

T.C  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**VAN GÖLÜ HAVZASINDAKİ BAZI YABANI MERCİMEK VE NOHUT BİTKİ KÖK  
NODÜLLERİNDEN RHİZOBİUM BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU ve  
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Müslüm Yıldız  
DANIŞMAN: Prof. Dr. Ekrem ATALAN

VAN-2007

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**VAN GÖLÜ HAVZASINDAKİ BAZI YABANI MERCİMEK VE NOHUT BİTKİ KÖK  
NODÜLLERİNDEN RHİZOBİUM BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU ve  
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Müslüm Yıldız

VAN-2007

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Prof. Dr Ekrem ATALAN danışmanlığında Müslüm YILDIZ tarafından hazırlanan “VAN GÖLÜ HAVZASINDAKİ BAZI YABANI MERCİMEK VE NOHUT BİTKİ KÖK NODÜLLERİNDEN RHİZOBİUM BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU” isimli bu çalışmada 25/10/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ekrem ATALAN                      İmza:

Üye : Doç. Dr. Murat ERMAN                      İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN                      İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../2008 gün ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### VAN GÖLÜ HAVZASINDAKİ BAZI YABANI MERCİMEK VE NOHUT BİTKİ KÖK NODÜLLERİNDEN RHİZOBİUM BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU

Müslüm YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr Ekrem ATALAN

Ekim, 2007, 78 Sayfa

Bu çalışmada, Van Gölü Havzasında doğal yayılış gösteren yabancı mercimek (*Lens orientalis*) ve nohut (*Cicer anatolicum*) bitki kök nodüllerinden Rhizobium suşları izole edildi ve karakterizasyonu yapıldı. Peryodik aralıklarla yapılan arazi çalışmalarında toplanan bitkilerin nodüllerden izole edilen 44 Rhizobial suşun numerik sınıflandırılması için toplam 54 farklı fenotipik test uygulandı. Test verileri bilgisayar yardımı ile analiz edildi ve oluşan dendogram üzerinde izolatlar 7 gruba ayrıldı. Bu grupları temsilen seçilen toplam 12 suş ve mercimek1045 ile nohut522 referans olmak üzere moleküler karakterizasyonu yapıldı. Rhizobium test suşlarının genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra RAPD-PCR çalışmaları yapıldı. Bu analiz için 10 mer OPAB primerleri kullanıldı. OBAP-7 primeri ile yapılan PCR çalışmasında 8 Rhizobium suşun Nohut522 referans suş ile aynı olduğu tesbit edildi. Ayrıca OPAB-11 primeri ile sadece 1 mercimek bitki kök nodülünden izole izolat tek band oluşturdu. Diğer suşlar herhangi bir primer ile band oluşturamadı. RAPD-PCR yöntemi *Rhizobium* izolatlarının karakterisazyonunda farklı bitki zolatlarını ayırmıştır. Buna ek olarak RFLP analizi için 16S rDNA PCR ile çoğaltıldıktan sonra *HindIII*, *BspI431*, *BamHI* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. DNA kesimi olmadığından RFLP analizi yapılamadı.

**Anahtar kelimeler:** Rhizobium, Mercimek, Nohut, İzolasyon, RAPD, RFLP

## ABSTRACT

### CHARACTERISATION OF RHIZOBIUM STRAINS WILD CHICKPEA AND LENTIL FROM VAN PROVINCE

YILDIZ Müslüm  
Msc, Biological Science  
Supervisor. Prof. Dr. Ekrem ATALAN  
October 2007, 78 Pages

In this study, Rhizobial strains were isolated from wild checpea (*Cicer anatolicum*) and wild lentil (*Lens orientalis*) that are grain an Van lake basin and characterised. Total 54 phenetic character were tested for numeric taxonomy of 44 Rhizobium strains that were isolated from root nodulaes of plants that collected peridiocally during field trips. Data of tests were analyzed by aid of computer and test strains were assigned 7 group on dendogram. An 14 representative strains from these groups were selected and moleculer characterisation were carried out after genomic DNA extraction. For this aim, 10 mer OPAB primers were used. 8 Rhizobial test strains plus checkpea 1045 strains were amplified with OPAB-7 primer given only one DNA band. These 8 test strains are same wieh nohut522 were given one DNA band. No DNA band were amplified from other test strains, in case of uses other OPAB primers.

Rhizobial test strains were isolated from different plant nodules separated by RAPD-PCR technigete. In addition, 16S rDNA's were amplified and digested with HindIII, Bsp1431, BamHI ve HaeIII . RFLP analysis were not carried an owing to undigestion of DNA bands.

**Key words:** Rhizobium, Characterisation, Isolation, RAPD

## ÖNSÖZ

Azot fiksasyonu canlı sistemleri için vazgeçilmez bir işlemdir. Doğada azot'un tespiti kimyasal ve biyolojik olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Biyolojik azot tespitinde görev alan mikroorganizmalardan baklagil bitkilerin kök nodüllerinde simbiyotik olarak yaşayan Rhizobiumlar havanın serbest azotunu (N<sub>2</sub>) canlıların kullanabileceği amonyum (NH<sub>4</sub>) formuna dönüştürürler. Simbiyotik azot tespitini gerçekleştiren Rhizobiaların taksonomisi son dönemlerde hızla değişmektedir. Daha önce tek bir cins altında toplanan rhizobial izolatlar bugün 4 ayrı cins ile temsil edilmektedir. Bu çalışmamızda yabancı mercimek (*Lens orientalis*) ve yabancı nohut (*Cicer anatolicum*) bitkilerinin kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* suşların fenotipik karakterlerine dayalı olarak MINITAB 14 istatistik programı ile suşların benzerlik düzeyine bağlı olarak Numerik taksonomisi yapıldı. numerik taksonomi sonuçlarına göre oluşan gruplardan temsilci olarak seçilen strainlerin genomik DNA izolasyonu yapılarak suşlar RAPD-PCR ve 16S rDNA-RFLP analizlerine tabii tutuldu.

Bu çalışmam süresince moleküler biyolojik yöntemlerin uygulanmasında ve fenotipik test çalışmalarında sonuçlardan emin olmak için testleri en az iki kez tekrarlamak zorunda kaldım. Özellikle yabancı mercimek ve nohut bitki izolatlarının genomik DNA ekstraksiyonu sırasında *Rhizobium* spp. türlerinin dış çeperlerinde bulunan lipopolisakkaritlerin yapıları nedeniyle saf genomik DNA izolasyonunu zorlaştırdı. Genomik DNA'nın RAPD analizi sırasında yabancı mercimek ve nohut izolatlarına OPAB primerlerinin uygun olmaması nedeniyle RAPD-PZR analizi için yeterli sayıda DNA bandı oluşmadı. Aynı şekilde RFLP analizi için PZR ile çoğaltığımız 16S rDNA retriksiyon enzimleri ile kesilmediğinden benzerlik düzeylerine göre analiz edilemedi.

Bu çalışmamda benden her türlü yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof.Dr Ekrem ATALAN'a öncelikle teşekkür ederim. Çalışmam sırasında Devlet Planlama Teşkilatı tarafından desteklenen ve Doç.Dr Murat ERMAN yürütücülüğünde devam eden projeden sağlanan kimyasal ve sarf malzemeler için Devlet Planlama Teşkilatı'na, Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve değerli öğretim görevlilerine fikirlerinden ve yardımlarından dolayı teşekkürü borç bilirim. Ayrıca Laboratuvar çalışmalarında benden yardımını esirgemeyen Araş.Görv. Kerem Özdemir ve Araş. Görv. M.Emre EREZ'e, arkadaşım Zeynel Abidin AKKUŞ'a ve aileme maddi ve manevi yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Müslüm YILDIZ

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	1
ABSTRACT	III
ÖNSÖZ	V
İÇİNDEKİLER	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
EKLER DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ ve LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	1
1.1 Rhizobium'ların İzolasyonu ve Ekolojisi	5
1.2 Rhizobium'ların Teşhis Karakterleri	11
1.3 Rhizobiumların Taksonomik Tanımlamaları	12
1.4 Rhizobium Baklagil İlişkisi	12
1.4.1 Rhizobium Bakterilerinin Baklagil Köklerine Girişi ve Yayılışları	13
1.5. <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin Moleküler Karakterizasyonu	15
2. MATERYAL ve METOT	24
2.1. Materyal	24
2.2. Yöntem	24
2.2.1 Bitki örneklerinin toplanması	24
2.2.2. Nodüllerin bitkilerden ayrılması ve sterilizasyonu	24
2.2.3. Nodüllerden bakterilerin izolasyonu	24
2.2.4 İzolatların saflaştırılması	27
2.2.5 İzolatların kültürel ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti	27
2.2.5.1 Gram boyama	27
2.2.5.2 Kongo kırmızılı YMA'da gelişim	28
2.2.5.3. Brom thymol mavili YMA'da gelişim	28
2.2.5.4. Pepton glukoz agar(PGA)'da gelişim	28
2.2.5.5. Laktozlu ortamda Ketolaktöz Testi	28
2.2.5.6 Hareket testi	29
2.2.5.7 Litmus milk	29
2.2.5.8. Katalaz Aktivitesi	29

İçindekiler (devam)	<u>Sayfa</u>
2.2.5.9. Metilen Mavisi Redüksiyonu	29
2.2.5.10 Farklı pH derecelerinde gelişim	29
2.2.5.11 Farklı Sıcaklık Derecelerinde Gelişim	30
2.2.5.12. Bakterilerin farklı karbon kaynaklarında üreme durumları	30
2.2.5.13. Vitamin isteklerinin belirlenmesi	30
2.2.5.14. Azot kaynaklarının kullanımı	31
2.2.5.15. Antibiyotik dirençliliklerinin tespiti	31
2.2.5.16 Numerik analiz	31
2.2.6. Moleküler Karakterizasyon	32
2.2.6.1. Genomik DNA izolasyonu	32
2.2.6.2. RAPD analizi	33
2.2.6.3. RFLP analizi	34
3. BULGULAR	36
3.1 Bakterilerin Nodüllerinden İzolasyonu	36
3.2 Rhizobial İzolatlarının Saflaştırılması	36
3.3. Kültürel ve Biyokimyasal Bulgular	38
3.4. Numerik Analizi Sonuçları	47
3.5. Moleküler Karakterizasyon sonuçları	49
3.5.1. Genomik DNA	49
3.5.2 RAPD analiz sonuçları	49
3.5.3. RFLP analiz sonuçları	50
4.TARTIŞMA ve SONUÇ	52
5. KAYNAKLAR	57
6. ÖZGEÇMİŞ	78

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 <i>Rhizobium</i> Bakterilerin Baklagil Köklerine girişi	14
Şekil 3.1: Rhizobial bakterilerinin Kök Nodüllerinden İzolasyonu	39
Şekil 3.2: İzolatların Gram Boyama Özellikleri	40
Şekil 3.3: İzolatların Kongo Kırmızılı YMA ortamındaki koloni morfolojileri	41
Şekil 3.4: İzolatların Brom Thymol mavili ortamda koloni morfolojileri	42
Şekil 3.5: İzolatların Karbon Kaynaklarını Kullanımı	46
Şekil 3.6: İzolatların Numerik Taksonomisi	48
Şekil 3.7: Genomik DNA	49
Şekil 3.8: Çalışmamızda kullanılan <i>Rhizobium</i> suşlarının OPAB-11 primer ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	50
Şekil 3.9: Çalışmamızda kullanılan <i>Rhizobium</i> suşlarının OPAB-7 primer ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü	51
Şekil 3.10: 16S rDNA bölgesi çoğaltılmış strainler	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Rhizobial Bakterilerin Filogenetik Sınıflandırılmaları	3
Çizelge 1.2: Rhizobial Türlerin listesi	4
Çizelge 1.3: <i>Rhizobium</i> Çapraz Aşılama Grupları	7
Çizelge 2.1. İzolatların Toplandığı Mevki, Orjin ve Tarih	25
Çizelge 2.2. Kullanılan Primerlerin Baz Dizilişi	33
Çizelge 2.2. PCR kokteylinin her bir örnek için gerekli olan madde miktarları	34
Çizelge 3.1: İzole edilen suşlara ait ön teşhis sonuçları	37
Çizelge 3.2: İzolatlara ait Kültürel ve Biyokimyasal Test Sonuçları	44

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu$ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
l	Litre
gr	Gram
PGA	Pepton Glukoz Agar
YMB	Yeast Mannitol Broth
YMA	Yeast Mannitol Agar
Native-PAGE	Doğal Poli Akrilamid Jel Elektrofözezi
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Poliakrilamid Jel Elektrofözezi
DGGE	Denatüre Jel Elektrofözezi
RNA	Riboz Nükleik Asit
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
rRNA	Ribozomal RNA
IGS	İntergenik Spacer
ERIC	Enterobakteriyel Repetitive İntergenik Consensus
REP	Repetitive Ekstragenik Polindromik
DNTP	Deoksi Nükleik Tri Fosfat
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
KOH	Potasyum Hidroksit
HCl	Hidrojen Klorür
HgCl <sub>2</sub>	Gümüş Klorür
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
Cu <sub>2</sub> O	Bakır Oksit

## EKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
EK:1 Kültürel ve Biyokimyasal testler için Besiyeri ve Ortamlar	75
EK:2 Moleküler teknik uygulamalarında kullanılan çözelti ve diğer tamponlar	77

## 1. GİRİŞ ve LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Dünya nüfusunun hızla artması sonucu protein içeren besin kaynaklarına daha çok ihtiyaç duyulmaktadır. Artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak için alternatif besin kaynaklarının tüketimi teşvik edilmektedir. Zengin protein kaynağına sahip baklagil bitkileri bunlardan biridir. Azotça fakir topraklarda yetişen baklagil bitkilerinin verimliliği artırmak için toprağa *Rhizobium* aşılması yapılmaktadır.

19. yy sonlarında balagil bitkilerin kök nodülleri aracılığıyla havadaki azotun tespit edildiğini farkına varıldı. Beijerinck (1888)'de kök nodülleriyle bakteriler arasında bir tür simbiyotik yaşam olduğunu bildirdi. Bu birliktelikte bakterilerin azot tespit işleminden sorumlu olduğunu ve bu bakterileri *Bacillus radiocola* olarak isimlendir. Daha sonra Frank (1889) bu bakterilerin isimlerini değiştirerek *Rhizobium* olarak adlandırdı. Orijinal ilk tür ismi olarak *Rhizobium legüminosarum* ismini verdi.

20. yy başlarında farklı bakteriler ile çeşitli koank bitkiler üzerindeki yoğun çalışmalar çapraz inokülasyon grupların varlığını ortaya koydu. Bu tanıma göre bir bakteri türü çapraz inokülasyon grubu içerisindeki diğer bütün baklagil bitkilerinde nodül meydana getirebilirdi (Fred ve ark., 1932). Bu görüş *Rhizobium* taksonomisinde uzun bir süre kullanıldı. Ancak daha sonra çapraz bitki grupları arasındaki enfeksiyonlardan dolayı bu tür bir sınıflandırmanın taksonomik marker olarak kullanılmasının güvensiz olduğu gerekçesiyle terk edildi (Graham, 1964). 1960'ın başlarında Bakteriologlar numerik taksonomik çalışmalarda DNA karakteristikleri ve serolojinin yanı sıra çeşitli metabolik , besinsel ve morfolojik karakterler kullanmaya başladı (Graham, 1964; Vincent, 1970).

Bu bilgiler *Rhizobium* ve *Agrobacterium* cinslerinin birbirlerinden farklı olduğunu hızlı ve yavaş büyüyen rhizobialar arasında daha açık bir farklılığın oluşmasını sağladı (Graham, 1964). Sonuçta *Bradyrhizobium* cinsi ayrı bir cins olarak sınıflandırmada yer aldı (Jordan, 1982). 1980'den sonra genetik karakterlerin (DNA-DNA ve DNA-rDNA hibridizasyonu, rRNA katalogları, rDNA sekans analizi v.b) çalışılmasıyla rhizobialar arasında ve onların diğer bakteri grupları arasındaki ilişkileri keşfedildi. Bu çalışmaların doğrultusunda rhizobiaların tür sayıları arttı. Bugün rhizobialar 55 tür ile temsil edilmektedir (Çizelge 1.2). Bu artışın tür ve cins seviyesinde iki temel nedeni vardır; Birçok farklı baklagil bitkisinin çalışılması ki bu baklagil bitkilerin çoğu gıda ve mera baklagilleridir. Rhizobial türlerin sayısının artmasının diğer bir nedeni ise taksonomik araştırmaların yenilenmesi, hücre DNA ve RNA'sındaki çalışmalarında kullanılan metotların gelişmesi filogenetik ve polifazik

sınıflandırmada daha detaylı sonuçların elde edilmesini sağladı. Şu anda total bakteriyel genom sayısının artışı mevcut türlerle beraber daha da artmaktadır. Bu durum şüphesiz bakteriyel sınıflandırma üzerinde büyük etki yapmaktadır.

*Rhizobiaceae* familyasında *Mesorhizobium* cinsi bütün 10 tür ile temsil edilmektedir (Çizelge 1.2). Bu türler *Rhizobium*, *Agrobacterium* ve *Sinorhizobium* (*Ensifer*) cinsleri dahil büyük filogenetik gruplardan farklı ancak filogenetik olarak onlarla ilişkilidir (Jarvis ve ark., 1997). cinsi türleri hızlı ve yavaş büyüyen türler arasında orta derecede bir büyümeyle *Mesorhizobium* karakterize edilir. 16s rDNA sekans analizi verilerine dayalı olarak *Mesorhizobium* cinsi, *Pseudomonobacter*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*, *Aquamicrobium* ve *Bartonella* gibi hızlı büyüyen rhizobilerden ayrılır.

*Rhizobium*'lar toprak bakterisi olup baklagil bitkilerin saçak kökleri üzerinde bulunan nodül oluşumunu sağlayan bakterilerdir. Etkili nodüllerde bakteriler atmosferdeki serbest azot (N<sub>2</sub>) gazını amonyum (NH<sub>4</sub>) formuna çevirirler (O'Gara ve Sahanmugam, 1976). Amonyum, bitkiler tarafından yetersiz besin durumunda topraktan alınır. Buna karşılık *Rhizobium*'lar, nodül yapısının içinde bulunur ve bitkinin besin ihtiyacını karşılarlar (Van Rhijin ve Vanderleyden, 1995). Etkisiz nodüllerde azot tespiti yoktur ancak *Rhizobium*'lar bitkilerin azot ihtiyacını karşılarlar. Ancak bu durumda da Rhizobia'lar parasitik olarak düşünülebilir (Denison ve Kiers, 2004).

Simbiyotik azot tespiti ilişkisi, meraların yetişmesi ve zirai ürünlerin verimini artırmak için toprağa gübre ilavesi yapılmadan kullanılmaktadır. Bundan dolayı bu alandaki araştırmaların çoğu zirai öneme sahip baklagilleri tespit etmek ve otlaklar ile zirai öneme sahip baklagillerin verimini artırmaya yöneliktir. Doğada ekolojik öneme sahip bitkilerle ilgili daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir (Boring ve ark. 1998).

Dünyada yaklaşık olarak 17.000-19.000 baklagil türü bulunmaktadır (Martinez Romero ve Cabellero Mellado, 1996). Bu baklagil türlerin hepsinde *Rhizobium* bakterileri nodül oluşturduğu halde, bunların sadece küçük bir oranında simbiyotik Rhizobial ilişkinin tespiti yapılabilmektedir. Bugün Rhizobial türler 12 cins içerisinde 55 tür ile temsil edilmektedir (Çizelge 1.2). Bu cinslerin içerisinde *Rhizobium* ("Rhizo" Latince bir kelime olup, kökte yaşayan anlamına gelir) cinsi en yüksek sayıda bulunmaktadır. *Rhizobium* cinsinin dışında *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* ve *Ensifer* (*Sinorhizobium*) diğer cinsleridir.

Şu anda bilinen Rhizobialar, Proteobacteria şubesinin alfa-Proteobacteria sınıfında olup bu sınıf içerisinde Rhizobiales takımının içinde 6 Rhizobial familya ile temsil edilmektedir (Çizelge 1.1., Garrity ve ark., 2004).

Çizelge 1.1. Rhizobial Bakterilerin Filogenetik Sınıflandırılmaları

---

Rhizobiales
Rhizobiaceae
<i>Rhizobium</i>
<i>Ensifer (Sinorhizobium)</i>
<i>Mesorhizobium</i>
Brucellaceae
<i>Ochrobactrum</i>
Phyllobacteriaceae
<i>Phyllobacterium</i>
<i>Mesorhizobium</i>
Bradyrhizobiaceae
<i>Bradyrhizobium</i>
Hyphomicrobiaceae
<i>Azorhizobium</i>
<i>Devosia</i>
Methylobacteriaceae
<i>Methylobacterium</i>

---

Ayrıca yukarıda verilen Rhizobia'ların dışında  $\beta$ -Proteobacteria sınıfında ise 2 familya içerisinde 3 rhizobial cins bulunmaktadır. Bu rhizobial türler aşağıda listelenmiştir (Garrity ve ark., 2004).

#### Burkholderiales

##### Burkholderiaceae

*Burkholderia*

*Cupriavidus*

##### Oxalobacteraceae

*Herbaspirillum*

Proteobacteria şubesinin  $\gamma$ -proteobacteria sınıfındaki bazı türler baklagil bitkilerinde nodül oluşturmaya rağmen, bu sınıf içerisinde yer alan diğer bazı türler nodül oluşturamamaktadır (Benhizia ve ark., 2004). Şu anda bilinen Rhizobial türler Çizelge 1.2'de listelenmiştir. Ancak Rhizobiaların mevcut sistematığı her geçen gün hızla değişmektedir.

Bu rhizobial cinslerdeki mevcut türlerin bir çoğunun nodul oluşturma biçimi henüz incelenmemiştir. Bu yüzden *Rhizobium*'ların fonksiyonel tanımlamaları henüz tamamlanamamıştır. Bu türlerin bir çoğu eskiden *Agrobacterium* olarak biliniyordu (*R. larrymoore*; *R. rubi*, *R. vitis* gibi türler; Young, 2004). Bununla birlikte eskiden *Agrobacterium* olarak sınıflandırılmış türlerin nodulasyon yetenekleri son dönemlerde kanıtlanmıştır. Örneğin *R. radiobacter* türü *Phaseolus vulgaris*, *Campylotropis* ve *Cassia spp.* baklagil türlerinde nodül oluşturduğu tespit edilmiştir (Han ve ark, 2005). *Wisteria*

Çizelge 1.2: Rhizobial Türlerin listesi

Binominal isim	Referans
<i>Rhizobium daejeonense</i>	Quan ve ark., 2005
<i>Rhizobium etli</i>	Segovia ve ark., 1993
<i>Rhizobium galegae</i>	Lindström, 1989
<i>Rhizobium gallicum</i>	Amarger ve ark., 1997
<i>Rhizobium giardinii</i>	Amarger ve ark., 1997
<i>Rhizobium hainanense</i>	Chen ve ark., 1997
<i>Rhizobium huautlense</i>	Wang ve ark., 1998
<i>Rhizobium indigoferae</i>	Wei ve ark., 2002
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <sup>T</sup>	(Frank, 1879) Frank, 1889
<i>Rhizobium loessense</i>	Wei ve ark., 2003
<i>Rhizobium mongolense</i>	van Berkum ve ark., 1998
<i>Rhizobium sullae</i>	Squartini ve ark., 2002
<i>Rhizobium tropici</i>	Martínez-Romero ve ark., 1991
<i>Rhizobium undicola</i>	(de Lajudie ve ark., 1998a) Young ve ark., 2001
<i>Rhizobium yanglingense</i>	Tan ve ark., 2001
<i>Ensifer (Sinorhizobium) abri</i>	Ogasawara ve ark., 2003
<i>Ensifer adhaerens</i>	(Wang ve ark., 2002) Young, 2003
<i>Ensifer (Sinorhizobium) americanum</i>	Toledo ve ark., 2003
<i>Ensifer arboris</i>	(Nick ve ark., 1999) Young, 2003
<i>Ensifer fredii</i> <sup>T</sup>	(Scholla ve ark., 1984) Young, 2003
<i>Ensifer (Sinorhizobium) indiaense</i>	Ogasawara ve ark., 2003
<i>Ensifer kostiensis</i>	(Nick ve ark., 1999) Young, 2003
<i>Ensifer kummerowiae</i>	(Wei ve ark., 2002) Young, 2003
<i>Ensifer medicae</i>	(Rome ve ark., 1996) Young, 2003
<i>Ensifer meliloti</i>	(Dangeard, 1926) Young, 2003
<i>Ensifer saheli</i>	(de Lajudie ve ark., 1994) Young, 2003
<i>Ensifer terangae</i>	(de Lajudie ve ark., 1994) Young, 2003
<i>Ensifer xinjiangense</i>	(Chen ve ark., 1988) Young, 2003
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	Wang ve ark., 1999
<i>Mesorhizobium chacoense</i>	Velázquez ve ark., 2001
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	(Nour ve ark., 1994) Jarvis ve ark., 1997
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	(Chen ve ark., 1991) Jarvis ve ark., 1997
<i>Mesorhizobium loti</i> <sup>T</sup>	(Jarvis ve ark., 1982) Jarvis ve ark., 1997
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	(Nour ve ark., 1995) Jarvis ve ark., 1997
<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	de Lajudie ve ark., 1998b
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	Gao ve ark., 2004
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	Gao ve ark., 2004
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	(Chen ve ark., 1995) Jarvis ve ark., 1997
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	Vinuesa ve ark., 2005
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Kuykendall ve ark., 1993
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <sup>T</sup>	(Kirchner, 1896) Jordan, 1982
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	Xu ve ark., 1995
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	Yao ve ark., 2002
<i>Burkholderia caribensis</i>	Vandamme ve ark., 2002
<i>Burkholderia cepacia</i>	Vandamme ve ark., 2002
<i>Burkholderia phymatum</i>	Vandamme ve ark., 2002
<i>Burkholderia tuberum</i>	Vandamme ve ark., 2002
<i>Azorhizobium caulinodans</i> <sup>T</sup>	Dreyfus ve ark., 1988
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	de Souza Moreira ve ark., 2006
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	(Chen ve ark., 2001) Vandamme and Coenye, 2004
<i>Devosia neptuniae</i>	Rivas ve ark., 2003
<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	Valverde ve ark., 2003
<i>Phyllobacterium trifolii</i>	Valverde ve ark., 2003
<i>Methylobacterium nodulans</i>	Jourand ve ark., 2004
<i>Ochrobactrum lupini</i>	Trujillo ve ark., 2005

T: Tip tür; a: Parantez içerisinde belirtilen orijinal yayın, Parantezden sonraki ise en son sınıflandırmayı yapan araştırmacı.

*sinensis* (Lui ve ark., 2005) bitkisinde nodül oluşturan ve *Sym* plasmidi içeren *R. rhizognes* strainleri aynı zamanda fasulye bitkisinde de hem nodül hemde tümör oluşturdıklarını tespit etmişlerdir (Valaguez ve ark., 2005).

Jordan (1982)'e göre nohut bitkisinde nodül oluşturan rhizobial bakteriler *Rhizobium ciceri* olarak isimlendirilmiştir. Ancak, Nour ve arkadaşlarının (1994) yaptığı taksonomik çalışmalar neticesinde *R. ciceri* türü yeni bir cins olarak kabul edilen *Mesorhizobium* cinsine dahil edilmiştir. Daha sonra Jarvis ve arkadaşlarının (1997) yaptıkları çalışma daha önceleri *Rhizobium* cinsine dahil olan *R. ciceri* türünü *Mesorhizobium ciceri* olarak *Rhizobiaceae* familyasında sınıflandırılmıştır.

Nodül oluşturan strainleri temsilcileri genellikle aynı cins içinde sınıflandırılmasına rağmen gerçekte nodulasyon yeteneğinden yoksun strainlerde görünüşlerine göre aynı cins içinde dahil edilmişlerdir. Örneğin *Bradyrhizobium betae*, pancar bitkisinde tümör oluşturur. Ancak bu türün azot tespit edemediği belirtilmiştir. (Weir, 2006)

*Mesorhizobium thioganicum*, sülfür okside eden bir bakteri türüdür. Ancak bu bakteri türü *Cicer arietinum*, *Pisum sativum* ve *Clitoria ternatea* baklagillerinde test edildiğinde nodül oluşturmadığı belirlenmiştir (Ghosh ve Roy, 2006). Ayrıca *Mesorhizobium* ve diğer cinslerde simbiyotik olmayan strainlerde vardır. Bu tür strainler simbiyosis genlerini kazanarak nodül oluşturabilirler (Sullivan ve ark., 1995).

*Sinorhizobium* cinsi son dönemlerde DNA sekanslarının benzerliğine dayalı olarak *Ensifer* adı altında tekrar sınıflandırıldı (Young, 2003). *Ensifer adhaenes* bir toprak bakterisi olup diğer bakterilere bağlanarak hücre parçalanmasına neden olabilir. *E.adhaerens* yabani tip bakteri olmasına rağmen ne *Leucena leucocephala* nede *Phaseolus vulgaris*'te nodül oluşturabilmektedir. Ancak *E. adhaenes* türüne *R. tropici*'den simbiyotik bir plasmid transfer edildiğinde diğer Rhizobilar gibi nodül yeteneği kazanır (Rogel ve ark., 2001).

### 1.1 *Rhizobium*'ların İzolasyonu ve Ekolojisi

*Rhizobium*'lar baklagil bitkilerinin köklerinde simbiyotik bir ilişki kuran ve toprakta yaygın tipik azot tespit eden bakterilerdir. Baklagiller; tohum zarfında tohum üreten otsu veya odunsu bitkilerdir. Bu tür baklagiller; bezelye (*Pisum sativum*), yer fıstığı (*Arachis hypogea*), fasulye (*Phaseolus vulgaris*), yonca (*Medicago sativa*), Üçgül (*Trifolium spp.*), Akasya (*Robinia pseudoacacia*), acı bakla (*Lupinus spp.*), Soya fasulyesi (*Glycine max*) gibi bitkilerdir. Bakteri ve baklagil bitkisi arasındaki bu ilişki mutualistik bir yaşam tarzıdır. Yani

bu birliktelikten hem mikroorganizma hemde bitki fayda sağlar. Bitkinin kök hücreleri bakteri için besin ve karbonhidrat sağlar. Buna karşılık bakteri de bitki için gerekli olan azotu, amonyak formunda bitkiye sağlar. *Rhizobium* spesifik konak bitkisinde nodül meydana getirir. Başka bir deyişle *Rhizobium* cinsinin bir türü sadece belirli bir tür baklagil bitkisinde nodül oluşturabilir. Baklagil bitkilerinin tohumları toprağa ekilmeden önce *Rhizobia* strainleriyle aşılır. Çünkü toprağa ekilecek baklagil bitkisiyle simbiyotik ilişki kurabilecek uygun *Rhizobium* türü bulunmayabilir.

*Rhizobium* cinsi üyeleri genellikle toprakta bulunup baklagil bitkilerinin köklerinde nodül oluşturarak azot tespitini gerçekleştirirler. *Rhizobium*'ların konak bitkinin nodüllerinden izole edilmesi kolaydır. Ancak *Rhizobium*'ların topraktan izolasyonu oldukça zordur (Vincent, 1970). Rhizobilar rutin olarak birçok bakteri için kullanılan pepton ortamında iyi gelişmezler ancak bitki orjinli çeşitli kompleks ekstraktlar üzerinde iyi gelişirler. *Rhizobium*'ların gelişimi için en uygun ortam Yeast Mannitol (YM) ortamıdır. Mannitol çoğunlukla karbon kaynağı olarak kullanılır. Mannitol içeren ortama çeşitli kimyasal maddeler ilave edilerek *Rhizobium*'ların gelişimleri ya artırılır ya da baskılanır. Standart YM'e ortamına bromtymol mavisi eklendiği zaman *Rhizobium*'lar için optimum pH ortamı belirlenir. Hızlı büyüyen *Rhizobium*'lar bu ortamda asit reaksiyon vererek ortamın rengini sarıya çevirirler. Yavaş büyüyen *Rhizobium*'lar ise bu ortamda alkali reaksiyon verirler (Vincent, 1970). *Rhizobium*'ların teşhisi için kullanılan diğer bir ortam ise kongo kırmızısı içeren YM'e ortamıdır. *Rhizobium*'lar genellikle bu ortamda kongo kırmızısını absorblamazlar ve YM'e üzerinde beyaz, opak bazen de pembe renkli koloniler meydana getirirler (Vincent, 1970). Standart YM'e ortamına; yeast ekstrakt, vitamin, inorganik azot bileşikleri ve amino asitler eklenerek *Rhizobium*'ların gelişimleri sağlanır.

*Rhizobium*'lar toprak bakterisi olup belirli baklagil konukçu bitkilerin kök ve dalları üzerinde azot tespit eden, nodül oluşumunu indüklemeye yeteneğindedir (Spaink ve ark., 1998). *Rhizobium* türlerinin farklılaşma sürecinde evrimsel açıdan kendi konukçularıyla beraber geliştikleri tahmin edilmektedir (Martinez-Romero ve Caballero-Mellado, 1996). Dünyada yaygın olarak bulunan fasulyenin (*Phaseolus vulgaris*) orjini Amerika'dır. Bu bitki dünyanın diğer bölgelerine 16. asrın başlarında transfer edilmiştir. Şu anda dünya çapında önemli tahıl ürünlerinden biridir (Gepts, 1990; Blipss, 1988). *Rhizobium*'ların bilinen 5 türü *P. vulgaris* üzerinde nodül oluşturmaktadır. Meksika, Kolombiya, Arjantin, İspanya, Fransa, Avusturya, Gambia, Tunus ve Türkiye'de *R. etli* by. *phaseoli* türü yaygın olarak bulunur (Aguilar ve ark., 1998; Diouf ve ark., 2000; Silva ve ark., 2003).

*Rhizobium* strainleri *Legüminoceae* familyası üyelerinin köklerinde nodül oluşturulur(Dreyfus ve Dommergues 1981). *Sesbania rastrata* baklagil bitkisinin, kök ve gövde üzerindeki nodüllerden *Rhizobium* strainlerini izole etmişlerdir. Nodüllerden *Rhizobia* izolasyonu ve identifikasyonu kolay olarak yapılmakta, fakat topraktan *Rhizobia* izolasyonu kolay değildir. Toprakta yapılacak *Rhizobia* izolasyonu için uygun bitki inokülasyon testleri yapılmalıdır. Ayrıca araştırmacılar *Rhizobium*'ların DNA'larında G+C içeriğinin %57-65 olarak kaydetmişlerdir.

*Rhizobia*'yı büyüme durumlarına göre Lohnis ve Hansen (1921)'de ilk olarak iki gruba ayırmışlardır (Çizelge 1.3). Yonca, fasulye ve bezelyeden izole edilen *Rhizobium*'ların YMA kültürlerinde hızlı büyüdüğü görülmüştür. Bu gruba hızlı büyüyen grup adını vermişlerdir. Soya ve bakladan izole edilen *Rhizobium*'ların ise kültürde üst gruptakine oranla 4 kat daha yavaş büyüdüklerini tesbit etmişlerdir. Bu gruba da yavaş büyüyen grup adını vermişlerdir. Durum bu iken genotipik ve fenotipik çeşitlilikler çalışılarak bilinmeyen tüm özelliklerin ortaya çıkarılması ve daha büyük grupların ortaya çıkarılmasına çalışılmıştır. *Rhizobium* cinsi bakterileri nodül oluşturdukları bitkiye spesifik olup aynı *Rhizobium* türü kendi çapraz grubunda bulunan bitkilerde de nodül oluşturabilir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3: *Rhizobium* Çapraz Aşılama Grupları (Lohnis ve ark. 1921)

<b>GRUP I</b>	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Bezelyeler ( <i>Pisum spp.</i> ) Bir çok <i>Vicia spp.</i> Mercimekler ( <i>Lens culinaris</i> )'de nodül oluşturur.
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Fasülyeler ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ve <i>P. cocineus</i> )' nodül oluşturur.
<i>Rhizobium trifoli</i>	Üçgül ( <i>Trifolium subterraneum</i> )'de nodül oluşturur.
<i>Rhizobium meliloti</i>	Yonca ( <i>Medicago sativa</i> ) ve diğer <i>Medicago spp.</i> Çemenotu ( <i>Trigonella</i> )'da nodül oluşturur.
<b>GRUP II</b>	
<i>Rhizobium lupini</i>	Acı baklalar ( <i>Lupinus</i> ) ve Serradella ( <i>Ornithopus spp.</i> )'de nodül oluşturur.
<i>Rhizobium japonicum</i>	Soya fasulyesi ( <i>Glycin max</i> )'de nodül oluşturur.
<i>Rhizobium spp</i>	Cowpea grubu ve çeşitli baklagil grupları Örn. <i>Vina spp.</i> <i>Beanut</i> , Lima

Norris (1965) asit üreten 717 *Rhizobium* straini ile yaptığı çalışma sonunda antik simbiyontların alkali üreten yavaş büyüyenleri mevcut olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca yavaş büyüyen *Rhizobium*'ların tropikal baklagillerde yaygın olarak bulunma hipotezini ileri sürmüştür. Yavaş büyüyenlerin nispeten seçici olmaları son zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya konuldu. Hızlı ve yavaş büyüyen *Rhizobium*'ların temel biyokimyasal

yollar benzerken tercih edilen biyokimyasal yollar farklı olabilir. Bununla birlikte mikroorganizmaların metabolizması ile ilgili çalışmaların bir ya da birkaç *Rhizobium* cinsi üzerinde yapılmıştır (Elkan ve Kuykendall, 1981). Hennecke ve arkadaşları (1985) hızlı ve yavaş büyüyen *Rhizobium*'larda 16S RNA katalog çalışmalarında meydana gelen grupların gerçekten farklı genetik grupları içerdiğini ve RNA'nın benzerlik katsayısının ( $S_{AB}$ ) 0,53 olduğunu tespit etmişlerdir. Böylece genetik analiz sonucunda hızlı ve yavaş büyüyen *Rhizobium*'ların çok farklı gruplara ayrıldığını tespit etmişlerdir.

Jordan'a (1982) göre karbonhidrat metabolizması, antibiotikten etkilenme, seroloji, DNA hibridizasyonu, RNA analizleri, DNA baz oranları özellikle kullanılarak hızlı-yavaş büyüme grupları kanıtlanmıştır. Hızlı ve yavaş büyüyen *Rhizobium*'ların bazıları arasındaki farkları esas alarak Uluslararası *Agrobacterium* ve *Rhizobium* alt komitesi yavaş büyüyen *Rhizobium*'ları *Bradyrhizobium* adı ile yeni bir cins olarak teklif etmiştir (Jordan, 1982). Böylece yavaş büyüyen ve *Rhizobium* olarak isimlendirilen bakteriler Bergey' Manuel of Systematic Bacteriology adlı kitapta *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* olmak üzere iki cins olarak listelemiştir: *Rhizobium* ( hızlı büyüyen grup ) ve *Bradyrhizobium* ( yavaş büyüyen grup). Alt komite, böylece Norris'in (1965) hipotezini kabul etmiştir. O, ılıman bölge baklagilleri ile simbiyotik ilişki kuran ve asit üreten hızlı büyüyen *Rhizobium* grubu için; ata kabul edilen tropikal baklagillerden izole edilen ve asit üretmeyen *Rhizobium*'ları yavaş büyüyen grup olarak tarif etmiştir. Büyüme karakterlerini esas alarak geleneksel *Rhizobium*'lar iki cinse ayrılmıştır. Yavaş büyüyen strainler soya fasulyesinde nodül oluşturan olarak tanımlanmış ve *B. japonicum* türünü içeren *Bradyrhizobium* cinsi içerisinde yer almıştır. Diğer *Bradyrhizobium*'lar mevcut olmakla birlikte örneğin; yer fıstığı *Bradyrhizobium*'u 9 tür ya da biovar seviyesinde sınıflandırılmamışlardır. İlerde cinsi içerecek bir takson teklif edilinceye kadar bunlar uygun konukçu bitki parantez içerisinde verilerek tanımlaması yapılmıştır.

Hızlı büyüyen *Rhizobium*'ların 5 türü (*R. legüminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, *R. galegae* ve *R. fredii*) *Rhizobium* cinsi içerisinde yer almaktadır. Önceden *R. phaseoli*, *R. trifolii* ve *R. legüminosarum* olarak tarif edilen türler *R. legüminosarum* ile birleştirilmiştir. *R. fredii* yeni tür olup ( Scholla ve Elkan, 1984) olağan olarak *B. japonicum* tarafından nodüle edilen Çin soya fasulyesinde etkili bir şekilde nodül oluşturan ve hızlı büyüyen *Rhizobium*'ları içerir.

*Rhizobium*'un bu türü son zamanlarda *Sinorhizobium fredii* (Chen ve ark., 1988) türünün tip strainini içeren *Sinorhizobium* cinsi olarak adlandırmıştır. Bu yeni takson genelde kabul edilmemesine rağmen onaylanmıştır. *Rhizobium* taksonomisi geçiş aşamasındadır. Moleküler bilgiler ve teknikler arttıkça şüphesiz mevcut *Rhizobium* sınıflandırılmasında

birçok kategorinin yeri değişecektir. Mevcut teşhis tablosu izolatların genel olarak teşhisinde faydalıdır. Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology yayımlandığından beri *Azorhizobium* (*A. caulinodans*) adlı yeni bir cins tarif edilmiştir ve resmi olarak tanımlanmıştır ( Dreyfus ve ark., 1988). Bu bakteriler ilk defa *Sesbania rastrata*'nın dallarındaki nodüllerden elde edilmiştir hem fenotipik hemde genotipik açıdan diğer iki türden de farklı olduğu bulunmuştur. Bu tür tropikal yer fıstığı baklagil bitkisinin dallarının üzerindeki nodüllerde yaygın olarak bulunmuştur. Bu nodüller genellikle kök ve dalın birleştiği yere yakın bulunurlar (Dreyfuss ve ark., 1988). *Sesbania rastrata*'nın iki *Rhizobium* tipi tarafından nodül oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu bakterilerden hızlı büyüyen tipi *Sesbania*'nın sadece köklerinde nodül oluştururken diğer bir izolat grubu ise hem kök hem de dallarında nodül oluşturur. Bu organizmaların diğer tropikal baklagillerin hem köklerinde hem de dallarında nodül oluşturan *Rhizobium*'lardan farklı olduğunu bulmuştur. Protein jel elektroforez, DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon sonuçları ve fenotipik karakterlerin numerik analizleri esas alınarak bu cinsin şu anda *A. caulinodans* olduğu ve geleneksel hızlı yada yavaş büyüyen *Rhizobium*lardan farklı bir takson olduğu açık olarak ortaya çıkmıştır. *Azorhizobium*, *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* arasında fenotipik farklar vardır. Boyce Thomson Araştırma Enstitüsü'nce son olarak yayımlanan raporunda fotosentetik bir *Sesbania* baklagil bitkisinin dalları üzerinde bulunan nodüllerde bakteriler bulunmuştur. Bu organizmaların *Photorhizobium* olarak ayrılması ve yayınlanması önerilmiştir. Bu bilgiler henüz yayımlanmamıştır (Dreyfus ve ark., 1988).

Ülkemizde *Rhizobium* bakterilerinin izolasyonu, teşhisi, nodül oluşturma ve azot bağlama potansiyelleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Gürbüzer (1980), Orta Anadolu bölgesinde mercimek için yüksek azot tespit edebilen 9 *Rhizobium* suşu izole etmiştir. İpek (1984), nohut bitkisi ile yaptığı çalışmalarda karışık inokulant uygulamasını, bitki ağırlığını ve verimini arttırdığını tespit etmiştir. Uçar ve Öner (1988), Afyon ilinin Sandıklı ilçesinin merkez köylerinde yetiştirilen nohutların çiçeklenme devresinde izole edilen nodüllerden 56 *Rhizobium* bakterisi izole etmiştir. Gök (1993), üçgül, soya, bakla ve fiğ bitkilerinden izole ettiği toplam 29 adet *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* suşlarının karakterizasyonunu yapmışlardır. Sarioğlu ve arkadaşları (1993), Elazığ yöresinde ekilen mercimek bitki kök nodüllerinden *Rhizobium* bakterilerini izole etmiş ve nodül oluşturma açısından 11'i etkili, 7'si orta ve 1 suşun ise etkisiz olduğunu bulmuştur. Ayhan (1995), Ankara Kazan ilçesinde 10 farklı toprak numunesinden *Rhizobium* bakterilerini izole etmiş ve simbiyotik özelliklerini incelemiştir. Karadoğan ve arkadaşları (1999) ise göller bölgesinde yetiştirilen nohut bitkilerinden 44 *Rhizobium* suşu izole etmiştir ve bu suşların sera şartlarında nodul sayımları

ve büyükleri arasında varyasyonları gözlemlemiştir. Ögütçü (2000), Erzurum'un yüksek rakımlı bölgelerinde (2000-2500 m) toplamış olduğu yabancı baklagil bitkilerinden *Rhizobium* bakterilerini izole ederek diğer bazı zirai bitkilerde nodül oluşturma ve azot bağlama potansiyellerini araştırmıştır.

*Rhizobium*lar toprak bakterisi olup, toprakta serbest yada baklagil köklerinde simbiyotik olarak bulunurlar. *Rhizobium* bakterilerinin ekolojisine; bitkisel ve Çevre faktörleri etki etmektedir.

Baklagil-*Rhizobium* ortak yaşamında konukçu bitki *Rhizobium* bakterisinin tanınmasını düzenleyip kontrol eder ve enfeksiyon başlangıcını olası kılar. Konukçu bitki genleri nodül oluşumundan sorumludur. Oksijen basıncın ayarlamada görev yapan leghemoglobin molekülünün apoprotein yarısı bitki tarafından, diğer yarısı ise bakteri tarafından kodlanır. Bol miktarda nişasta oluşumu ve leghemoglobinin bulunmayışı etkisiz nodül oluşumunu karakterize eder (Kızıloğlu ve Öztürk., 1992).

Nodüllerinin oluşumunda *Rhizobium* türleri tarafından bitki bünyesinde sentezlenen bitkisel hormonların etkili oldukları düşünülmektedir. Azot tespitinde N<sub>2</sub>'nin amonyuma indirgenmesi nodülde gerçekleşir. Bu indirgenme olayı bakterinin nitrogenaz enzimi tarafından katalizlenir ve havanın serbest azotuna hidrojen ilavesi ile gerçekleşir (Salisbury ve Ross 1992; Sarıoğlu, 1994)

Simbiyotik azot fiksasyonunu etkileyen çevre faktörleri pH, nem, havalanma, ışık, sıcaklık, toprak tipi ve besin element içeriği gibi faktörlerdir.

*Rhizobium* bakterileri pH: 4.0 ila 8.5 aralığında gelişmektedir. Optimum pH değeri ise 6.8'dir (Alexander 1961, Çakmakçı 1987).

**Nem ve havalanma:** Nem, baklagil bitkilerinin büyümesi için gerekli bir faktördür, aynı zamanda toprağa ilave edilen *Rhizobium* bakterileirinin de yaşamını devam ettirmesi için neme ihtiyaç vardır. (Sommer ve Bramm 1981; Kızıloğlu, 1995). Işığın yoğunluğu ve süresi, azot tespitinde önemli rol oynamaktadır. (Ülgen, 1975).

Toprağın sıcaklık değeri 25-29 °C arasında olması durumunda *Rhizobium* bakterileri gelişme göstermekte ve 28 °C olduğu anda *Rhizobium* bakterisi için optimum koşul oluşmaktadır (Grimm ve ark., 1994; Kızıloğlu, 1995). Optimum koşullarda 4 günde toprağın bir gramındaki bakteri sayısı  $4 \times 10^9$  veya  $5 \times 10^9$  hücre değerine ulaşabilmektedir (Burton, 1979; Somasegeren ve Hoben, 1985). *Rhizobium* bakterisinin etkinliği toprakların pH'sı, organik madde içeriği ve toprağın iyonik bileşimi ile ilişkili olarak değişim gösterir (Çakmakçı, 1987; Kızıloğlu, 1995).

**Makro besin elementleri:** Toprakta bulunan makro besin elementleri *Rhizobium* bakterilerinin metabolizması üzerinde etkili olarak *Rhizobium* azot fikse etme ve nodül oluşturma kabiliyetlerini etkilemektedir.

Toprağın fazla miktarda nitritli gübre ile gübrenmesi baklagil bitkilerin kök kıvrılmasını önleyerek *Rhizobium*'ların nodül oluşturmak üzere köke girişine engel olurlar ve nodül teşekkülünü engellerler. Özellikle nitrat şeklinde gübre azotu kılcal köklerin infeksiyon iplikçiği oluşturmasını ve oluşana da *Rhizobium* bakterisinin girmesini önlemektedir. (Lie, 1981; Özbek ve ark., 1993; Çakmakçı, 1987).

Fosfor, *Rhizobium* bakterisinin aktivitesini ve kök gelişimini artırarak nodül oluşumunun erken, daha büyük ve fazla sayıda olmasını sağlar. Fosforun toprakta yeter miktarda bulunması nodül sayısı ve büyüklüğünü olumlu yönde etkilemektedir (Kızıloğlu, 1995).

Kalsiyum, toprak reaksiyonuna etki ederek, baklagil bitkilerinin gelişmesine, ortamda bulunan *Rhizobium* bakterilerinin çoğalma ve hayatını devam ettirmesine yardımcı olur (Ülgen, 1975; Kızıloğlu, 1995).

Mikro besin elementlerinden **demir**, azot tespiti olayında rol oynaması, proteinlerin yapısında yer alması, nitrogenaz ve ferrodoksinin yapısında bulunması ve nitrogenaz ve hidrogenaz sistemlerinde katalizör olarak görev yapması bakımından önem arz etmektedir (Anonim, 1984; Ülgen, 1975).

Molibden nitrogenaz ve nitrat redüktaz gibi iki önemli enzimin gerekli bileşenidir. Kobalt, leghemoglobin sentezini denetleyen propionat oluşum yolunda gerekli olduğu düşünülen bir besin maddesidir. (Ülgen, 1975; Aydemir ve İnce, 1988; Kızıloğlu, 1995).

## 1.2. *Rhizobium*ların Teşhis Karakterleri

*Rhizobium*, toprak bakterilerinin bir cinsi olup Rhizobiaceae familyasında yer alırlar. *Rhizobium* cinsi bakteriler, oksijenli solunum yapan, çubuk şekilli, 0.5-0.9 µm x 1.2-3.0 µm boyutlarında spor oluşturmeyen, gram negatif bakterilerdir. *Rhizobium*'lar içerdikleri nitrogenaz enzimi sayesinde havadaki serbest azotu (N<sub>2</sub>) amonyak (NH<sub>3</sub>) formuna dönüştüren enzim kompleksine sahiptir. Ayrıca hücre içerisinde yaygın olarak β-hidroksibutirat granülleri içerirler. *Rhizobium*'lar hareketli olup tek polar (uç) kamçı taşıyan yada 2-6 arasında periferik (çevresel) kamçı bulundurlar. *Rhizobium*'lar baklagil köklerinde nodül oluşturarak azot tespitini gerçekleştirirler. *Rhizobium*'lar kemoorganotrofik hücreler olup dairesel, konveks, yarı şeffaf ve kabarık biçimli koloniler oluşturup beyaz renkli pigment taşırlar.

### 1.3. *Rhizobium* 'ların Taksonomik Tanımlamaları

Bütün *Rhizobium*'lar köklerde nodül oluştururlar ve tipik olarak hareketli toprak bakterileridir. *Rhizobium*'ların hücre morfolojileri ve biyokimyasal karakterleri simbiyotik olmayan Azotobakterilere oldukça benzerdir (Vincent, 1970). Azotobakteriler ve *Rhizobium*'lar arasındaki en belirgin fark *Rhizobium*'ların baklagil bitkilerin köklerinde nodül oluşturabilmeleridir.

*Rhizobium*'lar oksijenli solunum yapan kemoorganotrof (organik maddeleri okside ederek enerji elde etme biçimi) bakteriler olup oksijen varlığına iyi gelişirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 25-30 °C 'dir ve pH 6.0-7.0 arasında iyi gelişirler. *Rhizobium*lar oksijenli solunum yapan metabolizmaya sahip olmasına karşın birçok straini 0.1 atm oksijen basıncının az olduğu mikroaerofilik koşullarda iyi gelişebilirler. *Rhizobium*'lar eksopolisakkaritten oluşan ince bir kapsül ile çevrelenmiştir. Bu eksopolisakkarit kapsül organizmayı olumsuz çevre şartlarından korur.

### 1.4 *Rhizobium* Baklagil İlişkisi

*Rhizobium*'lar kimyasal gradiente doğru hareket etme yeteneğindedirler. Rhizosfer bölgesinde koloni oluşumunu yöneten aminoasit, karboksilik asit ve fenolik bileşikler gibi pek çok kimyasal çekici maddeler belirlenmiştir. *R. meliloti*'de hareketlilik ve kemotaksisin (kimyasal maddeye doğru mikroorganizmaların hareketi) nodül oluşumu için temel oluşturmayacağı ancak rekabet için önemli olduğu bilinmektedir. Bakterinin mutant suşlarının CHO veya aminoasitlere karşı olan yönelme özelliklerini kaybetmelerine rağmen yonca köklerinde lokalize bölgelere tutunabilme özelliğine sahip oldukları, aynı zamanda bağımsız bir kemotaktik bir yolun varlığı da saptanmıştır. Bu ikinci yolun luteolin adı verilen bir flavonid tarafından kullanılabilceği ve bu maddenin sadece *R. meliloti*'de nodülasyon genlerinin (nod) indüklenmesinde neden olmadığı, aynı zamanda kimyasal çekiciliğe sahip bir madde olduğu da ortaya konmuştur. *R. legüminasorum* suşları için nod genlerini indükleyen flavonoidlere karşı kemotaksis olayının var olduğu da ileri sürülmüştür. Bu durumda bütün bilinen nod genlerini taşıyan simbiyotik plazmid, kemotaksis için yararlı ancak temel değildir (Ayhan, 1994).

*Rhizobium*'lar baklagillerin rizosfere salgıladıkları flavonidleri nod genlerinin indüklenmesiyle cevap veririler. Nod gen proteinlerinin düzenli hareketi sonucu lipopolisakkaritler üretilir. Bu nod metabolitleri, bakteriden gelen sinyalleri bitkiye tanıtır ve kıvrımlı kök kılcallarının oluşması görünür hale gelir. Bakteriler, kök korteksine enfeksiyon iplikçiği yoluyla girerler (Şekil 1.1). Bu arada bitki hücreleri nod faktörlerine cevap olarak bölünmeye başlarlar ve nodül denilen organ meydana gelir. Bazı yonca (*Medicago sativa*) türleri gibi bitkilerde nod genlerinin yanı sıra *Rhizobium* olmaksızın nodül benzeri yapıların oluştuğu da bilinmektedir. Nod genlerinin yanı sıra efektif simbiyozun oluşumunda pek çok bakteriyel genler de rol oynamaktadır (Akçelik ve ark., 1997).

#### 1.4.1. *Rhizobium* Bakterilerinin Baklagil Köklerine Girişi ve Yayılışları

Nodüllerin oluşumu kompleks bir seri işlemlerle gerçekleşir. Nodül oluşumu; ökaryotik konukçu baklagil ile prokaryotik *Rhizobium*'u içeren etkileşme yöntemine bağlıdır. Kompleks olan bu simbiyoz neticesinde her iki simbiyontta morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir ve topraktaki düşük atmosferik azot kapasitesinin artışı sağlar (Medigan ve ark., 1997).

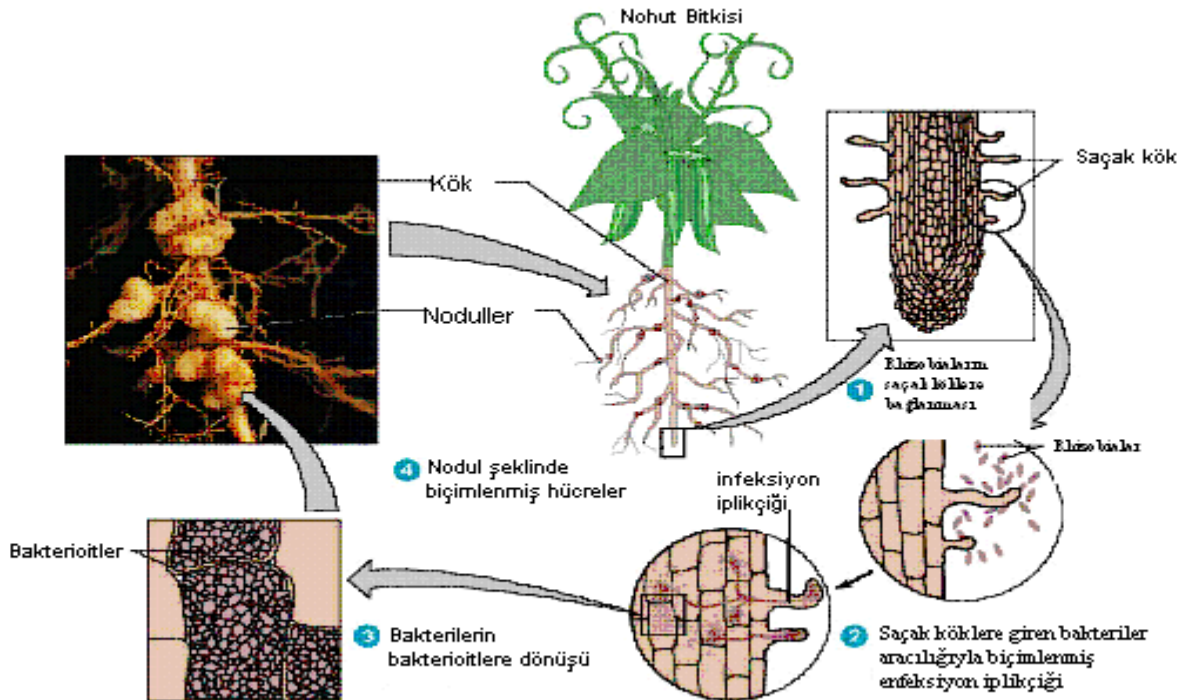
Nodül oluşumunun başlangıcında, birbirine benzer *Rhizobium* türleri baklagil bitkilerinin rizosfer bölgesinde çoğalırlar. Baklagil kökleri tarafından salgılanan kimyasal maddeler *Rhizobium*'ları cezbederek bağlanma olayını gerçekleştirirler. Kök nodüllerinin oluşmasında ilk önce kök emici tüyler *Rhizobium* istilasına karşı kıvrılır ve bakterinin etrafını çevirir. Bu kıvrılmaya bakteri tarafından meydana getirilen metabolitler yol açmaktadır. Bundan sonra bakteride sentezlenen enzimler hücre çeperinin bir kısmını parçalar ve bakterilerin emici tüy hücresine girmelerini sağlarlar. Sonra emici tüyde enfeksiyon iplikçiği denilen bir yapı oluşturulur. Bu enfeksiyon iplikçiği istila edilmekte olan hücrenin katlanmış ve genişlemiş plazma membranı ile bu membranın iç kısmında oluşan yeni selüloz molekülünden ibarettir. Bakteriler, iplikçiğin içinde yoğun şekilde çoğalırlar ve bu iplikçik iç kısımlara doğru uzayarak korteks hücrelerinin arasına ve içine girmeye başlar (Kırbağ ve Baltepe, 1987).

İçteki korteks hücrelerinde bakteriler sitoplâzmaya bırakılırlar ve bazı hücreleri özellikle tetraploid hücreleri bölünmeye teşvik ederler. Bu bölünmeler dokuların çoğalmasına yol açar. Çoğunlukla tetraploid hücrelerden ve bakteri içermeyen bazı diploid hücrelerden oluşan olgun bir kök nodülü meydana gelişir (Şekil 1.1).

Her büyümüş, hareket edemeyen bakteri, bakterioid olarak isimlendirilir. Bakterioidler genellikle sitoplâzma grupları halinde bulunurlar. Her grup peribakterioid membran denilen bir membran ile kuşatılmıştır. Peribakterioid membran ve bakterioid grup arasındaki bölümler peribakterioid olarak isimlendirilir (Robertson ve ark., 1980).

Genellikle nodül oluşumu ve gelişiminin hormonal olarak kontrol edildiği ve büyüme maddelerinin simbiyozisin her iki ortağı tarafından temin edildiği sanılmaktadır. Burada hormonların iş gördüğünü düşündüren olay, köklerde enfeksiyon iplikçiklerinin içeri girmesinden önce hücre bölünmelerinin görülmüş olmasıdır. Bu olayda oksinlerin, gibberellerin, sitokininlerin ve absisik asit gibi hormonların iş gördüğü belirtilmiştir. Nodül şekillerinin farklı olması hormonal ilişkilerinin türe göre değiştiğini düşündürmektedir (Corby, 1981).

Simbiyotik azot fiksasyonunun önemi muhtemelen ilk defa Hellriegel ve Wilfarth'ın 19. yüzyıl sonlarında yaptığı deneylerle anlaşılmıştı (Paul, 1989). Sonrasında yapılan çalışmalar simbiyotik azot fiksasyonunun doğasına büyük ölçüde ışık tuttu (Burris, 1988). Özellikle moleküler ve hassas analitik tekniklerin gelişimine paralel olarak simbiyotik azot fiksasyonu bilimi büyük ölçüde ilerledi (Graham ve ark., 1988; Shantharam ve Mattoo, 1997).



Şekil 1.1 *Rhizobium* Bakterilerin Baklagil Köklerine Girişi

#### **1.4.Rhizobium Bakterilerinin Moleküler Karakterizasyonu**

Son yıllarda moleküler biyolojideki yeni ve güçlü tekniklerin gelişiminide sağlamıştır. Bu teknikler biyoloji, tıp, ziraat alanlarında, biyoteknolojide, hastalıkların teşhis ve tedavisi bitki biyolojisi ve endüstriyel mikrobiyoloji’de yaygın kullanımına başlanmıştır. Dünyada ve ülkemizde moleküler teknikler daha çok başta bakteriler olmak üzere mikroorganizmaların tür ve tür altı kategorilerinin tespitinde ağırlıklı olarak kullanılmaktadır. Bu teknikler teşhiste kesin sonuç, uygulamada kolaylık ve ekonomiklik sağlamaktadır (Beriş, 2001). Bakterilerin teşhis ve karakterizasyonundaki sorunları gidermek için özellikle polimorfizm gösteren markır tekniklerin kullanımı önemlidir.

Bakterilerin moleküler karakterleri dışındaki özellikleri dikkate alınarak yapılacak teşhis ve tanımlamalar güvenilirliği ve doğruluğu az olan çalışmalardır. Bu nedenle protein markırları ve DNA’ya dayalı tekniklerin kullanılması önemlidir. Moleküler karakterler değişik hücresel koşullardan etkilenmemesi ve tekrarlanabilme özelliklerinden dolayı güvenilirliği ve doğruluğu tartışmasızdır. Bakterilerde özellikle plazmid tiplendirmesi kayda değer bir yöntemdir.

RFLP (Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi) tekniği RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) teknikleri bir çok bakteri cinslerinde parmak izi (fingerprinting) tiplendirmelerinde önde gelen ve güvenilir sonuçlar veren yöntemlerdir (Tignen, 1992; Ergül, 2002). RAPD yöntemi rastgele dekamer oligo nükleotidler (primerler) kullanılarak, PCR ile çoğaltılan DNA bandlarının ortaya çıkardığı farklılıkları esas alan bir tekniktir. Birçok avantajından dolayı PCR markırları ile benimsenmiş ve dünyanın farklı laboratuvarlarında tercih edilen bir yöntem olmuştur. Bu yöntemde saf DNA ekstraksiyonu, PCR şartlarının optimizasyonu ve uygun primerlerin kullanımı önemlidir.

Akçelik ve ark. (1997), *Bradyrhizobium* suşlarında nodulasyon yeteneğinin plazmidlerle olan ilişkisini araştırmışlardır. Bu özelliğin, bu suşlarda kromozomal DNA kökenli olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, antibiyotik direnç markırlarının oluşturulmasından sonra yürütülen türler arası konjugasyon denemelerinde, 72,6 kb büyüklükteki plazmidin konjugal aktarım yeteneğinde olduğu ancak transkonjugatlarda stabil olmadığını belirtmişlerdir.

Akçelik ve arkadaşları’nın (1997) bildirdiğine göre Percuoca ve grubu, topraktan izole edilen *R. legüminosarum* bv. *viciae* suşlarının plazmid içeriklerini belirlemişlerdir ve simbiyotik özelliklerini saptamışlardır. Plazmid bant sayısı ile büyüklüklerinin suştan suşa değişiklik gösterdiği, bir suшта sadece bir adet 135-140 kb büyüklükte Sym plazmidinin varlığını tespit etmişlerdir.

Wilson ve ark. (1993), bitki nodüllerinden izole ettikleri *R.legüminosarum* bv. *viciae* 'ye ait 20 suşu fenotipik, RAPD PCR ve plazmid profillerine göre gruplandırmışlar ve izolatların tek bir suş olduğunu belirlemişlerdir. 1994 ve 1995 yıllarında izole edile toplam 153 suştan sadece 20 suş karakterize edilmiştir. Teşhis edilen suşların bakteriyosin özellikleri incelenmiş, test bakterileri üzerinde % 68 oranında etki gösterdiğini bulmuşlar. 1994 ve 1995 yıllarında ait izolatların %62'sinin, bu bakteriyosinden etkilenmediği de rapor edilmiştir. İzole edilen bir çok suşun birbiriyle karıştırılmaması, suşlar arasında ayrımı geliştirme ve suşların teşhisini doğruluğunu ispatlama zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Sınıflandırmaya yönelik ilk çalışmalar genelde morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu temel alınarak yapılmıştır. Ancak özellikle fenotipik özellikler suşların ayrımı için yeterli olmadığından değişik metodlar geliştirilmiştir (Bağcı ve ark., 1991):

Mikrobiyal sistematikte protein jel elektroforezi, özellikle aynı türler veya türlere ait suşların hücresel proteinlerin karşılaştırılması ve ayrımı için hassas bir teknik olarak yıllardır kullanılmaktadır (Burce ve Jordens, 1991; Çökmüş ve Yousten, 1994; Nick ve ark., 1999)

Elektroforetik metotlar bir çok örneğe kolaylıkla adapte edilebildiğinden, farklı moleküllerin elektroforetik profilleri populasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. *Rhizobium*'ların lipopolisakkarit (LPS) ve proteinlerinin yapısında görülen geniş çeşitlilik, bunların elektroforetik davranışlarına yansımakta, izolatlar arasında farklılığın belirlenmesinde bir kriter olarak kullanımı mümkün olmaktadır. Bunun yanı sıra *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium*'un tarla izolatlarının identifikasyonu için plazmid profilleri de kullanılmaktadır (Hitchcock ve Brown, 1983; Kamcker ve Brill, 1986; Dreyfus ve ark., 1988; Kishore ve ark., 1996; Santamaira ve ark., 1997).

*Rhizobium* suşları, doğal azot gübresi olarak yılda bir kez tarım topraklarına verilir. Wisconsin soya çiftliklerinde toplanan 543 *B.japonicum*'ların tek yönlü SDS-PAGE ile ayrımı yapılmış, elektroforetik ayrımın serotiplendirme ile yapılan ayırmadan daha iyi olduğu açıklanmıştır. Tüm hücre proteinlerinin elektroforetik analizi sonunda suşlardan 23'ünün doğal, 6'sını inokulant suş olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan 61A76 suşunun en etkin suş olduğu ve % 21 oranında nodül oluşturduğu saptanmıştır. Bu predominant suşların bilhassa soya kültür, toprak tipi ve tarla lokasyon ile ilişkili olmadığı da rapor edilmişti (Kamicker ve Brill, 1986).

Dreyfus ve arkadaşları (1988), *Sesbania rostrata* kök nodüllerinde izole ettikleri 20 adet kök ve gövde nodül bakteri suşlarının 221 fenotipik özelliğinin numerik analizini yapmışlardır. Bu suşları *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* cinsine ait kontrol suşlarla ve sadece köklerde nodül oluşturan 9 suşla karşılaştırmışlardır. Ayrıca bu suşları tüm hücre proteinleri,

DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyonları karşılaştırılmıştır. Sadece kök nodülasyonu yapan suşları ise, *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium*'dan oldukça farklı olduğunu belirlemişlerdir. Suşların *Xanthobacter*'e yakın olduğunu fakat genotipik ve fenotipik yönden farklılık gösterdiğini rapor etmişleridir. Yeni bir cins olan *Azorhizobium*'a ait *Azorhizobium caulonodans* ORS 571 tip suşunu önermişlerdir.

*Sesbania* türlerinde kök ve gövde nodülü oluşturan *Rhizobium* izolatlarının, toplam çözünür protein ve membran lipopolisakkarit profillerinin SDS-PAGE ile analizi, suşların identifikasyonunda kullanılmıştır. İzolatların elektroforetik özellikleri referans suşlarla karşılaştırılmıştır. Protein ve LPS profilleri ile suşların birbirinden, hatta referans suşlardan ayrımının sağlanabildiği rapor edilmiştir (Kishore ve ark., 1996).

Brezilya'nın Atlantik Çölleri ve Amazon bölgesindeki tropik baklagil bitkilerinin nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium*'un toplam 800 suşu arasındaki akrabalıklar ve taksonomik pozisyonlar detemine edilmiştir. Araştırmacılar SDS-PAGE ile toplam 171 suş seçmişler, bunların da 23 adet elektroforetik tip suşunu da içine alan büyük bir kümede toplanmıştır. Birkaç izolatin ise *R.fredii*, *R.galegae* ve *R.loti* türleri ile aynı olduğu bulunmuştur. Fakat birçok suşun takson olarak tanımlanmadığı da bildirilmiştir (Moreria ve ark., 1993).

Gatti ve ark.(1997), laktik asit bakterilerinin farklı türlerine ait toplam 119 suştan saflaştırdıkları hücre duvar proteinlerinin SDS-PAGE parmak izini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon ve elektroforetik seperasyonun, termofilik laktobasil tür ve suşların karakterizasyonu için hızlı ve uygun bir metot olduğu sonucuna varılmıştır. Yaklaşık 50 kDa civarında olan iki hücre duvar proteininin de *Lactobacillus. delbruecki* suşlarına özgü olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan araştırmacılar, *Lactobacillus lactis* ve *Lactobacillus bulgaricus* alt türleri arasında ayrımın elektroforetik teknikle mümkün olmadığını da bildirmişlerdir. *Lactobacillus herveticus* ve *Lactobacillus delbrueckii*'nin ise hücre duvar proteinlerine göre ayrımını sağlanabildiği rapor edilmiştir.

Bu bakteri grubu ile yapılan bir diğer çalışmada, şaraplardan izole edilen 32 laktik asit bakterisinin SDS-PAGE ile elde edilen tüm hücre protein profillerine göre ayrı ayrı incelenmiş ve bu suşların *Leuconostoc oenos* veya *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*'nin üyesi oldukları açıklanmıştır (Patarat ve ark., 1994).

Elektroforezle desteklenen bir başka çalışmada ise *B. sphaericus* suşlarının gruplandırılmasında bakteriyosin aktivitelerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir (Çökmüş ve Yousten, 1993). DNA homoloji gruplarındaki suşlar arasında bakteriyosin profillerinde çeşitlilik gözlenmiştir. H5a5b'ye ait suşların benzer bakteriyosin aktivitesi gösterdiği ve

poliakrilamid jeldeki bakteriyosin bandının benzer olduğu tespit edilmiştir. *B.sphaericus* suşlarının Native-PAGE ve SDS-PAGE ile elde edilen filtrat protein profillerine göre ayrımı yapılmıştır. Yapılan çalışmada suşların birbirlerinden ayrımında, tamamen sporlanmış kültürlerdeki filtrat proteinlerin vejetatif evreye göre daha uygun olduğu rapor edilmiştir. Suşların ayrımında Native-PAGE'in kullanılabilmesi buna karşılık SDS-PAGE'in kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır (Mercan,1996).

Tamimi ve Young (2004), İngiltere'nin Jordan bölgesinde 16 farklı coğrafik alanda yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde nodül oluşturan 30 Rhizobial izolat elde ettiler. Bu izolatları PCR-RFLP yöntemini kullanarak iki grup altında topladılar.

I. grup izolatlar %80 oranında *Rhizobium etli* türünün strainleri, II. grup izolatlar ise %20 oranında *Rhizobium tropici* türünün strainleri olarak tanımladıkları rapor edilmiştir.

Navarro ve arkadaşları (2004), *Pachyrhizus spp.* baklagil türlerinde nodül oluşturan Rhizobia strainleri üzerinde yaptıkları çalışmada Rhizobial strainlerin fenotipik ve moleküler karakterizasyonları sonuçlarına göre strainlerin SDS-PAGE total protein profillerini LPS (lipopolisakkarit) profillerini ile karşılaştırdılar. Strainlerin total protein profillerini arasındaki benzerliği ve farklılığı TP-RAPD (iki primerli RAPD) ile karşılaştırarak elde ettikleri sonuçlara göre farklı bölgelerden izole edilen strainler arasında farklılık olmadığını benzer bantlar verdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçları 16S rRNA ITS bölgesinin komple sekans analizi ile karşılaştırdıklarında strainlerin *Bradyrhizbium* cinsi türlerine %98-99 oranında benzer olduklarını belirtmişlerdir.

Pinerio ve arkadaşları (2003), Porto Riko tropikal iklim baklagillerinden izole ettikleri 15 izolatın fenotipik, moleküler ve simbiyotik özelliklerini karakterize ettiler. Bu çalışmalarında izolatların teşhisini fenotipik karakterler dahil 16S RNA sekans analizi, LMW RNA (düşük moleküler ağırlıklı RNA) profilleri , TP-RAPD (iki primerli RAPD) bantları ve 16S rDNA-RFLP yöntemlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar, çalışmalarında izolatların farklı konak bitkilerden izole edilmesine rağmen izolatların sadece iki gruba ayrıldığını ve *R. gallicum* ve *R. tropici* ile benzerlik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Pineiro ve ark. *R. tropici* strainlerinin konaklarda rastgele nodül oluşturduğunu daha önce tanımladığı gib belli tür baklagil bitkilerinde nodül oluşturmadığını ileri sürmüşlerdir.

Ramsubhag ve ark. (2002), *Cajanus cajan* baklagil bitkisinde nodül oluşturan *Bradyrhizoibum elkanii* strainlerini izole ettiler. Elde ettikleri 30 izolat üzerinde numerik taksonomi ve 16S rRNA genlerinin dizilimi (ARPE) yöntemini kullanarak karakterize ettikleri suşlardan 23'ünün ortalama %14 ve üzeri *B. elkanii* türünden farklılık gösterdiğini diğer izolatların ise birbirinden %5 oranında farklılık gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Silva ve arkadaşları (2002), Meksika'nın Milpa platosunda kültürü yapılan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde nodül oluşturan rhizobial populasyonun genetik yapısının stabilitesini üç yıl süreyle çalıştılar. Araştırmacılar çalışmalarında *R. etli* bv. *phaseoli* ve *R. gallicum* bv. *gallicum* izolatlarının moleküler marker analizi (rrs, ginII, nifH ve nodB genlerinin parçasal baz dizilimi) ile izolatları karakterize ettiler. Elde ettikleri sonuçları multilocus enzim elektroforezinin küme analizi ve plazmid profilleri verilerine göre izolatların filogenetik pozisyonlarını belirleyerek birbirinden ayırmışlardır. Silva ve arkadaşları elde ettikleri verilere göre rhizobial populasyonun genetik analizi her iki tür arasında yüksek genetik farklılaşmalarının var olduğunu ancak çalışmaları süresince populasyonun düşük oranda farklılaştığını ileri sürmüşlerdir.

Andionou ve arkadaşları (2002), yabancı *Galegea orientalis* ve *Galegea officinalis* bitkilerinden izole ettikleri 101 *Rhizobium galegea* strainini gDNA-RFLP, nod kutusu sekanslarının belirlenmesi, 16S-23S bölgesinin PCR-RFLP yöntemlerini kullanarak izolatları karakterize ettiler. Elde ettikleri sonuçlara göre *R.galegae* bv. *officinalis* ve *R. galegae* bv. *orientalis* strainleri iki farklı grup oluşturduğunu ayrıca her iki grupta yer alan suşların nod kutusu bölgesinin yüksek oranda korunmuş olduğunu ancak biovarlar arasında yapısal olarak farklı derecelerde olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Gao ve arkadaşları (2001), *Astragalus adsurgens* baklagil bitkisinden izole ettikleri 95 rhizobia izolatını genetik çeşitliliğini moleküler biyolojik metotlar kullanarak incelediler. Araştırmacılar çalışmalarında hem referans strainlere hemde izolatlara AFLP, REP, ERIC ve BOX-PCR fingerprint yöntemlerini kullanarak izolatları karakterize ettiler. Elde ettikleri sonuçlarına göre izolatların *Agrabacterium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* ve *Sinorhizobium* cinslerine ait olduklarını belirtmişlerdir.

Lafay ve arkadaşları (2000) Avustralya yetişen *Acacia* cinsine ait 13 farklı türden izole ettikleri 118 rhizobial suşu SSV-rRNA ve PCR-RFLP yöntemlerini kullanarak izolatları analiz ettiler. Analiz sonuçlarına göre izolatları 9 farklı genom türü olarak tanımladılar. Araştırmacıların bu bulguları daha önce Lafay ve Burdon'unun (1998) de yaptıkları çalışma ile benzerlik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Bu genom türlerinin sekizi *Bradyrhizobium* cinsine ait olduğunu bir tane genom türünün ise *Rhizobium tropici*'ye benzer olduğunu ortaya koymuşlardır.

Chen ve arkadaşları (2000) Paraguay'da yetişen soya fasulyesinden (*Glycine max*) izole ettikleri 78 rhizobial suşu ERIC-REP-PCR yöntemi ile analiz ettiler. Bu izolatlardan 58'i yavaş büyüyen ve YMB ortamında alkali reaksiyon veren suşlar olarak tanımladılar. İzolatları 16S rDNA özelliklerine göre karşılaştırdıklarında *Bradyrhizobium japonicum* ve

*Bradyrhizobium elkanii* türlerine ait suşlar olarak belirlendiler. İzolatların referans strainler ve ticari strainler ile karşılaştırdıklarında aralarında yüksek oranda polimorfizmin olduğunu bildirmektedirler.

Ulrich ve ark. (2000) *Robinia pseudoacacia* baklagil bitkisinden izole ettikleri 70 rhizobial strainin fenotipik özellikleri ve 16S rDNA analizini yöntemlerine göre karakterize ettiler. İzolatların çoğaltılmış 16S rDNA genotipleri 7 farklı endonukleaz enzimi ile RFLP bantlarını ve 16S rDNA sekans analizi sonuçlarına göre izolatların %76'sının *Mesorhizoibum* cinsine ait olduğunu, %24'ünün ise *Rhizobium* cinsine ait strainler olduğunu belirmişlerdir. Araştırmacılar karakterize ettikleri izolatları 5 farklı genotip altında *M. amorphae*, *M. loti*, *M. huakii*, *R. legüminasorum* ve *R. tropici* genotiplerine benzer olduklarını ileri sürmüşlerdir.

Coutinho ve ark. (1999). Çalışmalarında geleneksel yollarla ekili soya (*Glycine max*) zirai topraklarındaki rhizobia çeşitliliğini belirlemek için tuzak konak bitki ile yakalama ve DNA fingerprint yöntemlerini kullanarak izolatları karakterize etmişlerdir. Tuzak bitki olarak kullanılan *Cajanus cajan* bitkisinden elde edilen 158 izolatın RAPD-DNA fingerprint ile izolatlar arasındaki benzerlik ve farklılıkları ortaya koymuşlardır.

Oliveria ve ark. (1999) Doğrudan topraktan izole ettikleri *Rhizobium* türlerini teşhis etmek amacıyla birkaç *R. tropici*, *R. legüminasorum* ve *Agrobacterium rhizogenes* türlerini 16S-23S rDNA bölgelerini sekans analizini yaparak izolatları birbiriyle karşılaştırmışlardır. Strainlerin filogenetik pozisyonlarını daha sonra denatüre gradient jel elektorforez tekniğini kullanarak doğrulamışlardır.

Oliveria ve arkadaşları (1998), *R. tropici*, *R. legüminosorum* ve *Agrobacterium rhizogenes* strainlerinin 16S- 23S rDNA (spacer bölge) türlere özgü primerler kullanarak onların filogenetik ilişkilerini ortaya koymuşlardır.

Vinuesa ve ark. (1998) *Camaecytisus proliferus* bitkisinde nodül oluşturan 9 strain ve Kanarya adalarında endemik olarak yetişen birkaç odunsu baklagil bitkisinde nodul oluşturan Rhizobial strainler ile referans strainlerin filogenetik analizini 16S rDNA'ya dayalı PCR-RFLP analizini, 16S-23S intergenic spacer (IGS) bölgenin PCR-RFLP ve REP-PCR, BOX, ERIC-REP bölgelerine spesifik primerleri kullanarak analiz ettiler. Vinuesa ve arkadaşları bu çalışmalarında; Kanarya izolatların 16S rDNA dayalı analizinde iki referans strainle grup oluşturduğunu, 16S rDNA-RFLP yönteminde kullanılan 3 farklı endonukleaz enzimlerinin oluşturdukları bantlara göre izolatları 6 gruba ayırdılar. Bu gruptaki strainlerin genotipik çeşitliliklerini ortaya koymak için REP-PCR yöntemini uyguladılar. REP-PCR sonuçlarına göre sadece 2 tane Kanarya strainin benzer fingerprint gösterdiğini buldular. Ayrıca, 16S-RFLP ve birbirinden oldukça farklı REP-PCR fingerprintlerini bilgisayar yardımıyla 16S

rDNA-RFLP örnekleriyle birleştirerek gruplardaki strainlerin filogenetik ilişkisine baktılar. Strainlerin 16S rRNA genlerinin yüksek oranda farklı gösteren ilk 264 baz çifti segmentlerinin DNA sekans analizi sonuçlarının fingerprinte dayalı sınıflandırma ile uygun olabileceğini buldular. Elde edilen üç farklı DNA sekanslarından biri daha önce tanımlanmış olan *Bradyrhizobium japonicum/Rhodo pseudomonas* DNA kümesine ait olduğunu ortaya koydular. Ayrıca Kanarya izolatlarının nodulasyon etkinliklerinin belirlenmesi için *Glycine max* (soya fasulyesi) ve *Leucanena leucocephala*'da yaptıkları denemelerde bu izolatların hiçbirinin bu bitkilerde nodul oluşturmadığı ancak *Acacia pendula*, *C. proliferus*, *Macroptilium atropurpureum* ve *Vigna unguiculata* bitkilerinde nodul oluşturduklarını belirlediler.

Fremont ve arkadaşları (1998), *Bradyrhizobium* strainlerinin moleküler, kültürel ve tarla uygulamalarını kullanarak strainlerin karşılaştırılması adlı çalışmalarında; *Acacia mangium* bitkisinde nodül oluşturan 33 *Bradyrhizobium* ve *Rhizobium* izolatının 16S rDNA bölgelerinin PCR ile çoğaltarak daha sonra aynı bölgenin RFLP analizini, konak spektrumu ve antibiyotik dirençliliklerine göre karakterize ettiler. Çalışmalarında elde ettikleri veriler sonucunda izolatları iki ana grup altında topladılar. I. grup izolatlar genetik olarak birbirine yakın ve elverişsiz koşullara daha çok dayanıklı olduklarını ancak II. grup izolatların genetik olarak birbirinden daha uzak ve nodül oluşturma etkinliklerin daha zayıf olduklarını belirlediler.

Khbaya ve arkadaşları (1998) dört farklı akasya türünden (*A. gumminifera*, *A. raddiana*, *A. cyacopylla* ve *A. horrida*) isole ettikleri 40 rhizobial suşun moleküler karakterizasyonunu 16S rDNA ve 16S-23S rDNA bölgelerinin PCR ile çoğaltılarak RFLP analizini sonuçlarına göre suşları karşılaştırdılar. Analiz sonuçlarına göre; 16S-23S spacer bölgesinin uzunluğu mikrosimbiyontlar arasında önemli derece çeşitlilik olduğunu ancak çoğaltılmış spacer bölgenin RFLP analizini tekrar gözden geçirildiğinde heterojenlik olmadığını ileri sürmüşlerdir. İzolatların 16S rDNA analizi sonuçlarına göre izolatlar 3 grup altında toplanmış bu gruplardan A ve B grubu izolatlarının *Sinorhizobium* cinsine ait olduklarını izolatların *S. meliloti* ve *S. fredii* ile yakın akraba olduklarını ileri sürmüşler. C grubu izolatlarının ise daha çok *A. tumefaciens* türüne yakın olduğunu izolatların bu türlere olan yakınlıkları ayrıca her kümeden seçilen birer temsilci suşun sekans analizi ile doğruladıklarını bildirmişlerdir.

Nuswantara ve arkadaşları (1998), *Astragalus sinicus* cv. *Japonya* bitkisinin simbiyontu olan *Rhizobium hauki* bv. *rengae* filogenetik pozisyonu belirlemek amacıyla *A. sinicus* bitkisinden izole ettikleri suşların 16S rDNA bölgelerini PCR ile çoğaltılarak RFLP yöntemi ile analizini bunun yanında 16S rDNA bölgesinin ilk 300 baz çiftinin sekans belirlenmesi,

bakteriyofaj tiplendirmesi ve 16S rDNA bölgesinin rastgele primerler kullanarak izolataları karakterize ettiler. Araştırmacılar çalışmalarında *Astragalus sinicus* bitkisi simbiyontu olan *R. haukii* strainlerinin yeni bir cins olan *Mesorhizobium haukii* türünün alt türleri olarak sınıflandırılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar 16S rDNA bölgesinin rastgele primerler kullanarak izolataları analiz ettiklerinde bu izolatların *Mesorhizobium loti* ve *M.haukii* ile yakın benzerlik gösterdiğini ortaya koydular.

Laquerre ve ark. (1997), Farklı coğrafik bölgelerde yetişen *Astragalus*, *Oxytropis* ve *Onobrychis spp.* bitki türlerinden izole ettikleri 44 rhizobial izolatin genetik çeşitliliğini belirlemek amacıyla; 16S rRNA-MRSP, REP-PCR ve PCR-DNA fingerprint yöntemlerini kullanarak izolataları değerlendirmişler. MRSP ve 16S rRNA sonuçlarına göre izolatların çoğunun *Mesorhizobium* cinsine ait olduğunu, 5 izolatin *Lotus spp.* ve *Cicer arietinum* bitki türlerinde nodül oluşturduğunu tespit ettiler. 3 tane *Astragalus* izolatinın ise *Bradyrhizobium* cinsine ait strainler, iki izolatin ise *Rhizobium legüminosarum*'a benzer olduğu ve geri kalan izolatların da *Rhizobium gallicum* strainleri olarak belirlendiler. Laquerre ve ark. elde ettikleri bu sonuçlara göre Rhizobial sınıflandırmanın cins ve belki de tür düzeyinde konak bitki ve coğrafik orijinden bağımsız olduğunu ileri sürdüler.

Tesfaye ve arkadaşları (1997) *Rhizobium* türlerinde 23S rDNA bölgesinin parçasal sekanslarının karşılaştırılması adlı çalışmalarında *Rhizobium* üyelerinin 23S rDNA bölgelerini PCR ile çoğaltarak bu bölgenin sekanslarının belirleyerek suşların filogenetik konumunu tespit ettiler. Suşların 23S rDNA nükleotit sekanslarındaki varyasyonlar, 16S rDNA sekans analizi ve konak nodülasyon özgünlüğü ile filogenetik ilişkileri tespit edildi. Üç *Rhizobium* türünü temsil eden altı tane strain (*R. legüminosarum* bv. *trifolii*, *R. meliloti* ve *R. etli*) ve *Bradyrhizobium* ve *Agrobacterium gibi* Rhizobial cinslerine ait suşlar analiz edildiğinde 5 farklı rDNA grubu oluşturduklarını bildirdiler. Araştırmacılar 23S rRNA bölgesinin sekans analizi sonuçlarına göre bu bölgenin *Rhizobium* strainleri ya da türleri için prob olarak kullanılabilceğini ileri sürmüşlerdir.

Bakteri genomundaki 16S rRNA geninde devamlı aynı olan yani değişmeyen ve değişken olan bölgeler bulunmaktadır. Bakteri türlerinin teşhisinde bu değişken bölgeler kullanılmaktadır. Gray ve arkadaşları (1984) 16S rRNA geninde 8 adet değişmeyen ve 9 adet değişken bölgenin olduğunu ortaya çıkardılar ve bu araştırmacılar bu özellikleri kullanarak kültür edilmemiş bakterilerin bile 16S rDNA'larını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla belli primerler kullanarak artırdılar. PCR veya diğer bazı izolasyon yöntemleri ile elde edilen 16S rDNA'nın baz dizin analizi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve hibridizasyon özellikleri kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, Stackebracdt ve Goebel (1994) hibridizasyon çalışmalarında aynı cinse ait olan türlerin arasında 16S rRNA dizisi açısından %97'den daha az benzerlik gösteren suşların farklı türler olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmamızda Van Gölü havzasının farklı bölgelerinde doğal olarak yetişen yabani baklagil bitkilerinden mercimek (*Lens orientalis*) ve nohut (*Cicer anatolicum*) bitki kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* suşların fenotipik karakterizasyonları belirlenerek suşların doğal isteklerinin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak Van Gölü havzasının farklı bölgelerinden (Çizelge 2.1) toplanan baklagil bitkileri yabani mercimek (*Lens orientalis*) ve nohut (*Cicer anatolicum*) bitkilerinin nodülleri arazide pens yada makas yardımıyla kesilerek 10 ml steril izotonik su içeren tüplere alınarak laboratuvar ortamına getirildi.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Bitki örneklerinin toplanması

Materyal olarak kullanılacak bitki kök nodülleri bitki kökü ile beraber çiçeklenme dönemleri başlamadan hemen önce periyodik zaman aralıklarıyla bitkilerin doğal yayılış gösteren alanlarından toplandı (Çizelge 2.1). Toplama esnasında bitki örneklerinin nodül oluşturmuş olması ve bu nodüllerin sağlıklı şekilde korunmasına özen gösterildi.

#### 2.2.2. Nodüllerin bitkilerden ayrılması ve sterilizasyonu

Toplanan bitki örneklerindeki aktif nodüllere (iri, pembe, sağlıklı) sırası ile aşağıdaki işlemler uygulandı (Sloger, 1969; Anonim, 1983; Sarıoğlu ve ark., 1993; Beck ve ark., 1993):

- 10 ml'lik steril izotonik su içeren tüplerde bulunan nodüller dikkatlice pens yardımıyla alındı ve steril beher içerisinde konuldu.
- 5-6 sn. %95' lik etil alkolle muamele edilerek içerisinde %0,1' lik asitli HgCl<sub>2</sub> çözeltisi bulunduran küvette 2-3 dk. bekletildi.
- Steril distile su ile iyice yıkanarak nodül sterilizasyonu işlemi tamamlandı.

#### 2.2.3. Nodüllerden bakterilerin izolasyonu

Steril nodüller, içerisinde 1 ml. steril saf su bulunan havanda ezildi ve elde edilen homojenattan YMA (Yeast Ekstract Mannitol Agar) besi ortamına çizgi ekim yapıldı. Petriler

Çizelge 2.1. İzolatların Toplandığı Mevki, Orjin ve Tarih

Kod	Mevki	Orjin	Tarih	Kod	Mevki	Orjin	Tarih
1A3L1	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E8C4	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A2L2	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E6C1	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A2L1	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E2C2	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A1L2	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E6C2	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A1L1	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E8C3	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A6L1	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E1C1	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A5L2	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E2C1	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A5L1	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E5C3	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A4L2	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E8C2	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A4L1	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E8C1	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1A7L1	Kesan deresi	Mercimek	02.06.2005	3E4C2	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1B1C1	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3E4C1	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1B1C2	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3E1C2	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1B1C3	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3E7C2	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1B1C4	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3E7C3	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1B2C2	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3E7C4	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1B4C1	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3E7C5	Muradiye Şelalesi	Nohut	09.06.2005
1B4C2	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3F2C1	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
1B2C4	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3F1C1	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
1B2C3	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3F2C2	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
1B2C2	Alacabük dağı	Nohut	02.06.2005	3F2C3	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
2C4C1	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	3F2C5	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
2C5C1	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	3F3C2	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
2C3C2	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	3F2C4	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
2C3C3	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	3F3C1	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
2C4C1	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	3F2C3	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
2C6C1	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	3F2C5	Süphan Dağı	Nohut	09.06.2005
2C5C4	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4H2V1	GürpınarYolu	Mercimek	15.06.2005
2C5C3	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4H2V2	GürpınarYolu	Mercimek	15.06.2005
2C5C3	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4H1V1	GürpınarYolu	Mercimek	15.06.2005
2C1C1	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4H2V3	GürpınarYolu	Mercimek	15.06.2005
2C1C2	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4K1L3	Akdamar Adası	Mercimek	15.06.2005
2C2C1	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4K7L2	Akdamar Adası	Mercimek	15.06.2005
2C2C2	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4K1L1	Akdamar Adası	Mercimek	15.06.2005
2C6C3	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4K6L4	Akdamar Adası	Mercimek	15.06.2005
2C6C2	PirReşit Ahmet	Nohut	07.06.1980	4K2L1	Akdamar Adası	Mercimek	15.06.2005
2D2L1	Ünseli		07.06.2005	4K2L4	Akdamar Adası	Mercimek	15.06.2005
2D2L2	Ünseli		07.06.2005	4K7L1	Akdamar Adası	Mercimek	15.06.2005

Çizelge 2.1. İzolatların Toplandığı Mevki ,Orjin ve Tarih (devam)

Kod	Mevki	Orjin	Tarih	Kod	Mevki	Orjin	Tarih
2D1L1	Ünseli	Mercimek	07.06.2005	4K1L4	AkdamarAdası	Mercimek	15.06.2005
2D1L2	Ünseli	Mercimek	07.06.2005	2M4L1	Ünseli	Mercimek	07.06.2005
2D4L2	Ünseli	Mercimek	07.06.2005	2M2L3	Ünseli	Mercimek	07.06.2005
2D4L1	Ünseli	Mercimek	07.06.2005	2M2L4	Ünseli	Mercimek	07.06.2005
2D3L1	Ünseli	Mercimek	07.06.2005	2M3L3	Ünseli	Mercimek	07.06.2005
2D3L2	Ünseli	Mercimek	07.06.2005	2M3L1	Ünseli	Mercimek	07.06.2005
2D1L1	Ünseli	Mercimek	07.06.2005	2M4L2	Ünseli	Mercimek	07.06.2005
2M4L3	Ünseli	Mercimek	07.06.2005	<b>Referans Suşlar</b>		<b>Orjin</b>	
5N1C3	Taşlı Köy-Çatak	Nohut	15.06.2005	av7 vicia	Atatürk Üniv. Fen ve Ed.Fak.Biy.Böl		
5N1C1	Taşlı Köy-Çatak	Nohut	15.06.2005	tn4 cicer	Atatürk Üniv.Fen ve Ed.Fak.Biy.Böl		
5S1C4	Alacabük dağı	Nohut	17.06.2005	yonca520	Ankara Toprak Gübre Araşt. Enst.		
5S2C3	Alacabük dağı	Nohut	17.06.2005	nohut522	Ankara Toprak Gübre Araşt. Enst.		
5S3C2	Alacabük dağı	Nohut	17.06.2005	fasulye83	Ankara Toprak Gübre Araşt. Enst.		
5S3C1	Alacabük dağı	Nohut	17.06.2005	mercimek1045	Ankara Toprak Gübre Araşt. Enst.		
5S1C3	Alacabük dağı	Nohut	17.06.2005				
5S3C3	Alacabük dağı	Nohut	17.06.2005				
5S2C4	Alacabük dağı	Nohut	17.06.2005				
5T3C4	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T4C2	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T3C2	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T3C3	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T5C3	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T5C4	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T1C4	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T1C1	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T2C2	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				
5T2C1	Kesan Deresi	Nohut	17.06.2005				

28±1°C' de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı ve oluşan tipik koloniler (1-5 mm çaplı, ağdalı, beyaz, saydam veya hafif mat, mukozlu ve yuvarlak) seçilerek yatkı YMA tüplerine aktarıldı (Somasegaran ve Hoben, 1985; Beck ve ark., 1993). Elde edilen izolatlar +4°C' de buzdolabında muhafaza edildi. *Rhizobium* cinsine ait olan strainlerin tanımlanması için sitolojik ve biyokimyasal analizlere tabi tutuldu.

#### 2.2.4. İzolatların saflaştırılması

Nodüllerden izole edilen izolatlar YMA ortamına ekildikten sonra Vincent, 1970'e göre önce izolatların Gram özellikleri belirlendi. Gram boyama sonuçlarına göre seçilen izolatlar Kongo Kırmızısı içeren YMA ortamına inkübe edildi. Kongo kırmızılı YMA ortamında gelişen ve boyayı emmeyerek beyaz yada pembemsi koloni oluşturan izolatlar seçilerek Brom thymol mavisi içeren YMA ortamına ekildi. Bu ortamda gelişerek YMA ortamını sarıya dönüştüren izolatlar tekrar YMA ortamına alınarak tek koloni düşecek şekilde ekildi. Seçilen koloniler yatık YMA ortamına ekildi. Gelişen izolatlar %15 Gliserol içeren kriyovial tüplerde ikili olarak hazırlanarak  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı. Ayrıca saflaştırılan izolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için yatık YMA tüplerine alınarak  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı.

#### 2.2.5. İzolatların kültürel ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti

Hareketlilik ve gram boyama testleri, Kongo kırmızılı besi yerinde üreme durumları, brom thymol mavili YMA'da hızlı yada yavaş gelişimleri metilen mavisi redüksiyonu, litmuslu ortamda asit üretme, katalaz aktivitesi, pH derecelerinde üreme, farklı sıcaklık derecelerinde üreme, ketolaktoz testi ile bakır halkası oluşturup oluşturmadıkları, Karbon kaynaklarının kullanımı, azot kaynaklarının kullanımı, vitamin isteklerinin belirlenmesi ve farklı antibiyotiklere olan dirençlilikleri (Vincent, 1970) tespit edildi.

##### 2.2.5.1. Gram boyama

YMA ortamında aktifleştirilen *Rhizobium* kültürlerinden bir damla alındı ve temiz bir lam üzerine homojen larak ince bir film halinde yayıldı. Havada kurutulan preparat alevden geçirilerek fikse edildi. Preparatın üzerine kristal viyole boyası dökülerek 30-60 sn beklendi. Preparat üzerindeki kristal viole dökülerek iyot solusyonu ile 1-2 dakika muamele edildi. Preparat su ile yıkanıp alkol-aseton(1:1) karışımı ile deklorize edildi ve işlem kristal viyole giderilinceye kadar (2sn-10 sn) devam edildi. Preparat daha sonra saf sudan geçirilerek preparat sulu bazik fuksin ile 30-60 sn boyandı. Preparat su ile yıkandı ve havada kurutuldu. Hazırlanan preparat 100x objektifi ile incelendi.

### 2.2.5.2. Kongo kırmızılı YMA'da gelişim

*Rhizobium*'lar genellikle karanlıkta inkübe edildiğinde Kongo kırmızısını absorbe etmezler. Koloniler beyaz, opak veya bazen pembe kalır. *Rhizobium*'lar şayet kırmızı boyayı absorblamışsa inkübasyon süresince ışığa maruz kalmıştır.(Vincent, 1970)

1/400 oranında olacak şekilde kongo kırmızısı ayrı steril edildi ve 1 litre YMA ortamına 10 ml ilave edildi(Vincent, 1970). 28<sup>0</sup>C'de 1 hafta süre boyunca strainlerin boyayı absorblama durumlarına bakıldı.

### 2.2.5.3. Brom thymol mavili YMA'da gelişim

Stok kültürlerden alınan *Rhizobium*'lar YMA ortamında aktifleştirildikten sonra bromthymol mavili YMA ortamına çizgi-plaka ile inoküle edildi.

Taze olarak hazırlanmış bromthymol mavili YMA ortamı pH'ı 6.8'e 1 N NaOH ve 1N HCl ile ayarlandı. İzolatlar brom thymol mavisi içeren ortama ekildi. Bu ortamda, yavaş gelişen *Rhizobium*'lar alkali reaksiyon vererek ortamı **mavi** renge, hızlı gelişen *Rhizobium*'lar ise asit reaksiyon vererek ortamı **sarıya** dönüştürler (Ülgen,1980).

### 2.2.5.4. Pepton glukoz agar (PGA)'da gelişim

Hazırlanan PGA ortamına %0,0004 oranında indikatör boya olarak bromocresol purple eklendi. İzolatlar PGA ortamına ekilerek 3 gün 30<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakıldı. Bakteriyel izolatların bu ortamdaki gelişimleri kaydedildi.

*Rhizobium*'ların PGA ortamında gelişmesi başarısızdır ve 30<sup>0</sup>C'de inkübe edildiğinde pH'da az miktarda değişikliğe neden olabilir.(Ülgen, 1980).

### 2.2.5.5. Laktozlu ortamda Ketolaktoz Testi

*Rhizobium*'larla *Agrobacterium* türlerinin morfolojik olarak ayırımları mümkün değildir. Bu sebeple türün ayırımını sağlamak için ketolaktoz testi uygulanır. YMA'da aktifleştirilen izolatlar laktozlu ortam bulunan petrilere ekildi ve 1-2 gün 28<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda ortamın üzeri benedik çözeltisi ile kaplandı. Ortamda ketolaktoz oluşumu söz konusu ise koloni etrafında sarı Cu<sub>2</sub>O halkası görülür. Bu pozitif sonuçtur. Kontaminasyonun varlığını gösterir (Çakmakçı, 1987).

#### **2.2.5.6. Hareket testi**

Bakterilerin hareketli olup olmadıklarını tespit için % 0,4 agar ilave edilen YMA besiyeri kullanıldı. Deney tüplerinde dik olarak dondurulan besiyerine bakteriler iğne yardımıyla aşılansarak 28<sup>0</sup>C’de bir hafta süreyle inkübe edildi (Gürbüzer, 1973).

#### **2.2.5.7. Litmus testi**

Litmus laktöz agar içeren petrilere izolatlar ekildi. İzolatların dört haftalık inkübasyon sırasında oluşturdukları zonlara göre ortamın pH’ını değiştirip değiştirmedikleri kaydedildi (Graham ve Parker, 1964).

#### **2.2.5.8. Katalaz aktivitesi**

Bir öze dolusu bakteri kültürü temiz bir lam üzerine konularak bir damla %10 luk hidrojen peroksit ile karıştırılıp suşların gaz oluşturma durumları araştırıldı (Sağiroğlu, 1984; Graham ve Parker, 1964).

#### **2.2.5.9. Metilen mavisi redüksiyonu**

YMB besiyerinde 28<sup>0</sup>C de bir hafta inkübe edilen kültürler üzerine %1 lik metilen mavisinden bir damla ilave edilerek 37<sup>0</sup>C’de 1 saat tutuldu mavi rengin beyaza dönüşüp dönüşmediği gözlendi (Graham ve Parker, 1964).

#### **2.2.5.10. Farklı pH derecelerinde gelişim**

1 Normal HCl ve 1M KOH kullanılarak YMA ortamı pH: 9.5, 9.0, 8.0, 5.0, 4.5, 4.0 ve 3.5 olacak şekilde hazırlandı. Farklı pH derecelerinde hazırlanan petrilere izolatler ekilerek 28<sup>0</sup>C’de 3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda suşların bu ortamlarda gelişip gelişmediği kaydedildi.

### 2.2.5.11. Farklı sıcaklıklarda büyüme

Taze hazırlanmış YMA ortamına çizgi yöntemiyle ekilen suşlar 30<sup>0</sup>C ve 40<sup>0</sup>C'de 3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda suşların bu sıcaklık derecelerindeki gelişimleri kaydedildi.

### 2.2.5.12. Bakterilerin karbon kaynaklarını kullanımı

İzolatların biyokimyasal karakterlerinin belirlenmesi için farklı karbon kaynakları içeren deney tüplerine aşılansarak karbon kaynağı kullanma istekleri belirlendi

Bakterilerin mannitol, ksiloz, raffinoz, ramnoz, maltoz, galaktoz, sukroz, glukoz, dulcitol, laktoz ve suksinatı kullanımları test edildi.

Karbon kaynaklarının kullanımının belirlenmesi için YEM broth sıvı besiyerinden karbon kaynağı olan mannitol çıkartıldı ve 0,004 g bromocresol purple indikatörü ilave edilerek stok besiyeri hazırlandı. Hangi karbon kaynağının testi yapılacaksa o şekerden %1 oranında stok çözeltisi hazırlanarak 0,2 µm'lik filtre kağıdı kullanılarak sterilize edildi. Aktif kültürden %4 oranında inoküle edilerek 28<sup>0</sup>C'de 3 gün süreyle çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı ve besiyeri renginin sarıya dönüştüren izolatlar karbon kaynağını kullanımı bakımından pozitif olarak kabul edildi (Jordan, 1984).

### 2.2.5.13. Vitamin isteklerinin belirlenmesi

YMB ortamından mannitol çıkartılarak %1 oranında sukroz ve arabinoz içeren 250 ml'lik erlenlere % 0.1 oranında ayrı ayrı hazırlanan deney tüplerine pyrodoxine, myo-inositol, riboflavin, folik asit ve d-pantotenik asit eklenerek hazırlandı. Hazırlanan sıvı ortam deney tüplerine 5 ml olacak şekilde dağıtıldı. İzolatların vitamin gereksinimlerinin olup olmadığını belirlemek için daha önce YMB ortamında 3 gün inkübe edilen taze sıvı kültürden %4 oranında hem vitamin içeren tüplere hemde kontrol grubu olarak hazırlanan YMB içeren sıvı kültüre inoküle edilerek 28<sup>0</sup>C'de 3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde suşların vitamin içeren ve YMB içeren tüplerde oluşturdukları yoğunluk gözlemlenerek izolatların vitamin ihtiyaçlarının gelişime olan etkisi kaydedildi.

#### **2.2.5.14. Azot kaynaklarının kullanımı**

Gao, 2004'e göre *Rhizobium* suşlarının azot ihtiyaçlarını belirlemek amacıyla YMA ortamına %0.1 oranında olacak şekilde Dextrin ve İnositol 10 ml steril saf su içeren şişelerde çözüldü. Çözelti 0.45 µl'lik steril filterelerden geçirilerek sterilize edildi. Test edilecek azot kaynağı YMA ortamına eklenerek petri kaplarına döküldü. Sıvı kültürden 100 µl alınarak petri kaplarına izolatların nokta ekimi yapıldı. Test sonuçları için Yeast ekstrakt pozitif olarak kabul edildi. İzolatların YMA ortamındaki gelişimleri negatif veya pozitif olarak değerlendirildi.

#### **2.2.5.15. Antibiyotik dirençliliklerinin tespiti**

İzolatların antibiyotik dirençliliklerini tespit etmek için 15 mercimek, 22 nohut 10 ml'lik deney tüplerinde hazırlanan sıvı YMB ortamına aşılandı. 28<sup>0</sup>C'de 3 gün inkübasyondan sonra her izolatın sıvı kültüründen mikropipet ile 100 µl alınarak taze hazırlanmış YMA plaklarına yayma ekim yapıldı. Sterilize edilmiş 6 mm çapındaki disklerle emdirilen antibiyotikler (Ampicilin 10 mg/ml, Tobramycin 10 mg/ml, Cefixim 5 mg/ml, Aztreonom 30 mg/ml, Clindamycin 2 mg/ml, Chloramphenicol 30 mg/ml, Cephalosporin 75 mg/ml, Kanamycin 50 mg/ml, Rifamycin 100 mg/ml, Streptomycin 100 mg/ml, Nalidixic acid 50 mg/ml) YMA plaklarına yerleştirildi. İzolatların disk çevrelerinde oluşturdukları inhibisyon zon çaplarının büyüklüklerine göre izolatların antibiyotik dirençlilikleri pozitif veya negatif olarak tespit edildi (Fremont ve ark., 1998; Vincent, 1970).

#### **2.2.5.16. Numerik analiz**

Test organizmalarının biyokimyasal ve kültürel özellikleri arasındaki benzerlik ve farklılık düzeylerine göre izolatların akrabalık derecelerini belirlemek için organizmalar testlere verdikleri cevaplar pozitif ve negatif olarak MiniTab14 istatistik programına yüklenerek izolatların referans strainlere ve kendi aralarında oluşturdukları akrabalık düzeyleri belirlendi. İzolatların Numerik analizi için toplam 44 *Rhizobium* strain için 54 fenotipik karakterin sonucu yüklendi. Numerik analizi sonucu dendogram olarak sunuldu (Şekil 3.6).

## 2.2.6. Moleküler Karakterizasyon

Test organizmalarının numerik analizi ile belirlenen akrabalık düzeyleri DNA-RAPD (Random Amplification Polimorfizm DNA) ve 16S rDNA-RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphizm) moleküler teknikler kullanılarak numerik analiz sonuçlarına göre belirlenen test organizmalarının karakterizasyonu yapıldı.

### 2.2.6.1. Genomik DNA izolasyonu

*Rhizobium* bakterilerinin dış çeperlerinde bulunan lipopolisakkarit yapıdan dolayı *Rhizobium* genomik DNA'sını izole etmek bir hayli zordur. Özellikle *Rhizobium* bakterilerinin genomik DNA izolasyonu için kullanılan bu metotta; hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,6-0,8 ulaşınca kadar 200 rpm'de 5 ml'lik tüplerde geliştirildi. Hücre pelleti 15 dk 10.000 rpm'de 1.5 ml eppendorf tüplerinde santrifuj edildikten sonra Tris-EDTA tamponu (10T/1E) ile yıkandı ve 400 µl Tris EDTA tamponunda çözüldü. Üzerine 40 µl %10'luk SDS ve 5 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenerek 45 dk 56<sup>0</sup>C'de sıcak suda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra eppendorf tüp üzerine 400 µl Tris ile doyurulmuş fenol eklenerek 10 dk 10.000 rpm'de santrifuj edildi. Santrifujden sonra dikkatlice mikropipet ile süpernatant alınarak yeni eppendorf tüpüne alındı ve üzerine 200 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve birkaç dakika hafifçe vortekslendi. Süpernatantın kloroform:izoamilalkol ile iyice karışması sağlandıktan sonra 10 dk 10.000 rpm'de santrifuj edilerek süpernatant yeni tübe transfer edilerek bir üst basamak yeniden tekrarlanarak 10 dk 10.000 rpm'de santrifuj edildi. Süpernatant tekrar temiz bir tüpe alınarak üzerine 400 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklendi, alt üst edilerek 10 dk 10.000 rpm'de santrifuj edildi. Süpernatant tekrar alındı ve üzerine 1/10 3M Sodyum asetat, 2 katı kadar da soğuk izoamilalkol eklenerek 2 saat -20<sup>0</sup>C'de derin dondurucuda bekletildi. Bu aşamadan sonra 30 dk 15.000 rpm'de sanrifuj edildikten sonra süpernatant dikkatlice döküldü ve pellet %30'luk etil alkol ile yıkaranark 15 dk 10.000 rpm'de santrifuj edildi. Etil alkol uzaklaştırıldıktan sonra tüp 37<sup>0</sup>C'lik etüvde 15 bekletilerek kurutuldu. En son safhada tüp üzerine 50 µl Tris-EDTA tamponu eklenerek +4<sup>0</sup>C'de depolandı.

Genomik DNA jel elektroforezi için 250 ml'lik erlen mayer içerisinde 120 ml TE tamponu eklenerek içerisine %1 agaroz olacak şekilde eklendi. Mikrodalga fırında 2 dakika bekletilerek agaroz'un erimesi sağlandı. Midi tank'a tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra çözelti soğutularak dikkatlice döküldü. Jel katılaştıktan sonra üzerine TBE tamponu eklenerek

tarak dikkatlice çıkarıldı. Her tarak boşluğuna 5 µl genomik DNA eklendi. Midi tank ayarlanabilir güç kaynağına bağlanarak 95V 30 dakika koşturuldu. DNA RAPD ürünler içinde yukarıdaki metotta Agaroz jel yoğunluğu %2 olacak şekilde ayarlanarak diğer adımlar aynen takip edildi.

### 2.2.6.2. RAPD analizi

İzolatların genomik DNA çoğaltımı Thermo Cycler cihazında yapıldı. de Oliveria ve arkadaşları (2000) metoduna göre; çoğaltma reaksiyonu 40 döngü olarak belirlendi. Her döngüden sonra 94<sup>0</sup>C'de 15 saniye'lik adım izlendi. Bağlama için 35<sup>0</sup>C'de 30 saniye, uzama için 72<sup>0</sup>C'de 1 dakika olarak ayarlandı. Son uzama safhası için 72<sup>0</sup>C'de 10 dakika olarak takip edildi. 50 µl DNA çoğaltım karışımı; 1µl Opab primerlerinden her deneme için ayrı primer kullanıldı. Kullanılan primerler ve bunlara ait baz sıraları Çizelge 2.2'de verilmiştir. Her defasında OPAB primerlerinden biri olmak üzere 1 µl primer, 1µl MgCl<sub>2</sub>, 1µl dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,4 µl Taq Polimeraz (Fermantas), 5 µl Taq Tamponu, 37 µl deiyonize su ile 0.2 ml PCR tüplerinde karışım hazırlandı ve son olarak 5 µl 50 ng hedef DNA miktarı eklenerek tüpler Thermo Cycler cihazına yüklendi (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.2. Kullanılan Primerlerin Baz dizilişi

OPAB1: 5- CCGTCGGTAG-3	OPAB11: 5- GTGCGCAATG-3
OPAB2: 5- GGAAACCCCT-3	OPAB12: 5- CCTGTACCGA-3
OPAB3: 5- TGGCGCACAC-3	OPAB13: 5- CCTACCGTGG-3
OPAB4: 5- GGCACGCGTT-3	OPAB14: 5- AAGTGCGACC-3
OPAB5: 5- CCCGAAGCGA-3	OPAB15: 5- CCTCCTTCTC-3
OPAB6: 5- GTGGCTTGGA-3	OPAB16: 5- CCCGGATGGT-3
OPAB7: 5- GTAAACCGCC-3	OPAB17: 5- TCGCATCCAG-3
OPAB8: 5- GTTACGGACC-3	OPAB18: 5- CTGGCGTGTC-3
OPAB9: 5- GGGCGACTAC-3	OPAB19: 5- ACACCGATGG-3
OPAB10: 5- TTCCCTCCCA-3	OPAB20: 5- CTTCTCGGAC-3

Bant büyüklüklerinin belirlenmesi için her elektorforez işleminde 100 baz çiftlik DNA ladder kullanıldı. Sonuçlar UV görüntüleme sisteminde incelendi ve fotoğraflandı. Amplifikasyon bantlarından kuvvetli olanlar değerlendirmeye alındı. Çok fazla DNA bantları

oluşmadığından benzerlik indeksi oluşturulamadı. Mevcut DNA bantlarının varlığına göre değerlendirildi.

### 2.2.6.3. RFLP analizi

Test organizmaları arasındaki benzerlik ve farklılığı ortaya koymak için 16S rDNA bölgeleri PCR ile çoğaltıldı. Toplam 15 test organizması besi ortamında 3 gün süre ile 25°C’de inkübe edildi. Bütün tamponlar hazırlanarak, gerekli maddeler ve enzimler ticari şirketlerden satın alındı. Elde edilen izolatların ve kontrol olarak kullanılan *Rhizobium* ırklarının izole edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrik olarak, 260 nm dalga boyunda ölçüldü. saflaştırılan genomik DNA'dan 16S rDNA'yı çoğaltmak için Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) sırasına sahip forward primeri ile (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT) sırasına sahip revers primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Ramsubhag ve ark., 2002). PCR amplifikasyonu Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 ile 0.5 ml PCR mikrosentrifüj tüpleri kullanılarak yapıldı. Taq DNA polimeraz, MgCl<sub>2</sub> solusyonu, Taq tampon ve deoksiribonükleotidler (dNTPs) ticari şirketlerden satın alındı (Fermentas). Tüm PCR kokteyli (Çizelge 2.2) mikrofüj tüplerinde hazırlandıktan sonra düşük seviyede vortekslenildi ve PCR cihazına yerleştirilinceye kadar buzda tutuldu. PCR programı başlangıç 95°C’de 5 dk, 35 döngü, denatürasyon için 95°C’de 1 dk, bağlanma (annealing) 55°C’de 1 dk, uzama için 72°C’de 1 dk ve son olarak 72°C’de 10 dk olarak ayarlandı. PCR’da çoğaltılmış 16S rDNA’ları % 1.5’lik 0.5 µg/ml ethidium bromide içeren agaroz jelde (0.5 X TBE tampon) koşturuldu.. Yaklaşık 5 µl PCR ürünü jel yükleme boyası (mavi renkli) ile birlikte karıştırılarak jele yüklendi ve 100V, 2 saat boyunca koşturuldu

Çizelge 2.3. PCR kokteylinin her bir örnek için gerekli olan madde miktarları

Deionize su	33,25 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
dNTP	1 µl
GP1	1 µl
GP2	1 µl
Taq Tamponu	5 µl
Taq polimeraz	0,25 µl
DNA örneği	5 µl

16S rDNA bölgesi moleküler markerlar (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas) kıyaslanarak 600-bp pozisyonundaki band tesbit edildi.

16S rDNA bölgeleri çoğaltılan Rhizobial suşlardan elde edilen bantlar daha sonra *HindIII*, *BamHI*, *BspI430* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile ticari firmanın (Fermantas) belirttiği protokole göre yapıldı. Bu protokole göre 15 µl reaksiyon karışımı için; 5 µl DNA, 1 µl enzim, 1 µl 10x enzim tamponu ve 8 µl deionize su 200 µl PCR tüplerinde hazırlandı. PCR tüpleri su banyosunda 1-16 saat 37<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda PCR tüplerinden alınan 5 µl kesim ürünü 5 µl örnek boyası ile karıştırıldı. Örnek tamponu hazırlanan %2'lik agaroz jele yüklendi ve 2 saat 100 V, 380 mA'de koşturuldu.

Elde edilecek DNA bandlarının benzerlik indeksi oluşturulup NTSYS-Pc (Numerical taxonomy and Multivariation Analysisi System Programı kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) küme analizi yapılması planlandı fakat yeterli kesim olmadığından analizi yapılamadı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Bakterilerin Nodüllerinden İzolasyonu

Araziden getirilen bitkilerin kök nodülleri steril edildikten sonra steril bir havan içerisinde ezildi. Bir öze dolusu nodül sürüntüsü alınarak YMA içeren petri kaplarına yayma ekimi yapıldı. YMA üzerinde gelişen kolonilerden Jordan,1984'e göre *Rhizobium* cinsine ait, Jarvis ve arkadaşlarının (1997) belirttiği *Mesorhizobium* cinsi morfolojisi gösteren koloniler seçildi (Şekil 3.1).

#### 3.2. Rhizobial İzolatlarının Saflaştırılması

Yabani nohut ve mercimek bitkisi izolatları Vincent'e (1970) göre ön teşhisleri yapıldı. İzolatların gram boyama, Kongo kırmızısı ve thymol mavisi gibi indikatör boyalar kullanılarak ön teşhisleri yapıldı ve sonuçlar aşağıda Çizelge 3.1'de verildi.

Toplanan 35 yabani mercimek (*Lens culinaris*) ve 75 yabani nohut (*Cicer anatolicum*) bitki nodüllerinden toplam 110 izolat gram boyama yönünden test edildi. İzolatların Gram boyanma özellikleri Nikkon binoküler ışık mikroskobu altında 100x objektifle incelendi. 35 yabani mercimek izolatından 15'i gram negatif özellik gösterirken 75 nohut bitkisi izolatından 22'si gram negatif özellik gösterdi (Çizelge 3.1). Gram negatif bakteriler ışık mikroskobu altında pembe renkte görünürler (Şekil 3.2). Sonuçta 37 rhizobial suş seçilerek teşhis ve moleküler karakterizasyon çalışmaları uygulandı.

Gram boyama özellikleri belirlenen 110 izolat Kongo Kırmızısı içeren YMA ortamında ekildi. İnkübasyon sonucunda Kongo Kırmızılı YMA üzerinde beyaz ve pembemsi koloni oluşturan izolatlar belirlendi. Gram negatif olarak belirlenen izolatlar bu ortamda boyayı nufuz etmediğinden referans izolatlar gibi beyaz ve pembemsi koloniler oluştururken diğer izolatlar boyayı emerek siyah ve kırmızı renkli koloniler meydana getirdi (Şekil 3.3)

Gram boyama özellikleri ve Kongo Kırmızılı YMA ortamında gelişme durumları belirlenen izolatlar, brom thymol mavili YMA ortamına ekildi. Bu ortamda gelişen *Rhizobium* izolatları asit üreterek ortamın rengini sarıya dönüştürler. Thymol mavisi içeren YMA ortamına ekilen 110 izolattan 15 mercimek ve 22 nohut izolatı asit üreterek ortamın rengini sarıya dönüştürdü (Şekil 3.4)

Çizelge 3.1: İzole edilen suşlara ait ön teşhis sonuçları

Kod	Gram Boyama	Kongo Kırmızısı	Brom Timol Mavisi	Kod	Gram Boyama	Kongo Kırmızısı	Brom Timol Mavisi	Seçilen suşlar
1A3L1	+	+	+	3E7C3	-	-	-	1A3L1
1A2L2	+	+	+	3E7C4	+	+	+	1A2L2
1A2L1	-	-	-	3E7C5	+	+	+	1A1L1
1A1L2	-	-	-	3F2C1	-	-	-	1A1L1
1A1L1	+	+	+	3F1C1	+	+	+	1A4L2
1A6L1	-	-	-	3F2C2	-	-	-	1B1C1
1A5L2	-	-	-	3F2C3	-	-	-	1B1C3
1A5L1	-	-	-	3F2C5	-	-	-	1B2C2
1A4L1	-	-	-	3F2C4	-	-	-	1B4C1
1A4L2	+	+	+	3F3C2	-	-	-	1B4C2
1A7L1	-	-	-	3F3C1	-	-	-	2C2C1
1B1C1	+	+	+	3F2C3	-	-	-	2C6C1
1B1C2	-	-	-	3F2C5	-	-	-	2C6C3
1B1C3	+	+	+	4H2V1	+	+	+	2D3L2
1B1C4	-	-	-	4H2V2	+	+	+	3E8C4
1B2C2	+	+	+	4H1V1	+	+	+	3E7C4
1B4C1	+	+	+	4H2V3	+	+	+	3E7C5
1B4C2	+	+	+	4K1L3	-	-	-	3F1C1
1B2C4	+	+	+	4K7L2	+	+	+	4H2V1
1B2C3	-	-	-	4K1L1	+	+	+	4H2V2
1B2C2	-	-	-	4K6L4	+	+	+	4H1V1
2C4C1	-	-	-	4K2L1	-	-	-	4H2V3
2C5C1	-	-	-	4K2L4	-	-	-	4K7L2
2C3C2	-	-	-	4K7L1	-	-	-	4K1L1
2C3C3	-	-	-	4K1L4	+	+	+	4K6L4
2C6C1	+	+	+	2M2L3	+	+	+	4K1L4
2C4C1	-	-	-	2M4L1	-	-	-	2M2L3
2C5C4	-	-	-	2M2L4	-	-	-	2M3L1
2C5C3	-	-	-	2M3L3	-	-	-	2M4L3
2C5C3	-	-	-	2M3L1	+	+	+	5S3C1
2C1C1	-	-	-	2M4L2	-	-	-	5S2C4
2C1C2	-	-	-	2M4L3	+	+	+	5T3C2
2C2C1	+	+	+	5N1C3	-	-	-	5T5C3
2C2C2	-	-	-	5N1C1	-	-	-	5T1C4
2C6C3	+	+	+	5S1C4	-	-	-	5T1C1
2C6C2	-	-	-	5S2C3	-	-	-	5T2C2
2D2L1	-	-	-	5S3C2	-	-	-	5T2C1
2D2L2	-	-	-	5S3C1	+	+	+	Merc.1045
2D1L1	-	-	-	5S1C3	-	-	-	Yonca520
2D1L2	-	-	-	5S3C3	-	-	-	Fasulye83
2D4L2	-	-	-	5S2C4	+	+	+	tn4 cicer
2D4L1	-	-	-	5T3C4	-	-	-	204 vicia
2D3L1	-	-	-	5T4C2	-	-	-	Nohut522
2D3L2	+	+	+	5T3C2	+	+	+	Av7 vicia
2D1L1	-	-	-	5T3C3	-	-	-	
3E8C4	+	+	+	5T5C3	+	+	+	

Çizelge 3.1: İzole edilen suşlara ait ön teşhis sonuçları (devam)

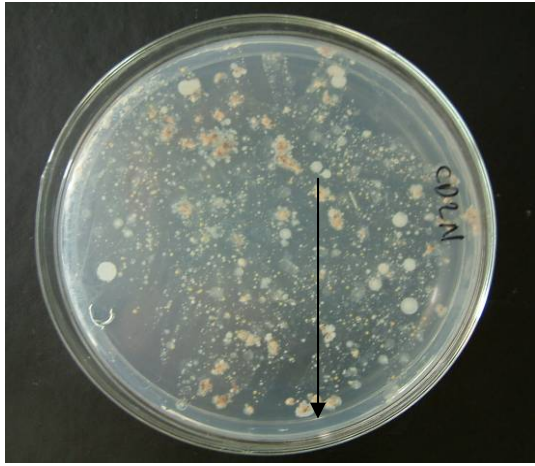
Kod	Gram Boyama	Kongo Kırmızısı	Brom Timol Mavisi	Kod	Gram Boyama	Kongo Kırmızısı	Brom Timol Mavisi
3E6C1	-	-	-	5T5C4	-	-	-
3E2C2	-	-	-	5T1C4	+	+	+
3E6C2	-	-	-	5T1C1	+	+	+
3E8C3	-	-	-	5T2C2	+	+	+
3E1C1	-	-	-	5T2C1	+	+	+
3E2C1	-	-	-	Merc1045	+	+	+
3E5C3	-	-	-	Nohut522	+	+	+
3E8C2	-	-	-	Yonca520	+	+	+
3E8C1	-	-	-	Fasulye83	+	+	+
3E4C2	-	-	-	tn4cicer	+	+	+
3E4C1	-	-	-	204vicia	+	+	+
3E1C2	-	-	-	Av7vicia	+	+	+
3E7C2	-	-	-				

### 3.3. Kültürel ve Biyokimyasal Bulgular

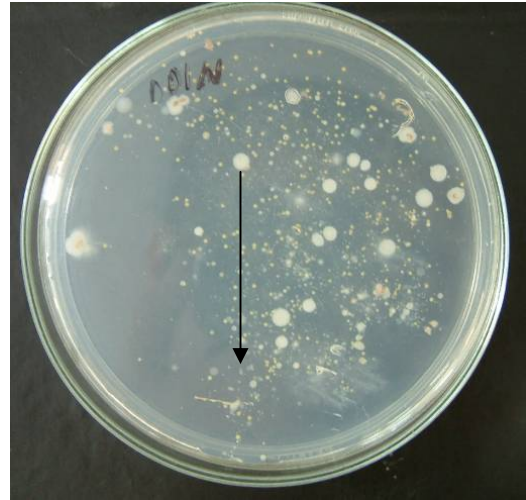
Vincent (1970) göre *Rhizobium* suşlarının Kongo kırmızılı YMA'da gelişim, brom timol mavili YMA ortamında asit üretme ve gram boyama özelliklerine göre ayrılan 37 suş seçilerek hareket testi, pepton glukoz agarda gelişim, ketolaktoz, hidrojen sulfur üretimi, oksidaz, katalaz aktivitesi, karbon kaynaklarının kullanımı (Raffinoz, Ksiloz, Maltoz, Galaktoz, Sukroz, Suksinat, Ramnoz, Dulsitol, Laktoz, Fruktoz, Glukoz ve Mannitol) biyokimyasal ve kültürel testler uygulanarak *Rhizobia* suşlarının bu ortamlardaki aktiviteleri belirlendi. Test sonuçları Çizelge 3.2 gösterilmiştir.

Test strainlerinin tümü Kongo kırmızılı YMA üzerinde beyaz ve pembemsi koloniler oluşturdu. Strainlerin YMA üzerinde mukoz oluşturma durumları Vincent, 1970'te tanımladığı gibi referans suşlara göre benzer mukozumsu yapı gösterdi. Test strainleri gram boyama açısından referans suşlar ile aynı özellikte olup test edilen 37 strain gram negatif olarak değerlendirildi. Strainlerin brom timol mavili YMA ortamında asit reaksiyon verip ortamın rengini sarıya dönüştürdü.

Strainlerin hareket muayenesi SIM ortamında değerlendirildi. Mercimek ve nohut izolatlarının bir kaçı hariç tümü hareketlilik gösterdi (Çizelge 3.2). Test strainlerinden 2C2C1, 4H1V1, 5T1C1 ve referans suşlardan 204 vicia ve av7 vicia suşları hariç diğer bütün izolat ve referans suşlar Ketolaktoz ortamında bakır halkası meydana getirmedi. İzolatların katalaz aktivitesi sonucunda birkaç izolat hariç katalaz pozitif özellik gösterdi (Çizelge 3.2).



*Mesorhizobium spp.*



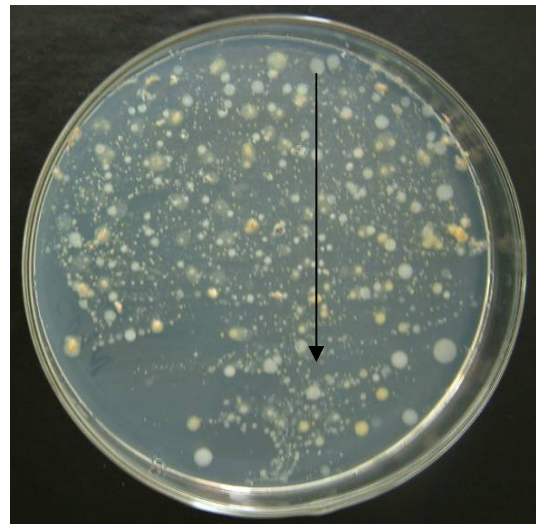
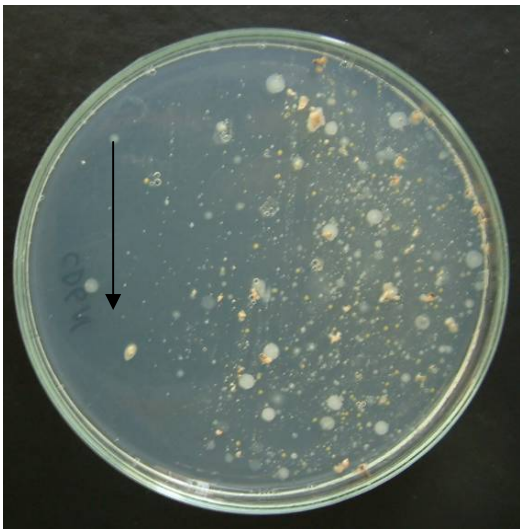
*Rhizobium spp*

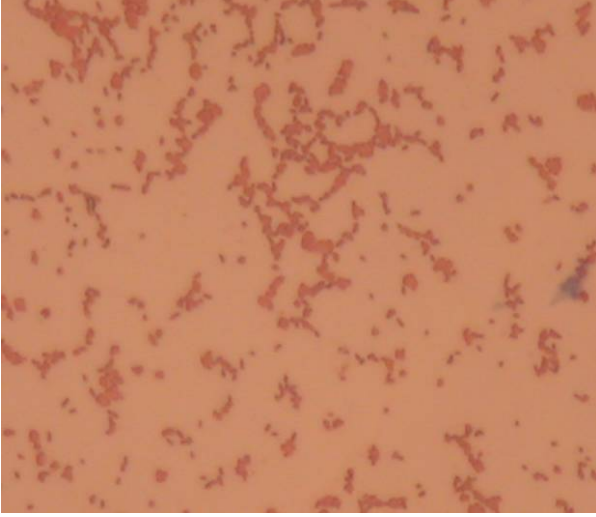


*Mesorhizobium spp*

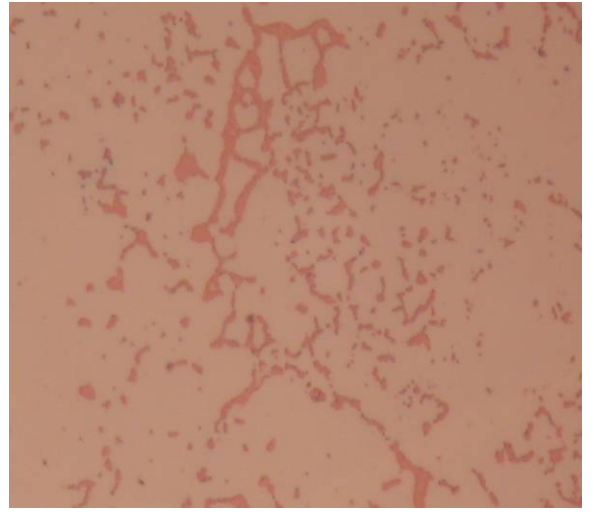


*Rhizobium spp.*

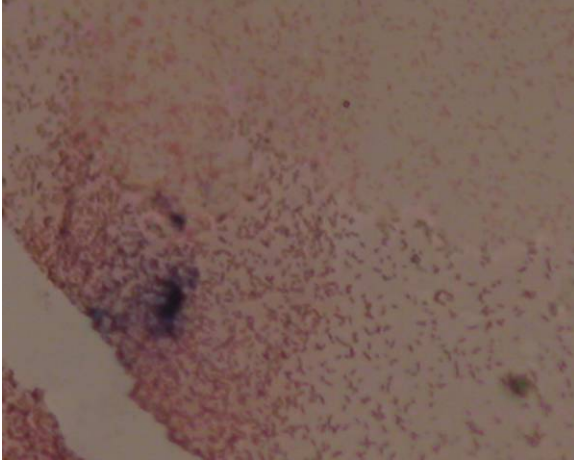




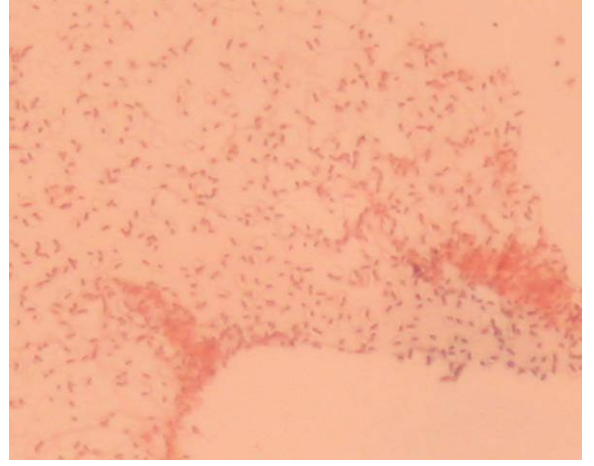
5S3C1



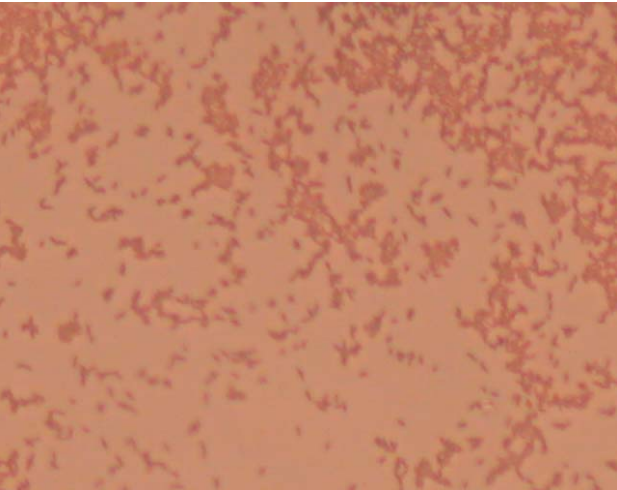
2M3L1



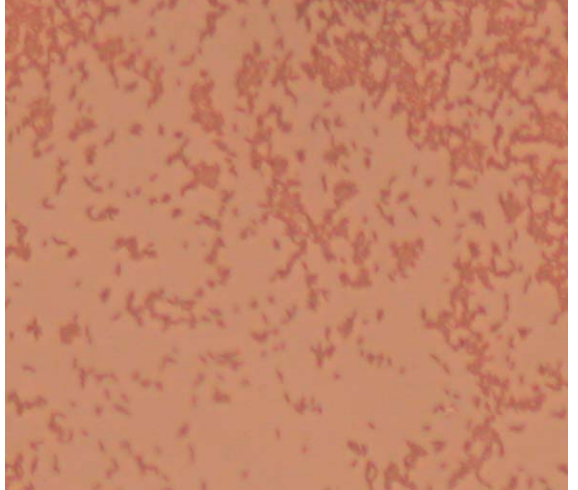
Nohut522



Mercimek1045

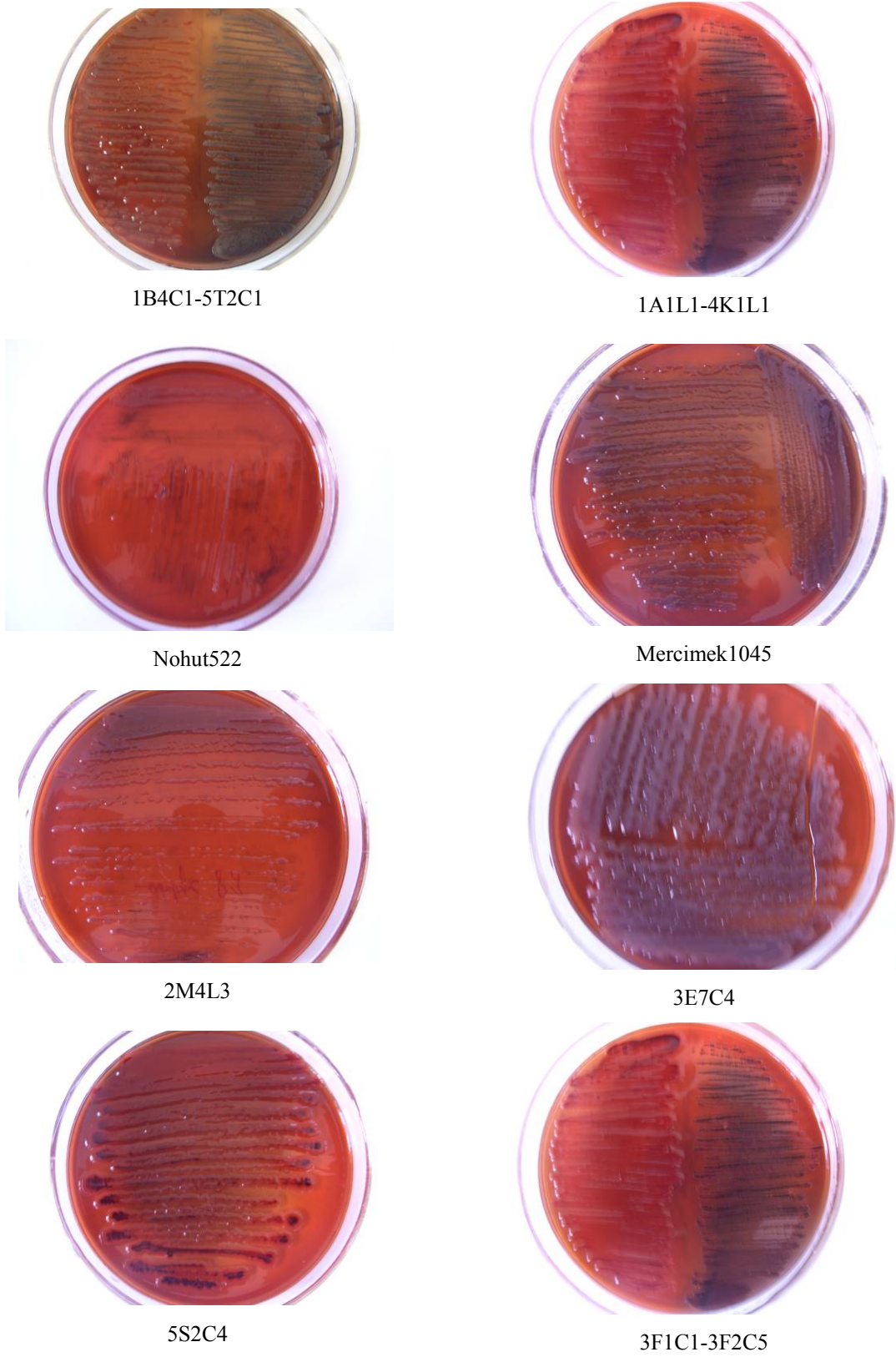


3E7C4



3F1C1

Şekil 3.2: İzolatların Gram Boyama Özellikleri



Şekil 3.3. İzolatların Kongo Kırmızılı YMA ortamındaki koloni morfolojileri



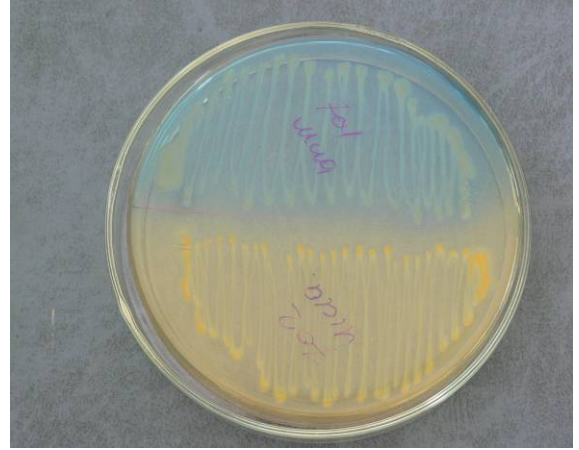
Üst:Yonca 520 Alt: mercimek 1045



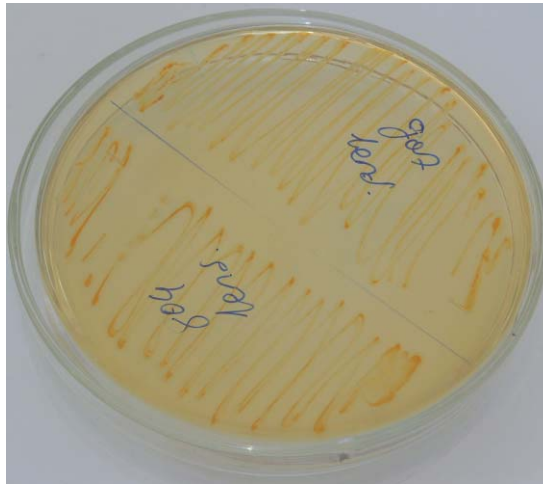
Üst:5S3C1 Alt: 4K7L2



Üst:2C6C1 Alt:5T2C2



Üst: 4H2V1 Alt: 4H2V2



Üst:2M4L3 Alt: 1A1L1

Şekil 3.4. İzolatların Brom Thymol mavili ortamda koloni morfolojileri

Test strainleri oksidaz aktivitesi açısından; mercimek izolatlarından 4K7L2, 4K1L1, 4K6L4, 4K1L4, 2M2L3, 2M3L1, 2M4L3 ve 1A1L1 izolatları oksidaz negatif özellik gösterdi. Nohut izolatlarından 1B1C1, 1B1C3, 2C2C1, 2C6C1, 2C6C3, 3E7C5, 5S3C1, 5S2C4 ve 5T1C4 izolatları oksidaz negatif özellik gösterdi (Çizelge 3.2).

gölü havzasında bulunan topraklar genellikle alkali toprak yapısı gösterdiğinden test strainleri yoğun asidik pH ortamlarında (3.5, 4.0, ve 4.5) gelişme göstermedi. Ancak asidik pH 5.0 ortamında 1A2L2, 1A4L2, 1B1C1, 1B1C3, 4K7L2 ve 2M3L1 izolatları hariç diğer bütün izolatlar gelişme gösterdi (Çizelge 3.2). Bu durum izolatların asidik pH 5.0 gibi asidik topraklara adapte olabileceğini göstermektedir. İzolatların alkali pH ortamlarından pH 8.0 ortamında 5T3C2 izolatu hariç diğer tüm izolatlar gelişme gösterdi. Alkali pH ortamı arttıkça izolatların gelişme seviyelerinde azalma gözlemlendi (Çizelge 3.2).

*Rhizobium* bakterilerinin optimum gelişme sıcaklıkları genellikle 28<sup>0</sup>C'dir (Jordan, 1982). Mercimek ve nohut izolatlarının 30<sup>0</sup>C ve 40<sup>0</sup>C'de gelişme durumlarına göre izolatların tümü 30<sup>0</sup>C sıcaklık ortamında gelişme gösterirken 40<sup>0</sup>C sıcaklığında bazı izolatlar gelişme gösteremedi (Çizelge 3.2).

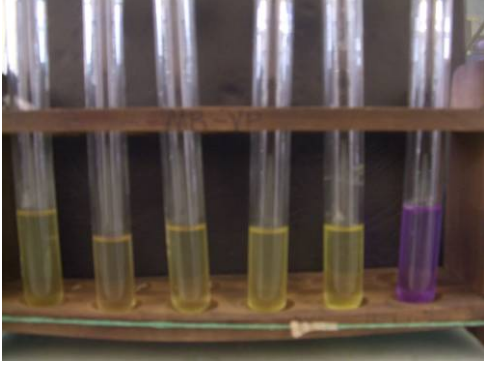
*Rhizobium* bakterileri Litmus milk besiyerinde asit reaksiyon vererek çevrelerinde zon meydana getirirler (Öğüt, 2002). Litmus milk ortamında mercimek izolatlarından 1A3L1, 4K7L2, 4K1L1, 4K6L4 ve nohut 2C2C1 izolatu litmus milk ortamında zon meydana getirmedi.

*Rhizobium* bakterilerinin toprakta baklagil bitkileriyle interaksiyona girebilmeleri için toprağın tuzluluk oranı önemlidir. *Rhizobium* bakterileri aşırı tuzlu ortamlarda gelişme gösteremezler (Gao, 1994). %2'lik tuz içeren YMA ortamına ekilen izolatlardan 1A3L1, 1A2L2, 1B1C1, 1B1C3, 2M3L1 ve Nohut522 referans suşu gelişme göstermezken diğer izolatlar YMA üzerinde belirgin koloniler meydana getirdi.

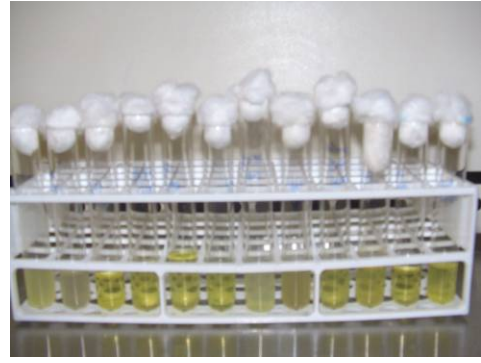
Bakterilerin polifazik taksonomisinde karbon kaynaklarının kullanımı oldukça önemlidir (Young, 2003). *Rhizobium* bakterileri karbon kaynaklarının kullanımı açısından mannitol içeren ortamlarda genellikle daha iyi gelişme gösterirler (Vincent, 1970; Gao, 1994). Çalışmamızda kullanılan mercimek ve nohut izolatları karbon kaynaklarından mannitol, maltoz, galaktoz, sukroz ve glukoz ortamında daha iyi geliştikleri, ksiloz, ramnoz, fruktoz gibi karbon kaynaklarını orta derecede kullandıkları, dulsitol, suksinat ve rafinoz gibi karbon kaynaklarını pek tercih etmedikleri gözlemlendi (Çizelge 3.2). *Rhizobium* izolatları bromocresol purple indikatörü ilaveli mor renkli YMB ortamında asit üreterek ortamın rengini sarıya dönüştürürler (Şekil 3.5).



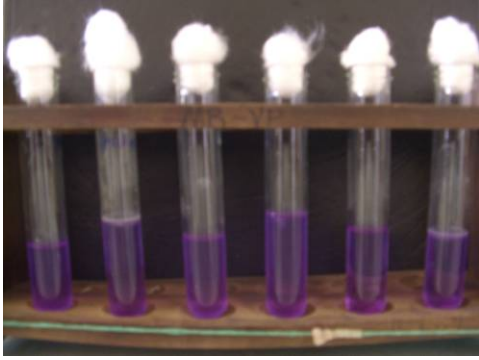




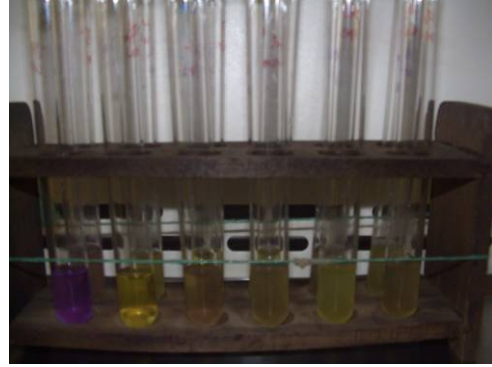
Dulcitol



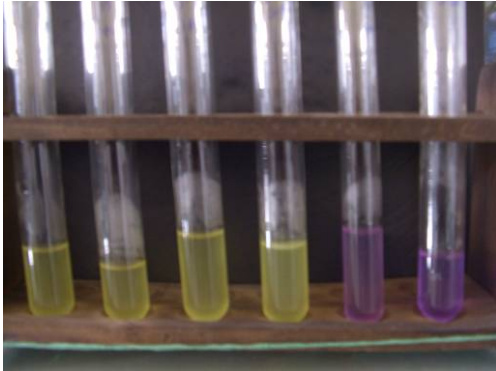
Mannitol



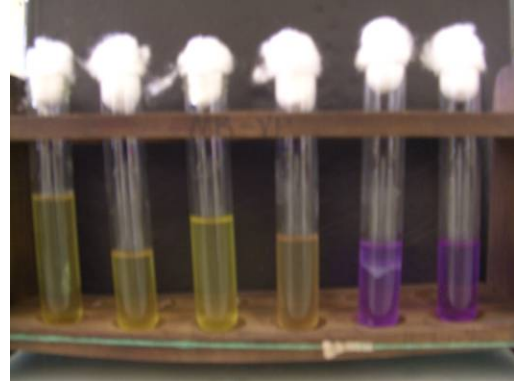
Suksinat



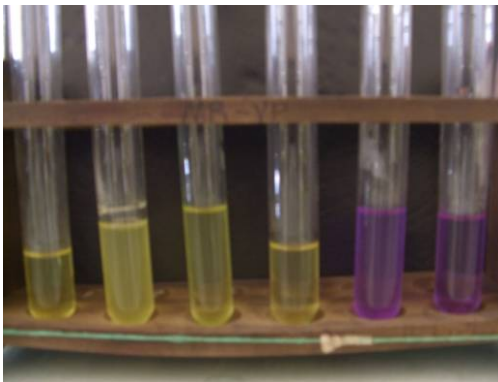
Laktöz



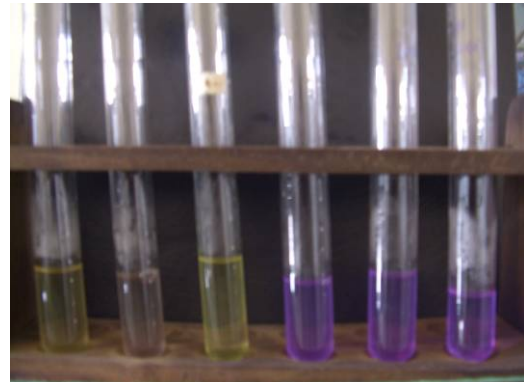
Raffinoz



Ramnoz



Maltoz



Ksiloz

Şekil 3.5: İzolatların Karbon Kaynaklarını Kullanımı

Bütün canlı sistemlerinde olduğu gibi bakterilerin katabolik reaksiyonlarında görev alan enzimler daha etkili bir şekilde reaksiyonları katalizleyebilmeleri için vitaminlere ihtiyaç duyarlar. Oksijenli solunum yapan *Rhizobium* bakterileri karbon ve azot kaynaklarının oksidasyonu sırasında görev alan enzimlerin aktivasyonu için vitaminlere ihtiyaç duyarlar. Çalışmamızda kullanılan test strainleri riboflavin, d-pantotenat, piridoksin ve folik asit içeren YMB ortamında geliştirildi. Ancak test strainleri vitamin kaynaklarını içeren ortamda kontrol grubuna göre daha iyi bir gelişme göstermedi (Çizelge 3.2).

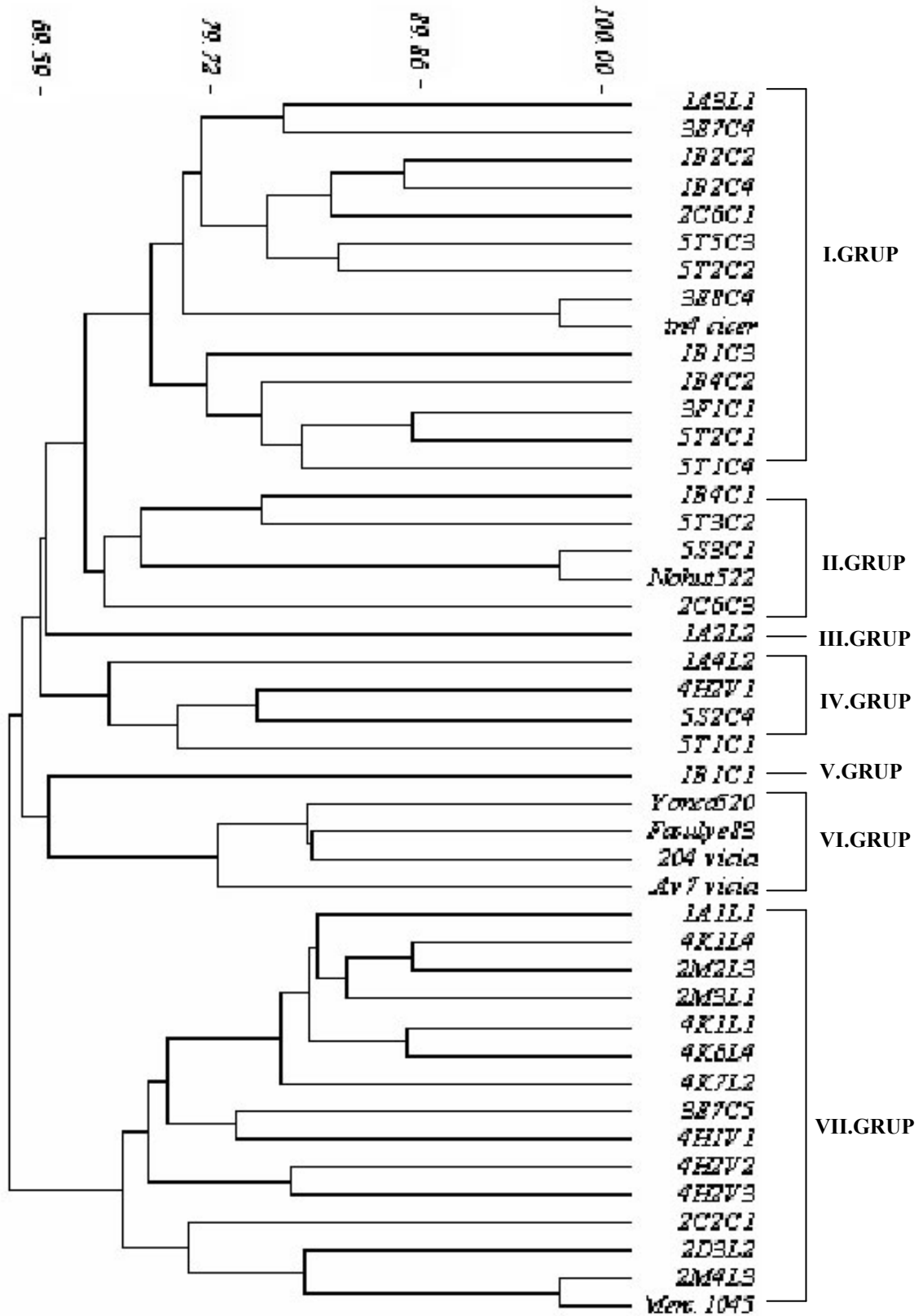
Test suşlarının antibiyotiklere dirençleri tespitinde elde edilen bulgulara göre suşların çoğu Tobramycin (10 mg) karşı direnç gösteremedi. Ampicilin ve Chloramphenicol'e karşı ise daha fazla direnç gösterdi (Çizelge 3.2).

### 3.4. Numerik analiz Sonuçları

Toplam 44 test suşu (37'si test straini ve 7'si referans suş) üzerine uygulanan 54 adet kültürel ve biyokimyasal karakter açısından test edildi. Elde edilen sonuçlar MiniTab 14 istatistik programı kullanılarak Şekil 3.6'de gösterilen dendogram elde edildi. %75 benzerlik düzeyi kriter alındı ve bu benzerlik düzeyinde 7 farklı grup elde edildi. Suşlar arasındaki benzerlik düzeyleri dikkate alındığında I. grup izolatlar tn4cicer referans straini ile yakın benzerlik oluşturarak aynı grup içinde yer aldı. Bu grupta yer alan 1A1L1 mercimek izolatının nohut izolatları ile aynı grupta yer alması farklılık gösterdi. II. grupta yer alan nohut izolatları ise nohut522 referans straini ile aynı grupta yer aldı. Tek başlarına birer grup meydana getiren III. grup straini 1A2L2 ve V. grup straini 1B1C1 ayrı birer tür olabileceğini göstermektedir. IV. grupta yer alan 5T1C1, 5S2C4, 4H2V1 ve 1A4L2 suşları farklı bitkilerden izole edilmesine rağmen aynı grupta yer aldı. Diğer taraftan VI. grupta yer alan Yonca520, fasulye83, 204 vicia, av7vicia referans strainleri aynı grupta yer aldı.

VII. grupta yer alan mercimek izolatları ise referans strain mercimek1045 ile aynı grupta yer almaları bu suşların mercimek1045 referans straini ile yakın benzer özellikler taşıdığını göstermektedir. Çalışmamızda genelde beklenen olmasına rağmen farklı bitkilerden izole edilen bazı izolatların aynı grupta yer alması tartışılabilir bir durumdur. Özellikle VI. grupta yer alan referans suşların ayrı gruplarda yer alması beklenirdi. Bunun nedeni de yapılan testlerin hem teknik olarak dikkatlice yapılmaması hemde referans suşların zamanla bazı karakterlerini kaybetmesi muhtemel sonuçları vermiştir denilebilir.

## BENZERLİK ORANI



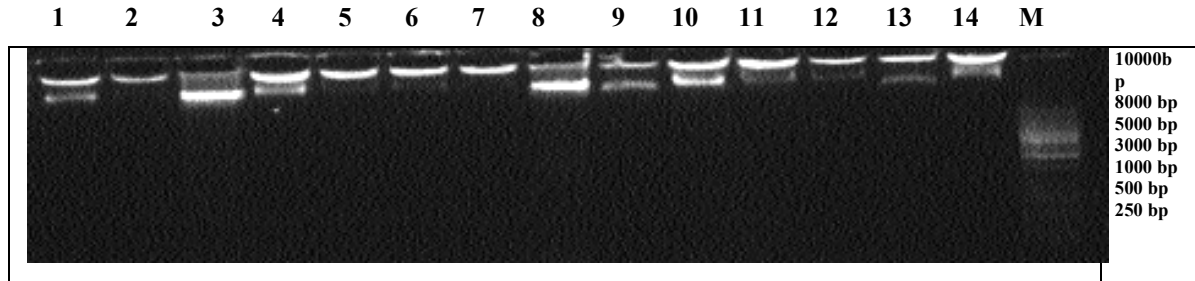
Şekil 3.6:İsolatların Numerik Taksonomisi (Mini Tab 14 istatistik programı)

### 3.5. Moleküler Karakterizasyon Sonuçları

Numerik analiz ile belirlenen gruplardan temsilci olarak toplam 14 test organizması (4H2V3, 2C2C1, Nohut 522, Mercimek 1045, 1B1C1, 5S3C1, 1B1C3, 2D3L2, 4H2V1, 1A2L2, 3E7C4, 2M3L1,13:5S3C1, 1A1L1) seçilerek RAPD ve RFLP çalışmaları bu test organizmaları ile yapıldı.

#### 3.5.1. Genomik DNA

Rhizobiumların genomik DNA büyüklükleri yaklaşık olarak 1.2 kb büyüklüğündedir (Jordan, 1984). Rhizobium bakterileri dış çeperlerinde bulundukları eksopolisakkarit yapıdan dolayı genomik DNA'larını saf olarak elde etmek bir hayli zordur. Genomik DNA'ları ekstrakte edilen Rhizobium test organizmalarının DNA bandları Şekil 3.7'de görülmektedir.

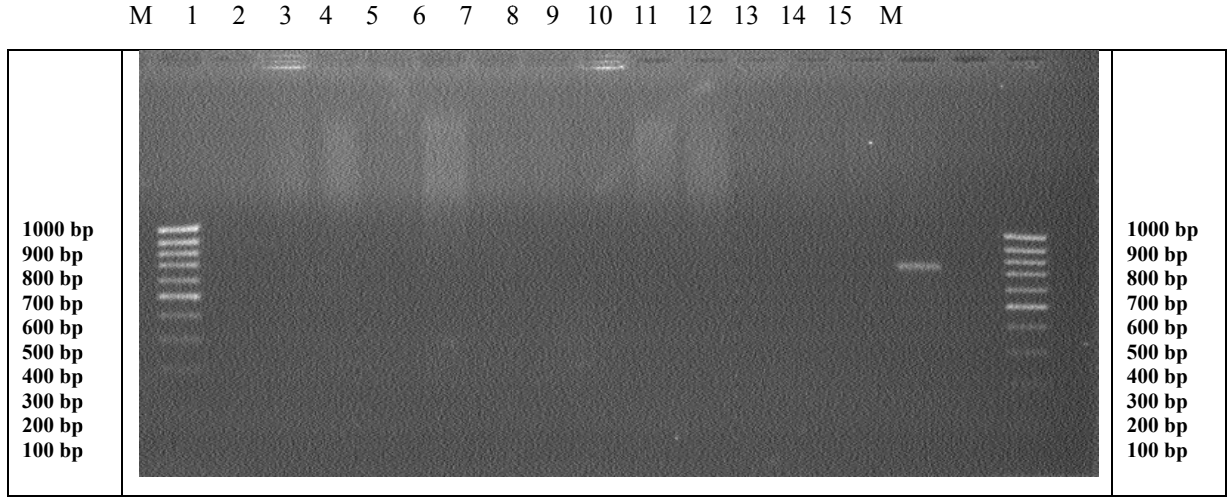


Şekil 3.7: Genomik DNA

1:4H2V3, 2:2C2C1, 3: Nohut 522, 4: Mercimek 1045, 5:1B1C1, 6: 5S3C1, 7:1B1C3, 8:2D3L2, 9:4H2V1 10:1A2L2, 11:3E7C4, 12:2M3L1,13:5S3C1, 14:1A1L1, M: Marker(1 kb)

#### 3.5.2. RAPD analiz sonuçları

Suşlar arasındaki moleküler benzerlik düzeyini ortaya koymak için RAPD 10 mer Opab-11 primeri kullanıldı. RAPD-PCR sonucunda sadece 14 numaralı kuyucukta yer alan 1A1L1 (yabani mercimek bitkisinden izole edilmiştir) suşu 850 bp büyüklüğünde tek bant verdi. RAPD sonuçları için elde edilen amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüleri Şekil 3.8 ve 3.9'da verilmiştir.



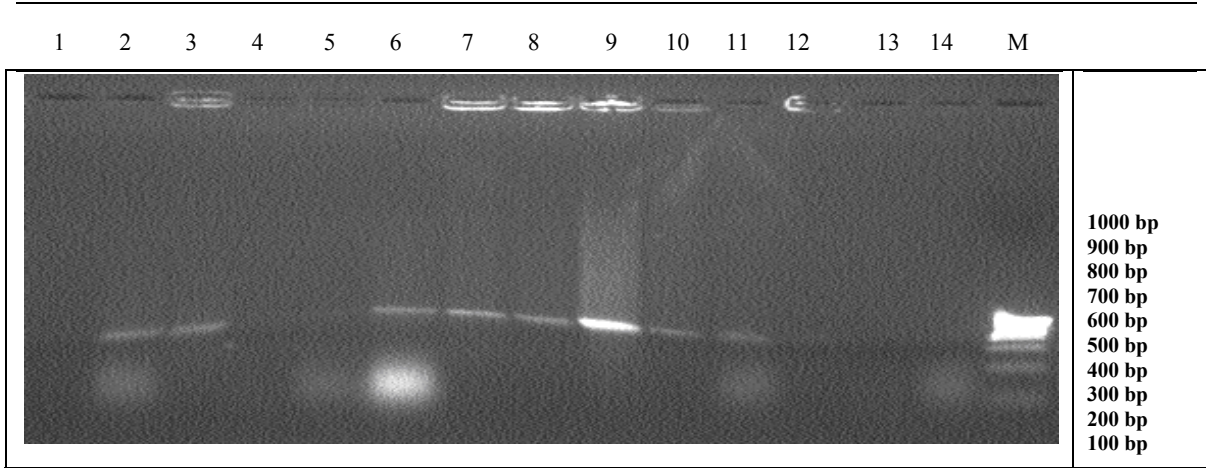
Şekil 3.8: Çalışmamızda kullanılan *Rhizobium* suşlarının OPAB-11 primer ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (Marker: 100 baz çiftlik DNA ladder kullanılmıştır) 1:4H2V3, 2:2C2C1, 3: Nohut 522, 4: Mercimek 1045, 5:1B1C1, 6: 5S3C1, 7:1B1C3, 8:2D3L2, 9:4H2V1,10:1A2L2, 11:3E7C4, 12:2M3L1,13:5S3C1, 14:1A1L1, M: Marker(100 kb) (10 mer Opab 11 primer)

Kullanılan 10 mer OPAB-7 primer bulgularına göre; nohut bitkisinden izole edilen suşlardan 2, 3, 6, 7, 11 ve 13, nolu kuyucularda ile mercimek bitkisinden izole edilen 1, 8, 9, 10 ve 12 numaralı kuyucuklarda 750-800 bp büyüklüğünde tek bant elde edildi. Bu sonuçlara göre 2, 3, 6,7, 11 ve 13 numaralı kuyucuklarda yer alan test suşlarının nohut522 referans straini ile aynı olduğu, 1, 8, 9, 10 ve 12 numaralı kuyucuklarda yer alan test suşlarının ise 3 numaralı kuyucukta yer alan mercimek1045 referans straini aynı olduğu belirlendi. Her ne kadar suşlar farklı bitkilerden izole edilmişlerse de aynı ebatta PCR ürünü verdikleri gözetildi.

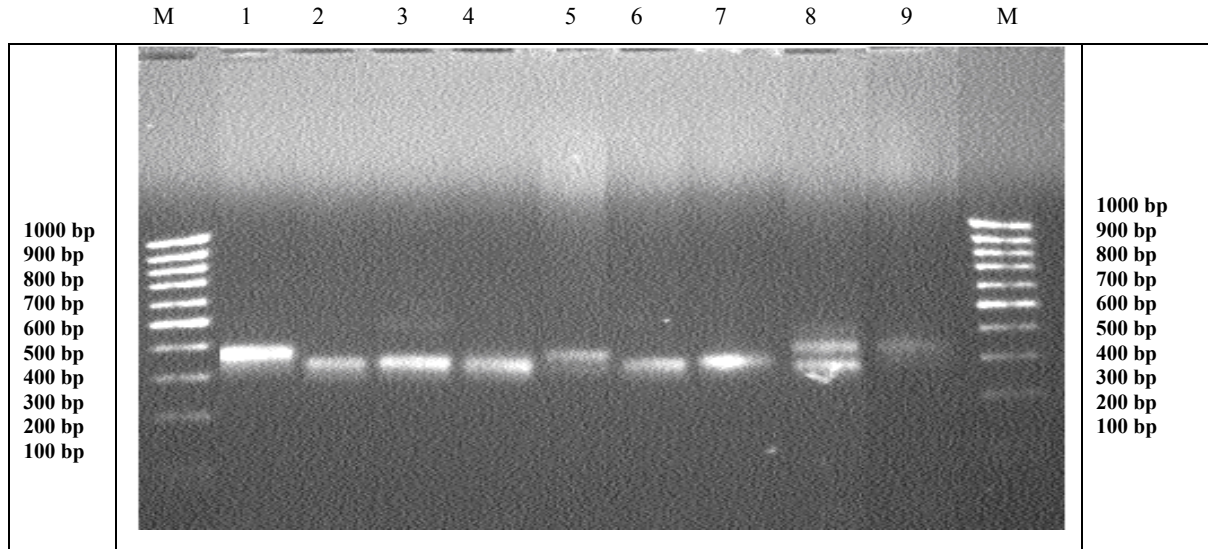
### 3.5.3. RFLP analizi sonuçları

Test organizmalarının numerik analiz sonuçlarına göre tespit edilen akrabalık düzeylerini doğrulamak için seçilen temsilci suşların 16S rDNA bölgeleri Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) sırasına sahip forward primeri ile Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT) baz dizilimine sahip primerler kullanılarak çoğaltıldı. Ramsubhag ve arkadaşlarının (2002) belirttiği gibi 600 bp büyüklüğünde 16S rDNA bantları elde edildi. Ancak izolatların tümünde aynı sonuçlar elde edilemedi. PCR çalışmaları birkaç sefer tekrarlanmasına rağmen Şekil 3.10' de verilen suşlar dışında diğer suşların 16S rDNA bantları elde edilmedi..

Çoğaltılan 16S rDNA bandları (2C2C1, Nohut522, Mercimek1045, 1B1C1, 5S3C1, 1B1C3, 2D3L2, 3E7C4 ve 1A1L1 suşları) HinIII, HaeIII, BamHI ve Bsp1430 restriksiyon enzimleri ile ticari firmanın (Fermantas) belirttiği protokole tabii tutuldu. Ancak suşlardan hiç birinin 16S rDNA bölgeleri bu enzimlerle kesilemediğinden suşlar arasındaki benzerlik dendogramı oluşturulamadı.



Şekil 3.9: Çalışmamızda kullanılan Rhizobium suşlarının OPAB-7 primer ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (Marker: 100 baz çiftlik DNA ladder kullanılmıştır) 1:4H2V3, 2:2C2C1, 3: Nohut 522, 4: Mercimek 1045, 5:1B1C1, 6: 5S3C1, 7:1B1C3, 8:2D3L2, 9:4H2V1,10:1A2L2, 11:3E7C4, 12:2M3L1,13:5S3C1, 14:1A1L1, M: Marker(100 bp) (10 mer Opab 7 primer)



Şekil 3.10: 16S rDNA bölgesi çoğaltılmış strainler. 1:2C2C1, 2: Nohut 522, 3: Mercimek 1045, 4:1B1C1, 5: 5S3C1, 6:1B1C3, 7:2D3L2, 8:1A2L2, 9:1A1L1, M: Marker(100 bp)

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

*Rhizobium* cinsini ilk olarak Frank, 1889 yılında isimlendirdi. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda *Rhizobium* taksonomisi gelişerek bugünkü halini aldı (Çizelge 1.2). *Rhizobium*'ların izolasyonu, teşhisi ve biyokimyasal karakterlerinin tespiti ilk defa geniş bir şekilde Vincent, (1970) tarafından yapıldı. Vincent (1970) ve Graham (1964)'e göre *Rhizobium*'ların topraktan izolasyonu oldukça zor ancak nodüllerinden izolasyonu çok daha kolaydır. Nodül seçiminde ise sağlıklı ve pembe renkli nodüllerin seçimi önerilmektedir.

*Rhizobium* toprak bakterisi olup 18000 civarında tür ihtiva eden *Legüminaceae* familyasına ait bazı türlerinde simbiyotik ilişki kurmaktadır.

Otsu baklagil bitkilerinden olan yabancı mercimek (*Lens orientalis*) ve nohut (*Cicer anatolicum*) bitkileri de *Legüminaceae* familyasına ait türler olup genellikle yüksek rakımlarda 2000-2500 metre yüksekliklerde yayılış gösterirler. Bu rakımda yetişen diğer bitkiler gibi bu baklagil bitkileri de ekstrem çevre şartlarına maruz kalırlar. Van Gölü havzasının nötr alkali toprak yapısı ve toprağın azotça fakir olması nedeniyle bitkinin daha az verimli olmasına neden olmaktadır (Nour ve ark., 1994a)

*Rhizobium* bakterilerin ekonomik ve zirai açıdan önemli olduğundan dünyanın birçok yerinde *Rhizobium* taksonomisi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların neticesinde *Rhizobium* taksonomisine her geçen gün yeni bir takson eklenmektedir. Dünya'da ve ülkemizde *Rhizobiales* takımının sınıflandırılma çalışmaları henüz yeterli düzeyde değildir.

Bu çalışmamızda toplanan baklagil bitki örneklerinin kök nodüllerinde sağlıklı olanların sayı bakımından az olması nedeniyle toplanan 110 bitki örneğinden alınan nodüller steril edildikten sonra steril bir havanda ezilerek 1 damla su içinde hazırlanan süspansiyon yayma ekim yöntemiyle YMA ortamına ekildi. Ancak kök nodüllerinin hepsinin sağlıklı olmaması nedeniyle bu izolatlardan ancak 38 tanesi yapılan mikroskopik ve kültürel testler sonucu *Rhizobium* cinsine yakın benzerlik gösterdi (Çizelge 3.1). Toplanan 110 mercimek ve nohut bitkisinden yalnızca 38 tanesinde Vincent (1970)'de belirtildiği gibi sağlıklı pembe nodüller bulunmaktaydı. Bu yüzden toplanan bitki örneklerindeki bütün nodüllerden *Rhizobium* cinsi üyeleri elde edilemedi.

Ön çalışmalar mevcut *Rhizobium* bakterilerinin hızlı büyüyen gruplar olduğu belirlendi. Bitkilerden izole edilen *Rhizobium* bakterileri varyasyon göstermekte ve sadece

fenotipik karakterleri dikkate alarak belli bir sınıf veya cinse yerleştirmek zor olmaktadır (Milnitsky ve ark., 1997)

Jordan (1984)'e göre baklagil bitkilerinin kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* cinsi bakterileri teşhis etmek için öncelikle gram boyama, kongo kırmızılı YMA'da gelişerek beyaz ve opak kolonilerin oluşumu, brom timol mavili YMA ortamında gelişerek ortamın rengini sarıya çevirerek asit oluşturma gibi karakterler göz önüne alınarak *Rhizobium* ve *Agrobacterium* cinsi yeleri birbirinden ayırt edilirler. Çalışmamızda yabancı mercimek ve nohut bitki kök nodüllerinden izole edilen bakteriler YMA ortamına ekildikten sonra yukarıda belirtilen testlere tabii tutuldu. İzole edilen 110 suştan ancak 38 tanesi Jordan ve arkadaşlarının belirttiği testlerin sonuçlarına uygunluk gösterdi (izelge 3.1). Geri kalan suşlar %15 gliserol ortamına alınarak -20<sup>0</sup>C derecede depo edildi. Kalan 38 suş için Jordan (1984) ve Vincent (1970)'te belirttiği testler uygulanarak suşların biyokimyasal karakterleri tespit edilerek numerik analizi yapıldı (izelge 3.2).

*Rhizobium* ile *Agrobacterium* cinsi üyelerini birbirinden morfolojik olarak ayırmak oldukça zordur. Bu ayırım için genellikle pepton glukoz agar ortamında üreme ve Ketolaktoz halkası oluşumuna göre birbirinden ayırt etme yoluna gidilir. *Rhizobium*'ların PGA ortamında gelişmeleri zordur (lgen, 1980). Çalışmamızda gram boyama özellikleri, kongo kırmızılı YMA'da üreme ve brom timol mavili YMA'da karakterleri belirlenen türler PGA ortamında geliştirildi. İzolatların bir çoğu bu ortamda gelişemezken birkaçı az gelişerek ortamın pH'ını değiştirdi.

*Rhizobium* cinsi yeleri genellikle alkali nötr ortamlarda gelişirler (Jordan, 1984). Çalışmamızda farklı pH ortamlarında geliştirilen izolatlar pH 3.5, 4.0, 4.5 ortamlarında gelişme gsteremezken pH 5.0 asit ortamında izolatların birçoğu gelişerek koloni meydana getirerek Jordan, 1984'e göre uygunluk göstermedi. İzolatlar pH 8.0 ve 9.0 ortamlarında hızlı gelişerek belirgin koloniler meydana getirdi.

Young, (2004) Rhizobiaların filogenetiği adlı çalışmasında karbon kaynaklarının kullanımının Rhizobial türler arasında farklılık gösterdiğini bildirdi. Bu amaçla *Rhizobium* taksonomisinde karbon kaynakları kullanımı oldukça sık kullanılmaktadır. Gao, (2001) *Rhizobium* bakterilerinin genellikle karbon kaynağı olarak mannitol tercih ettiğini diğer karbon kaynaklarının kullanımının aynı türün suşları arasında dahi farklılık gösterdiğini bildirmektedir. Çalışmamızda karbon kaynağı olarak kullanılan mannitol'u bütün izolatlar kullanırken suksinat içeren ortamda izolatlar gelişmedi. Mannitol dışında izolatların genellikle maltoz, galaktoz, sukroz ve glukoz kullanımı daha çok görüldü.

Canlılar büyüme ve gelişme için enerji kaynaklarının dışında vitaminlere de ihtiyaç duyarlar. Bakteriyel sınıflandırmada kullanılan bu özellik taksonların birbirinden benzerlik ve farklılıklarını ortaya koymak için kullanılmaktadır. İzolatlarımızın vitamin ihtiyaçlarını belirlemek için uyguladığımız vitamin kaynaklarını hiç biri mercimek ve nohut izolatlarının gelişimi üzerinde bir etki yaratmadı. İzolatlar vitamin istekleri yönünden negatif olarak kabul edildi

*Rhizobium* bakterileri *Bradyrhizobium* strainlerine kıyasla dah hızlı büyürler ve YMA üzerinde 3 gün içerisinde belirgin koloniler meydana getirirler. Ayrıca bromotimol mavili agarda asit üreterek ortamın rengini sarıya dönüştürler. Rhizobial izolatların bu ortamda 10 gün kadar bir inkübasyondan sonra asit üretmeleri *Bradyrhizobium* cinsine benzer özellik gösterdiği düşünülebilir. Fenotipik testlerin sonuçlarının numerik analizi sonucu izolatlar 12 gruba ayrıldı ve gruplaşma üzerinde coğrafik orijinlerinin etkisinin fazla olmadığı gözlemlendi. Hatta farklı istasyonlardan toplanan bitki köklerinden izole edilen *Rhizobium*'ların farklı gruplara ayrıldığı gözlemlendi. Benzer sonuçlar Fremont ve ark. (1999) yaptığı ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmalarında aynı istasyonlardan izole edilen izolatların genetiksel olarak farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada Van gölü havzasında yetişen yabancı mercimek ve nohut bitki kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* bakterilerinin fenotipik karakterlerinin numerik analizi sonucunda oluşan dendogramda 7 grup oluştu. Referans Av7 vicia , tn4 cicer, nohut 522, mercimek 1045, test suşları ayrı gruplar oluştururken yonca520 ve fasulye83 ve 204 vicia referans test organizmaları aynı gruba dahil oldu. Genelde referans suşların farklı gruplara ayrılırken VI. Grupta yer alan referans suşların aynı grupta yer alması referans suşların zamanla çevresel şartların etkisinde kalarak referans suşların genetik olarak değişebildiği düşünülebilir. Referans suşlar arasındaki ilişkiyi tam olarak ortaya koymak için en azından 16S rDNA baz dizilerinin tespitinin yapılması ve filogenetik analizinin yapılması gerekmektedir. Oluşan gruplar *Rhizobium* bakterilerinin hangi bitki kök nodüllerinden güvenilir bir şekilde izole edildiğini yansıtmaktadır.

Her ne kadar farklı bitki kök nodüllerinden izole edilen bazı test organizmaları farklı gruplara, yani beklenen gruba dahil olmasa dahi (1A3L1 suşunun III: grupta olması gerekirken II: grupta yer alması gibi) sonuçlarımızın güvenilir olduğunu göstermektedir. Tarla çalışmalarında yabancı mercimek ve yabancı nohut bitkilerinden izole edilen *Rhizobium* bakterilerinin muhtemelen farklı NodA genlerine sahip olan suşlarda nodulasyon olayı gerçekleşmektedir.

Özellikle referans strain mercimek1045 suşu ile aynı grupta yer almaları (%85 benzerlik oranında) aynı tür olabileceğini belirtir. Yabani nohut kök nodüllerinden izole edilen bakterileri referans strainleriyle aynı gruba dahil olmadığı gözlemlendi ve bu grupların farklı bir tür olabileceğini düşündürmektedir.

*Rhizobium* bakterilerinin antibiyotiklere dayanıklılık testleri sonuçları farklılık gösterdi. Çoğunluk *Rhizobium* strainleri antibiyotiklerin bulunduğu ortamda geliştiklerinin gözlemlendiği halde çoğunluğu Tobramycin, Rifamicin ve Cephalosporin antibiyotiğine karşı duyarlı kaldılar. Galiano (1990) belirttiği gibi numerik analiz sonuçlarında ortaya çıkan farklı grupların antibiyotik testleri içinde benzer sonuçlar görüldü. Genelde tüm gruplarda yer alan strainler benzer sonuçlar gösterdi.

Lafay ve arkadaşları (1998) Güneydoğu Avustralya'da 32 baklagil Legüminoceae familyana ait 475 *Rhizobium* bakterisi habitat ilişkisini incelemiştir ve sonuçta 21 genomik tür belirlemiştir. Bu çalışmamızda da mevcut test organizmaların genomik DNA'ları izole edildi ve 16S rDNA primerleri yardımıyla çoğaltıldı. Ayrıca Operon kiti (10 mer OPAB primer) kullanılarak RAPD-PCR yöntemi ile bakterilerin karakterizasyonu yapıldı. Kullanılan OPAB 11 primeri ile *Rhizobium* test bakterileri 750 bp civarında DNA bandı verdi (Şekil 3.8). Halbuki OPAB-7 primeri ile aynı *Rhizobium* test bakterilerinden 10 tanesi 500 bp uzunluğunda DNA segmenti çoğaldı. Test bakterileri arasındaki polimorfizmi daha ayrıntılı ortaya koyabilmek için 20 farklı OPAB primeri kullanıldığı halde karakterizasyonu ortaya koyabilecek düzeyde polimorfik DNA bantları elde edilemedi. Yabani mercimek ve nohut bitkisinden izole edilen *Rhizobium* bakterilerinin 16S rDNA sequencing ve filogenetik analizleri yapılması yeni olabilecek türlerin taksonomik pozisyonlarını teyit edeceğini belirtmek gerekir.

Bu çalışmada toplam 12 *Rhizobium* ve 25 *Mesorhizobium* suşunun polifazik taksonomi yaklaşımı kullanarak karakterize ettik. Daha önceki çalışmalarda da farklı analiz yöntemleri kullanıldığında bazı farklılıklar gözlemlenmiştir. Fenotipik karakterlerin numerik analizi, 16S rDNA PCR-RFLP ve RAPD-PCR sonuçları *Rhizobium* test suşları tarif edildi. Fenotipik karakterlerin numerik analizi çalışmamızda kullandığımız *Rhizobium* bakterilerinin heterojen olduğu belirlendi. Test suşları sadece iki farklı bitki kökündeki nodüllerden elde edilmesine rağmen 7 farklı grup dendogram üzerinde belirlendi. RAPD-PCR *Rhizobium* test suşlarının genetik varyasyonu ortaya koymak için yapıldı. Bütün sonuçlarımız *Rhizobium* test suşlarının hem tür hem de genetik seviyede yüksek oranda çeşitlilik gösterdi.

Rhizobial taksonomisi hala tamamlanabilmiş değildir. Young ve arkadaşları (2001) *Rhizobium* ve *Agrobacterium* cinsinin sadece 16S rRNA gen dizi analizine dayalı olarak yapmıştır ve fenotipik hiçbir karakteri dikkate almamıştır. 16S rRNA geni ve ITS baz dizilişlerinin analizine göre birkaç gruba ayrılmaktadır. ITS analizine göre oluşan üç temel grup (I, II, III) 16S rRNA gen gaz analizleri ile uygunluk gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda her ne kadar numerik analiz sonuçları RAPD-PCR sonuçları ile tam olarak uygunluk göstermese de, RAPD-PCR yönteminde çoğunluk *Rhizobium* bakterilerinin tek band vermesi, bu test organizmalarının aynı olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada yabani mercimek ve nohut bitki kökünden yüksek sayıda *Rhizobium* bakterileri izole edildi ve saflaştırıldı. Yapılan fenotipik testler sonucunda farklı lokalite ve bitki köklerinden izole edilen *Rhizobium* bakterilerin farklı gruplara ayrıldığı belirlendi. Benzer sonuçlar antibiyotik dayanıklılık testi için de elde edildi. Restriksiyon PCR-RFLP için DNA enzimleri ile kesilmediğinden yapılamadı. Bu çalışmamızda yabani mercimek ve nohut bitki kökünden yüksek sayıda *Rhizobium* bakterileri izole edildi ve saflaştırıldı. Yapılan fenotipik testler sonucunda farklı lokalite ve bitki köklerinden izole edilen *Rhizobium* bakterilerin farklı gruplara ayrıldığı belirlendi. Benzer sonuçlar antibiyotik dayanıklılık testi için de elde edildi. Restriksiyon PCR-RFLP için DNA enzimleri ile kesilmediğinden yapılamadı.

#### 4. KAYNAKLAR

- Açıkgöz, N., 1997. Experiences o transfer of management of technology for Ascochyta blight of chickpea i Turkey. *Anadolu J. of AARI*, 7 (1): 1-8.
- Aguilar, O M., M. V.Lopez, P. M. Riccillo, R. A. Gonzalez, M. Pagano, D. H. Grasso, A. Puhler, and G. Favelukes. 1998. Prevalence of the *Rhizobium etli-like* allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with vild beans from the sauthern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3520-3524.
- Akçelik, M., Karuç, K., Ayhan, K., Gürgün, V., 1997.*Bradyrhizobium japonicum* suşlarının nodülasyon yeteneğine ait genetik determinantların belirlenmesi. *Tr.J. of Biology*, (21):237-247.
- Aksoy, U. ve Yaşar E., 1995. *Sürdürülebilir (Sustainable) Tarım. Ege Üniv. Tar.Uyg. ve Araş. Mer. Yayın Bülteni-* 23, İzmir.
- Alcamo, I.E., 1996. **Fundamentals of microbiology**. An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc., Newyork, 770-771.
- Alexander, M., 1961. Introduction to soil microbiology. Toppon Comp. Ltd. Tokyo, Japon.
- Amarger, N., Macheret, V., Laguerre, G., and Amarger, N. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (4): 996–1006.
- Andionou, E.E., Terefework, Z., roumiantseva, M.L., Dzyubenko, N.I., Onichtchouk, O.P., Kurchak, O.N., Dresler-Nurmi, A., Young, J.P.W., Simarov, B.V., Lindström, K.; 2002. Symbiotic and Genetic Diversity of *Rhizobium galegae* İsolates Collected from the *Galega orientalis* Gene Center in the Caucasus. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2): 1067-1074.
- Anomin, 2000. **Tarımsal Yapı ve Üretim**. DİE Yayını, Ankara.
- Anonim, 1983. **Technical handbook on symbiotic nitrojen fixation**. Food and agriculture organization of The United Nations, Rome, p.34-36
- Anonim, 1984. Legume inoculants and their use FAO, Rome.
- Anonim. 1994. Tarımsal Yapı ve Üretim, DYE Dıs Ticaret İstatistikleri Raporu, 1994.
- Arda, M., 2000. **Temel Mikrobiyoloji**. İkinci baskı. Medisan yayınları, seri no,2 548.
- Aydemir, O., İnce, F., 1988. **Bitki besleme**. Dicle Üni. Eğ. Fak.Yay No:2, Diyarbakır.

- Ayhan, K., 1994. *Rhizobium* bakterilerindeki nodülasyon genlerinin fonksiyonları ve regülasyonu. ***Kükem Dergisi***, 17 (2):43-48.
- Ayhan, K., 1995. Ankara'nın Kazan ilçesi topraklarından izole edilen *Rhizobium* legüminosarum suşlarının simbiyotik özelliklerinin belirlenmesi. ***Kükem Dergisi***, 18 (1): 51-56
- Bağcı, H., Shareef, S.R., Özdamar, K. 1991. *Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması. ***Doğa Tr J of Biology***, (5):70-81.
- Bala, A., P. Murphy., and K. Giller., 2002. Occurrence and genetic of *Rhizobia* nodulating *Sesbania sesban* in African soils. ***Soil Biology&Biochemistry*** 34: 1759-1768
- Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer. **The Protokaryotes**. Volume III. p: 2197-2214
- Beck, D. P., Materon, L. A. and Afandi, F., 1993. **Practical *Rhizobium*-legüme technology manual**. International center for agricultural research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo, Syria. P. 1-54
- Beck, D.P., Wery J., saxxena M.C., Ayadi A., 1991 Dintrogen fixation and nitrogen balance in cool-season food legumes. ***Agron, J.***, 84: 334-341.
- Bellingham, P. J., Buxton, R. P., Duncan, R. P., and Lee, W. G. 2004. Seedling growth rate and survival do not predict invasiveness in naturalized woody plants in New Zealand. ***Oikos***, 106 (2): 308–316.
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A.,and Squartini,A. 2004. Gamma proteobacteria can nodulate legumesof the genus *Hedysarum*. ***Systematic and Applied Microbiology***, 27 (4): 462–468.
- Boring, L. R., Swank, W. T., Waide, J. B., and Henderson, G. S. 1988. Sources, fates, and impacts of nitrogen inputs to terrestrial ecosystems: review and synthesis. ***Biogeochemistry***, 6 (2): 119–159.
- Bruce, K.D., Jordens, J.Z. 1991. Characterization of noncapsulate *hemophilus influenzae* by whole-cell polypeptide profiles, restriction endonuclease analysis, and RNA gene restriction pattern. ***J.Clin.Microbiol***, 29(2):291-296.
- Burris, R.H., 1988. Biological nitrogen fixation: A sientific perspective. ***Plant and Soil***, 108: 7-14.
- Burton, S.C., 1979. ***Rhizobium species***. Microbial Technology 1:29-58.

- Chen, W. X., Li, G. S., Qi, Y. L., Wang, E. T., Yuan, H. L., and Li, J. L. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 41 (2): 275–280
- Chen, W. X., Tan, Z. Y., Gao, J. L., Li, Y., and Wang, E. T. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov, isolated from tropical legumes. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 47 (3): 870–873.
- Chen, W. Y., G. H. Yan, and J. L. Li. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean *rhizobia* and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. Nov. ***Int. J. Syst. Bacteriol.*** 38: 392-397
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., and Chen, X. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 45 (1): 153–159.
- Chen, W.-M., Laevens, S., Lee, T.-M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., and Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 51(5): 1729–1735.
- Chen, W.-M., Laevens, S., Lee, T.-M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 51(5): 1729–1735.
- Corby, H.D.L., 1981. The systematic value of leguminous root nodules. ***Advances in Legume Systematic***. (Editors: Polhill R.M., Raven, P.H.) Royal Botanic Gardens, Kew. 657-669.
- Coutinho, H. L. C., de Olivera, V. M., and Moreira, F. M. 2000. Systematics of legume nodule nitrogen fixing bacteria: Agronomic and ecological applications. In F. G. Preist and M. Goodfellow, editors. ***Applied Microbial Systematics***, pages 107–134. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., Maas, W.K., 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. ***Microbiological Reviews***, 52 (3): 375-395.
- Çakmakçı, M., 1987. ***Biyolojik Azot tespiti ve ekolojik araştırma yöntemleri***. TÜBİTAK Tarım Ormancılık Araştırma Grubu. Tarımsal Mikrobiyoloji Araştırma Grubu. Tarımsal Mikrobiyoloji Araştırma Enst. Yay. No:2, Ankara.

- Çökmüş, C., Yousten, A.A., 1994. Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE. *J Invertebr Pathol*, 61: 323-325.
- Dangeard, P. A. 1926. **Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses**. Series 16. Le Botaniste, Paris.
- de Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. D., Kersters, K., Dreyfus, B., and Gillis, M. 1998a. *AlloRhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48 (4): 1277–1290.
- de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M. D., Lindström, K., Dreyfus, B., and Gillis, M. 1998b. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48 (2): 369–382.
- de Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K., and Gillis, M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 715–733.
- de Oliveira, I.A., Vasconcellos, M.J., Seldin, L., Paiva, E., Vargas, M.A., de Sa, N.M.H., 2000. Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Effective *Rhizobium* spp. Associated with Beans Cultivated in Brazilian Cerrado Soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 39-44.
- de Oliveria, V.M., Coutinho, H.L.C, Sobral, B.W.S, Guimaraes, C.T., van Elsas, J.D., Manfio, G.P., 1998. Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE). *Letters in Applied Microbiology*, (28): 137-141.
- de Souza Moreira, F. M., Cruz, L., de Faria, S. M., Marsh, T., Martínez-Romero, E., de Oliveira Pedrosa, F., Pitard, R. M., and Young, J. P. W. 2006. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systematic and Applied Microbiology*, 29 (3): 197–206.
- Denison, R. F. and Kiers, E. T. 2004. Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic? *Microbes and Infection*, 6 (13):1235–1239.

- Diouf, A., P. de Lajudie, M. Neyra, K. Kesters, M. Gillis, E. Martinez Romero, and M. Gueye. 2000. Polyphasic characterization of *rhizobia* that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 159-179
- Dreyfus, B., and Y. R. Dommergues. 1981. Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume, *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 10:313-317
- Dreyfus, B., Garcia, J.L., Gillis, M., 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodan* gen. Nov.,sp. Nov.,a stem nodulating, nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 89-98.
- Elkan, G. H., and L. D. Keykendall.1981. Energy metabolism in *Rhizobium*, p. 145-166. In: W. J. Broughton (ed.), Ecology of nitrogen fixation. Oxford University Press, Oxford, U.K
- Frank, B. 1879. Ueber die Parasiten in den Wurzelanschwillungen derPapilionaceen. *Botanische Zeitung*, 37: 376–387, 394–399.
- Frank, B. 1889. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der*
- Fred, E.B., Baldwin, I.L., McCoy, E., 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. *University of Wisconsin press*, Madison. sy: 343.
- Fremont, M, Y. Prin, M. Chauviere, H.G. Diem, K.H Rwee, And T.K. Tan. 1998. A comparison of *Bradyrhizobium* strains using molecular, cultural and field studies. *Plant Science.* 141:81-91
- Frémont, M., Pwee, K. H., Tan, T. K., Prin, Y., Diem, H. G., and Chauvière,M. 1999. A comparison of *Bradyrhizobium* strains using molecular, cultural and field studies. *Plant Science*, 141 (1): 81–91.
- Gao, J., Terefework, Chen, W., Lindström, K., 2001. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *Journal of Biotechnology*, 91:155-168.
- Gao, J.-L., Turner, S. L., Kan, F. L., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Qiu, Y. H.,Gu, J.,Terefework, Z., Young, J. P. W., Lindström, K., and Chen, W. X. 2004. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum*sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northernregions of China. *International Journal of Systematic and EvolutionaryMicrobiology*, 54 (6): 2003–2012.

- Garrity, G. M., Bell, J. A., and Lilburn, T. G. (2004). *Taxonomic outline of the prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, Release 5.0 May 2004*. Bergey's Manual Trust. <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline>.
- Gatti, M., Fornasari, M.E., Neviani, E., 1997. Cell-wall protein profiles of dairy thermophilic lactobacilli. *Letters in Applied Microbiology*, 25: 345-348.
- Gatti, M., Fornasari, M.E., Neviani, E., 2001. Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* by SDS-PAGE of cell-wall proteins. *Letters in Applied Microbiology*, (32): 352-356.
- Geniaux, E., Amarger, N., 1993. Diversity and stability of plasmid transfer in isolated from single field population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *FEMS Microbiology Ecology*, 102: 251-260.
- Gepts, P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (*Fabaceae*) beans. *Econ. Bot.* 44: 28-38
- Gepts, P., and F. A. Bliss. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, *Fabaceae*) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Econ. Bot.* 42: 86-104
- Gezgin, S., Karakaplan, S., 1992. Konay-Çumra Ovası Topraklarında Bitkiye faydalı Azot Miktarının Tayininde Kullanılabilecek Yöntemler Üzerine Bir Araştırma. *Tr.J.of.Agricultural and Forestry*, 18: 235-241.
- Ghosh, W. and Roy, P. 2006. *Mesorhizobium thioanganeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1): 91-97.
- Gibbs, B.M., Shapton, D.A., 1968. Identification Methods for Microbiologist. *Academic press*, London. 51-62,
- Gök, M., 1993. Soya, üçgül, bakla ve fiğ bitkilerine ait değişik *Rhizobium* spp. Suşlarının ekolojik yönden önemli bazı özelliklerinin laboratuvar koşullarında belirlenmesi. *Doğa-Tr.J. of Agricultural and Forestry.*, 17: 921-930
- Graham, P. H. 1964. The application of computer techniques of the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* 35: 511-517
- Graham, P.H., Bale, J., Baker, D., Fried, M., Roskoski, J., Mackay, K.T., Crasswell, E., 1988. The contribution of biological nitrogen fixation to plant production: An overview of the symposium and its implications. *Plant and Soil*, 108: 1-6.

- Graham, P.H., Parker, C.A., 1964. Diagnostic Features in The Characterization of The Root-Nodule Bacteria of Legumes. *Plant and Soil*, 10 (3): 383-396.
- Gray, M.W., Sankoff, D. ve Cedergren, R.J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, *Nucleic Acids Res.*, 12 (1984) 5837-5852
- Grimm, s.S., Jones, J.W., Boote, K.J., Herzog, D.C., 1994. Modelling the occurrence of reproductive stages after flowering for four soybean cultivars. Published in Argon.J., 86: 31-38.
- Gür, S., (2002). Mercimek ve fasulye nodülye nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* suşlarının bazı kültürel ve biyokimyasal özellikleri. S.D.Ü. *Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2): 25-33
- Gürbüz, E., 1973. ***Rhizobium meliloti* Suşlarının Özellikleri ve Etkenlik Derecelerinin Saptanması.** (Doktora Tezi basılmış), Ankara.
- Gürbüz, E., 1978. En Fazla Azot Tespit Etme Özelliği Gösteren Soya Fasulyesi Nodozite Bakterilerinin Seçilmesi.. ***Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları.*** Köy İşleri ve Kooperatifler Bakanlığı, Topraksu Genel Müdürlüğü., Yay. No, 78. Ankara.
- Gürbüz, E., 1980. **Orta Anadolu koşullarında en fazla azot tesbit etme özelliği gösteren mercimek ve nohut nodazite bakterilerinin seçimi. Topraksu Genel Müdürlüğü, Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Yayınları.** Rapor Yayın no:25, Ankara.
- Han, S.-Z., Wang, E.-T., Chen, W.-X., and Han, S.-Z. 2005. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 28 (3): 265–276.
- Hardarson, G. and Danso S.K.A., 1993. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil*, 152: 19..
- Hardarson, G., 1993. Methods for enhancing symbiotik nitrojen fixation. *Plant Soil* 152: 1-17
- Heitor, L.C., V.M. Oliveira, A. Lovato, A.H.N. Mira, and G.P. Manfio. 1999. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology*. 13:159-167

- Hennecke, H., K. Kaluza, B. Thony, M. Furhman, W. Ludwig, and E. Stackebrandt. 1985. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol.* 142: 342-348
- Hitchcock, P.J., Brown, T.M., 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology*, (154):1, 269-277.
- İpek, S., 1984. Ankara koşullarında bakteri aşılmasının anız ve nadasa ekilen nohut (*Cicer arietinum L*)'ta bazı tarımsal özellikler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ank. Üniv. Ziraat Fak.
- Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E., and Patel, J. J. (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32 (3): 378–380.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., and Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (3): 895–898.
- Jordan, D.C., 1984. *Bergey's of Manual of Systematic Bacteriology*. (Editors: Jordan, D.C., 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Editors: Krieg N.R., Holt J.G.) Williams Wilkins, Baltimore.
- 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
- Jourand, P., Giraud, E., Béna, G., Sy, A., Dreyfus, B., de Lajudie, P., Willems, A., and Gillis, M. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (6): 2269–2273.
- Kamicker, B.J., Brill, W.J., 1986. Identification of *Bradyrhizobium Japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (3): 487-492.
- Kantar, F., 1997. **Prospect of bio-organic fertilizers and sustainable agriculture in Turkey**. Proceedings of the Training Course on Bio-Organic Farming Systems for Sustainable Agriculture, November 26 to December 6, 1995 Cairo, Egypt, 263-276.

- Karadoğan, T., Karasu, A., arkı, K. ve zelik, S., 1999. **Gller yöresinde nohut bitkisinde etkili nodl oluşturan *Rhizobium* suşlarının seçimi ve etkinliklerinin belirlenmesi.** Türkiye 3. Tarla Bitkileri Kongresi. 15-18 Kasım 1999, Adana, s. 401-406
- Karu, K., Cebel, N., Altuntaş, S., 1993. **Ankara ili Kazan ilçesi topraklarının doğal *Rhizobium* populasyonu.** T.C. Başbakanlık Köy Hizmetleri Genel Müd., Toprak ve Gübre Araş. Enst.Müd., Geneyl Yayın No:194, Rpor Seri NO:R112, Ankara.
- Khbaya, B., Neyra, M., Normand, P., Zerhari, Filali-Maltouf, A., 1998. Genetic diversity and Phylogney of Rhizobia That Nodulate *Acacia* spp. in Morocco Assessed by Analysis of rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12):4912-4917.
- Khbaya, B., Neyra, M., Normand, P., Zerhari, K., Filali-Maltouf, A., 1998. Genetic diversit and phylogney of rhizobia that nodulate Acaci spp. in Morocco assesed by analysis of rRNA genes. *Applied and Enviromental Microbiology*, (64):4912-4917.
- Kırbağ, F., Baltepe, ř., 1987. Yüksek Bitkilerde Simbiyotik azot bağlanması . *Ekoloji Dergisi*, 22: 26-30.
- Kızıloğlu, F.T., 1995. **Toprak mikrobiyolojisi ve biyokimyası.** Atatürk ni. Zir. Fak. Yay. No: 180, Erzurum.
- Kızıloğlu, F.T., ztrk, A., 1992. **Nodül oluşumunda baklagil- *Rhizobium* karşılıklı etkileşmelerinin biyolojisi (eviri).** Yüzüncü Yıl ni. Fen-Ede. Fak. Fen Bil.Derg., 3 (3):37-50.
- Killham, K.K., 1994. **Soil Ecology.** Cambridge Univ. Press, U.K., 242-254.
- Kirchner, O. (1896). Die Wurzelknllchen der Sojabohne. *Beirge zur Biologie der Pflanzen*, 7: 213–224.
- Kishore, L., Natarajan, k., Babu, C.R., 1996. Total Soluble protein and membrane liopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* İzolates. *Microbios*, 86:143-156.
- Kuru (Kamazoğlu), E., 1999. Sabit yataklı reaktrlerde mikrobiyal nitrat giderimi ve kinetiği. Atatürk niv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, s. 2-10
- Kuykendall, L. D., Gaur, Y. D., and Dutta, S. K. (1993). Genetic diversity among *Rhizobium* strains from *Cicer arietinum* L. *Letters in Applied Microbiology*, 17 (6): 259–263.

- Lafay, B., Burdon, J.J., 2000. Small-Subunit rRnA Genotyping of Rhizobia Nodulating Australian *Acacia* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1): 396-402.
- Laquerre, G., van Berkum, P., Amarger, N., Prevost, D., 1997. Genetic Diversity of Rhizobial Symbionts Isolated from Legume Species within the Genere Astragalus, Oxytropis, and Onobrychis. *Applied and Enviromental Microbiology*, 63 (12): 4748-4758.
- Laquerre, G., van Berkum, P., Amarger, N., Prevost, D., 1997. Genetic Diversity of Rhizobial Symbionts Isolated from Legume Species within the Genera *Astragalus*, *Oxytropis* and *Onobrychis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (12): 47-48.
- La-Rue, T.A. Patterson, T.G., 1981. How much nitrojen do legumes fix? Advences in Agronomy, 34, 15-38
- Lie, T.,1981. *Environmental physiology of the legume-Rhizobium symbiosis in nitrogen fixation. Ecology*. (Editors: Broghton W.J.) 1. 104-134.Clerandon Press. Oxford.
- Lindström, K. (1989). *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3): 365–367.
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski, D.F., Williams, P., downie, j.A., 2000. The regulatory locus cin RI in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Molecular Microbiology*, 20 (4): 345-348.
- Lohnis, F., Hansen, R., 1921. Nodule bacteria of leguminous plants. J.Agr.Res. 20: 543-556.
- Long, S.R., 1989. *Rhizoibum* Genetics. *Annu.Rev.Genet*, (23):483-506.
- Madigan, MT., Martinko, J.M., Parker, J., 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International., 8. Baskı: 595-603.
- Martinez, E., Palacios, R.,Sanchez, F., 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *Journal of Bacteriology*, 169 (6): 2828-2834.
- Martinez-Romero, E., and J. Cabellero-Mellado. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci*. 15: 113-140
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., and Pardo, M. A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41 (3): 417–426.

- Maskey, S.L., Bhattarai S., Peoples M.B. and Herridge D.F., 2001. On-farm measurements of nitrogen fixation by winter and summer legumes in the Hill and Tera regions of Nepal. *Field Crops Research*, 70 (3): 209-221.
- Mckane, L. And Kandel J., 1986. **Microbiology essentials and Application**. McGraw Hill International Editions. Singapore, 657-680.
- Mercan, N., 1996. *Bacillus sphaericus* suşlarının PAGE ile elde edilen Hücre dışı protein profillerine göre ayrımı. (Yüksek lisan Tezi basılmış). Ankara Üniv. Fen Bil. Enst., Ankara.
- Miksch, G., Lentzsch, P., 1988. Transfer of *Rhizobium leguminosarum* SYM plasmids to *R.meliloti* and stability of resident and transferred plasmids. *J.Basic Microbiol*, 28: 445-455.
- Miksch, G., Lentzsch, P., 1990. Expression and stability of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* Sym plasmid in *R.meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens* and its effect on clover-bacterium symbiosis. *Journal Basic of Microbiology*, 30 (3): 181-187.
- Moreira, f.M.S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., France, A.A., 1993., Characterization of Rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *System. Appl. Microbiol*, 16: 135-146.
- Mostasso, L., Mostasso, F.L., Dias, B.G., Vargas, M.A.T., Hungria, M., 2001. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research*, 73: 121-132.
- Navarro-Rodriguezi D.N., Camacho, M., Leidi, e.O., Rivas, R., Velazquez, E., 2004. Phenotypic and Genotypic Characterization of Rhizobia from Diverse Geographical Origin that Nodulate *Pachyrhizus* species. *System. Appl Microbiol*, 27: 737-745.
- Nick, G., de lajudie, P., Eardly, B.D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M., Lindström, K., 1999. *Sinorhizobium arboris* sp.nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp.nov., isolated from *Leguminous* trees in Sudan and Kenya. *Int.Syst.Bacteriol.*, 39: 1359-1368.
- Norris, D. O.1965. Acid production by *Rhizobium*, a unifying concept. *Plant and soil*. 22: 143-166.
- Nour, S. M., Cleyet-Marel, J.-C., Normand, P., and Fernandez, M. P. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (4): 640–648.

- Nour, S. M., Fernandez, M. P., Normand, P., and Cleyet-Marel, J.-C. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 44 (3): 511–522.
- Nuswantara, S., Fufie, M. Yamada, T., Malek, W., İnaba, M., Kaneko, Y., Murooka, Y., 1998. Phylognetic Position of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*, a Symbiont of *Astragalus sinicus* cv. Japan. ***Journal of bioscience and Bioengineering***, 87 (1): 49-55.
- O’Connell, P.F., 1992. **Sustainable agriculture a valid alternative**. Outlook on Agriculture, 21 (1): 5-12.
- O’Gara, F., Shanmugam, K. T. 1976. Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia. Export of fixed N<sub>2</sub> as NH<sub>4</sub>. ***Biochimica et Biophysica Acta***, 437 (2): 313–321.
- Ogasawara, M., Suzuki, T., Mutoh, I., Annapurna, K., Arora, N. K., Nishimura, Y., and Maheshwari, D. K. 2003. *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. izolated from tropical legumes, *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. ***Symbiosis***, 34 (1): 53–68.
- Oliveria, V.M., Coutinho, H.L.C., Sobrai, B.W.S., Guimaraes, C.T., van Elsas, J.D., Manfio, G.P., 1998. Discrimination of *Rhizobium tropici* and R. Leguminosarum strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragment and denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE). ***Letters in Applied Microbiology***, 28:137-141.
- Orson, J.a., 1996. The sustainabilityof intensive arable systems: Implications for rotational policy. ***Aspects of applied Biology***, 47, 11-15.
- Oyaizu, H., Naruhashi, N., Gamou, T., 1992. Moleculer methods of analysing bacterial diversity: the case of *Rhizobia*. ***Biodiv. Conserv.*** 1, 237-249
- Öğüt, M., 2001. ***Azospirillum brasilense ve Bazı Rhizobium suşlarının Türkiye’de yetiştirilen yaygın fasulye(Phaseolus vulgaris) çeşitlerinde nodulasyona ve bitki büyümesine etkisi*** (doktora tezi). Gaziosmanpaşa Üniv. Fen Bil. Enst., Tokat.
- Öğütçü, H., 2000. **Yabancı baklagil bitkilerinden izole edilen *Rhizobium* suşlarının baklagil bitkilerinde nodül oluşturma ve azot bağlama potansiyellerinin araştırılması**. (Yüksek Lisans Tezi. basılmış) Atatürk Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özbek, H., Kaya. Z., Gök, M., Kaptan, H., 1993. ***Toprak bilimi***. P. Schachtschabel, H., Blume P., Brummer G., Hartge K.H., Sxhwertmann U.(çeviri). Ç.Ü. Zir. Fak. Ders Kitaplar Yay No:16.

- Özçelik, H., 1995. **Toprak Biyolojisi**. Süleyman Demirel Üniv. Yay. Ders Kitapları No:3, Atabey-Isparta.
- Panarata, L., Pimentel, M.S., Pot, B., Kersters, K., Faia, A.M., 1994. Identification of lactic acid bacteria isolated from Portuguese wines and musts by SDS-PAGE. *J.Appl.Bacteriol.*,(76):288-293.
- Paul, E.A., 1989. *Return of Nitrogen to soil: Biological nitrogen fixation*. p. 164-196. *Soil Microbiology and Biochemistry* (Editors: Paul E.A.) Academic press Inc. San Diego, CA.
- Pelczar, M. J., Chan, Jr. E.C.S, and Krieg, N.R, 1986. **Microbiology**. McGraw-Hill,Inc. Singapore, p.559-562
- Pineiro-Zurdo, J.L.Z., Velazquez, E., Lorite, M.J., Brelles-Marino, Graciela., Schröder, E.C., Bedmar, E.J., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., 2003. Identification of Fast-Growing Rhizobia Nodulating Tropical Legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. *System.App.Microbiol.* 27: 469-477.
- Plant-Microbe Interactions*, 18 (12): 1325–1332
- Prescott, L., Harley, J:P. and Klein, D.A., 1993., *Microbiology*. Second Edition, WCB, Wm.C. Brown Publishers.
- Quan, Z.-X., Bae, H.-S., Baek, J.-H., Im, W.-T., Lee, S.-T., and Chen, W.-F. 2005. *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (6): 2543–2549.
- Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Dazzo, F. B., Kroppenstedt, R. M., Martínez-Molina, E., Gillis, M., and Velázquez, E. 2003. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (1): 47–53.
- Robertson, J.G., ve Farnden, K.F.J., 1980. Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. Vol 5. *The Biochemistry of Plants* (Editors: Mifflin B.J.) Academic Press, New York. 65-115.
- Rupela, O.P. and Saxena, M.C., 1987. Nodulation and nitrogen fixation in chickpea. In: *The Chickpea*, (M.C. Saxena and K.B. Singh Eds.), CAB International, Walingford, Oxon, OX10 8 DE, UK, 191-206.
- Sağiroğlu, G., 1984. **Doğu Anadolu Bölgesi figlerinden etkili nodoziet bakterilerinin (*Rhizobium leguminosarum* Frank) seçimi**. (Doktora Tezi, basılmış) Fırat Üniv. Fen Bilimleri Enst, Elazığ.

- Sağıroğlu, G., Özçelik, S. ve Kaymaz, S., 1993. Elazığ ve yöresinde üretilen mercimek bitkilerinden etkili nodozite bakterilerinin (*Rhizobium legüminosarum biovar viciae*) seçimi. *Doğa Tr. J. Of Agricultural and Forestry*, 17: 569-573
- Salisbury, F.B., Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California , 682-705.
- Samih, M. T., and J.P.W. Young. 2004. *Rhizobium etli* is the dominant common bean nodulating *Rhizobia* in cultivated soils from different lokacions in Jordon. *App. Soil. Ecology*.
- Santamaria, M., Corzo, J., Barrios, M.L., Navarro, A.M.G., 1997. Charactersation and differentiation of indigenous *Rhizobia* izolated from Canarian shrub legumes of agricultural and ecological interest. *Plant and Soil*, 143-152.
- Sardesai, N., Babu, C.R., 2001. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism is affected by changes in respiratory enzymatic activities due to cold stress in two psychrotrophic strains of *Rhizobium*. *Current Microbiology*,42: 53-58.
- Sarıoğlu, G., 1994. Biyolojik azot tespiti. *Kükem Dergisi*, 17 (2): 17-21.
- Sarıoğlu, G., Özçelik, S., Kaymaz, S., 1993. Elazığ ve yöresinde üretilen mercimek bitkilerindne etkili nodozite bakterileirinin(*Rhizobium legimunaosarum biovar viceae*) seçimi. *Doğa Tr. J. Of Agricultural and Forestry*, 17: 569-573
- Schiffmann, J. And Alper Y., 1968. Inoculation of peanuts by application of *Rhizobium* suspension into the planting furrows. *Expl. Agri.*, 4: 219-226.
- Scholla, M. H., and G. H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. Nov.. a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 484-486
- Schripsema, J., De Rudder, K.E.E., Van Vliet, T.B., Lankhorst, P.P., De Broom, E., Kijne, J.W., van Brussel, A.A.N., 1996. Bacteriocin samall of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of n-acyl-l-homoserine lactone molecules, dnown as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. *Journal Bacteriology*,178 (2):366-371. (Abstract).
- Segovia, L., Young, J. P. W., and Martínez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43 (2): 374–377.
- Shantharam, S., Mattoo, A.K., 1997. Enhancing biological nitrogen fixation: An appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. *Plant and Soil*,194: 205-216.

- Silva, Claudia., Vinuesa, P., Equiarte, E.L., Martinez-Romero, E., Souza, V., 2002. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a Traditionally Managed Milpa Plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2):884-893.
- Silva. C., Vinuesa P., L. E. Eguiarte, Martinez-Romero E, and Souza V. 2003. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population genetics and biogeographic implications. *App. And. Envi. Microbiology*, p. 884-893
- Sloger, C., 1969. Symbiotic effectiveness and N<sub>2</sub> fixation in nodulated soybean. *Plant Physiol*, 44, 1666-1668
- Somasegaran, P. and Hoben, H. J., 1985. Methods in legume *Rhizobium* technology. Library of Congress Number 87-106-109 Hawaii, p.1-52
- Somasegaran, P., Hoben H.J and Gurgun V., 1988. Effects of inoculations rate, rhizobial competition, and nitrogen fixation in chickpea. *Agron. J.*, 80, 68-73.
- Sommer, C., Bramm, A., 1981. Attempts of irrigation control according to plant physiological criteria. A Paper Presented in 9<sup>th</sup> International Congress of Biometeorology from September 23 to October 1, Stuttgart-Hohenheim.
- Spaink, H. P., A. Kondorosi, and P. J. J. Hoyykaas. 1998. *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Spaink, H.P., 2001. The molecular basis of the host specificity of *Rhizobium* bacteria Tan, z.Y., Xu, X.D., Wang, E.T., Gao, T.L., Romero, E.M., Chen, W.X., 1997. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related *Rhizobia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (3): 874-879.
- Squartini, A., Struffi, P., Döring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velázquez, E., Mateos, P. F., Martínez- Molina, E., Dazzo, F. B., Casella, S., and 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 (4): 1267–76.
- Stackebrandt, E. ve Goebel, B.M., Taxonomic Note: A Place for DNADNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 (1994) 846-849.

- Şehirali, S., 1988. **Yemeklik Dane Baklagiller**. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay. NO: 1089, Ders Kitabı No:314, Ankara.
- Taiz, L. and Zeiger E., 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Pub. Con. Inc., California, 405-421.
- Tamimi, S.M., Young, J.P.W., 2004. *Rhizobium* etli is the dominant common bean nodulating rhizoba in cultivated soils from different locations in Jordan. ***Applied Soil Ecology***, 30: 1-8
- Tan, Z. Y., Kan, F. L., Peng, G. X., Wang, E. T., Reinhold-Hurek, B., and 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 (3): 909–914.
- Toledo, I., Lloret, L., and Martínez-Romero, E. 2003. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. ***Systematic and Applied Microbiology***, 26 (1): 54–64.
- Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.-M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., and Velazquez, E. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. ***Applied and Environmental Microbiology***, 71 (3): 1318–1327.
- Uçar, F. ve Öner, M., 1988. Nohut kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* suşlarının morfolojik ve biyokimyasal karakterleri. ***Doğa Tu Biyol*** (Genetik, Mikrobiyoloji, Moleküler Biyoloji, Sitoloji) 12 (2):135-141
- URL1: . <http://rulbim.leidenuniv.nl/~spaink/ANTONOVA1.html>.
- URL2: A quick *Rhizobium* primer, <http://sciborg.uwaterloo.ca/~tcharles/rhizbium.html>.
- Ülgen, H., 1975. Baklagil bitkilerinin nodül bakterileri (*Rhizobium*) ile aşılınması. Ankara Toprak ve Gübre Araşt. Enst. Müd. Yay., Genel Yay. No: 56, Teknik Yay. No: 40, Ankara, 1-34.
- Ülgen, H., 1975. **Baklagil bitkilerinin nodül bakterileri ile aşılınması**. T.C Köyişleri Bakanlığı, Topraksu Genel Müdürlüğü, Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü. Genel Yay. No:56. Teknik Yay. No:40. Ankara
- Ülgen, H., 1980. **Bakteri Kültürü ve Aşılamanın Baklagil Bitkilerin Ürün Miktrına ve Azot Kapsamına Etkisi**. Köy İşleri Bakanlığı, Toprak su Genel müdürlüğü. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü, Yayın No:94, Ankara.
- Valverde, A., Velazquez, E., Gutierrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., and Igual, J.-M. 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium

- associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53 (6): 1979–1983.
- van Berkum, P., Beyene, D., Campbell, T. A., Bao, G., and 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 (1): 13–22.
- van Brussel, A.A.N., Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Pees, E. And Lugtenberg, B.J.J., 1985. Bacteriocin small of fast-growing *Rhizobia* is chloroform soluble and is not required for effective nodulation. **Journal of Bacteriology**, 162 (3):1079-1082.
- van Rhijn, P., Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*–plant symbiosis. **Microbiological Reviews**, 59(1): 124–142
- Vandamme, P. and Coenye, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54 (6): 2285–2289.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W. M., de Vos, P., and Willems, A. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, 25 (4): 507–12.
- Velázquez, E., Igual, J. M., Willems, A., Fernández, M. P., Muñoz, E., Mateos, P. F., Abril, A., Toro, N., Normand, P., Cervantes, E., Gillis, M., Martínez-Molina, E. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51 (3): 1011–1021.
- Vincent, J.M., 1970. *A practical manual for the study of root nodule bacteria*, **International Biological Program Handbook 15**. Blacwell publisher, Oxford.
- Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F., Werner, D., 1998. Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* Strains nodulating Endemic Woody Legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Genes Encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA Intergenic Spacers, Repetitive EXtragenic Palindromic PCR Geneomic Fingerprinting, and Partial 16S rDNA Sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, 64 (6):2096-2104.
- Vinuesa, P., Silva, C., Martínez-Romero, E., Werner, D., León-Barrios, M., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., and Willems, A. 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium*

- japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 55 (2): 569–575.
- Vouillot, M. O., Huet, P. and Boissard, P., 1998. Early detection of N deficiency in a wheat crop using physiological and radiometric methods. ***Agronomic***, 18: 117-130
- Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Fernández-López, M., Reinhold-Hurek, B., and Martínez-Romero, E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 52 (5): 1687–1693.
- Wang, E. T., van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X. H., Dorado, O., Chen, W. X., and Martínez-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 (3): 687–699.
- Wang, E. T., van Berkum, P., Sui, X. H., Beyene, D., Chen, W. X., and Martínez-Romero, E. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 49 (1): 51–65.
- Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z., and 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 (5): 1575–1583.
- Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., and 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 (6): 2231–2239.
- Wilson, R.A., Handley, B.A. and Beringer, J.E., 1998. Bacteriocin production and resistance in a field population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. ***Soil Biology and Biochemistry***, 30 (3): 413-417.
- Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., and Fan, H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, 45 (4): 706–711.

- Yao, Z. Y., Kan, F. L., Wang, E. T., Wei, G. H., and Chen, W. X. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 52 (6): 2219–2230.
- Young, J. M. 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination ‘*Sinorhizobium adhaerens*’ (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an opinion. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 53 (6): 2107–2110.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., and Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *AlloRhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 51 (1): 89–103.
- Young, J. P. W., Haukka, K.E., 1996. Diversity and phylogeny of *rhizobia*. ***New Phytologist***, 133: 87-94
- Zahran, H.H., 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. ***Journal of Biotechnology***, 91 (2-3):143-153

**EK:1****1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Ortamlar****1.1 Yeast mannitol agar (Vincent, 1970)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
NaCl	0,1 g
Mannitol	10 g
Yeast Extract	1 g
Agar	15 g
Saf su	1000 ml
PH	6,8-7

121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

**1.2 Ketolaktoz ortamı (Çakmakçı, 1987)**

Laktoz	10 g
Maya ekstraktı	10 g
Agar	20 g
Saf su	1000 ml

121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

**1.3 Pepton glukoz agar(Gibbs ve Shapton, 1968)**

Kazein pepton	10 g
D(+) glukoz	5 g
Bromkresol purpur	0,04 g
Agar	12 g
Saf su	1000 ml
PH	7,2

121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

**1.4 Brom thymol blue (Yao ve Vincent, 1970)**

Bromo thymol blue            0,5 g

Etil alkol                        100 ml

121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

1 litre YMA ortamına 5 ml eklenir.

**1.5 Kongo kırmızı (Vincent, 1970)**

Kongo kırmızı                2,5 g

Saf su                            100 ml

121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. %0,25 suda çözülmüş 10 ml karışım 1 litre

YMA ortamına eklenir.

**EK:2 Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Çözelti ve Tamponlar**

DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar:

**1. TBE buffer (10X)**

Tris	108 gr
EDTA	7,44 g
Borik asit	55 gr
Saf su	1 lt

Not: Kullanılırken 1X'e kadar seyreltilir.

**2. TE Buffer solusyonu**

1 M Tris (pH:8)	20 ml
0,5 M EDTA	200µl
Saf su	1 litreye tamalanır

**3. DNA Yükleme Boyası**

Sukroz	30gr;
Bromofenol Blue	10 mg
EDTA(0,5)	20 ml
Saf su ile	100 ml'ye tamamlanır.

**4. Fenol:kloroform:izoamilalkol Solusyonun hazırlanışı**

500 gr fenol tinalizasyon yöntemi ile eritilir ve üzerine aynı hacimde % 1'lik hidroksi kinolin eklenir. Bunun üzerine 0,5 M Tris-CI (pH:8) aynı miktarda eklenerek magnetik karıştırıcı ile 15 dakika karıştırılır. İkili faz oluncaya kadar devam edilir ve süpernatant atılır. Atılan süpernatant kadar yine 0,1 M Tris-CI (pH:8) eklenerek magnetik karıştırıcı ile 15 dakika karıştırılır ve süpernatant atılır. Geriye kalan solusyon +4°C'de depolanır.

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Şanlıurfa/Suruç ilçesinin Kübükmamı köyünde doğdum. Ailem 1986 yılında ekonomik nedenlerden dolayı Gaziantep iline taşındı.

1991 yılında Gaziantep/Şehitkamil ilçesine bağlı Sadettin Batmazoğlu ilkokulunu bitirdim. 1995 yılında Gaziantep/Şehitkamil ilçesine bağlı Arif Nihat Asya Lisesi'nde ortaokulu öğrenimimi tamamladım. 1998 yılında Gaziantep/Şehitkamil ilçesine bağlı Arif Nihat Asya Lise'sinde ortaöğrenimimi tamamladım. 2000 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2004 yılında Biyoloji bölümünde Biyolog olarak mezun oldum. 2004 yılının Eylül ayında Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrencisi olarak başladım. 2004-Kasım ayında TÜBİTAK tarafından desteklenen TBAG2344 (103T156) nolu "Bazı zirai bitki türlerinin kök ve çevresinde alınan toprak numunelerinde Actinomycetales'in bazı cinslerine ait bakterilerin izalasyonu ve Streptomyces türlerinin karakterizasyonu, teşhisi ve biyoçeşitliliğinin tespiti" adlı araştırma projesinde yardımcı eleman olarak görev aldım. 2005-Nisan ayında "Van Gölü Havzası'ndan toplanan yabancı baklagil bitkilerin köklerinde *Rhizobium* bakterisi türleri ile arbusküler mikorizal (AM) fungus türlerinin izole edilmesi ve bu izolatların kültür bitkilerinde simbiyotik karakterlere ve bitki gelişmesine etkilerinin araştırılması" isimli ve 2005-DPT-ZF1 nolu araştırma projesinde yardımcı personel olarak görev aldım.