16				
12.5-3-1	0,17	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16			
13.5-3-2	0,17	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00		
14.5-3-3	0,17	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	

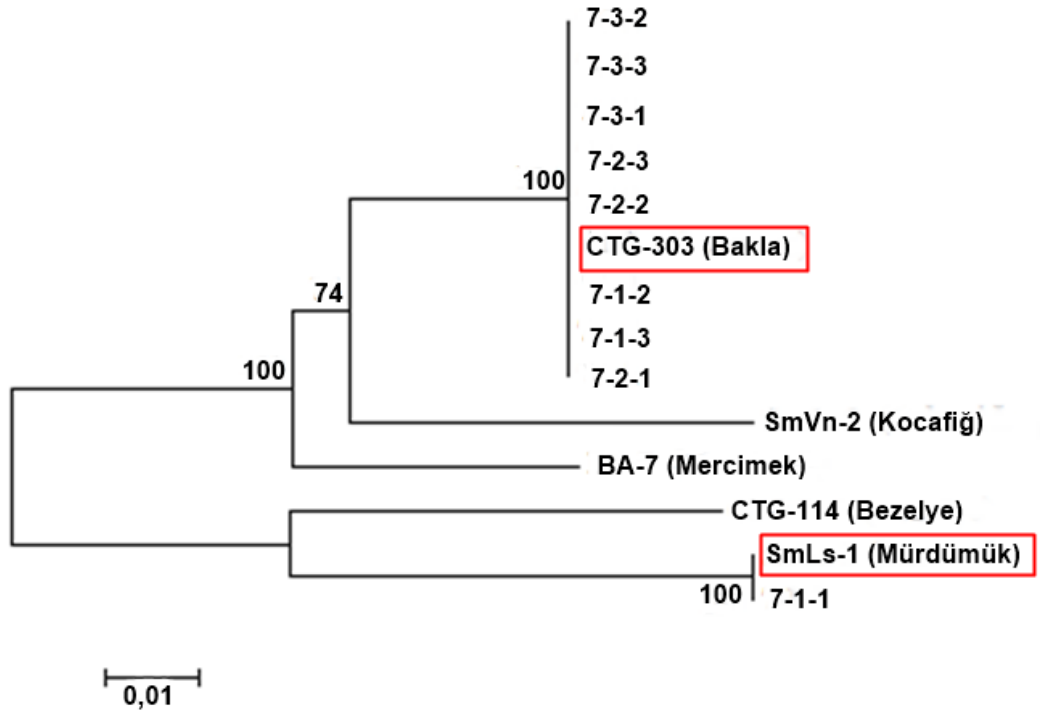


Şekil 4.25. Deneme 6 Neighbor Joining ağacı

Deneme 6’da (Şekil 4.25) bakla bitkisinin altı kök nodülünden (6-1-1, 6-1-2, 6-1-3, 6-2-2, 6-3-1, 6-3-3) yabancı tür mürdümük izolatu olan SmLs-1 elde edilirken, üç kök nodülünden (6-2-1, 6-2-3, 6-3-2) bakla bitkisi izolatu olan CTG-68 elde edildi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Deneme 6 uzaklık matrisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.BA-6														
2.CTG-68	0,13													
3.CTG-202	0,13	0,12												
4.SmLs-1	0,13	0,12	0,01											
5.SmVn-2	0,19	0,10	0,17	0,16										
6.6-1-1	0,13	0,12	0,01	0,00	0,16									
7.6-1-2	0,13	0,12	0,01	0,00	0,16	0,00								
8.6-1-3	0,13	0,12	0,01	0,00	0,16	0,00	0,00							
9.6-2-1	0,13	0,00	0,12	0,12	0,10	0,12	0,12	0,12						
10.6-2-2	0,13	0,12	0,01	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,12					
11.6-2-3	0,13	0,00	0,12	0,12	0,10	0,12	0,12	0,12	0,00	0,12				
12.6-3-1	0,13	0,12	0,01	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,12			
13.6-3-2	0,13	0,00	0,12	0,12	0,10	0,12	0,12	0,12	0,00	0,12	0,00	0,12		
14.6-3-3	0,13	0,12	0,01	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,12	0,00	0,12	

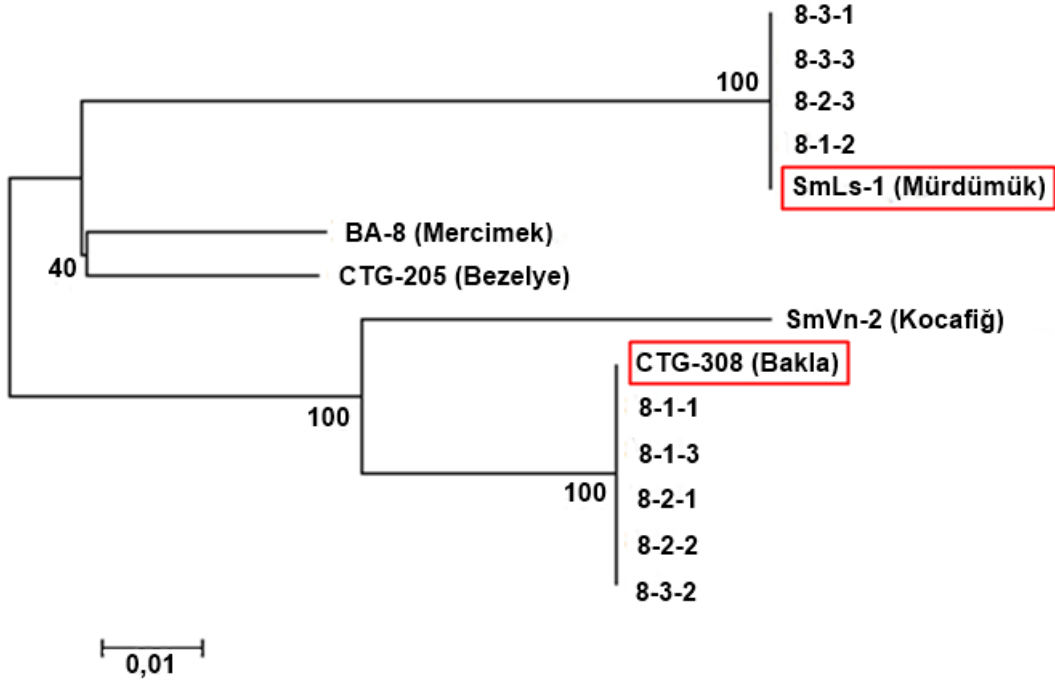


Şekil 4.26. Deneme 7 Neighbor Joining ağacı

Deneme 7’de (Şekil 4.26) bakla bitkisinin sekiz kök nodülünden (7-1-2, 7-1-3, 7-2-1, 7-2-2-, 7-2-3, 7-3-1, 7-3-2, 7-3-3) bakla bitkisi izolatu olan CTG-303 elde edilirken, bir kök nodülünden (7-1-1) yabancı tür mürdümük izolatu olan SmLs-1 elde edildi (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Deneme 7 uzaklık matrisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.BA-7														
2.CTG-303	0,06													
3.CTG-114	0,14	0,14												
4.SmLs-1	0,13	0,14	0,01											
5.SmVn-2	0,09	0,07	0,16	0,15										
6.7-1-1	0,13	0,14	0,01	0,00	0,15									
7.7-1-2	0,06	0,00	0,14	0,14	0,07	0,14								
8.7-1-3	0,06	0,00	0,14	0,14	0,07	0,14	0,00							
9.7-2-1	0,06	0,00	0,14	0,14	0,07	0,14	0,00	0,00						
10.7-2-2	0,06	0,00	0,14	0,14	0,07	0,14	0,00	0,00	0,00					
11.7-2-3	0,06	0,00	0,14	0,14	0,07	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00				
12.7-3-1	0,06	0,00	0,14	0,14	0,07	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
13.7-3-2	0,06	0,00	0,14	0,14	0,07	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
14.7-3-3	0,06	0,00	0,14	0,14	0,07	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	



Şekil 4.27. Deneme 8 Neighbor Joining ağacı

Deneme 8’de (Şekil 4.27) bakla bitkisinin beş kök nodülünden (8-1-1, 8-1-3, 8-2-1, 8-2-2, 8-3-2) bakla bitkisi izolatu olan CTG-308 elde edilirken, dört kök nodülünden (8-1-2, 8-2-3, 8-3-1, 8-3-3) yabancı tür mürdümük izolatu olan SmLs-1 elde edildi (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Deneme 8 uzaklık matrisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.BA-8														
2.CTG-308	0,09													
3.CTG-205	0,05	0,09												
4.SmLs-1	0,09	0,14	0,10											
5.SmVn-2	0,12	0,07	0,12	0,14										
6.8-1-1	0,09	0,00	0,09	0,14	0,07									
7.8-1-2	0,09	0,14	0,09	0,00	0,14	0,14								
8.8-1-3	0,09	0,00	0,09	0,14	0,07	0,00	0,14							
9.8-2-1	0,09	0,00	0,09	0,14	0,07	0,00	0,14	0,00						
10.8-2-2	0,09	0,00	0,09	0,14	0,07	0,00	0,14	0,00	0,00					
11.8-2-3	0,09	0,14	0,09	0,00	0,14	0,14	0,00	0,14	0,14	0,14				
12.8-3-1	0,09	0,14	0,09	0,00	0,14	0,14	0,00	0,14	0,14	0,14	0,00			
13.8-3-2	0,09	0,00	0,09	0,14	0,07	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,14	0,14		
14.8-3-3	0,09	0,14	0,09	0,00	0,14	0,14	0,00	0,14	0,14	0,14	0,00	0,00	0,14	

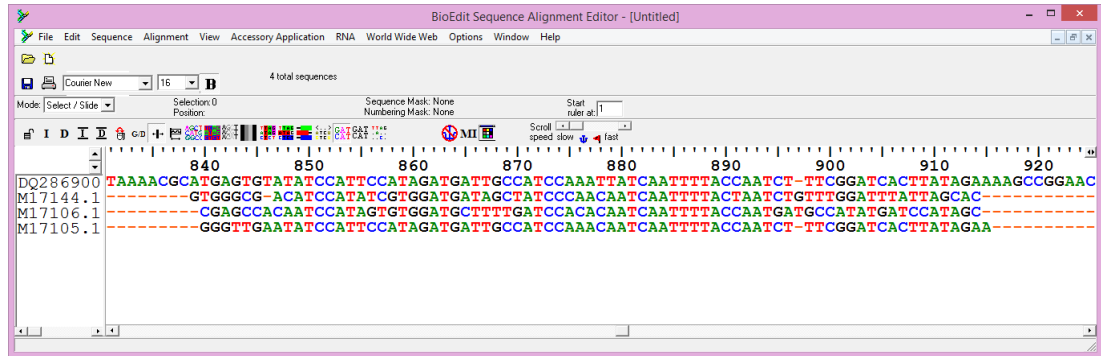
4.2.1 ITS-PCR ürünlerin polimorfik DNA analizi

Denemelerde kullanılan test izolatlarının ITS bölgesinin PCR ürünleri ele alınarak; nodülasyon testlerinde nodül oluşumu için tercih edilen izolatlarda, tercih edilmeyen izolatlara göre farklılık olup olmadığının anlaşılması için BioEdit programında benzer bölgeleri çıkartılarak polimorfik bölgeleri incelendi (Bkz. EK A). Bu işlemde mercimek bitkisinden elde edilen *Rhizobium* izolatı BA-1'in ITS bölgesinin PCR ürünü tam olarak güvenilir olmadığı için kullanılmadı (BA-1 izolatı deneme 1'de kullanıldı ve deneme 1'den elde edilen dokuz nodülün hiçbirinden BA-1 izolatı çıkmadı).

Denemelerde kullanılan *Rhizobium* izolatlarının ITS-PCR bölgelerinin polimorfik yapısı incelendiğinde, denemelerde nodülasyon oluşumu için tercih edilen organizmaların kendilerine özgü polimorfizm içermediği bulundu

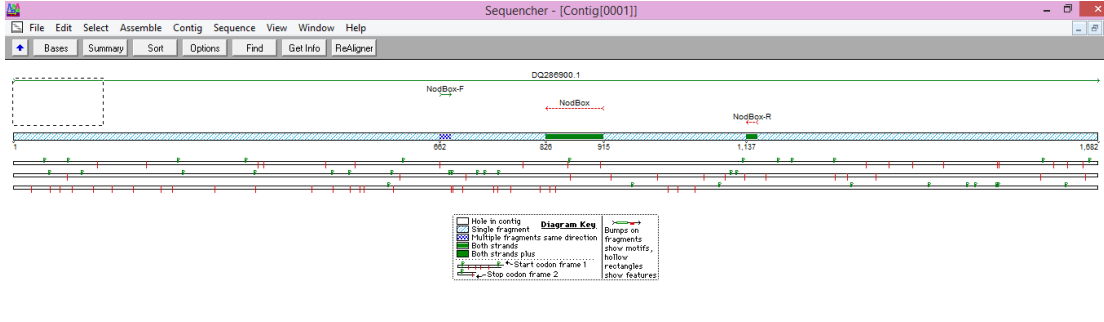
4.3 *nod* Kutusu Analizi

nod kutusu bölgesinin çoğaltılması için uygun primerlerin bulunması amacıyla; *nod* kutusu bölgesi belirlendi. Bunun için NCBI veri tabanında bulunan DQ286900.1, M17105.1, M17106.1 ve M17144.1 dizilerinin BioEdit programında hizalandı (Şekil 4.28).



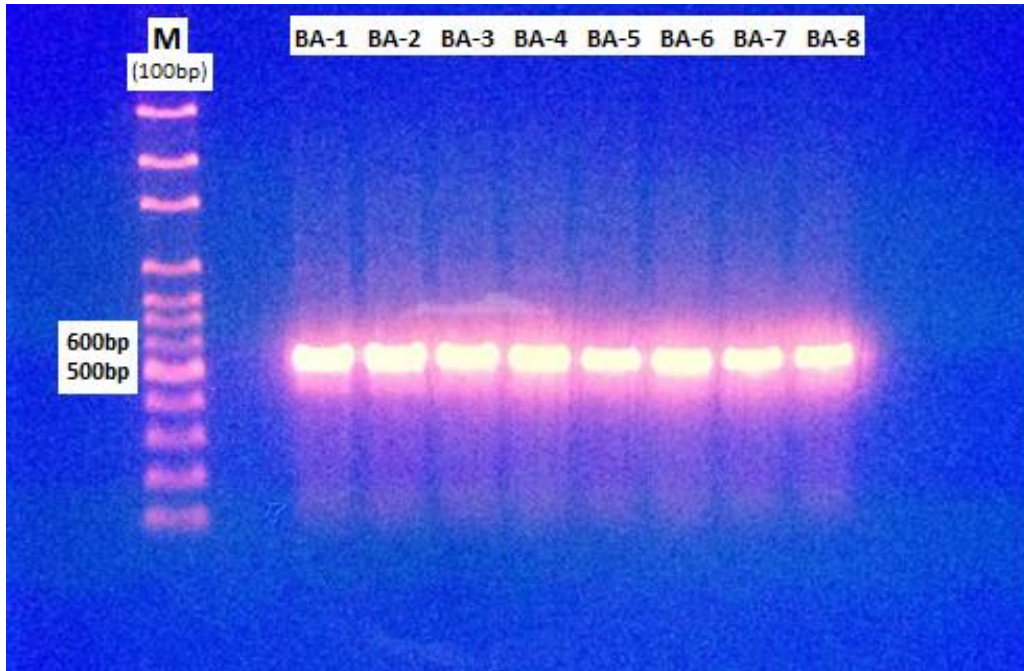
Şekil 4.28. BioEdit programında hizalanmış olan *nod* kutusu bölgesi

Bölge için özgül primer bulmak için web ortamındaki Primer3 programı (v 0.4.0) kullanıldı. Bölgenin 200 bp aşağısında ve yukarısında olacak şekilde ileri ve geri primerleri tasarlandı. Tasarlanan primerler Sequencher v5.0 programında kontrol edildi (Şekil 4.29).



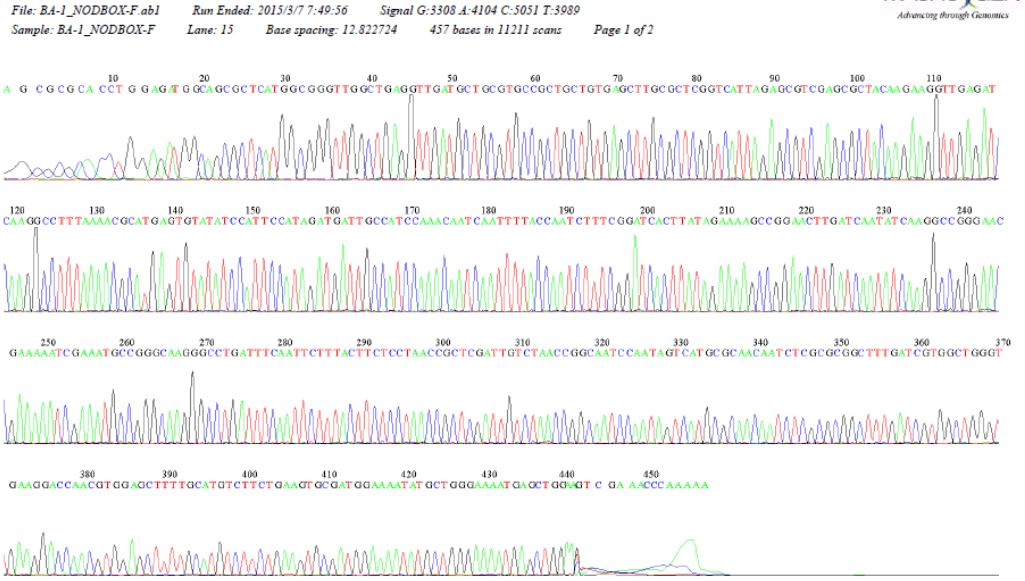
Şekil 4.29. Sequencer v5.0 programında primerlerin bağlantı yerleri.

Primerlerin sentezlenmesinin ardından denemelerde kullanılan her bir izolata PCR işlemi yapıldı ve ürünler %1'lik agaroz jelde gözlemlendi (Şekil 4.30).

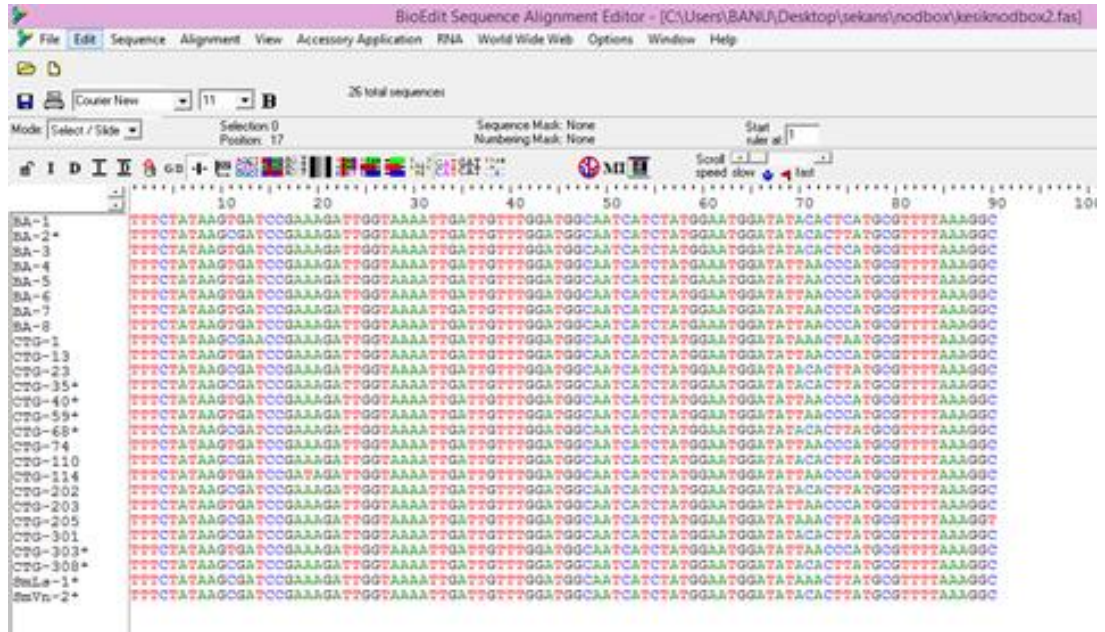


Şekil 4.30. Mercimek bitkisinin köklerindeki nodüllerden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatlarının *nod* kutusu bölgesi PCR görüntüsü

Elde edilen PCR dizileri (Şekil 4.31) BioEdit programında kontrol edilip hizalandı (Şekil 4.32).

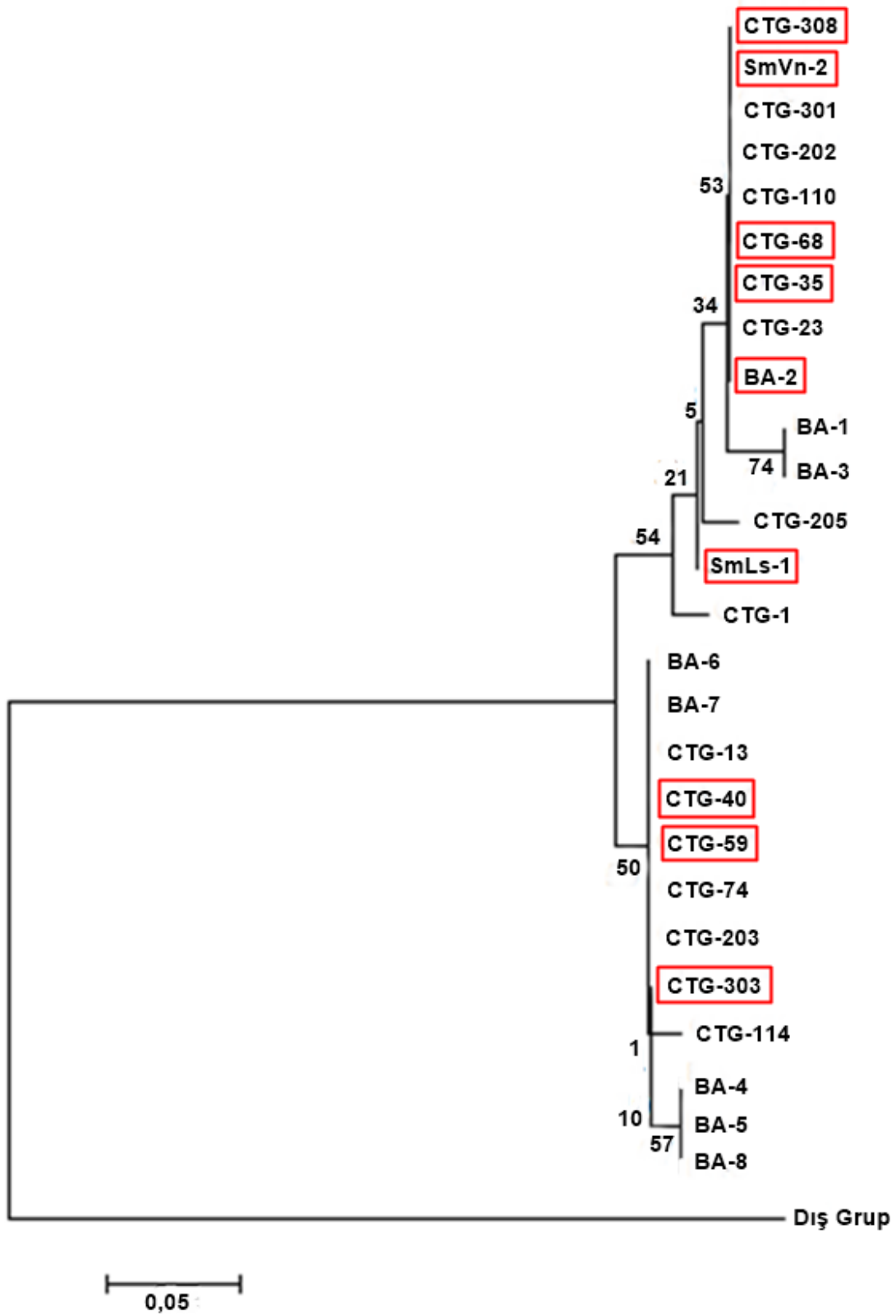


Şekil 4.31. Macrogen Inc.'de dizileme işlemi yapılan BA-1 izolatının NodBox-F primeriyle elde edilen dizisi.



Şekil 4.32. BioEdit programında kontrol edilip hizalanan *nod* kutusu bölgeleri.

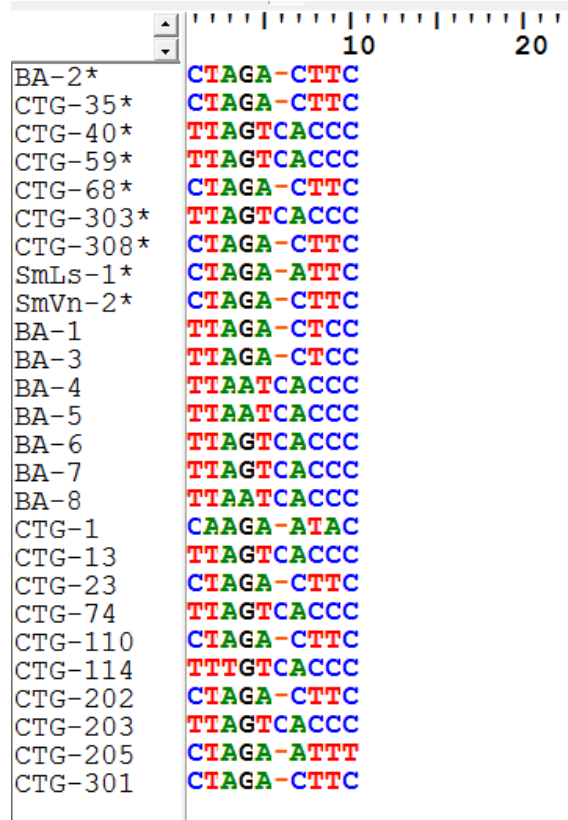
Dış grup olarak NCBI veri tabanından alınan X65620.1 kodlu dizi kullanılarak Mega6 programında dizilerin Neighbour Joining (bootstrap 10000) ağaçları (Şekil 4.33) oluşturuldu.



Şekil 4.33. *nod* kutusu bölgesi Neighbor Joining ağacı (kırmızıyla işaretlenmiş olan izolatlar denemelerde bakla bitkisi tarafından tercih edilen izolatlardır)

4.3.1 *nod* kutusu-PCR ürünlerin polimorfik DNA analizi

Denemelerde kullanılan test izolatlarının *nod* kutusu bölgesinin PCR ürünleri ele alınarak; nodülasyon testlerinde nodül oluşumu için tercih edilen izolatlarda, tercih edilmeyen izolatlara göre farklılık olup olmadığının anlaşılması için BioEdit programında benzer bölgeleri çıkartılarak polimorfik bölgeleri incelendi (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Denemelerdeki izolatlarının *nod* kutusu-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)

Denemelerde kullanılan *Rhizobium* izolatlarının *nod* kutusu- PCR bölgelerinin polimorfik yapısı incelendiğinde, denemelerde nodülasyon oluşumu için tercih edilen organizmaların kendilerine özgü polimorfizm içermediği bulundu.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi'ndeki bazı illerde (Samsun, Ordu, Amasya, Sinop ve Çorum) yetiştirilen bakla (*Vicia faba* L.), bezelye (*Pisum sativum* L.), mercimek (*Lens culinaris* Medik.) ve yabancı türler kocafiğ (*Vicia narbonensis* L.) ve mürdümüğü (*Lathyrus setifolius* L.) kök nodüllerinden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatlarıyla, *Vicia* grubu içinde rhizobia-baklagil seçiciliğinin olup olmadığı bakla bitkisi kullanılarak test edilmiştir. Bakla, bezelye, mercimek ve yabancı türlerden elde edilen izolatlar kendi laboratuvar kültür koleksiyonumuzdan kullanılmıştır.

5.1 *Rhizobium* İzolatlarının Gruplandırılması İçin RAPD-PCR Kullanımı

Rhizobium leguminosarum biovar. *viciae* izolatlarının denemelerde kullanılmak üzere birbirlerinden ayrılması için öncelikle RAPD-PCR işlemi uygulanmıştır. RAPD işlemi, Rivas ve diğ. (2006) ve Rajasundari ve diğ. (2009) tarafından belirtildiği gibi izolatların ayrımında oldukça kolaylık sağlamıştır. %2'lik metafor agarozda oluşan bant profilleri oldukça farklı çıkmıştır. Oluşan bantların farklılığından yararlanılarak izolatlar, denemeler için sekiz farklı gruba ayrılmıştır.

5.2 Nodülasyon Testi Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

Nodülasyon testleri Vincent (1970)'da verilen yönteme uygun olarak yapılmıştır. Bu yöntem ve içeriğinde bulunan ortamlar bakla fidesinin gelişimini desteklemiş ve deneylerin başarıyla sonuçlanmasını sağlamıştır.

Nodülasyon testlerinde herhangi bir rhizobiyal izolatın bulunmadığı kontrol çalışmasında, bakla bitkisinin gelişeceği ortama azotsuz fide besin çözeltisi verilmiştir. Bitki azot olmayan bu ortamda beklendiği üzere tam olarak gelişmemiştir. Gövde ve kök yapısı zayıf kalmış, meyve oluşumu tespit edilmemiştir. Gruber ve Galloway (2008) belirttiği gibi azot, bitki gelişimi için önemlidir ve yokluğu kısıtlayıcı faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Herhangi bir

rhizobiyal izolatın bulunmadığı ve azotlu kontrol çalışmasında ise dışarıdan fide besin çözeltisi içinde bitkinin geliştiği ortama azot takviyesi yapılmıştır. Bitkinin normal gelişim gösterdiği ve meyve oluşturabildiği görülmüştür.

Denemeye alınan her bir izolatın sadece bir tanesinin yer aldığı pozitif kontrollerin çalışmasında ise burada bitkinin geliştiği ortama azotsuz fide besin çözeltisi verilmiş ve ortama rhizobiyal suş ilavesi yapılmıştır. Her bir şişe içerisinde tek bir rhizobiyal suş bulunacak şekilde hazırlanan pozitif kontroller sonucunda, bakla bitkisine aşılana tüm pozitif kontroller nodül oluşturabilmişlerdir. Oluşan nodüllerin yapısı incelendiğinde bazı pozitif kontrollerde nodül sayısının daha fazla bazılarının ise daha az olduğu görülmüştür. Nodül büyüklükleri incelendiğinde farklılıklar bulunmuştur. Nodüllerin bir kısmının aktif olduğunu gösterir şekilde pembe renkte, bir kısmının ise pasif olduğunu gösterir şekilde beyaz-sarı renkte olduğu tespit edilmiştir.

Denemeye alınan 5 izolatın (bakla, bezelye, mercimek izolatlarından birer tane ve yabancı tür örnekleri) karışımının yer aldığı asıl çalışmadan alınan aktif nodüller kullanılarak bakteri izolasyonu Somasegaran ve Hoben (1985) ve Elkan (1987)'da belirtilen yöntemle göre yapılmış, çok az kültürde fungal kontaminasyon oluşmasına karşı saflaştırma işlemlerinden sonra izolatlar saf olarak elde edilmiştir. Bu yöntem nodüllerden *Rhizobium* izolatlarının ayrılması için oldukça kullanışlıdır. DNA izolasyonu için Temizkan ve Arda (2004)'da verilen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemi uygulanma sebebi *Rhizobium* izolatlarının çok miktarda eksopolisakkarit oluşturmaları ve klasik DNA izolasyonlarında bu eksopolisakkaritlerin varlığının DNA izolasyonuna imkan vermemesidir. Bu nedenle Temizkan ve Arda (2004)'da verilen ve içerisinde CTAB/NaCl bulunan yöntem uygulanmıştır. Bu madde eksopolisakkaritleri bağlayarak onların çökmesini sağlar, böylece DNA elde edilebilir.

5.3 Denemelerde Tercih Edilen İzolatın Belirlenmesi

Denemelerde tercih edilen izolatın belirlenmesi için ilk olarak DNA, RAPD ile çoğaltılmış, fakat da Cunha Galvão ve Lages-Silva (2008)'da belirtildiği gibi tekrar yapılan RAPD işlemleri sonucunda daha önce elde edilen RAPD bantları oluşturulamamıştır. İşlem birçok defa tekrarlanmasına rağmen anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bu nedenle denemelerde tercih edilen izolatların ayrılmasında ITS-

PCR amplifikasyonu kullanılmıştır. Gürtler ve Stanisich (1996), Palmer ve Young (2000) ve Kwon ve diğ. (2005) belirtildiği gibi oldukça değişkenlik gösteren ve genomda tek kopya olarak bulunan bu bölge izolatların ayırımında oldukça kullanışlı olmuştur.

Denemelerde yapılan nodülasyon testi çalışmasıyla Surin ve Downie (1985) ve van Berkum ve diğ. (1995) belirttiği gibi rhizobia-baklagil özgüllüğü tespit edilmiştir. Bakla bitkisinin köklerindeki nodülden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları tekrar bakla bitkisine aşılınmaları sonucunda; rekabet ortamında dahi diğer bitkilerden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatlarına kıyasla daha başarılı oldukları ortaya çıkmıştır. Bu durum Friesen ve Mathias (2010). Sachs ve Simms (2008) ve Marco ve diğ. (2009) belirttiği gibi, konukçu bitki yararlı rhizobiayı daha büyük nodül oranıyla desteklemiş, yararlı olmayanların ise kabiliyetlerini azaltmıştır.

Denemelerde kullanılan mercimek bitkisinden elde edilen izolatlardan sadece biri (BA-2) rekabet ortamında başarılı olmuş ve nodül oluşturmuştur. Bu izolat kullanıldığı denemede diğer tüm izolatları geride bırakarak başarılı olmuştur. Bu durum mercimek bitkisinin alındığı tarlada daha önce bakla yetiştiriciliği yapılmış olabileceği ve bu ürünlerden geriye kalan özgülleşmiş izolatın daha sonra mercimek ekimiyle mercimek bitkisinin köklerinde nodül oluşturması; böylelikle mercimek bitkisi köklerinden elde edilmiş olmasına bağlı olabilir. Bu durumda bu izolatın asıl simbiyotik türü bakla bitkisi olabilir. Bunun dışında izolatın tüm nodüllerden elde edilmiş olması izolatın kendi uyum yeteneğinin yüksek olmasıyla ve bu şekilde bakla bitkisinden ve yabancı türlerden elde edilen izolatların yerine nodül oluşturmuş olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Denemelerin hiçbirinde bezelye bitkisinden elde edilen izolatlar elde edilememiştir. Rekabet ortamında bakla bitkisi ile nodül oluşturamamışlardır. van Berkum ve diğ. (1995) bakla (*Vicia faba* L.) üzerine yaptıkları RFLP çalışmalarında, belirttikleri bakla bitkisinden elde edilen *Rhizobium* izolatlarının *Pisum sativum* Medik., *V. villosa* Roth, ve *Trifolium* spp. ait bitkilerde bulunanlardan ayırt edilebildiğini durumu; çalışmamızda denemelerin hiçbirinde bezelye bitkisine ait izolatların nodül oluşturamamasıyla desteklenmiştir. İki bitki arasında belirgin bir konukçu spesifikliğı olduğu ve bakla bitkisinde bezelye bitkisinden elde edilen izolatların aktif nodül oluşturamadığı görülmüştür.

Denemelerde bakla, bezelye, mercimek ve yabancı türler kocağı ve mürdümük bitkilerinin köklerinden alınan aktif nodüllerden izole edilen izolatlar içinde; bakla bitkisi için yararlı ve rhizobia-baklagil simbiyotik yaşamı için en uygun rhizobiyal izolatlar belirlenmiştir. Bu izolatlar bakla bitkisinden elde edilen CTG-35, CTG-40, CTG-59, CTG-68, CTG-303, CTG-308; mercimek bitkisinden elde edilen BA-2; yabancı tür kocağı bitkisinden elde edilen SmVn-2 ve yabancı tür mürdümükten elde edilen SmLs-1'dir.

Mercimek bitkisinden elde edilen *Rhizobium* izolatı BA-1'in nodülasyon testlerinin incelenmesi için elde edilen ITS-PCR ürünü agaroz jelde PCR ürününün bantının çift oluşturduğu görülmüştür. Tekrarlanan PCR işlemleri sonucu değiştirmemiştir. PCR protokolü ve PCR içeriğı değişik modifikasyonlar yapılmış ve işlemler optimize edilmeye çalışılmasına karşın çift bant oluşumunun devam ettiği görülmüştür. Çift bant oluşumun DNA kontaminasyonu kaynaklı olup olmadığının anlaşılması için BA-1 izolatından tekrar DNA izolasyonu yapılmış ve DNA ITS-PCR işlemine tabi tutulmuştur. İşlem sonucunda tekrar çift bant oluşumu gözlemlenmiştir. Böylelikle oluşumun kontaminasyon kaynaklı olmadığı mikroorganizma kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. PCR ürünü bant kesme işlemi ve dizileme işlemi yapılabilmesi için Macrogen Inc. Hollanda firmasına gönderilmiş. Fakat firmadan gelen dizileme sonuçlarının temiz olmadığı görülmüştür. Macrogen Inc. firmasına gönderilen diğer ITS-PCR ürünlerinden elde edilen diziler temiz olarak elde edilmiştir. Tek bant oluşumunu sağlayabilmek için PCR ürünü klonlama işlemine tabi tutulmuştur. Plazmit DNA ürünleri Macrogen Inc. firmasına gönderilmiş fakat temiz bir dizi elde edilememiştir. Deneme 1'de kullanılan ve bakla bitkisi tarafından nodülasyon oluşumu için tercih edilmediğı anlaşılan BA-1'e ait dizi, nodülasyon testi ağacında kullanılabilmesi için oldukça temizlenmeye çalışılmış ancak güvenilir olmaması nedeniyle daha sonraki değerlendirmede (polimorfik DNA) kullanılmamıştır. BA-1 izolatında oluşan bu durum muhtemelen bu mikroorganizmaya özgüdür; dolayısıyla ITS bölgesi için Gürtler ve Stanisich (1996) ve Palmer ve Young (2000)'nin belirttiğı genomda tek kopya olarak bulunduğu görüşünün bu izolat için geçerli olmadığı söylenebilir.

Denemelere katılan test izolatlarının hepsinin ITS-PCR bölgelerinin polimorfik DNA analizi yapıldığında; nodülasyon testlerinde nodül oluşumu için tercih edilen izolatlarda, tercih edilmeyen izolatlara göre ayırt edici bir farklılık bulunmamıştır. Kwon ve diğ (2005)'de belirtildiğı gibi yüksek dizi varyasyonu tespit edilmiştir.

Yakın ilişkili olan bu izolatlarda bile Gürtler ve Stanisich (1996) değindiği gibi dizi varyasyonu fazladır. Bununla birlikte simbiyotik ilişkinin özgüllüğünün açıklanmasında kullanılabilecek herhangi bir şablon tespit edilememiştir.

5.4 *nod* Kutusu'nun Bölgesinin İncelenmesi

Rhizobia–baklagil tercihindeki özgüllüğün NodD proteinin bağlandığı promotor bölge *nod* kutusu ile ilgili olup olmadığı ilk kez bu tez çalışmamızda araştırılmış; özgüllüğün nedeninin doğrudan *nod* kutusundaki dizi farklılığıyla ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda farklı rhizobiyal suşlara ait *nod* kutusu dizilerinin ortaya çıkarılması nedeniyle, bu veriler bundan sonra yapılacak çalışmalara belirli ölçülerde katkı sağlayacaktır.

Denemelere katılan test izolatlarının hepsinin *nod* kutusu-PCR bölgelerinin polimorfik DNA dizileri incelendiğinde; nodülasyon testlerinde nodül oluşumu için tercih edilen izolatlarda, tercih edilmeyen izolatlara göre ayırt edici bir farklılık bulunmamıştır. Moat (2002)'a göre *nod* kutusu bölgesi oldukça korunmuş DNA dizisine sahiptir ancak Schlaman ve diğ. (1998)'de belirtildiği gibi bu oldukça korunmuş olan bölgelerin bazı bölgelerinde azda olsa dizi farklılıkları bulunabilmektedir. Fakat yaptığımız çalışmada bu dizi farklılıkları simbiyotik izolatların neden tercih edildiğini açıklamada yeterli olamamıştır.

Bu çalışma ile inokulant çalışması sonuçlarının izlenebilmesi ve hangi izolatın bitkiler tarafından tercih edildiğinin belirlenebilmesinde, kullanılabilecek çok karmaşık olmayan bir genetik yöntem ortaya konulmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 *Rhizobium* İzolatlarının Gruplandırılması İçin RAPD-PCR Kullanımı

Tez çalışmasında kullanılan *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatlarının ayrılabilmesi için RAPD işlemi kullanıldı işlem sonucunda, izolatların birbirlerinden oldukça farklı bant profilleri oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.1). Oluşan bant profillerinin farklılığından yararlanılarak izolatlar sekiz farklı deneme içinde kolaylıkla ayrılabilirdi.

RAPD-PCR çalışmalarında aynı sonuçları devamlı olarak almanın güçlüğü nedeniyle tez çalışmasının devam eden basamaklarında bu yöntem tercih edilmedi.

6.2 Nodülasyon Testi Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

Her bir rhizobiyal izolatının tek tek kullanıldığı pozitif kontrollerde, tüm izolatlar bakla bitkisinin köklerinde nodül oluşturabildi. Bu durum bize bakla, bezelye, mercimek veya yabancı türlerden elde edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatlarının herhangi bir rekabet durumunda kalmadıklarında, bakla bitkisinin kökünde kolaylıkla nodül oluşturduğunu gösterdi.

Denemelerde bir bakla, bir bezelye, bir mercimek ve iki yabancı türün köklerinden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları bir arada rekabet ortamında bakla bitkisine aşılandığında, bakla bitkisinin belli izolatları tercih ettiği bulundu. Deney sonuçları incelenip (Şekil 4.20-27) toplam nodül sayısı dikkate alındığında genel olarak; 72 nodülün 38'inden bakla bitkisinin kökündeki nodülden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatları CTG-35, CTG-40, CTG-59, CTG-68, CTG-303, CTG-308 (%52,78), 18'inden yabancı tür mürdümük kökündeki nodülden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatu SmLs-1 (%25), 9'undan mercimek bitkisinin kökündeki nodülden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatu BA-2 (%12,5) ve 7'sinden yabancı tür kocafig kökündeki nodülden izole edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatu SmVn-2 (%9,72) elde edildi.

Bakla bitkisinden elde edilen izolatların tekrar bakla bitkisine aşılınmaları sonucunda diğer bitkilerden izole edilen bakterilere karşı nodülasyon rekabetinde %52,78 oranında başarılı olmaları, bitkiye karşı özgül ilişkiler geliştirmiş olduklarını gösterebilir.

Yabani türlerden elde edilen SmLs-1 ve SmVn-2 izolatlarının toplam olarak rekabette %34,72 oranında başarılı olmaları; yabani genleri sayesinde, ortama uyum sağlama yeteneklerinin fazla olmasına ve bu bakımından diğer organizmalarla daha kolay rekabet etmeleriyle ilişkilendirilebilir.

Mercimek bitkisinden elde edilen BA-2 izolatının kullanıldığı denemede, tüm nodüllerden bu izolat elde edildi. Böylece rekabet ortamında özgülleşmiş bakla izolatını ve rekabet oranı yüksek olan yabani tür izolatlarını geride bıraktı. Bu durum mercimek bitkisinin alındığı tarlada daha önce bakla yetiştiriciliği yapılmış olabileceği ve bu ürünlerden geriye kalan özgülleşmiş izolatın daha sonra mercimek dikimiyle mercimek bitkisinin köklerinde nodül oluşturmasıyla veya ilgili izolatın uyum yeteneğinin yüksek olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Denemelerin hiçbirinde bezelye bitkisinden elde edilen izolatlar başarılı olamadı. Bezelyeden izole edilen mikroorganizmalarda özgülüğün diğer izolatlarla rekabet etmesini engelleyici olduğu düşünülebilir.

Denemelerde kullanılan *Rhizobium* izolatlarının ITS-PCR bölgelerinin polimorfik yapısı incelendiğinde, denemelerde nodülasyon oluşumu için tercih edilen organizmaların kendilerine özel bir şablon oluşturmadığı bulundu.

6.3 *nod* Kutusu'nun İncelenmesinden Elde Edilen Sonuçlar

Denemelerde tercih edilen mikroorganizmaların tercih edilme özgülüğünün bulunmasında; özgülüğün *nodD* gen ürünü olan NodD proteinin bağlandığı *nod* kutusu bölgesindeki farklılıklardan kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırıldı. Bu çalışmada test için kullanılan izolatların *nod* kutusu bölgesi çoğaltılarak incelendi. Neighbour Joining 10000 bootstrap ağacı (Şekil 3.18) oluşturuldu ve ağaç incelendiğinde bakla bitkisi tarafından aktif nodül oluşturması için tercih edilen *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* izolatlarının *nod* kutusu açısından belli bir grup oluşturmadığı bulundu. Söz konusu bölgenin izolatlar arasındaki özgülüğü açıklayacak şekilde ilişkili olmadığı anlaşıldı, ancak bir kontrol bölgesi olması bakımından diğer gen bölgeleriyle ilişkisinin araştırılması gerekmektedir.

Denemelerde kullanılan *Rhizobium* izolatlarının *nod* kutusu bölgesi PCR polimorifik yapısı incelendiğinde, denemelerde nodülasyon oluşumu için tercih edilen organizmaların kendilerine özgü polimorfizm içermediği bulundu. *nod* kutusu dizisinde oldukça korunmuş olan bölgelerin dışında bazı dizi varyasyonları da tespit edildi. Fakat bu dizi farklılıkları izolatların neden tercih edildiğinin belirlenmesi için yeterli veri oluşturmadı.

6.4 Tez Çalışmasının Etkileri

Mutualistik ilişkilerden biri olan rhizobia-baklagil özgüllüğü bu çalışmada açık bir şekilde ortaya kondu. Ülkemizde yaygın bir şekilde dikimi yapılan bakla bitkisi üzerine inokulant uygulamalarının başarılı olabilmesi için bu tercih durumunun dikkate alınmasının gerekliliği ortaya çıktı.

6.5 Öneriler

Rhizobium leguminosarum biovar. *viciae* izolatlarının tercih etme özgüllüğünün belirlenmesinde tez çalışmasında önerilen *nod* kutusu yöntemi hipotezimize doğrulayacak şekilde yeterli veri oluşturmadı. Bu özgüllüğün bitki mikroorganizma etkileşimi sonucu ortaya çıktığı gerçeği dikkate alınarak, mikroorganizmanın daha farklı gen bölgelerinin çalışılması, *nod* kutusunun NodD proteini ve diğer gen bölgeleriyle etkileşiminin incelenmesi veya bitkiden salgılanan flavonoidlerin etki mekanizması ile ilgili yeni çalışmalar yapılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akçay E., Roughgarden J., 2007. Negotiation of mutualism: rhizobia and legumes, *Proc. R. Soc. B*, 274, 25-32.
- Akçay E., Simms E.L., 2011. Negotiation, sanctions, and context dependency in the legume-*Rhizobium* mutualism, *Am Nat.*, 178 (1), 1-14.
- Álvarez-Martínez E.R., Valverde Á., Ramírez-Bahena M.H., García-Fraile P., Tejedor C., Mateos P.F., Santillana N., Zúñiga D., Peix A., Velázquez E., 2009. The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds, *Arch Microbiol*, 191, 659–668.
- Amarger N., Macheret V., Laguerre G., 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 996-1006.
- Aoki S., Kondo T., Prévost D., Nakata S., Kajita T., Ito M., 2010. Genotypic and phenotypic diversity of rhizobia isolated from *Lathyrus japonicus* indigenous to Japan, *Systematic and Applied Microbiology*, 33, 383–397.
- Baimiev A. K., Gubaidullin I.I., Chemeris A.V., Vakhitov V.A., 2005. Structures of sugar-binding peptides of *Galega orientalis* and *G. officinalis* lectins determine the choice, *Molecular Biology*, 39(1), 90–97.
- Barton L.L., Northup D.E., 2011. Interactions between microorganisms and plants, Editors: Barton L.L., Northup D.E., *Microbial Ecology*. 1th ed., Wiley-Blackwell, USA.
- Başıbüyük H.H., Bardakcı F., Belshaw R., Quicke D.L., 2000. *Phylogenetic systematic a practical guide to theory and practice*, Önder matbaa, Sivas.
- Berge O, Lodhi A, Brandelet G, Santaella, C., Roncato, M.A., Christen, R., Heulin, T., Achouak, W., 2009. *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and nonlegume rhizospheres, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 367-72.
- Bibi F., Chung E.J., Khan A., Jeon C.O., Chung Y.R., 2012. *Rhizobium halophytocola* sp. nov., isolated from the root of a coastal dune plant, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1997–2003.
- Bouzar H., Jones J.B., 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1023-1026.

- Brewin N.J., 1991. Development of the legume root nodule, *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 191–226.
- Brewin N.J., 1998. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes, Editors: Spaink H. P., Kondorosi A., Hooykaas P. J. J., *The Rhizobiaceae*, Kluwer Academic Publishers, Kluwer, Dordrecht, 417–429.
- Brewin 2004. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–Legume symbiosis, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(4):293–316.
- Burdon J.J., Gibson A.H., Searle S.D., Woods M.J., Brockwell J., 1999. Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian *Acacia*: Within-species interactions, *J. Appl. Ecol.*, 36, 398–408.
- Busse H. J., Dener E. B. M., Lubitz W., 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics, *Journal of Biotechnology*, 47, 3–38.
- Campbell N.A., Reece J. B., 2002. *Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Chen W.X., Tan Z.Y., Gao J.L., Li Y., Wang E.T., 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 870–873.
- Coutinho H.L.C., Oliveira V.M., Lovato A., Maiac A.H.N., Manfio G.P., 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans, *Applied Soil Ecology*, 13, 159–167.
- Cubero J.I., 1973. Evolutionary trends in *Vicia faba*, *Theor. Appl. Genet.*, 43, 59–65.
- Cubero J.I., 1974. On the evolution of *Vicia faba* L., *Theor. Appl. Genet.*, 45, 47–51.
- Cronk Q., Ojeda I., Penninton R.T., 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics, *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 99–103.
- da Cunha Galvão L. J., Lages-Silva E., 2008. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), Editors: Walter J. M., Rapley R., *Molecular Biomethods Handbook*, 2nd ed., Humana Press, Totowa, NJ, 133–147.
- Dall’Agnol R.F., Riberiro R.A., Ormeño-Orrillo E., Rogel M.A., Delamuta J.R.M., Andrade D.S., Martínez-Romero E., Hungria M., 2013. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4167–4173.
- Dall’Agnol R.F., Riberiro R.A., Delamuta J.R.M., Ormeño-Orrillo E., Rogel M.A., Andrade D.S., Martínez-Romero E., Hungria M., 2014. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4167–4173.
- de Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck, U., Coopman, R., Collins, M.D., Kresters, K., Dreyfus, B., Gillis, M., 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov.,

- sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 93-96.
- De Maagd R.A., Wijfjes A.H.M, Spaink H.P., Ruiz-Sainz J.E, Wijffelman C.A., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J. J., 1989. *nodO*, a new nod gene of the *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* Sym plasmid pRLJI, encodes a secreted protein, *Journal Of Bacteriology*, 171(12), 6764-6770.
- Denison R.F., 2000. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia, *Am. Nat.*, 156, 567-576.
- Denison R.F., 2001. Ecologists and molecular biologist find common ground in the rhizosphere, *Trends in Ecology and Evolution*, 16(10), 535-536.
- Depret G., Laguerre G., 2008. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* populations nodulating pea, *New Phytologist*, 179, 224–235.
- Diange E.A., Lee S.S., 2013. *Rhizobium halotolerans* sp. nov., isolated from chloroethylenes contaminated soil, *Curr Microbiol*, 66, 599-605.
- Ditta G., Virts E., Palomares A., Kim C., 1987. The *nifA* Gene of *Rhizobium meliloti* is Oxygen Regulated, *Journal of Bacteriology*, 169 (7), 3217-3223.
- Durmaz, R., 2001. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Elkan G., 1987. *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*. Marcel Dekker, New York, ABD.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 39(4), pp. 783-791.
- Felsenstein J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: Inferences and reliability, *Annu. Rev. Genet.*, 22, 521-565.
- Fisher R.F., Brierley H.L., Mulligan J.T., Long S.R., 1987. Transcription of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Identification of a *nodD* transcription initiation site in vitro and in vivo, *J. BioI. Chern.*, 262,6849-6855.
- Franklin R.B., Taylor D.R., Mills A.L., 1999. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), *journal of Microbiological Methods*, 35, 225-235.
- Freeman S., Herron J.C., 2009. *Evrimsel analiz*, 2. baskı, Palme, Ankara.
- Friesen M.L., Mathias A., 2010. Mixed infections may promote diversification of mutualistic symbionts: why are there ineffective rhizobia?, *J. Evol. Biol.*, 23, 323–334.
- Forey P.L., Kitching I.J., Siebert, D.J., 1992. *Cladistics a practical course in systematics*, Claredon press, Oxford.
- Garcia-Fraile P., Rivas R., Willems A., Peix A., Martens M., Martinez-Molina E., Mateos P.F., Velazquez E., 2007. *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 844-848.

- García-Martínez J., Acinas S.G., Antón A.I., Rodríguez-Valera F., 1999. Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity, *Journal of Microbiological Methods*, 36, 55–64
- Gordon A.J., Lea P.J., Rosenberg C., Trinchant J.C., 2001. Nodule formation and function, Editors: Lea P.J., Gaundry J.F.M., *In plant nitrogen*, Springer Berlin, Germany, 101-146.
- Grisson C., Jackson S., Merlot S., Dobson A., Grison C., 2015. *Rhizobium metallidurans* sp. nov., a symbiotic heavy metal resistant bacterium isolated from the Anthyllis vulneraria Zn-hyperaccumulator, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1525-30.
- Gruber N., Galloway J.N., 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle, *Nature*, 451, 293-296.
- Gu C.T., Wang E.T., Tian C.F., Han T.X., Chen W.F., Sui X.H., Chen W.X., 2008. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1364-1368.
- Gu T., Sun L.N., Zhang J., Sui X.H., Li S.P., 2014. *Rhizobium flavum* sp. nov., a triazophos-degrading bacterium isolated from soil under the long-term application of triazophos, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2017–2022.
- Gürkanlı C.T., 2010. Orta karadeniz bölgesinde bazı illerde yetiştirilen bakla, fasulye ve bezelye bitkilerinden rhizobiyal simbiyontlarının genetik çeşitliliği, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 276661.
- Gürtler V., Stanisich V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region, *Microbiology*, 142, 3-16
- Györgypal Z., Kiss G.B., Kondorosi A., 1991. Transduction of Plant Signal Molecules by Rhizobium NodD Proteins, *BioEssays*, 13 (11), 575-581.
- Haider N., Nabulsi I., Mirali, N., 2012. Identification of species of *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) using chloroplast DNA data, *Turk J Agric For*, 36, 297-308.
- Hall B.G., 2004. *Phylogenetic trees made easy a how-to manual for molecular biologist*, 2nd ed., Sinauer associates, USA.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Serie*, 41, 95-98.
- Hameed S., Yasmin S., Malik K.A., Zafar Y., Hafeez F.Y., 2004. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes, *Biol Fertil Soils*, 39, 179–185.
- Han T.X., Wang E.T., Wu L.J., Wen F.C., Gu J.G., Gu C.T., Tian C.F., Chen W.X., 2008. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1693-1699.

- Handley B.A., Hedges A.J., Beringer J.E., 1998. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* in soil, *Soil Biol. Biochem.*, 30 (2), 241-249.
- Heath K.D., Tiffin P., 2007. Context dependence in the coevolution of plant and rhizobial mutualists, *Proc. R. Soc. B*, 274, 1905–1912.
- Heath, K.D., Tiffin P., 2009. Stabilizing mechanisms in a Legume–Rhizobium mutualism, *Evolution*, 63(3), 652–662.
- Henson J.M., French R.C., 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31, 81-109.
- Hillis D.M., Bull J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis, *Systematic Biology*, 42, 182-192.
- Hou B.C., Wang E.T., Li Y.Jr., Jia R.Z., Chen W.F., Gao Y., Dong R.J., Chen W.X., 2009. *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Širj.) Vassilcz., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 3051–3057.
- Hunter W.J., Kuykendall L.D., Manter D.K., 2007. *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite-reducing alpha-Proteobacteria isolated from a bioreactor, *Current Microbiology*, 55, 455-460.
- Jordan D.C., 1982, Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32, 136–139.
- Jukes T. H., Cantor C. R., 1969. Evolution of protein molecules. Editor: Munro H.N., *In mammalian protein metabolism*, Academic Press, New York, 21–132.
- Kaiya S., Rubaba O., Yoshida N., Yamada T., Hiraishi A., 2012. Characterization of *Rhizobium naphthalenivorans* sp. nov. with special emphasis on aromatic compound degradation and multilocus sequence analysis of housekeeping genes, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58, 211–224.
- Kaur J., Verma M., Lal R., 2011. *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Müller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1218–1225.
- Kesari V., Ramesh A.M., Rangan L., 2013. *Rhizobium pongamiae* sp. nov. from root nodules of *Pongamia pinnata*, *BioMed Research International*, 2013, 1-9.
- Khalid R., Zhang Y.J., Ali S., Sui X.H., Zhang X.X., Amara U., Chen W.X., Hayat R., 2014. *Rhizobium pakistanensis* sp. nov., isolated from groundnut (*Arachis hypogaea*) nodules grown in rainfed Pothwar, Pakistan, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107(1), 281-290.
- Khbaya B., Neyra M., Normand P., Zerhari K., Filali-Maltouf A., 1998. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4912-4917.

- Kiers E.T., Rousseau R.A., West S.A., Denison R.F., 2003. Host sanctions and legume-rhizobium mutualism, *Nature*, 425, 78-81.
- Kittiwongwattana C., Thawai C., 2013. *Rhizobium paknamense* sp. nov., isolated from lesser duckweeds (*Lemna aequinoctialis*), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(10), 3823-3828.
- Kittiwongwattana C., Thawai C., 2014. *Rhizobium lemnae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aequinoctialis*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2455-2460.
- Kumar N. S., Gurusubramanian G., 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications, *Sci Vis*, 11 (3), 116-124.
- Kwon S.W., Park J.Y., Kim J.S., Kang J.W., Cho Y.H., Lim C.K., Parker M.A., Lee G.B., 2005. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 263-270.
- Ladizinsky G., 1975. On the origin of the broad bean *Vicia faba* L., *Israel J. Bot.* 24, 80-88.
- Laguerre G., Fernandez M.P., Edel V., Normand P., Amarger N., 1993. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 761-767.
- Laguerre G., Louvrier P., Allard M.R., Amarger N., 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* for nodulation of host legumes, *Applied And Environmental Microbiology*, 69(4), 2276-2283.
- Lin D.X., Chen W.F., Wang F.Q., Hu D., Wang E.T., Sui X.H., Chen W.X., 2009. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1919-1923.
- Lin S.Y., Hsu Y.H., Liu Y.C., Hung M.H., Hameed A., Lai W.A., Yen W.S., Young C.C., 2014. *Rhizobium straminoryzae* sp. nov., isolated from the surface of rice straw, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2962-2968.
- Lin S.Y., Hung M.H., Hameed A., Liu Y.C., Hsu Y.H., Wen C.Z., Arun A.B., Busse H.J., Glaeser S.P., Kämpfer P., Young C.C., 2015. *Rhizobium capsici* sp. nov., isolated from root tumor, of a green bell pepper (*Capsicum annuum* var. *grossum*) plant, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107(3), 773-84.
- Lindstrom K., 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 365-367.
- Liu T.Y., Li Y.Jr., Liu X.X., Sui X.H., Zhang X.X., Wang E.T., Chen W.X., Chen W.F., Pulawska J., 2012. *Rhizobium cauense* sp. nov., isolated from root nodules of the herbaceous legume *Kummerowia stipulacea* grown in campus lawn soil, *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 415- 420.
- Long S.R., 1989. *Rhizobium* genetics, *Annu. Rev. Genet.*, 23, 483-506.

- Long S.R., 1996. *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective, *The Plant Cell*, 8, 1885-1898.
- López-López A., Rogel M.A., Ormeño-Orrillo E., Martínez J., Martínez E., 2010. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov., *Systematic and Applied Microbiology*, 33 (6), 322–327.
- López-López A., Rogel-Hernández M.A., Barois I., Ceballos A.I.O., Martínez J., Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E., 2012. *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 2264–2271.
- Lu Y.L., Chen W.F., Han L.L., Wang E.T., Chen W.X., 2009. *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 3006–3011.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Marco D.E., Pérez-Arnedo R., Hidalgo-Perea Á., Olivares J., Ruiz-Sainz J.E., Sanjuán J., 2009. A mechanistic molecular test of the plant-sanction hypothesis in legume–rhizobia mutualism, *Acta Oecologica*, 35, 664–667.
- Martinez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P., Pardo M.A., 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 417–426.
- Maxted N. 1995. *An Ecogeographical Study of Vicia subgenus Vicia*. *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools*, 8. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- McGill B., 2005. A mechanistic model of a mutualism and its ecological and evolutionary Dynamics, *Ecological Modelling*, 187, 413–425.
- McInroy S.G., Campbell C.D., Haukka K.E., Odee D.W., Sprent J.I., Wang W.J., Young J.P.W., Sutherland J.M., 1999. Characterization of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using BiologTM and partial 16S rDNA sequencing, *FEMS Microbiology Letters*, 170, 111-117.
- Moat A.G., Foster J.W., Spector MP., 2002. *Microbial physiology*, 4th ed., Wiley-Liss Inc., New York.
- Moschetti G., Peluso A.L., Protopapa A., Anastasio M., Pepea O., Defez R., 2005. Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP–16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 619–631.
- Mount D.W., 2001. *Bioinformatic sequence and genome analysis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Oke V., Long S.R., 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*–legume symbiosis, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 641–646.

- Ophel K. ve Kerr A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40 (3), 236-241.
- Qin W., Deng Z.S., Xu L., Wang N.N., Wei G.H., 2012. *Rhizobium helanshanense* sp. nov., a bacterium that nodulates *Sphaerophysa salsula* (Pall.) DC. in China, *Arch Microbiol*, 194, 371–378.
- Quan Z.X., Bae H.S., Baek J.H., Chen W.F., Im W.T., Lee S.T., 2005. *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2543-2549.
- Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S., Fancelli S., Bazzicalupo M., 1996. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (7), 2279-2285.
- Palmer K.M., Young P.W., 2000. Higher Diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* Populations in Arable Soils than in Grass Soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6), 2445-2450.
- Panday D., Schumann P., Das S.K., 2011. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2632–2639.
- Parag B., Sasikala C., Ramana C.V., 2013. Molecular and culture dependent characterization of endolithic bacteria in two beach sand samples and description of *Rhizobium endolithicum* sp. nov., *Antonie van Leeuwenhoek*, 104, 1235–1244.
- Peng G., Yuan Q., Li H., Zhang W., Tan Z., 2008. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2158-2163.
- Pulawska J., Willems A., De Meyer S.E., Süle S., 2012a. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species, *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 215-220.
- Pulawska J., Willems A., Sobiczewski P., 2012b. *Rhizobium skierniewicense* sp. nov., isolated from tumors on chrysanthemum and cherry plum, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 895–899.
- Rajasundari K., Ilamurugu K., Logeshwaran P., 2009. Genetic diversity in rhizobial isolates determined by RAPDs, *Afr. J. Biotechnol.*, 8 (12), 2677-2681.
- Ramana C.V., Parag B., Girija K.R., Ram B.R., Ramana V.V., Sasikala C., 2013. *Rhizobium subbaraonis* sp. nov., an endolithic bacterium isolated from beach sand, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 581–585.
- Ramirez-Bahena M.H., Garcia-Fraile P., Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J.M., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Velazquez E., 2008. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB

- 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2484-2490.
- Rangin C., Brunel B., Cleyet-Marel J.C., Perrineau M.M., Béna G., 2008. Effects of *Medicago truncatula* Genetic Diversity, Rhizobial Competition and Strain Effectiveness on the Diversity of a Natural Sinorhizobium Species Community, *Applied And Environmental Microbiology*, 74(18), 5653–5661.
- Rashid, M.H., Young, J.P.W., Everall, I., Willems, A., Braun, M.S., Wink, M., 2015. Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, DOI: 10.1099/ijs.0.000373.
- Ren D.W., Wang E.T., Chen W.F., Sui, X.H., Zhang X.X., Liu H.C., Chen W.X., 2011a. *Rhizobium herbae* sp. nov. and *Rhizobium giardinii*-related bacteria, minor microsymbionts of various wild legumes in China, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1912–1920.
- Ren D.W., Wang E.T., Chen W.F., Sui X.H., Wang E.T., Chen W.X., 2011b. *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 580–586.
- Ribeiro R.A., Rogel M.A., López-López A., Ormeño-Orrillo E., Barcellos F.G., Martínez J., Thompson F.L., Martínez-Romero E., Hungria M., 2012. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1179–1184.
- Rincón-Rosales R., Villalobos-Escobedo J.M., Rogel M.A., Martinez J., Ormeño-Orrillo E., López-López A., 2013. *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3423-3429.
- Rivas R., Peix A., Mateos P.F., Trujillo M.E., Martínez-Molina E., Velázquez E., 2006. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulate chickpea in different Spanish soils, *Plant Soil*, 287, 23–33.
- Rozahon M., Ismayil N., Hamood B., Erkin R., Abdurahman M., Mamtimin H., Abdukerim M., Lal R., Rahman E., 2014. *Rhizobium populi* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Populus euphratica*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3215–3221.
- Sachs J.L., Simms E.L., 2008. The Origins Of Uncooperative Rhizobia, *Oikos*, 117, 961-966.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4), 406-425.
- Saïdi S., Ramírez-Bahena M.H., Santillana N., Zúñiga, D., Álvarez-Martínez, E., Peix, A., Mhamdi, R., Velázquez, E., 2014. *Rhizobium laquerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* in several continents, *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(1), 242-247.

- Sambrook J ve Russell D.W., 2001. *Molecular Cloning a laboratory manual Vol.1* 3th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schlaman H.R.M., Phyllips D.A., Kondorosi E., 1998. Genetic Organization and Transcriptional Regulation of Rhizobial Nodulation Genes, Editors: Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J.J., *The Rhizobiaceae*, Springer Science Business Media, B.V., The Netherlands, 361-386.
- Schwartz M.W., Hoeksema J.D., 1998. Specialization and resource trade: biological markets as a model of mutualisms, *Ecology*, 79, 1029-1038.
- Segovia L., Young, J.P.W., Martinez-Romero E., 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bivar *phaseoli* Type I Strains as *R. etli* sp. nov., *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43 (2), 374-377.
- Shen L., Zheng L.P., Liu H., Liu R., Zhang K.Y., Lai R., 2010. *Rhizobium kunmingense* sp. nov. isolated from rhizosphere soil of *Camptotheca acuminata* Decne, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 56, 143-149.
- Sheu S.Y., Huang H.W., Young C.C., Chen W.M., 2015. *Rhizobium alvei* sp. nov., isolated from a freshwater river, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2), 472-478.
- Sikora S., Redžepović S., 2003. Genotypic characterisation of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis, *Food Technol. Biotechnol.*, 41 (1), 61–67.
- Simms E.L., Taylor D.L., 2002. Partner choice in nitrogen fixation mutualisms of legumes and rhizobia, *Integr. Comp. Biol.*, 42, 369-380.
- Singh A.K., Bhatt B.P., Upadhyaya A., Kumar S., Sundaram P.K., Singh B.K., Chandra N., Bharati R.C., 2012. Improvement of faba bean (*Vicia faba* L.) yield and quality through biotechnological approach: A review, *African Journal of Biotechnology*. 11(87), 15264-15271.
- Somasegaran P., Hoben H. J., 1985. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*, USAID, ABD.
- Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velazquez E., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Dazzo F.B., Casella S., Nuti M.P., 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1267- 1276.
- Surin B.P., Downie J.A., 1988. Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* genes *nodLMN* involved in efficient host specific nodulation, *Mol Microbiol*, 2, 173-183.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Tan Z.Y., Kan F.L., Peng G.X., Wang E.T., Reinhold-Hurek B., Chen W.X., 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 909-914.

- Temizkan G., Arda N., 2004. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Tian C.F., Wang E.T., Wu L.J., Han T.X., Chen W.F., Gu C.T., Gu J.G., Chen W.X., 2008. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2871-2875.
- Tian C.F., Young J.P.W., Wang E.T., Tamimi S.M., Chen W.X., 2010. Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: the role of recombination and lateral gene transfer, *FEMS Microbiol Ecol*, 1–14.
- Turdahon M., Osman G., Hamdun M., Yusuf K., Abdurehim Z., Abaydulla G., Abdukerim M., Fang C., Rahman E., 2013. *Rhizobium tarimense* sp. nov., isolated from soil in the ancient Khiyik River, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2424–2429.
- Udvardi M.K., 2001. Legume models strut their stuff, *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 14(1), 6-9.
- Valverde A., Velazquez E., Fernandez-Santos F, Vizcaino N., Rivas R., Mateos P.F., Martinez-Molina E., Igual J.M., Willems A., 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1985-1989.
- van Berkum P., Beyene D., Vera F.T., Keyser H.H., 1995. Variability among *Rhizobium* Strains Originating from Nodules of *Vicia faba*, *Applied And Environmental Microbiology*, 61 (7), 2649-2653.
- van Berkum P., Beyene D., Bao G., Campbell T.A., Eardly B.D., 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour], *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 13-22.
- Vincent J.M., 1970. *A manuel for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
- Wang E.T., van Berkum P., Beyene D., Sui X.H., Dorado O., Chen, W.X., Martinez-Romero, E., 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 687-699.
- Wang F., Wang E.T., Wu L.J., Sui X.H., Li Y.Jr., Chen W.X., 2011. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2582–2588.
- Wei G.H., Wang E.T., Tan Z.Y., Zhu M.E., Chen W.X., 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2231-2239.
- Wei G.H., Tan Z.Y., Zhu M.E., Wang E.T., Han S.Z., Chen W.X., 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1575-1583.

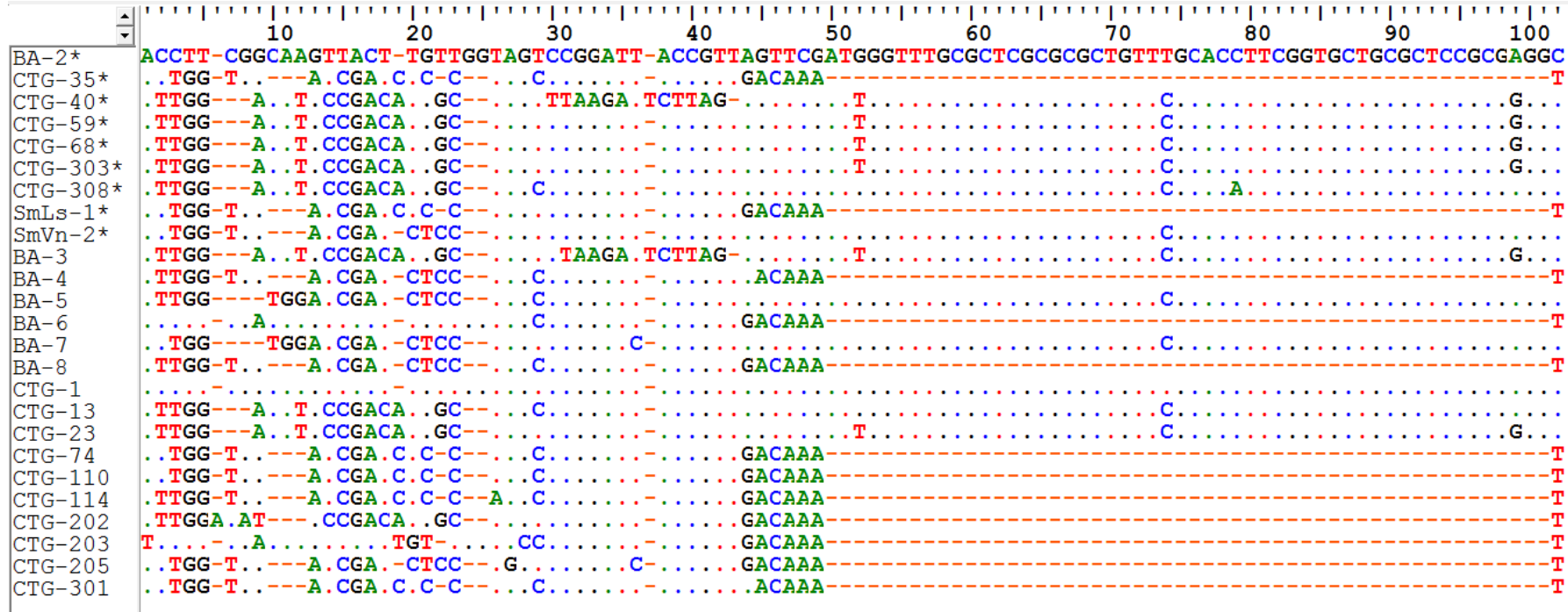
- Wen Y., Zhang J., Yan Q., Li S., Hong Q., 2011. *Rhizobium phenanthrenilyticum* sp. nov., a novel phenanthrene-degrading bacterium isolated from a petroleum residue treatment system, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 57, 319–329.
- West S.A., Kiers E.T., Pen I., Denison R.F., 2002. Sanctions and mutualism stability: when should less beneficial mutualists be tolerated?, *J. Evol Biol*, 15, 830-8
- Williams J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, A. J., Tingey, S. W., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535.
- Willems A., 2006. The Taxonomy of Rhizobia: an Overview, *Plant and Soil*, 287, 3–14.
- Xu L., Shi J.F., Zhao P., Chen W.M., Qin W., Tang M., Wei G.H., 2011. *Rhizobium sphaerophysae* sp. nov., a novel species isolated from root nodules of *Sphaerophysa salsula* in China, *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, 845–854
- Xu L., Zhang Y., Deng Z.S., Zhao L., Wei X.L., Wei G.H., 2013. *Rhizobium qilianshanense* sp. nov., a novel species isolated from root nodule of *Oxytropis ochrocephala* Bunge in China, *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(3), 559-65
- Yao L.J., Shen Y.Y., Zhan J.P., Xu W., Cui G.L., Wei G.H., 2012. *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 335–341.
- Yoon J.H., Kang S.J., Yi H.S., Oh T.K., Ryu C.M., 2010. *Rhizobium soli* sp. nov., isolated from soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1387–1393.
- Young C.C., Cheng K.T., 1998. Genetic diversity of fast-and slow-growing soybean rhizobia determined by random amplified polymorphic DNA analysis, *YoungBiol Fertil Soils*, 26, 254–256.
- Young J.M., Kerr A., Sawada H., 2005. Genus II. *Agrobacterium*. Editor: Garrity G.M., *In Bergey's manual of systematic bacteriology, part C the alpha-, beta-, delta-, and Epsilonproteobacteria Vol. 2*, 2nd ed., Springer, ABD, 325-340.
- Zahran H.H., 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology, *Journal of Biotechnology*, 91, 143-153.
- Zhang G.X., Ren S.Z., Xu M.Y., Zeng G.Q., Luo H.D., Chen J.L., Tan Z.Y., Sun G.P., 2011a. *Rhizobium borbori* sp. nov., aniline-degrading bacteria isolated from activated sludge, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 816–822.
- Zhang L., Shi X., Si M., Li C., Zhu L., Zhao L., Shen X., Wang Y., 2014a. *Rhizobium smilacinae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the leaf of *Smilacina japonica*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 106 (4), 715-23.
- Zhang R.J., Hou B.C., Wang E.T., Li Y.Jr., Zhang X.X., Chen W.X., 2011b. *Rhizobium tubonense* sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 512–517.

- Zhang X., Sun L., Ma X., Sui X.H., Jiang R., 2011c. *Rhizobium pseudoryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2425–2429.
- Zhang X., Li B., Wang H., Sui X., Ma X., Hong Q., Jiang R., 2012. *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oilcontaminated soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1871–1876.
- Zhang X.X., Turner S.H., Guo X.W., Yang H.J., Debellé F., Yang G.P., Dénarié J., Young J.P.W., Li F.D., 2000. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity, *Applied and Environmental*., 66 (7), 2988–2995.
- Zhang X.X., Tang X., Sheirdil R.A., Sun L., Ma X.T., 2014b. *Rhizobium rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice roots, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1373–1377.
- Zhang X.X., Gao, J.S., Sherdil, R.A., Wang X.C., Zhang L., 2015a. Isolation and proposal novel rice promoting endophytic bacteria, *Rhizobium oryzicola* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, DOI: 10.1099/ij.s.0.000358.
- Zhang Y.J. Zheng W.T., Everall I., Young J.P.W., Zhang X.X., Tian C.F., Sui X.H., Wang E.T., Chen W.X., 2015b. *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum* grown in Southern China, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, DOI: 10.1099/ij.s.0.000365.

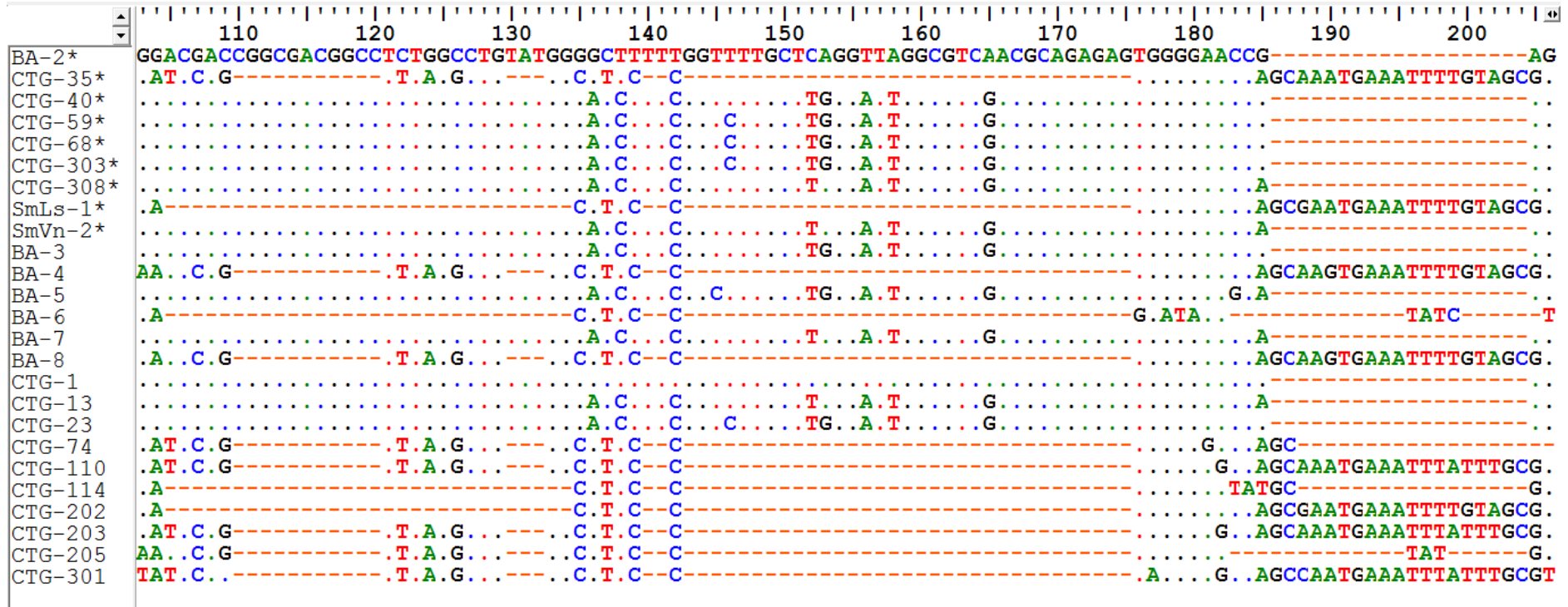
EKLER

EK A: Denemelerde kullanılan izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri

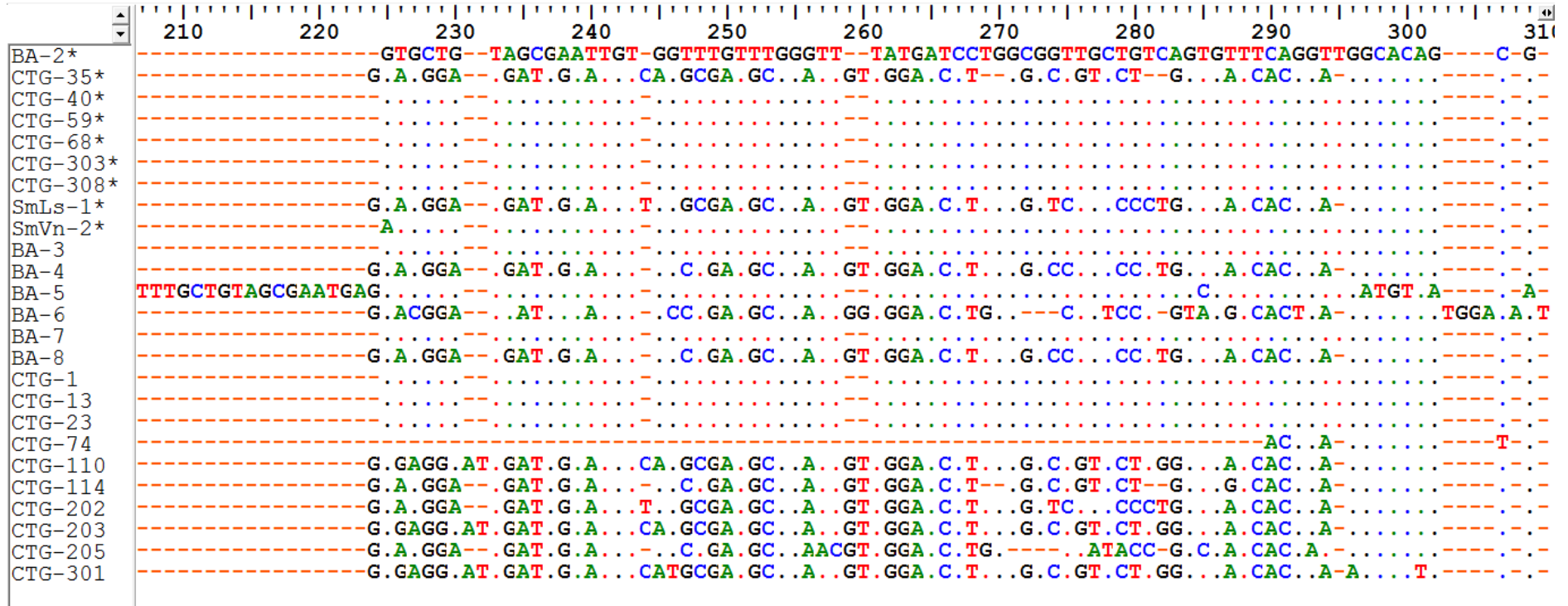
EK A



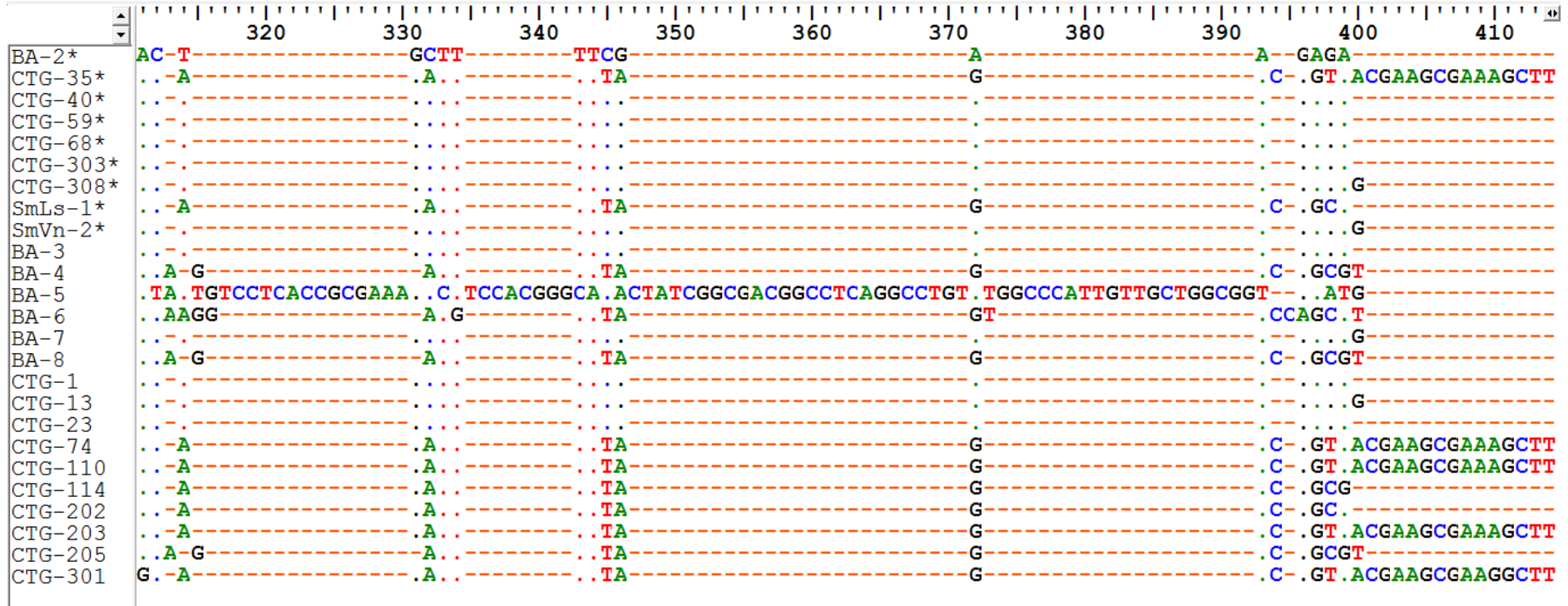
Şekil A.4. Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)



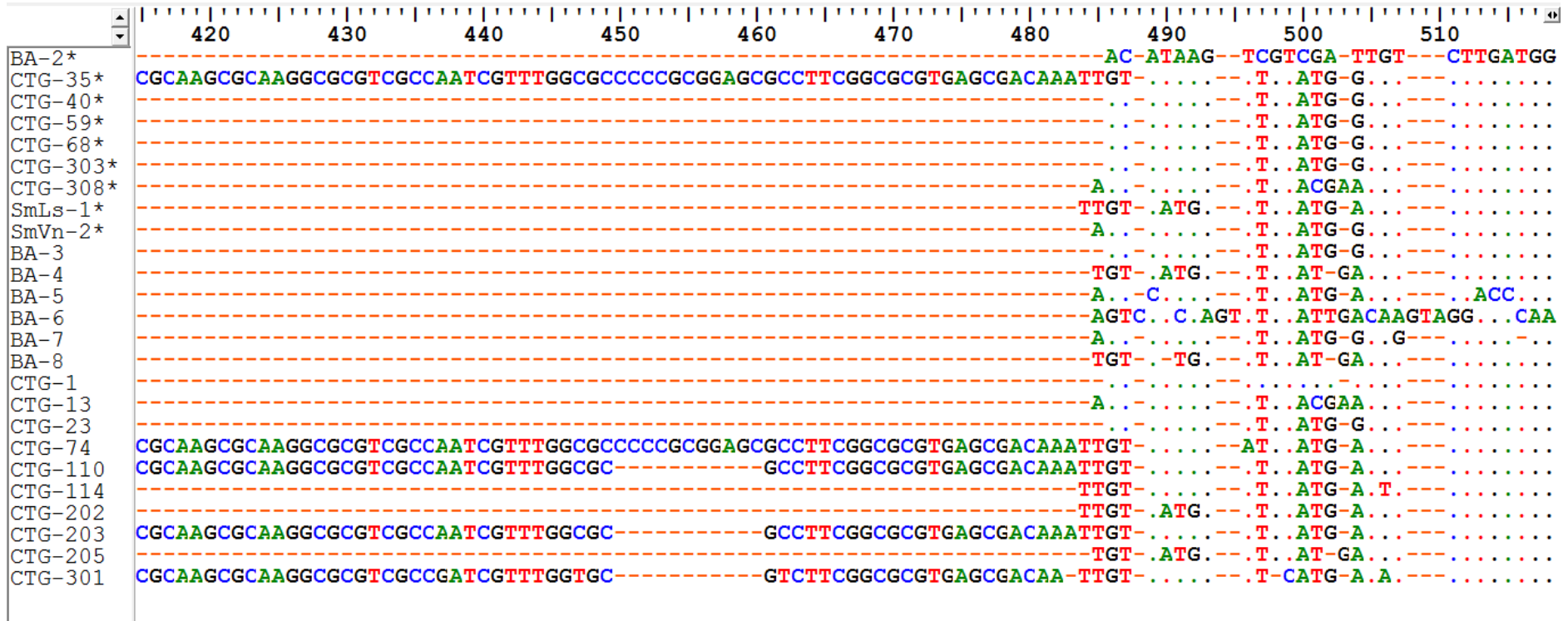
Şekil A.4 (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)



Şekil A.4. (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)



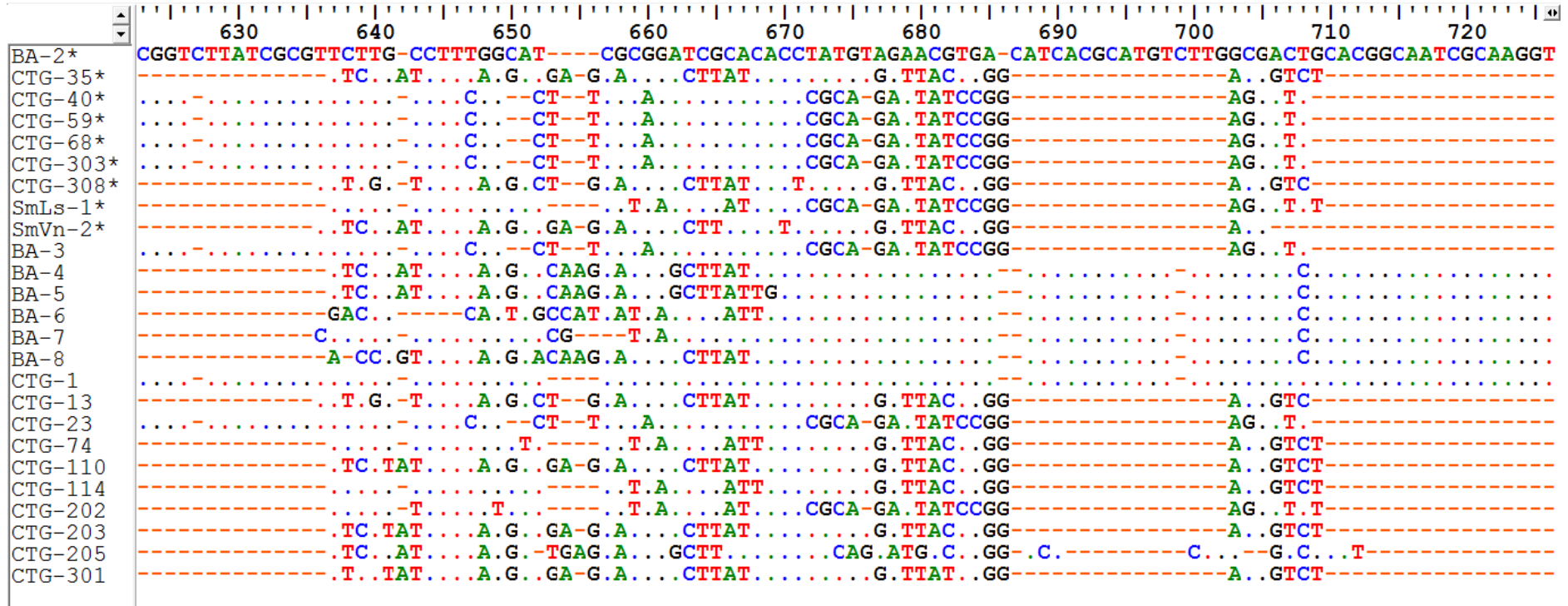
Şekil A.4. (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)



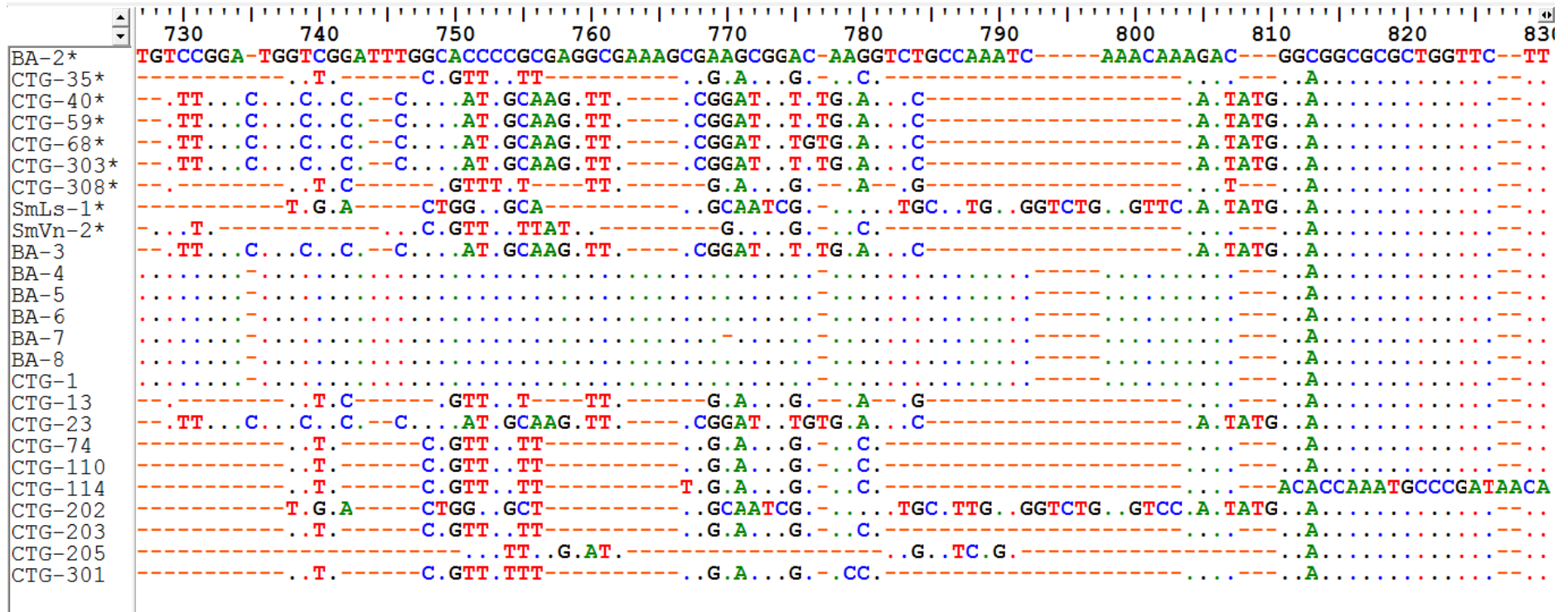
Şekil A.4. (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretili olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)

	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620				
BA-2*	G-GTTTGT	TTTT-GC	-----	AT--	GAT-CAGT	CCTGAA	CCAGGC	TGCGCG	TGT--	GTGGGTT	GTA-GTAGC-GTT	CGATCC	CAGCGT	AAACCG	CGTAG
CTG-35*	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G.G..	.T-----	-----	-----	-----
CTG-40*	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	-----	-----	-----	.A...
CTG-59*	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	-----	-----	-----	.A...
CTG-68*	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	-----	-----	-----	.A...
CTG-303*	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	-----	-----	-----	.A...
CTG-308*	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	AGC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G.G..	-----	-----	-----	-----
SmLs-1*	.-...C...	.TAT--	-----	AT--	.GAT-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	.TT-----	-----	-----	-----
SmVn-2*	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	AGC-.GAC	.T.A.T	.GT...	.C.C-A	C...	.A..TG	.C.G.G..	-----	-----	-----	-----
BA-3	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	-----	-----	-----	.A...
BA-4	.-...C--	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G.GC	.T-----	-----	-----	-----
BA-5	.C-.G-.C-	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G.GC	.T-----	-----	-----	-----
BA-6	C-.T.A.-	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G.G..	.T-----	-----	-----	-----
BA-7	.-...G-.C-	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	.T-----	-----	-----	-----
BA-8	.-...C--	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GCT.G.C	-TGA-.C	TA-A	.C.-..	-C.AA..	-TA..TG	.C.GAGC	.T-----	-----	-----	-----
CTG-1	.-...C--	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	-----	-----	-----	-----
CTG-13	.-...C--	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G.G..	-----	-----	-----	-----
CTG-23	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	-----	-----	-----	.A...
CTG-74	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC	.T.....	.A..A.G	-AC	.GT-.A..TG	.C.G..	.TT-----	-----	-----	-----
CTG-110	.-...C--	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.G-...	-AC....	.GT-.A..TG	.C.G.G..	.T-----	-----	-----	-----
CTG-114	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..A..TG	.C.G..	.T-----	-----	-----	-----
CTG-202	.-...C...	.TAT--	-----	AT--	.GAT-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G..	.TT-----	-----	-----	-----
CTG-203	.-...C--	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.G-...	-AC....	.A..TG	.C.G.G..	.T-----	-----	-----	-----
CTG-205	.-...T..	.C.-..	-----	.A--	.GC-...	.TGA.TC		.A.G-...	-AC....	.A..AG	.TG.C.G	.GC	.T-----	-----	-----
CTG-301	.-...C--	.C.-..	TTTTGGG	TTT.ATCT	.GC-.GAC	.T.A.C		.A.GT...	-AC....	.A..TG	.G.G.G..	.T-----	-----	-----	-----

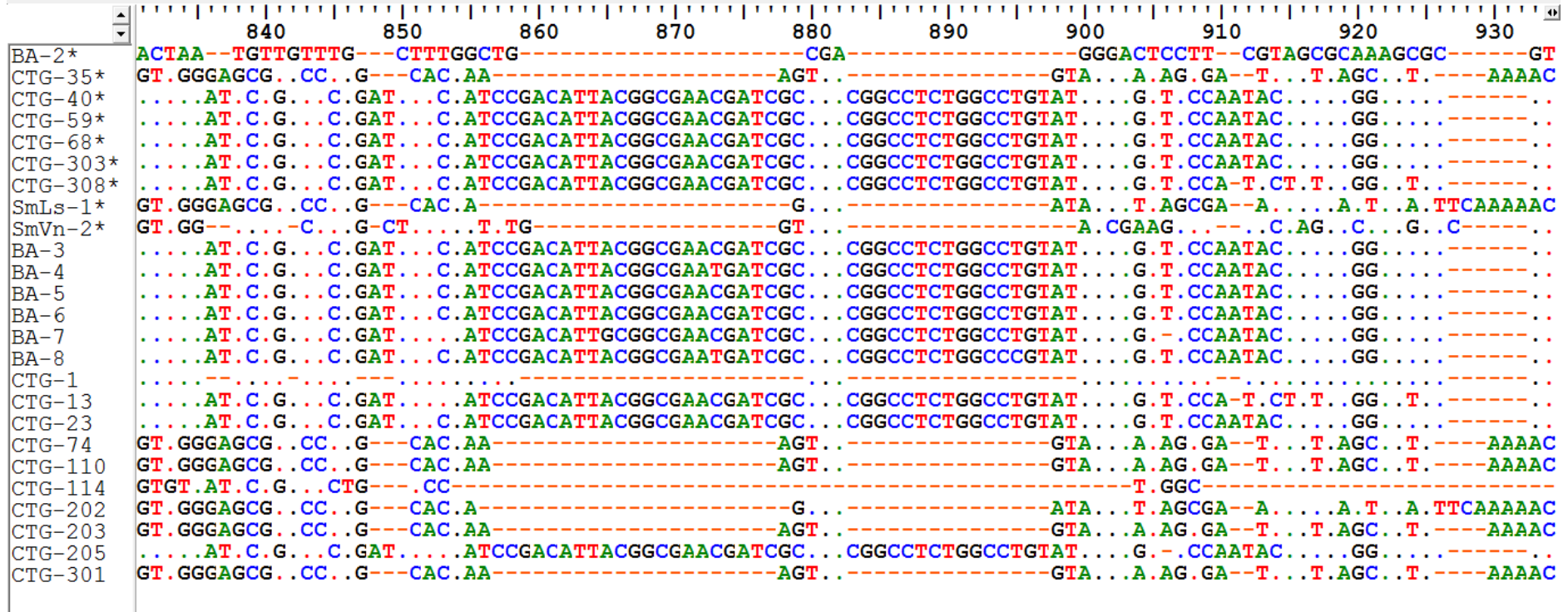
Şekil A.4. (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)



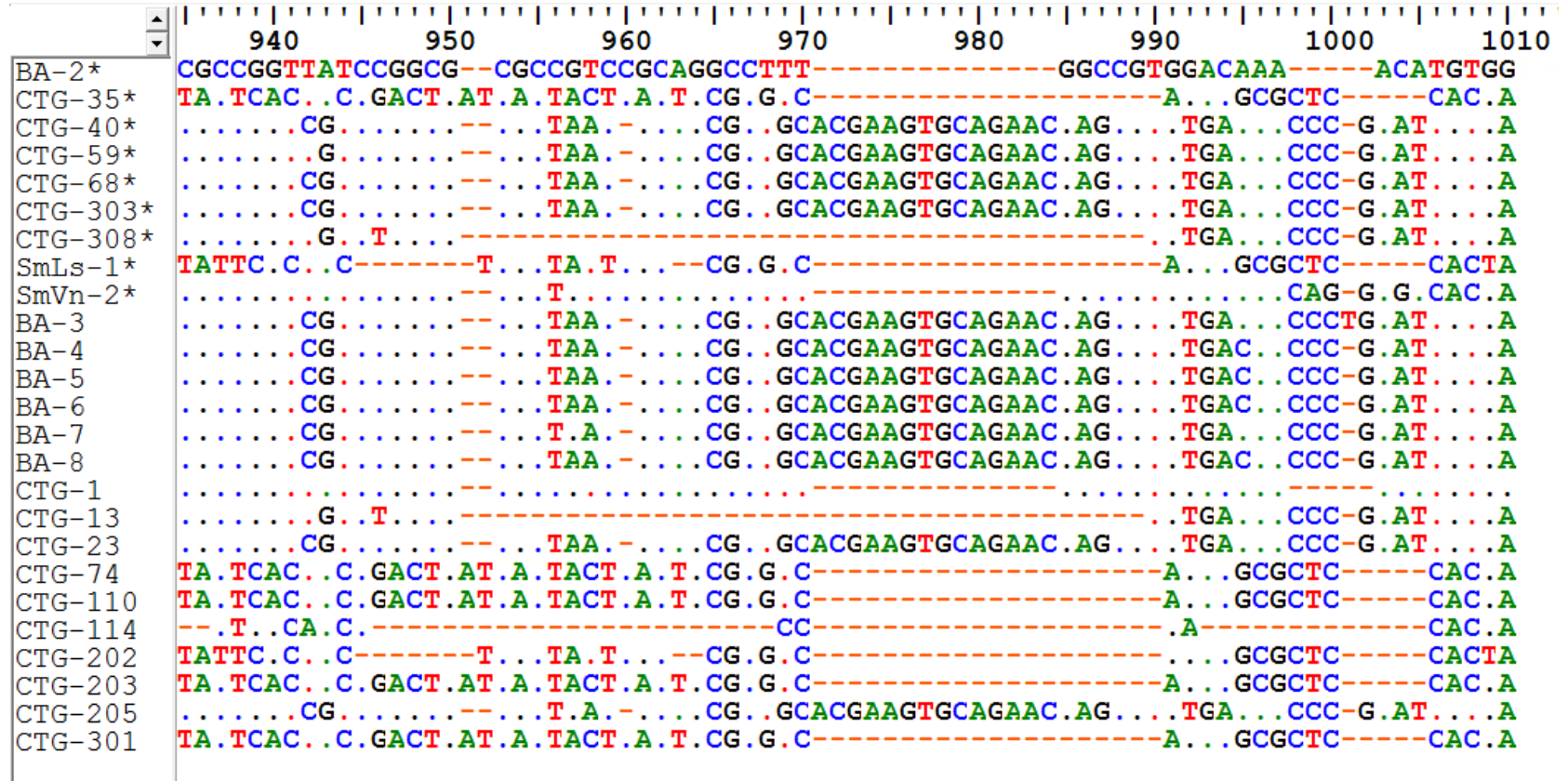
Şekil A.4. (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretili olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliklilik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)



Şekil A.4. (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)



Şekil A.4. (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)



Şekil A.4. (devam). Denemelerdeki izolatlarının ITS-PCR polimorfik DNA bölgeleri (*işaretli olanlar denemelerde bakla bitkisi tarafından simbiyotik birliktelik için tercih edilen *Rhizobium* izolatlarıdır)

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Emine Banu AYDIN

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara 20.12.1982

Adres : Bahçelievler Mah. Başarır Sok. No:20/9
İlkadım/SAMSUN

E-Posta : banukibarogluaydin@gmail.com

Lisans : Gazi Üniversitesi / Fen-Edebiyat Fakültesi / Biyoloji
Bölümü (2000-2004)

Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü./
Biyoloji Anabilim Dalı (2005-2008)

Mesleki Deneyim: Araştırma Görevlisi (2007-2015)
Ondokuz Mayıs Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü /
Biyoloji Anabilim Dalı