

**ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE BAZI
İLLERDE YETİŞTİRİLEN BAKLA,
FASULYE ve BEZELYE BİTKİLERİNİN
RHİZOBİYAL SİMBİYONTLARININ
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ**

CEM TOLGA GÜRKANLI

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu doktora tez çalışması Ondokuz Mayıs
Üniversitesi F-463 numaralı proje
kapsamında desteklenmiştir**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE BAZI İLLERDE YETİŞTİRİLEN BAKLA,
FASULYE ve BEZELYE BİTKİLERİNİN RHİZOBİYAL SİMBİYONTLARININ
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ**

CEM TOLGA GÜRKANLI

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN

PROF. DR. İBRAHİM ÖZKOÇ

SAMSUN-2010

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından / / tarihinde yapılan sınav ile
..... Anabilim
Dalı'nda YÜKSEK LİSANS / DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... / / 2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE BAZI İLLERDE YETİŞTİRİLEN BAKLA, FASULYE ve BEZELYE BİTKİLERİNİN RHİZOBİYAL SİMBİYONTLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ

ÖZET

Bu çalışmada Samsun, Sinop, Ordu ve Amasya illerinde yetiştirilen bakla (*V. faba* L.), bezelye (*P. sativum* L.) ve fasulye (*P. vulgaris* L.) bitkilerinin kök nodüllerinden izole edilen Rhizobia grubu bakterilerin teşhisi ve bu izolatların içerdikleri nodülasyon ve azot fiksasyon genlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla belirtilen illerden, farklı ilçeleri temsil edecek şekilde 30 bakla, 30 bezelye ve 30 fasulye olmak üzere toplam 90 Rhizobia izolatı elde edilmiştir. İzolatların ön gruplamaları 16S rDNA PZR-RFLP analizi ile yapıldıktan sonra, temsilci izolatların 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* baz dizileri belirlenmiş ve filogenetik analizleri yapılmıştır.

16S rDNA ve *recA* filogenileri sonucunda, bakla ve bezelye'den elde edilen izolatların tümü *R. leguminosarum* bv. *viciae* ile ilişkili bulunurken, fasulye'den izole edilen izolatlar *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* bv. *phaseoli*, *R. phaseoli* türleri ile ilişkili olarak bulunmuştur. Ayrıca analizlerde bu kromozomal genlerin farklı Rhizobiyal türler arasında lateral olarak transfer edildiğine dair kanıtlar da elde edilmiştir. Bu tez Türkiye de Rhizobia grubu bakterilerin moleküler olarak teşhisine yönelik ilk çalışma olması nedeniyle bu türlerin de Türkiye'den ilk kayıtlarını barındırmaktadır.

NodA ve *nifH* baz dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizlerde fasulye'den elde edilen *R. leguminosarum* izolatları ve yine bu bölgede bulunan fakat orijinal olarak Güney Amerika kökenli olan *R. etli* veya *R. phaseoli* izolatları arasında simbiyotik plazmitlerin (*pSym*) lateral olarak transfer edildiğine dair güçlü veriler elde edilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada, daha önceki çalışmalarda nodülasyon testleri ile ileri sürülen, bakla ve belirli *Rlv* popülasyonları arasındaki özgünlüğe dair ilk moleküler kanıtlar da bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Rhizobium*, *nodA*, *nifH*, filogeni

**GENETIC VARIATION OF RHIZOBIAL SYMBIONTS OF FABA BEAN,
COMMON BEAN AND PEAS GROWN IN SOME PROVINCES IN MIDDLE
BLACK SEA REGION**

ABSTRACT

In this study we aimed to identify the Rhizobia isolated from the root nodules of Faba Bean (*V. faba* L.), Peas (*P. sativum* L.) ve Common Bean (*P. vulgaris* L.) grown in Samsun, Sinop, Ordu and Amasya provinces and to determine their nodulation and nitrogen fixation genes.

For this aim we collected 30 Faba Bean, 30 Peas and 30 Common Bean, totally 90 Rhizobia isolates representing different districts of the stated provinces. After we made the pregrouping of the isolates with 16S rDNA PCR-RFLP analysis, we determined the base sequences of 16S rDNA, *recA*, *nodA* and *nifH* genes and performed the phylogenetic analysis for representative isolates.

At the results of 16S rDNA and *recA* phylogenies, all isolates obtained from Faba Bean and Peas were found to be related with *R. leguminosarum* bv. *viciae* while isolates from Common Bean were found to be related with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* bv. *phaseoli*, *R. phaseoli* species. Besides, in analysis we obtained some evidences indicating that these chromosomal genes were transferred among different Rhizobial species. Because of being the first study to identify the Rhizobia in Turkey with using molecular techniques this thesis contains the first reports of these species from Turkey.

In the phylogenetic analysis done with using the *nodA* and *nifH* base sequences we determined strong evidences for lateral transfer of the symbiotic plazmids (*pSym*) between the *R. leguminosarum* isolates obtained from Common Bean and *R. etli* or *R. phaseoli* isolates also obtained from here but originated from South America.

Additionally in this study, we determined the first molecular evidences for the specificity between Faba Bean and certain *Rlv* populations, which was suggested in previous studies with some nodulation tests.

Key words: *Rhizobium*, *nodA*, *nifH*, phylogeny

TEŞEKKÜR

Sekiz yıllık akademik yaşantım süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve her konuda yardım eden hocam sayın Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a,

Tez çalışmam sırasında hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sevgili eşim Araş. Gör. İrem GÜRKANLI'ya,

Beni bu dünyaya getiren ve bir bilim insanı olmam konusunda her zaman cesaretlendirip, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Nuriye GÜRKANLI, babam Prof. Dr. Ahmet Turan GÜRKANLI ve kardeşim Emre GÜRKANLI'ya,

Bilgi ve tecrübesine sıklıkla baş vurduğum sayın Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ ve Doç. Dr. Erkut PEKŞEN'e,

Laboratuarını bana açarak bu çalışmada kullandığım teknikleri bana sabırla öğreten İngiltere York Üniversitesinden sayın Prof. Dr. Peter J.W. Young ve Dr. Cyril Bontemps'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Rhizobia'nın Tanımı.....	5
2.2. Kök Nodül Bakterilerinin Sınıflandırılmasındaki Gelişmeler.....	5
2.3. Rhizobia İzolatlarının Teşhis ve Sınıflandırılmasında Kullanılan Yöntemler.....	13
2.4. Nodülasyon Süreci ve Genetik Temelleri.....	14
2.4.1. Nodülasyon (nod) Faktörleri ve Sentezlenmesinde Rol Oynayan Genler.....	14
2.4.2. Baklagil Rhizobium Özgüllüğünü Sağlayan Diğer Faktörler.....	18
2.4.3. Kök Nodül Oluşumunun Basamakları.....	19
2.5. Azot Fiksasyon Süreci ve Genetik Temelleri.....	24
2.5.1. Nitrojenaz Enzimi ve Yapısı.....	24
2.5.2. Azot Fiksasyonu İle İlgili Genler.....	26
2.5.3. Azot Fiksasyonun da Elektron Akış Basamakları.....	27
2.6. Konukçu Bitkiler Olarak Bakla, Bezelye, Fasulye ve Rhizobiyal Simbiyontları.....	28
3. MATERYAL ve METOT.....	36
3.1. Örnekleme ve Bitki Örneklerinin Toplanması.....	36
3.2. Kök Nodüllerinden Rhizobium İzolasyonu.....	37
3.3. Geleneksel Yöntemler ile Kök Nodül Bakterilerinin Ön Teşhisleri.....	38
3.3.1. Gram Boyama.....	38
3.3.2. Brom-Cresol Purple İçeren Pepton Glukoz Agarda Gelişim.....	39
3.3.3. Nodülasyon (Otantikasyon) Testi.....	39
3.4. Moleküler Yöntemler ile Kök Nodül Bakterilerinin Tanımlanması.....	40

3.4.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu.....	40
3.4.2. RFLP Analizi İçin 16S rDNA Amplifikasyonu.....	42
3.4.3. 16S rDNA-RFLP Analizi İçin PZR Amplifikasyon Ürünlerinin Saflaştırılması.....	42
3.4.4. 16S rDNA-RFLP (Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi) Analizi.....	43
3.4.5. DNA Dizileme İçin 16S rDNA Amplifikasyonu.....	44
3.4.6. <i>recA</i> Amplifikasyonu.....	45
3.4.7. <i>nodA</i> Amplifikasyonu.....	45
3.4.8. <i>nifH</i> Amplifikasyonu.....	47
3.4.9. İzole edilen genomik DNA'ların ve PZR Ürünlerinin Elektroforetik İncelenmeleri.....	48
3.4.10. 16S rDNA, <i>recA</i> , <i>nodA</i> ve <i>nifH</i> Genleri İçin DNA Dizileme.....	49
3.4.11. DNA Dizilerinin İşlenmesi ve Filogenetik Analizler.....	49
3.5. Kullanılan Çözeltiler ve Besi Yerleri.....	57
3.5.1. Asitleştirilmiş Civa Klorür (% 0.1).....	57
3.5.2. Yeast Ekstrakt Mannitol Agar (YMA).....	57
3.5.3. Gliserol Stok (%20).....	57
3.5.4. Kristal Viyole.....	57
3.5.5. Gram İyodin Çözeltisi.....	58
3.5.6. Alkol-İyot Karışımı.....	58
3.5.7. Safranin.....	59
3.5.8. Brom-Cresol Purple İçeren Pepton Glukoz Agar.....	59
3.5.9. Fide Agar.....	59
3.5.10. NaOCl (%1'lik).....	60
3.5.11. Su Agarı.....	60
3.5.12. Fide Solüsyonu.....	60
3.5.13. Yeast Extract Mannitol Broth (YMB).....	61
3.5.14. Trypton Yeast Ekstrakt (TY).....	61
3.5.15. Tris-Cl.....	61
3.5.16. EDTA (0.5 M) pH 8.....	61
3.5.17. 10X Tris-EDTA (TE) tamponu, pH 8.....	61
3.5.18. %10'luk SDS.....	62

3.5.19. ProteinazK (20 mg/ml).....	62
3.5.20. NaCl (5 M).....	62
3.5.21. CTAB (Setil trimetil amonyum bromür)/NaCl.....	62
3.5.22. Kloroform/izoamil alkol (24:1).....	62
3.5.23. Etanol (%70).....	62
3.5.24. 30 mg/ml RNaz (RibonükleazA).....	63
3.5.25. 3M pH 5.2 Sodyum Asetat (NaAC).....	63
3.5.26. TBE (Tris-Borat-EDTA).....	63
3.5.27. Ethidium-Bromür.....	63
4. BULGULAR.....	64
4.1 Örnekleme ve Kök Nodüllerinden Rhizobium İzolasyonu.....	64
4.2 Geleneksel Yöntemler ile Kök Nodül Bakterilerinin Ön Teşhisleri.....	65
4.2.1 Gram Boyama.....	65
4.2.2 Brom-Cresol Purple İçeren Pepton Glukoz Agarda Gelişim.....	65
4.2.3 Nodülasyon (Otantikasyon) Testi.....	66
4.3 Moleküler Yöntemler ile Kök Nodül Bakterilerinin Tanımlanması.....	72
4.3.1 Rhizobia İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu.....	72
4.3.2 16S rDNA-RFLP Analizi için Rhizobia İzolatlarından 16S rDNA Amplifikasyonu.....	73
4.3.3 16S rDNA PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	74
4.3.4 RFLP Analizleri ile Rhizobium İzolatlarının Ön Gruplaması.....	75
4.3.4.1 Bezelye'den İzole edilen Rhizobium Örneklerinin 16S rDNA- RFLP ile Ön Gruplaması.....	75
4.3.4.2 Bakla'dan İzole edilen Rhizobium Örneklerinin 16S rDNA-RFLP ile Ön Gruplaması.....	75
4.3.4.3 Fasulye'den İzole edilen Rhizobium Örneklerinin 16S rDNA- RFLP ile Ön Gruplaması.....	76
4.3.5 16S rDNA Dizileme Analizleri.....	82
4.3.6 <i>recA</i> DNA Dizileme Analizler.....	90
4.3.7 <i>nodA</i> DNA Dizileme Analizleri.....	97
4.3.8 <i>nifH</i> DNA Dizileme Analizleri.....	105
4.3.9 16S rDNA- <i>recA</i> Birleştirilmiş Filogeni.....	112
5. TARTIŞMA.....	113

6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	127
7. LİTERATÜRLER.....	132
ÖZGEÇMİŞ.....	159

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ

Nod faktör	Nodülasyon faktörü
<i>pSym</i>	Simbiyotik plazmit
T_m	Melting Temperature-Erime Sıcaklığı
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
FAME	Fatty Acids Methyl Esters (Yağ Asidi Metil Esterleri)
Rep-PZR	Repetitif PZR
RFLP	Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi
LCO	Lipo-Kito Oligosakkarit
Sym Genleri	Simbiyotik Genler
Nif Genleri	Azot fiksasyon genleri
<i>Rlv</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonları
Biovar (bv.)	Biyolojik Varyete
İndel	İnsersiyon-Delesyon
AIC	Akaike Information Criterion
BIC	Basian Information Criterion
NJ	Neighbor-Joining
ML	Maksimum-Likelihood
MP	Maksimum-Parsimony
CI	Consistency indeks
RI	Retention indeks
HI	Homoplasy indeks
ILD	Incongruence Length Difference
bç	Baz çifti
I	Proportion of invariable sites
G	Gamma distrubition

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1	Kök nodül bakterilerinin <i>Bacteria</i> domaini içerisinde sınıflandırıldığı familyalar ve cinsler	12
Şekil 2.2	Rhizobia tarafından salgılanan nod faktörlerinin genel kimyasal yapısı (Spaink, 2000).....	15
Şekil 2.3	Nod faktörlerinin sentezlenmesini uyaran moleküler süreç (Campbell ve ark., 2006).....	20
Şekil 2.4	Shepherd kancası (Brewin, 2004).....	21
Şekil 2.5	Rhizobiyal hücrelerin kök korteks hücreleri içerisine geçişi ve bacteroid oluşumu (Brewin 2004).....	22
Şekil 2.6	Rhizobia’da nodülasyon süreci (http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium.pdf , 18.12.2009).....	23
Şekil 2.7	Dinitrojenaz enziminin yapısı (Dixon ve Kahn, 2004).....	25
Şekil 2.8	Nitrojenaz enzim aktivitesinin şematik mekanizması, (Dixon ve Kahn, 2004).....	28
Şekil 3.1.	Samsun, Sinop, Ordu ve Amasya illerinden Örneklem yapılan ilçeler. Farklı renklerdeki kutular her bir ilde örneklem yapılan ilçeleri göstermektedir (Kırmızı: Samsun, Mavi: Ordu, Yeşil: Sinop, Kahverengi: Amasya).....	37
Şekil 3.2	16S rDNA dizilemesi için kullanılan primerler ve bağlandığı bölgeler.....	45
Şekil 4.1	Sırasıyla fasulye ve bakla kök nodüllerinden izole edilen (A) CTG-412 (<i>Rhizobium phaseoli</i>), (B) CTG-59 (<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>), izolatlarının YMA ortamındaki koloni görünüşleri.....	64
Şekil 4.2	(A) Fasulye’den izole edilen <i>Rhizobium phaseoli</i> (CTG-412) izolatının Gram boyama sonucu 10x100’lük büyütmedeki mikroskopik görüntüsü (B) Bakla’dan izole edilen <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (CTG-59) izolatının Gram boyama sonucu 10x100’lük büyütmedeki mikroskopik görüntüsü.....	65
Şekil 4.3	Brom-Cresol Purple içeren PGA ortamına aşılınmış ve 28 °C’de 48 saat inkübe edilmiş bir kontaminantın ve bir Rhizobia (<i>R. phaseoli</i>) izolatının (CTG-412) gelişimi.....	66

Şekil 4.4	(a) Fasulye'den izole edilen Rhizobia izolatları için yapılan bir nodülasyon denemesi, (b) CTG-403 izolatının fasulye kökünde oluşturduğu aktif nodüller, (c) CTG-403 izolatının fasulye kökünde oluşturduğu aktif bir determinate nodülün iç yapısı	66
Şekil 4.5	(a) Bakla'dan izole edilen Rhizobia izolatları için yapılan bir nodülasyon denemesi, (b) Bakla'dan izole edilen CTG-59 izolatının bakla kökünde oluşturduğu aktif nodüller, (c) CTG-59 izolatının bakla kökünde oluşturduğu aktif bir indeterminate nodülün iç yapısı.	67
Şekil 4.6	(a) Bezelye'den izole edilen Rhizobia izolatları için yapılan bir nodülasyon denemesi, (b) Bezelye'den izole edilen CTG-1 izolatının bezelye kökünde oluşturduğu aktif nodüller, (c) CTG-1 izolatının bezelye kökünde oluşturduğu aktif bir indeterminate nodülün iç yapısı	68
Şekil 4.7	(a) Bezelye'den izole edilen CTG-1 izolatının bezelye kökünde oluşturduğu aktif (pembe renkli) nodüller, (b) CTG-1 izolatının bakla kökünde oluşturduğu aktif (pembe renkli) fakat küçük nodüller	68
Şekil 4.8	Bakla'dan izole edilen Rhizobia izolatlarına ait genomik DNA örnekleri: Markör (Amresco 1 kb DNA Ladder), CTG-12, -17, -23, 29, 59, 68, 107, 303, 307, 308, 309, Markör (Amresco 1 kb DNA Ladder).....	72
Şekil 4.9	Bezelye'den izole edilen bazı Rhizobia izolatlarına ait 16S rDNA amplifikasyon ürün örnekleri: Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder), CTG-13, -46, -74, -78, -110, -202, -209, -211, -212, -213, Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder).....	73
Şekil 4.10	Bezelye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin saflaştırılmış 16S rDNA amplifikasyon ürünleri: Üst sıra: Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder), CTG-1, 25, 32, 18, 13, 5, 9, 201, Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder), 36, 64, 202, 46, 211, 110, 212, 213, Alt sıra: Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder), CTG-78, 76, 73, 74, 209, 210, 109, 114, Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder), 205, 206, 204, 203, 207, 208.....	74

- Şekil 4.11** Sinop ve ilçelerinden toplanan bezelye bitkilerinden izole edilen kök nodül bakterileri (CTG-78, -76, -73, -74, -209, -210, -109, -114) için sırasıyla *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilen RFLP şablonları..... 78
- Şekil 4.12** Ordu ve ilçelerinden toplanan bakla bitkilerinden izole edilen kök nodül bakterileri (CTG-2, -23, -29, -17, -12, -6, -307, -308) için sırasıyla *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilen RFLP şablonları..... 79
- Şekil 4.13** Samsun ve ilçelerinden toplanan fasulye bitkilerinden izole edilen kök nodül bakterileri (CTG-409, -410, -411, -412, -413, -414, -415, -416) için sırasıyla *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilen RFLP şablonları ve Sinop'tan fasulye nodüllerinde izole edilen kök nodül bakterileri (CTG-418, -419, -420, -421, -422, -423, -424) için *PstI* restriksiyon enzimi kullanılarak elde edilen RFLP şablonu..... 80
- Şekil 4.14** DNA dizileme için seçilen bezelye *Rhizobium* izolatlarından **A)** fD1(pA')/pF' ve **B)** fD1(pA')/rD1 primer çiftleri kullanılarak yapılan 16S rDNA amplifikasyon ürünleri, (soldan sağa: Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder, CTG-1, -13, -74, -110, -114, -202, -203, -205)..... 82
- Şekil 4.15** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve veri tabanından indirilen baklagil simbiyontlarının (Çizelge 3.4) kısmi 16S rDNA dizilerine bağlı filogenetik ilişkilerini gösteren ağaç. Bu ağaç HKY+I (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak Neighbor-Joining algoritmasına göre çizilmiş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir 86
- Şekil 4.16** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve veri tabanından indirilen baklagil simbiyontlarının (Çizelge 3.4) kısmi 16S rDNA dizilerine bağlı filogenetik ilişkilerini gösteren ağaç. Bu ağaç HKY+I (Dış Grup Dahil) baz değişim modeli

- kullanılarak Maksimum-Likelihood algoritmasına göre çizilmiş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir..... 87
- Şekil 4.17** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.4'de belirtilen 16S rDNA haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizi sonucu oluşturulan eşit uzunluktaki 126 ağacın strict konsensüs ağacı. Bu ağaç üzerinde sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir..... 88
- Şekil 4.18** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.4'de belirtilen 16S rDNA haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizi sonucu oluşturulan eşit uzunluktaki 126 ağacın %50 Majority Rule konsensüs ağacı. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir.... 89
- Şekil 4.19** DNA dizileme için seçilen bezelye izolatlarından *recA* amplifikasyon ürünleri: soldan sağa: Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder, CTG-1, -13, -74, -110, -114, -202, -203, -205..... 90
- Şekil 4.20** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.5'de belirtilen *recA* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Neighbor-Joining ağacı. Bu ağaç HKY+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir ... 93

- Şekil 4.21** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.5’de belirtilen *recA* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Likelihood ağacı. Bu ağaç HKY+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir ... 94
- Şekil 4.22** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.5’de belirtilen *recA* haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizi sonucu oluşturulan eşit uzunluktaki 1461 ağacın strict konsensüs ağacı. Bu ağaç üzerinde sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir 95
- Şekil 4.23** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.5’de belirtilen *recA* haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizi sonucu oluşturulan eşit uzunluktaki 1461 ağacın %50 Majority Rule konsensüs ağacı. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir.... 96
- Şekil 4.24** (a) DNA dizileme için seçilen *Rhizobium* bakla izolatlarından (CTG-23, -35, -40, -59, -68, -301, -303, -308) *nodA1/nodA2* primer çifti kullanılarak yapılan *nodA* amplifikasyon ürünleri.
(b) 1. PZR amplifikasyon ürünlerinden kesilen bantların (kare içerisinde) kalıp olarak kullanıldığı 2. PZR amplifikasyonunun ürünleri. Bu ürünler DNA dizileme için kullanılmıştır 97
- Şekil 4.25** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.6’da belirtilen *nodA* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Neighbor-Joining ağacı. Bu ağaç HKY+G (Dış grup hariç) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma

noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir.... 101

Şekil 4.26 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.6'da belirtilen *nodA* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Likelihood ağacı. Bu ağaç TPMuf2+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir.... 102

Şekil 4.27 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.6'da belirtilen *nodA* haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizleri sonucunda elde edilen eşit uzunluktaki 15 ağacın Strict konsensüs ağacı. Bu ağaç üzerinde sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir..... 103

Şekil 4.28 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.6'da belirtilen *nodA* haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizleri sonucu elde edilen eşit uzunluktaki 15 ağacın %50 Majority Rule konsensüs ağacı. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir.... 104

Şekil 4.29 (A) DNA dizileme için seçilen bazı *Rhizobium* bakla ve bezelye izolatlarından (BIORON 100 bp DNA Ladder, CTG-68, -203, -205) *nifHI/nifHctg* primer çifti kullanılarak yapılan *nifH* amplifikasyon ürünleri.
(B) CTG-403, CTG-407, CTG-416 ve CTG-430 izolatlarından *nifHF/nifHI* primerleri kullanılarak yapılan *nifH* amplifikasyon ürünleri (Bant kesme sonrası 2. PZR)..... 105

- Şekil 4.30** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* örneklerinin ve Çizelge 3.7’de belirtilen *nifH* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Neighbor-Joining ağacı. Bu ağaç TIM3ef+G (Dış grup Dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir..... 108
- Şekil 4.31** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* örneklerinin ve Çizelge 3.7’de belirtilen *nifH* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Likelihood ağacı. Bu ağaç TIM3ef+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir..... 109
- Şekil 4.32** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* örneklerinin ve Çizelge 3.7’de belirtilen *nifH* haplotiplerinin Parsimony analizleri sonucunda elde edilen eşit uzunluktaki 2 ağacın Strict konsensüs ağacı. Bu ağaç üzerinde sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir..... 110
- Şekil 4.33** Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* örneklerinin ve Çizelge 3.7’de belirtilen *nifH* haplotiplerinin parsimony analizleri sonucu elde edilen eşit uzunluktaki 2 ağacın %50 Majority Rule konsensüs ağacı. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir..... 111

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1	Nod faktörlerinin sentezlenmesinde ve salgılanmasında görev alan farklı genler (Krishnan ve Bennett, 2006).....	16
Çizelge 3.1	Bakla, bezelye ve fasulye Bitki örneklerinin toplandığı il ve ilçeler.....	36
Çizelge 3.2	16S rDNA PZR-RFLP analizlerinde kullanılan restriksiyon enzimleri için kullanılan reaksiyon karışımları.....	43
Çizelge 3.3	16S rDNA, <i>recA</i> , <i>nodA</i> ve <i>nifH</i> genlerinin DNA dizilemeleri için kullanılan primerler.....	49
Çizelge 3.4	Filogenetik analizlerinde kullanılan Rhizobium izolatlarının 16S rDNA erişim numaraları.....	52
Çizelge 3.5	Filogenetik analizlerinde kullanılan Rhizobium izolatlarının <i>recA</i> erişim numaraları.....	53
Çizelge 3.6	Filogenetik analizlerinde kullanılan Rhizobium izolatlarının <i>nodA</i> erişim numaraları.....	55
Çizelge 3.7	Filogenetik analizlerinde kullanılan Rhizobium izolatlarının <i>nifH</i> erişim numaraları.....	56
Çizelge 4.1	Bezelye (<i>P. sativum</i> L.) köklerinden alınan nodüllerden izole edilen Rhizobia izolatlarının kodları ve bitki örneklerinin toplandıkları lokaliteler	70
Çizelge 4.2	Bakla (<i>V.faba</i> L.) köklerinden alınan nodüllerden izole edilen Rhizobia izolatlarının kodları ve bitki örneklerinin toplandıkları lokaliteler	70
Çizelge 4.3	Fasulye (<i>P. vulgaris</i> L.) köklerinden alınan nodüllerden izole edilen Rhizobia izolatlarının kodları ve bitki örneklerinin toplandıkları lokaliteler	71
Çizelge 4.4	16S rDNA, <i>recA</i> , <i>nodA</i> ve <i>nifH</i> DNA dizilemeleri için seçilen Rhizobia izolatları.....	81
Çizelge 4.5	16S rDNA veri seti için yapılan AIC ve BIC testlerinin sonuçları..	83
Çizelge 4.6	<i>recA</i> veri seti için yapılan AIC ve BIC testlerinin sonuçları.....	91
Çizelge 4.7	<i>nodA</i> veri seti için yapılan AIC ve BIC testlerinin sonuçları.....	98
Çizelge 4.8	<i>nifH</i> veri seti için yapılan AIC ve BIC testlerinin sonuçları.....	106

Çizelge 4.9	<i>R. leguminosarum</i> ile ilişkili izolatlar için ILD test sonuçları	
	*Orijinal ağacın uzunluğu.....	112
Çizelge 4.10	<i>R. etli</i> ve <i>R. phaseoli</i> ile ilişkili izolatlar için ILD test sonuçları	
	*Orijinal ağacın uzunluğu.....	112

1. GİRİŞ

Proteinler, nükleik asitler ve hücredeki diğer bir dizi bileşen için önemli bir element olan azot karbondan sonra hücrede en çok bulunan elementtir ve tipik bir bakteri hücresinin kuru ağırlığının % 12'sini oluşturur (Madigan ve ark., 2003). Dünya atmosferinin yaklaşık %80'inin azot gazından oluşmasına karşın bu azot çoğunlukla azot gazı (N_2) şeklindedir ve fiske edilene yani hidrojen ile birleştirilip amonyağa indirgenene kadar bitkiler dolayısıyla da bitkileri tüketen diğer canlılar tarafından kullanılamaz. Azot doğada üç yolla fiske edilir (Campbell ve Reece, 2006; <http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium.pdf>, 18.12.2009);

- **Atmosferik Fiksasyon:** Bu olay şimşeklere bağlı olarak kendiliğinden meydana gelir ve sadece küçük bir miktar azot bu yolla fiske edilir (<http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium.pdf>, 18.12.2009).
- **Endüstriyel Fiksasyon:** Haber-Bosch süreci adı verilen bu süreç azot gübresi yapımında kullanılır ve çok yüksek miktarda enerji gerektirir. Dünya nüfusunu doyurmak için gerekli yiyeceğin yaklaşık üçte birinin endüstriyel yolla üretilen azot gübrelerine dayandığı tahmin edilmektedir. Azot döngüsüne insanların en büyük müdahalesi olan kimyasal gübrelerin artan kullanımı azot oksitlerinin artan emisyonu, toprak asitlenmesi ve su ötrifikasyonu gibi ekolojik sorunlara neden olmaktadır (Dixon ve Kahn, 2004; Oldroyd ve Downie, 2004; <http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium.pdf>, 18.12.2009).
- **Biyolojik Fiksasyon:** Atmosferik azotun (N_2) amonyağa biyolojik olarak indirgenmesi şeklinde tanımlanan biyolojik azot fiksasyonu biyosferdeki mevcut azotun % 65'inin kaynağıdır. Bu amonyağın büyük bir kısmı baklagil konukçusunun uygun bakteri tarafından enfekte edilmesiyle başlayan ve kök nodüllerinin oluşmasıyla sonuçlanan baklagil-Rhizobium simbiyozu tarafından üretilir (Lodwig ve ark., 2003).

Atmosferik azotun, simbiyotik, ilişkili ve serbest yaşayan bakterilerce amonyağa dönüştürülmesi yani biyolojik azot fiksasyonu biyosferin azot içeriğini takviye etmesi ve denitrifikasyona bağlı kayıpları dengelemesi nedeniyle azot döngüsünün önemli bir parçasıdır. Ayrıca bu simbiyotik ilişkiler, kimyasal gübre kullanımını, buna bağlı olarak

da çevre kirlenmesini azalttığı ve ürün miktarını arttırdığı için dünya tarımı açısından önemlidir. Bütün bu perspektiflerden ele alındığında biyolojik azot fiksasyonu çevre ve dünya tarımı için büyük öneme sahiptir (Laranjo ve ark., 2002; Dixon ve Kahn, 2004). Tüm yaşayan organizmalar içerisinde sadece bazı prokaryotlar azot fiksasyon yeteneğine sahiptir ve bu bakteriler pek çok ana bakterial şubeye dağılmış durumdadırlar (Zakhia ve de Lajudie, 2001). Bu bakterilerden, azotu serbest yaşam formundayken fiske eden ve bu fiske edilmiş azotu kendi gelişimleri için kullanan bakteriler **serbest yaşayan diazotroflar** olarak adlandırılırlar. Serbest yaşayan diazotroflara bilinen en iyi örnekler toprak bakterileri olan *Azotobacter* türleri ve obligat anaerob *Clostridium* türleridir. Ek olarak *Klebsiella*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus* ve *Herbaspirillum* türleri rizosfer, rizoplane, filosfer ve bitkilerin hücreler arası boşluklarında kolonize olurlar ve burada bitki-ilişkili azot fiksasyonu gerçekleştirirler. Diğer taraftan spesifik konukçuları ile simbiyotik birliktelikler oluşturan bazı özelleşmiş bakteriler konukçu içerisinde özel yapılar oluşturarak azot fiske eder ve bu fiske edilen azotu konukçularına aktarırlar. Bunlara **simbiyotik diazotroflar** adı verilir (Sawada ve ark., 2003). Simbiyotik diazotroflara bir örnek *Actinomyceales* ordosu içerisinde yer alan *Frankia* cinsi üyeleridir. Frankiae, 8 farklı familyadan, 25 cins ve 200'ün üzerinde türe ait, küçük ağaçlar ve çalıllardan oluşan oldukça çeşitlilik gösteren bir grubun kökleri üzerinde perennial nodüller oluşturan azot fiske edebilen aktinomiset simbiyontlardır ve bu birliktelik aktinorizal olarak adlandırılır (Lechevalier, 1994). Bu birliktelik içerisinde yer alan bitkiler azotça fakir topraklarda veya tahrip edilmiş ortamlarda öncül olması sebebiyle önemlidirler. Bu surette biokütle üretiminde, arazi ıslahında ve orman restorasyonunda faydalı olurlar (Benson, 1982). Bunula birlikte en iyi bilinen ve en iyi çalışılmış bitki-bakteri mutualizm ilişkisi *Rhizobiales* ordosuna ait bakteriler ve Baklagiller (*Fabaceae*) familyası üyesi bitkiler arasındakilerdir (Beattie, 2006). Rhizobia ve baklagiller arasındaki bu birliktelik biyolojik olarak fiske edilen azotun % 80'inin kaynağıdır ve bu da dünya genelindeki protein girişinin % 25-30'una karşılık gelmektedir (McInroy ve ark., 1999). Yaklaşık 650 cins içerisinde sınıflandırılmış 18.000'den fazla tür ile bitkiler aleminin en geniş üçüncü familyasını oluşturan Baklagiller tarımsal anlamda çok önemlidirler ve dünya genelinde yiyecek, yem üretimi, yeşil gübre, erozyonu önlemek, bitkisel ilaç ve bahçe düzenleme gibi pek çok amaç için yetiştirilirler (Doyle, 1994; Gao ve ark., 2004; Germano ve ark., 2006). Baklagiller familyasına ait üç tane alt

familyadan, *Mimosoideae* ve *Papilionoideae* alt familyalarına ait türlerin % 90'ından fazlasının ve *Caesalpinoideae* alt familyasına ait türlerin ise %25'den azının *Rhizobia* ile simbiyotik ilişki içerisine girdiği ve nodül oluşturduğu bilinmektedir (Hirsch ve ark., 2001).

Rhizobia, Baklagiller familyasına ait bitkilerin üzerinde kök ve bazı durumlarda da gövde nodülleri oluşturma ve bu yapılar içerisinde atmosferik azotun simbiyotik fiksasyonunu gerçekleştirme yeteneğine sahip toprak bakterileridir (Moreira ve ark., 1998). Etkin bir simbiyoz oluşturmak için *Rhizobia*'nın bir dizi özel gen grubuna ihtiyacı vardır. Bunlar, bitkileri simbiyotik nodüller oluşturmak üzere uyaran nodülasyon faktörlerinin (Nod faktörleri) sentezinde rol alan enzimleri kodlayan *nod* genleri ve azot fiske eden nitrojenaz enziminin sentezinden sorumlu *nif* genleridir (Haukka ve ark., 1998). *Rhizobia* genomunun büyük bir bölümünü izolatların ekolojik yetenekleri ve simbiyotik performansları üzerinde önemli ölçüde etkisi olan plazmitler teşkil eder. Pek çok *Rhizobia* da nodülasyon (*nod*, *nol* ve *noe*) ve azot fiksasyon (*nif* ve *fix*) için gerekli simbiyotik genler Simbiyotik Plazmitler (*pSym*) üzerinde bulunurlar (Silva ve ark., 2003). Bu plazmitlerin laboratuvar koşullarında ve arazide izolatlar, türler ve cinsler arasında transfer edilebildiği gösterilmiştir (Turner ve Young, 2000). Bu nedenle bir *Rhizobiyal* tür taşıdığı *pSym* tipine bağlı olarak birden fazla baklagil türünde nodül oluşturabilirken benzer şekilde bir baklagil türü birden fazla *Rhizobiyal* tür ile simbiyotik ilişki kurabilir.

1982'ye kadar kök nodüllerinden izole edilen tüm bakteriler *Rhizobium* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. Türler ise belirli konukçu bitkiler ile nodül oluşturmaya dayanan çapraz-aşılama (cross-inoculation) grup fikrine göre tanımlanmıştır (Germano ve ark., 2006). Bu dönemden sonra kök nodül bakterilerinin taksonomisi, sistematikteki gelişmelere ve yeni konukçu ve habitatlardan yapılan keşiflere paralel olarak büyük değişimler geçirmiştir. Günümüzde α -*Proteobacteria* içerisinde *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* ve *Ensifer* olmak üzere beş tane *Rhizobiyal* cins vardır. Bununla birlikte son yıllarda azot fiske eden Baklagil simbiyontlarına ait, α -*Proteobacteria* içerisinde; *Methylobacterium*, *Devosia*, *Blastobacter*, *Ochrobactrum*, cinslerini ayrıca β -*Proteobacteria* içerisinde; *Burkholderia* ve *Cupriavidus* cinslerini ve γ -*Proteobacteria* içerisinde de tanımlanmamış bazı izolatları kapsayan yeni soy hatları tanımlanmıştır (Romdhane ve ark., 2006).

Dünyanın farklı bölgelerindeki baklagiller (özellikle yabani baklagiller) üzerinde yapılacak araştırmalar Rhizobia'nın biyolojik çeşitliliğini ve ekolojik özelliklerini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır. Aynı zamanda bu araştırmalar sonucunda elde edilecek özellikle moleküler veriler nodülasyon ve azot fiksasyonu gibi ekolojik anlamda küresel öneme sahip olayların esasları, nasıl evrimleştiği ve popülasyonlar arasında nasıl dağıldığı gibi sorulara daha net biçimde cevap verilmesini sağlayacaktır. Bu çalışma Türkiye'de yetiştirilen Bakla (*Vicia faba* L.), bezelye (*Pisum sativum* L.) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)'de yayılış gösteren kök nodül bakterilerinin teşhisine yönelik öncül bir çalışmadır ve bu bölgeden dünya literatürüne ve veri tabanlarına ilk moleküler verileri sağlaması anlamında da büyük önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Rhizobia'nın Tanımı

Rhizobia kelimesi Yunanca *rhiza* (kök) ve *bios* (yaşam) isimlerinden türetilmiştir (Krishnan ve Bennett, 2006). Klasik olarak *Fabaceae* (Baklagiller) familyasına ait bitkilerde, kök veya gövde nodülleri oluşturma kabiliyetine sahip simbiyotik bakteriler olarak tanımlanan Rhizobia, bu nodüller içerisinde azot (N₂) fiksede edebilen bakteroidlere dönüşmektedirler (Tan ve ark., 2001). Her ne kadar bu simbiyotik ilişki Rhizobia ve Baklagillere özgül bir ilişki olsa da *Parasponia* (*Ulmaceae*) buna bir istisna oluşturmaktadır (Trinick, 1973; Akkermans ve ark., 1978; Lafay ve ark. (2006)'dan). Rhizobium aynı zamanda bir cins ismi olmasına karşın genellikle kök nodül bakterilerinin tümünü ifade etmek için de kullanılır. Bu çalışmada da Rhizobium (çoğulu Rhizobia) kelimesi italik olarak yazılmadığı yerlerde kök nodül bakterilerinin genelini belirtmek için kullanılmaktadır.

2.2 Kök Nodül Bakterilerinin Sınıflandırılmasındaki Gelişmeler

Rhizobia taksonomisi sürekli olarak değişen bir yapı göstermektedir. Bu durum taksonomide kullanılan morfoloji, fizyoloji ve DNA dizi analizleri gibi kriterlerdeki teknolojik gelişmelere bağlı olarak gerçekleşmektedir (Sahgal ve Johri, 2006). Rhizobia taksonomisini anlamak ve bu gün gelinen noktayı doğru değerlendirmek için geçmişten günümüze meydana gelen değişimleri ve kullanılan kriterleri gözden geçirmekte fayda vardır.

Hellriegel ve Wilfarth'ın yaptıkları çalışmalar, baklagillerin havadan azot temin etmelerini sağlayan etmenin kök nodülleri içerisindeki mikroplar olduğunu açıkça ortaya koymuştur (Hellriegel ve Wilfarth, 1888; Young ve Haukka, (1996)'dan). Hellriegel, baklagil kök nodüllerinin fizyolojik önemlerini gösterirken, mikrobiyologlar buna neden olan organizmayı araştırmışlardır. Frank, kök nodüllerini incelemiş ve o dönemdeki pek çok kişi gibi simbiyontun bir fungus olduğunu düşünmüştür ve buna *Schinzia leguminosarum* adını vermiştir (Frank, 1879; Young ve Haukka, (1996)'dan). Beijerinck, baklagillerin kök nodüllerinden bir bakteriyi ilk olarak izole ettiğinde buna *Bacillus radicola* adını vermiştir, fakat bu tür daha sonra Frank tarafından *Rhizobium* adıyla tekrar isimlendirilmiştir (Beijerinck, 1888; Frank, 1889; Sahgal ve Johri (2003)'den). İlk araştırmacılar Rhizobia'yı bütün baklagilleri nodüle edebilen tek bir tür

olarak kabul etmişlerdir. Lohnis ve Hansen'in yaptıkları öneriyle Rhizobia gelişim hızlarına göre geleneksel olarak iki gruba ayrılmıştır (Lohnis ve Hansen, 1921; Ballows ve ark. (1991)'den). **Hızlı gelişenler** terimi genel olarak yonca, fasulye, bezelye ile ilgili olan ve jenerasyon zamanı 6 saatten az olan Rhizobia için kullanılırken, **yavaş gelişenler** terimi ise soya fasulyesi ve börülce türleri ile ilişkili olan ve jenerasyon zamanı 6 saatten fazla olan Rhizobia'yı ifade etmek için kullanılmıştır (Ballows ve ark., 1991). Bu grupta günümüzde sınıflandırma anlamında herhangi bir önem taşımasa da, elde edilen izolatların kimlikleri konusunda bir ön bilgi vermesi nedeniyle, zaman zaman pratikte kullanılmaktadır. Bu iki grup, 1982 yılında Jordan'ın *Bradyrhizobium* adında yeni bir cins tanımlamasına kadar aynı cins (*Rhizobium*) içerisinde sınıflandırılmışlardır (Sahgal ve Johri, 2003). Fred ve arkadaşlarının baklagil nodül bakterileri üzerine yayınladıkları klasik ve kapsamlı kitaplarında yaptıkları önerileri, 1982'ye kadar nomenklatürde herhangi bir değişiklik meydana gelmediği için yarım asır boyunca geçerliliğini korumuştur (Fred ve ark., 1932; Young ve Haukka, (1996)'dan). Bu araştırmacılar konukçu çeşitliliğine bağlı olarak *Rhizobium* cinsi içerisinde ***R. leguminosarum*** (*Lathyrus*, *Lens*, *Pisum* ve *Vicia*), ***R. japonicum*** (*G. max*), ***R. lupini*** (*Lupinus*), ***R. meliloti*** (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*), ***R. phaseoli*** (*Phaseolus*) ve ***R. trifolii*** (*Trifolium*) olmak üzere 6 tür tanımlamışlardır. Ayrıca bu tanımladıkları türlerin belirli morfolojik ve fizyolojik özelliklerini de tarif etmişlerdir (Sahgal ve Johri, 2003). Rhizobia'nın konukçu sınırlarına bağlı olarak türlere ayrılabilmesi ve tersi biçimde baklagillerin karşılıklı olarak değiştirilebilir simbiyontlarına bağlı olarak gruplanabileceği fikri **çapraz aşılama** (cross inoculation) kavramı olarak bilinmektedir (Young ve Haukka, 1996). Çapraz aşılama fikrine dayalı taksonomi bu kurala uymayan pek çok istisnai örneğin keşfedilmesinden ve ayrıca hızlı gelişen Rhizobia'da azot fiksasyonu ve nodülasyon için gerekli genlerin bakteriler arasında transfer edilebilen simbiyotik plazmitler üzerinde bulunduğu belirlenmesinden dolayı geçerliliğini yitirmiştir. Dahası, aynı dönemlerde *Rhizobium* sınıflandırılmasının, nodülasyon özelliklerine göre değil, genomik, fenotipik ve filogenetik özellikleri kapsayan genel bakteri taksonomisine uydurulması gerektiği geniş ölçüde kabul edilmiştir (Malek ve Sajnaga 1999; Zakhia ve de Lajudie, 2001). Modern bakteri taksonomisinde cins ve daha yüksek taksonomik kategorilerdeki hiyerarşik sınıflandırma temel olarak 16S rDNA dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizlerden elde edilen sonuçlara göre oluşturulur (Sawada ve ark., 2003). Buna karşın

bakteri sınıflandırmasındaki temel birim olan tür ise, %70 veya daha fazla DNA-DNA hibridizasyon değeri ve 5 C°'den az T_m derece farkı gösteren izolatların oluşturduğu grup olarak tanımlanır (Wayne ve ark., 1987). Bununla birlikte %70'lik bu değer kesin bir sınır olarak alınmamalıdır zira diğer özellikleri açısından birbirinden ayrılamayan ve %50'den az DNA-DNA hibridizasyon değeri gösteren izolatlarda aynı tür içerisinde değerlendirilebilir. Bir tür olarak kabul edilen izolatlar arasında G+C içeriği açısından %5 mol'den az fark bulunmalıdır. Ayrıca farklı türler olarak ifade edilen izolatların 16S rDNA dizi benzerliklerinin ise %97'den az olması gerekmektedir (Goodfellow ve O'Donnel, 1993; Malek ve Sajnaga, (1999)'dan; Tindall ve ark., 2010).

Nümerik taksonomi, karbonhidrat metabolizması, antibiyotik dirençliliği, seroloji, DNA hibridizasyonu, RNA analizleri ve DNA baz oranları gibi analizleri kapsayan çalışmalar, yavaş ve hızlı gelişen Rhizobia arasındaki farklılıkların sadece gelişim hızları ile sınırlı olmadığını göstermiştir (Ballows ve ark., 1991). Bu veriler ışığında Jordan, yavaş gelişen Rhizobia'yı tek bir türü olan (*B. japonicum*) **Bradyrhizobium** adıyla yeni bir cinse yerleştirmiştir (Jordan, 1982). Bu ayrım "Uluslararası *Rhizobium* ve *Agrobacterium* Taksonomisi Alt Komitesi" tarafından kabul edilmiş ve **Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology**'nin 1984'deki ilk baskısında baklagiller ile simbiyotik ilişkiye giren kök nodül bakterileri, **Rhizobium** (hızlı gelişen) ve **Bradyrhizobium** (yavaş gelişen) olmak üzere iki cins olarak verilmiştir (Jordan, 1984). Daha sonraki dönemlerde gerek mevcut *B. japonicum* türü içerisinde gelişen tekniklere bağlı olarak yeni türler tanımlanması, gerekse de farklı lokalitelerdeki yeni konukçulardan izole edilen örneklerden yeni *Bradyrhizobium* türlerinin tanımlanmasıyla cins içerisindeki türlerin sayısı artmıştır. Günümüzde bu cins içerisinde **B. japonicum** (Jordan, 1982), **B. elkanii** (Kuykendall ve ark., 1992), **B. liaoningense** (Xu ve ark., 1995), **B. yuanmingense** (Yao ve ark., 2002), **B. betae** (Rivas ve ark., 2004), **B. canariense** (Vinuesa ve ark., 2005), **B. jicamae** (Ramirez-Bahena ve ark., 2009), **B. pachyrhizi** (Ramirez-Bahena ve ark., 2009) olmak üzere toplam 8 adet tür bulunmaktadır.

Bu dönemden sonra özellikle yabancı baklagillerin mikrosimbiyontlarının araştırılması çok sayıda yeni Rhizobia cins ve türünü beraberinde getirmiştir. Dreyfus ve ark. (1988), *Sesbania rostrata* gövdesinden izole ettikleri bakterilerin, fenotipik özellikleri, karşılaştırmalı protein jel elektroforez şablonları, DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon oranları açısından o döneme kadar tanımlanmış olan iki Rhizobiyal

cinsten (*Rhizobium* ve *Bradyrhizobium*) oldukça farklı olduklarını belirlemişlerdir. Bu veriler ışığında ***Azorhizobium*** adıyla yeni bir cins ve cinsin tip türü olarak da ***A. caulinodans***'ı tanımlamışlardır. Moreira ve ark. (2006) *A. doebereineriae* türünü tanımlayana kadar, bu tür uzun yıllar boyunca *Azorhizobium* cinsi içerisindeki tek tür olarak kalmıştır.

Diğer bir Rhizobiyal cins olan ***Sinorhizobium*** ilk olarak Chen ve ark. (1988) tarafından Çin de yetiştirilen soya fasulyesinden izole edilen simbiyotik bakterilerden tanımlanmıştır. Chen, *Sinorhizobium* içerisinde iki adet tür tanımlamıştır. Bunlardan bir tanesi daha önce Scholla ve Elkan (1984) tarafından *Rhizobium* cinsi içerisinde *R. fredii* olarak tanımlanan *Sinorhizobium fredii*, diğeri ise tamamen yeni bir tür olan *S. xinjiangensis*'dir. Tanımlanan bu yeni cins, Jarvis ve ark. (1992) tarafından eleştirilse de, de Lajudie ve ark. (1994), yaptıkları çalışma ile Chen'in tanımlamış olduğu *Sinorhizobium* cinsinin doğruluğunu göstermiş ve daha önce *Rhizobium* cinsi içerisinde sınıflandırılan *R. meliloti*'yi de *S. meliloti* adıyla bu cins içerisine dahil etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada *S. saheli* ve *S. teranga* adıyla yeni iki tür tanımlamışlardır. Willems ve ark. (2003) *Sinorhizobium* türlerini temsilen seçtikleri izolatlar ile ***Ensifer*** cinsinin tip türünü (*E. adherens*) fenotipik ve çeşitli genotipik özellikleri açısından karşılaştırdıklarında bu iki cinsin sinonim olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte *Ensifer* cinsi *Sinorhizobium*'dan daha önce tanımlandığından sistematikteki öncelik (**priority**) kuralı gereğince *Ensifer* cins ismi kabul edilmiş ve *Sinorhizobium* ise sinonim olarak kalmıştır (Young, 2003). Son yıllarda tanımlanan yeni türler ile birlikte *Ensifer* cinsi içerisinde; ***E. meliloti*** (de Lajudie ve ark., 1994), ***E. saheli*** (de Lajudie ve ark., 1994), ***E. terangae*** (de Lajudie ve ark., 1994), ***E. adherens*** (Casida, 1982), ***E. fredii*** (Chen ve ark., 1988), ***E. medicae*** (Rome ve ark., 1996), ***E. arboris*** (Nick ve ark., 1999), ***E. kostiense*** (Nick ve ark., 1999), ***E. kummerowiae*** (Wei ve ark., 2002), ***E. morelense*** (Wang ve ark., 2002), ***E. americanus*** (Toledo ve ark., 2003), ***E. xinjiangense*** (Chen ve ark., 1988) olmak üzere 12 adet tür bulunmaktadır.

İlk olarak *Lotus corniculatus* köklerinden izole edilerek tanımlanan *Rhizobium loti*'nin yapılan çalışmalar sonucunda o döneme kadar tanımlanmış *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azorhizobium* ve *Ensifer* türlerinden oldukça farklı olduğu belirlenmiştir (Jarvis ve ark., 1982; Jarvis ve ark., 1997). Bu dönemi takiben ***R. huakuii*** (Chen ve ark., 1991), ***R. ciceri*** (Nour ve ark., 1994), ***R. mediterraneum*** (Nour ve ark., 1995) ve ***R. tianshanense*** (Chen ve ark., 1995) gibi bu türe oldukça yakın yeni türler de

tanımlanmıştır. Jarvis ve ark. (1997), 16S rDNA baz dizilerinin filogenetik ilişkilerine dayanarak bu türlerin *Rhizobium* cinsinden bağımsız ayrı bir cinste sınıflandırılmasını önermişler ve bu yeni cinse, kapsadığı türler hem gelişim süreleri hem de filogenetik pozisyonları açısından *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* cinsleri arasında bir özellik gösterdiklerinden ***Mesorhizobium*** adını vermişlerdir. Günümüzde *Mesorhizobium* cinsi içerisinde; *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum* (de Lajudie ve ark., 1998), *M. amorphae* (Wang ve ark., 1999), *M. chacoense* (Velazquez ve ark., 2001), *M. septentrionale* (Gao ve ark., 2004), *M. temperatum* (Gao ve ark., 2004), *M. thiogangeticum* (Ghosh ve Roy, 2006), *M. albiziae* (Wang ve ark., 2007), *M. caraganae* (Guan ve ark., 2008), *M. gobiense* (Han ve ark., 2008a), *M. tarimense* (Han ve ark., 2008a), *M. australicum* (Nandasena ve ark., 2009), *M. metallidurans* (Vidal ve ark., 2009), *M. opportunistum* (Nandasena ve ark., 2009) ve *M. shangrilense* (Lu ve ark., 2009) olmak üzere 19 tür bulunmaktadır.

De Lajudie ve ark. (1998) Senegal'den *Neptunia natans* kök nodüllerinden izole ettikleri bakterilerin o zamana kadar tanımlanan Rhizobiyal cinslerden (*Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* ve *Azorhizobium*) farklı olduğunu belirterek ***Allorhizobium*** adıyla yeni bir cins ve cinsin tip türü olarak da *A. undicola* türünü önermişlerdir. Bu yeni cins ve tür on yıldan fazla bir zaman geçerliliğini korumuştur. Young ve ark. (2001) *Allorhizobium*, *Rhizobium* ve *Agrobacterium*'un ayrı birer cins olarak kabul edilmeleri için gerekli özgün fenotipik karakterlere sahip olmadıklarını ve filogenetik ayrımlarının seçilecek algoritmaya ve veri setindeki DNA dizilerine göre değiştiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle de bu üç cinsin *Rhizobium* cinsi adı altında birleştirilmesini önermişlerdir. Bu öneri genel anlamda kabul görmüştür. Dolayısıyla da *Allorhizobium* cinsi ve *A. undicola* türü artık geçerliliğini yitirmiş, *Rhizobium* cinsi ve *R. undicola* türü olmuştur. İlk olarak tanımlandığı dönemlerde oldukça polifiletik bir yapı gösteren *Rhizobium* cinsi günümüze kadar yukarıda açıklandığı gibi içerisinde çeşitli cins ve türlerin ayrılması (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* ve *Ensifer*) veya katılmasıyla (*Allorhizobium* ve *Agrobacterium*) büyük oranda değişmiş ve filogenetik anlamda çok daha homojen bir yapıya kavuşmuştur. Günümüzde *Rhizobium* cinsi içerisinde; *R. leguminosarum* (Frank, 1889; Sahgal ve Johri (2003)'den), *R. galegae* (Lindström, 1989), *R. tropici* (Martinez-Romero ve ark., 1991), *R. undicola* (de Lajudie ve ark., 1998), *R. etli* (Segovia ve ark., 1993), *R. giardinii* (Amarger ve ark., 1997), *R. gallicum* (Amarger ve

ark., 1997), *R. hainanense* (Chen ve ark., 1997), *R. mongolense* (Van Berkum ve ark., 1998), *R. huautlense* (Wang ve ark., 1998), *R. larrymoorei* (Bouzar ve ark., 2001), *R. yanglingense* (Tan ve ark., 2001), *R. indigoferae* (Wei ve ark., 2002), *R. sullae* (Squartini ve ark., 2002), *R. loessense* (Wei ve ark., 2003), *R. daejeonense* (Quan ve ark., 2005), *R. lusitanum* (Valverde ve ark., 2006), *R. radiobacter* (Smith ve Townsend, 1907; Young ve ark. (2005)'den), *R. rhizogenes* (Riker ve ark., 1930; Young ve ark. (2005)'den), *R. rubi* (Hildebrand 1940; Young ve ark. (2005)'den), *R. vitis* (Ophel ve Kerr, 1990), *R. cellulosityticum* (Garcia-Fraile ve ark., 2007), *R. selenitireducens* (Hunter ve ark., 2007), *R. fabae* (Tian ve ark., 2008), *R. miluonense* (Gu ve ark., 2008), *R. multihospitium* (Han ve ark., 2008b), *R. oryzae* (Peng ve ark., 2008), *R. phaseoli* (Ramirez-Bahena ve ark., 2008), *R. pisi* (Ramirez-Bahena ve ark., 2008), *R. alkalisoli* (Lu ve ark., 2009), *R. mesosinicum* (Lin ve ark., 2009), *R. tibeticum* (Hou ve ark., 2009a), *R. alamii* (Berge ve ark., 2009) ve *R. soli* (Yoon ve ark., 2009) olmak üzere 34 tür bulunmaktadır.

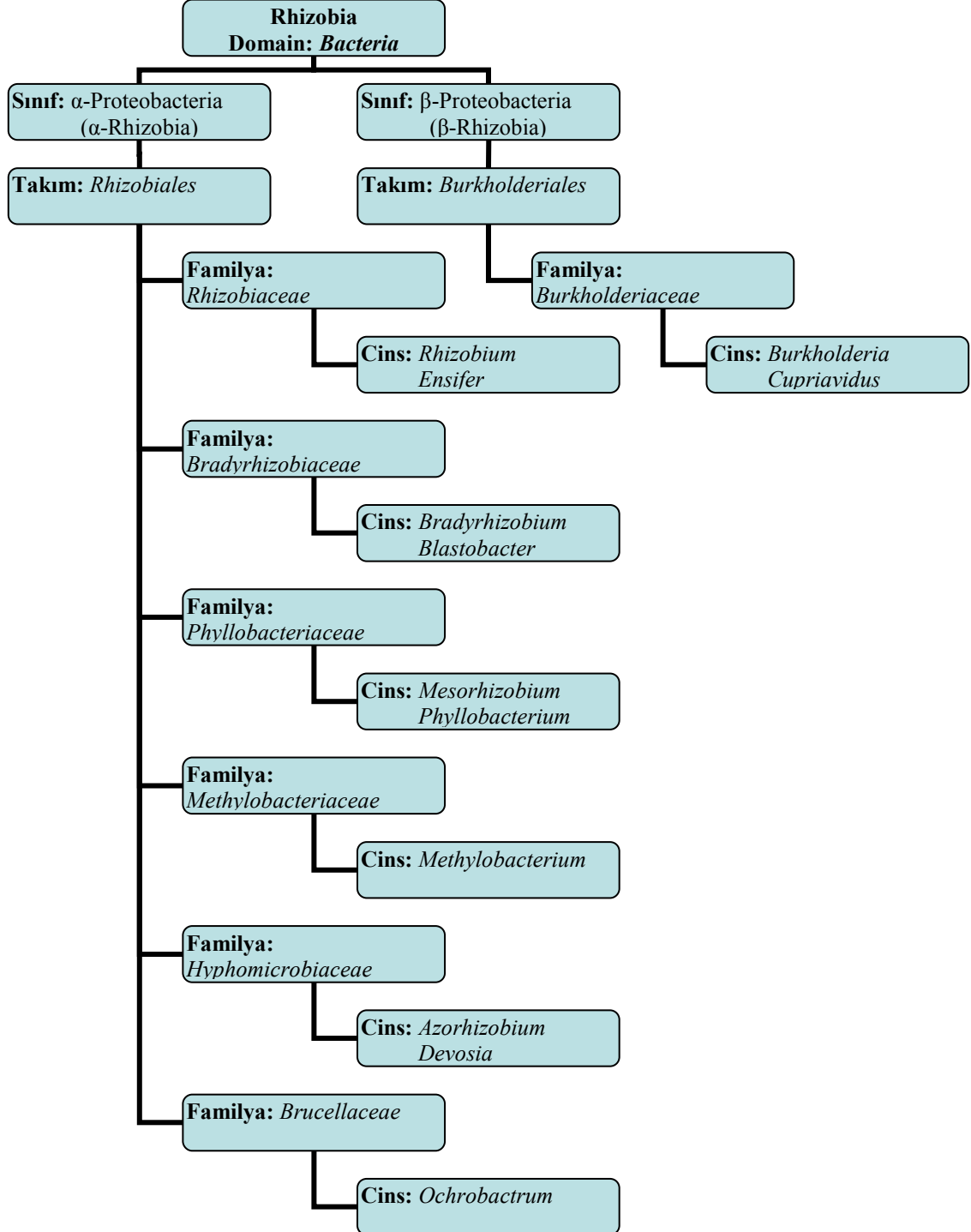
Son yıllarda yapılan çalışmalar ile **simbiyotik diazotrofi** özelliğinin yukarıda belirtilen tipik Rhizobiyal cins veya türler ile sınırlı olmadığı, bunların yanı sıra filogenetik anlamda bu gruplardan bağımsız, beklenmedik bazı türlerin de bir şekilde bu özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Bu türlerden biri olan *Blastobacter denitrificans* ilk olarak Almanya'da bir göl suyundan izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Hirsch ve Müler, 1985). Buna karşın bu çalışmada türün simbiyotik diazotrofi özelliğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Van Berkum ve Eardly (2002) yaptıkları çalışmada *Aeshynomene indica*'dan izole edilen ve *Bradyrhizobium spp.* olarak tanımlanan bazı izolatların 16S rDNA analizlerinde *Blastobacter denitrificans*'a benzediğini belirlemiş ve bu türün tip suşunu da içine alan bir çalışma yaparak bu türe ait izolatların *A. indica* ile simbiyotik azot fiksasyon özelliğini ortaya koymuşlardır. Rivas ve ark. (2003), Hindistan'da sucul bir Baklagil olan *Neptunia natans*'dan izole ettikleri bakterilerin daha önce Senegal'den aynı bitkiden izole edilen ve *Rhizobium undicola* (önceden *Allorhizobium undicola*) olarak tanımlanan türden farklı olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda bu izolatların *Devosia* cinsi içerisinde yeni bir tür olduğunu belirlemişler ve *Devosia neptuniae* adıyla bu türü tanımlamışlardır. Son yıllarda kök nodül bakterileri hakkındaki en sıra dışı bulgulardan biri Jourand ve ark. (2004)'dan gelmiştir. Bu araştırmacılar Samba ve ark. (1999)'nın Senegal'de yetişen 3 *Crotalaria* türünden izole ettikleri bakterilerin fakültatif metilotrofik bakteriler olan *Methylobacterium* cinsi içerisindeki

yeni bir türe ait olduklarını belirlemişler ve bu türü *Methylobacterium nodulans* adıyla tanımlamışlardır. Bu konuda bir diğer bulgu Trujillo ve ark. (2005)'dan gelmiştir. Araştırmacılar Ngom ve ark. (2004)'nın *Acacia mangium* kök nodüllerinden izole ederek *Ochrobactrum* cinsine ait olduklarını belirttikleri bakterilerin *nod* ve *nif* genlerinin varlığını göstermişler ve ayrıca izolatların yeni bir *Ochrobactrum* türüne ait olduklarını kanıtlayarak türü *Ochrobactrum lupini* adıyla tanımlamışlardır. Bundan birkaç yıl sonra Zurdo-Pineiro ve ark. (2007), İspanya'da yetişen *Cytisus scoparius* kök nodüllerinden izole ettikleri iki simbiyotik izolatın *Ochrobactrum* cinsi içerisinde yeni bir tür olduğunu belirtmişler ayrıca *nod* ve *nif* genlerini taşıdıklarını da göstermişlerdir. Bu yeni türü de *Ochrobactrum cytisi* adıyla tanımlamışlardır. İspanyadan rapor edilen diğer bir sıra dışı Rhizobia'da, Valverde ve ark. (2005) tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar *Trifolium pratense* kök nodüllerinden izole ettikleri bakterilerin *Phyllobacterium* cinsi içerisinde yeni bir tür olduğunu tespit etmişler ve bu türe de *P. trifolii* adını vermişlerdir.

Moulin ve ark. (2001) Güney Afrika'dan *Aspalathus carnosa* ve Fransız Guyana'sından *Machaerium lunatum* kök nodüllerinden izole ettikleri bakterilerin *Bacteria* domain'ninin **β -Proteobacteria** alt sınıfına ait olduklarını rapor edinceye kadar, baklagillerin kökleri ile simbiyotik ilişkiye giren diazotrofik bakterilerin sadece **α -Proteobacteria** alt sınıfına ait oldukları düşünülmüştür. Bu araştırmacılar yaptıkları 16S rDNA baz dizi filogenisi analizlerinde, bu bakterilerin *Burkholderia* cinsi içerisinde yer aldıklarını belirlemişler ve bu grup içerisindeki bakterilere β -Proteobacteria alt sınıfına atfen **β -Rhizobia** (dolayısıyla da α -Proteobacteria alt sınıfında yer alan Rhizobia ya da **α -Rhizobia**) adını vermişlerdir (Moulin ve ark., 2001). Bu bulguyu takip eden yıllarda β -Rhizobia'ya yönelik çok sayıda çalışma yapılmış ve *Burkholderia* cinsi içerisinde *B. phymatum* (Vandamme ve ark., 2002), *B. tuberum* (Vandamme ve ark., 2002), *B. cepacia* (Rasolomampianina ve ark., 2005), *B. mimosarum* (Chen ve ark., 2006), *B. nodosa* (Chen ve ark., 2007), *B. sabiae* (Chen ve ark., 2008), ve *Cupriavidus* cinsi içerisinde de *C. taiwanensis* (Chen ve ark., 2003) türleri tanımlanmıştır. Dolayısıyla günümüzde toplamda 7 adet β -Rhizobia türü bulunmaktadır.

Günümüzde Baklagiller familyasına ait bitkilerin kökleri ile simbiyotik ilişki içerisine giren diazotrofik bakteriler Şekil 2.1'de görülebileceği gibi *Bacteria* domaininin α - ve β -Proteobacteria alt sınıfları içerisindeki 12 cins ve 88 türde sınıflandırılmaktadır. Bakteri sistematığı alanındaki gelişmeler ve farklı konukçulardan

(özellikle yabancı baklagil türlerinden) ve farklı lokalitelerden yapılan araştırmalar ile ilerde bu rakamların daha da artacağı kesindir.



Şekil 2.1 Kök nodül bakterilerinin *Bacteria* domaini içerisinde sınıflandırıldığı familyalar ve cinsler

2.3 Rhizobia İzolatlarının Teşhis ve Sınıflandırılmasında Kullanılan Yöntemler

Yapılan çalışmalarda, her ne kadar elde edilen Rhizobiyal izolatların tümü önemli olsa da, onlarca veya yüzlerce örnekten oluşan bir koleksiyonla çalışılırken bazı dolaylı yöntemler ile genetik çeşitliliği belirlemek ve ön gruplama yapmak zamansal ve maddi koşullar açısından gereklidir. Bu amaçla kimliği bilinmeyen Rhizobiyal izolatların öncül karakterizasyonları için, farklı **fenotipik karakterlerin nümerik taksonomisi**, **RAPD** (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), **FAME** (Yağ asidi metil esterleri) analizleri, **total çözünebilir protein şablonları**, **faj tiplleme**, **rep-PZR** (Genomik parmak izi), **antibiyotik dirençliliği** gibi yöntemler kullanılmaktadır (Lindström ve ark., 2006). Elde edilen Rhizobiyal izolatların ön karakterizasyonu için belirtilen bu metotların yanı sıra yaygın biçimde kullanılan bir diğer yöntemde **16S rDNA PZR-RFLP** (Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi) analizidir. Bu yöntem Rhizobia grubu bakteriler için ilk olarak Laguerre ve ark. (1994) tarafından uygulanmıştır. Araştırmacılar *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* veya *CfoI*, *HinfI*, *RsaI*, *MspI* (veya *NdeII*) enzim setleri kullanarak yapılan 16S rDNA PZR-RFLP analizinin o dönemde tanımlanan tüm Rhizobiyal türleri ayırabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmayı takip eden yıllarda pek çok yeni Rhizobiyal tür tanımlanmasına rağmen bu enzim setleri hala ayırım gücünü büyük oranda korumaktadır, bu nedenle de bu çalışmada tercih edilmiştir.

Daha önce belirttiğimiz gibi bakteri taksonomisinde cins ve daha yüksek taksonomik kategorilerdeki hiyerarşik sınıflandırma temelde 16S rDNA dizilerine dayalı filogenetik analizlerden elde edilen sonuçlara göre yapılır (Sawada ve ark., 2003). Bunun temel nedeni, ribozomal genlerin fonksiyonel devamlılık göstermeleri, tüm organizmalarda bulunmaları, ve farklı dizi pozisyonlarında oldukça farklı oranlarda değişmeleridir ki, bu özellik en uzak ilişkileri de kapsayacak şekilde çoğu filogenetik ilişkilerin ölçülmesini mümkün kılmaktadır (Woese, 1987). Bu nedenle elde edilen farklı 16S rDNA RFLP şablonlarını temsilen seçilen izolatların kısmi veya tam 16S rDNA dizileri belirlenerek, bu izolatların dolayısıyla da temsil ettikleri grupların cinsleri kesin olarak belirlenir ve türleri hakkında ise bir fikir sahibi olunur.

Bakteri sistematğinde 16S rDNA dizilemesinin bir yaklaşım olarak büyük başarısı, bakterilerin evrimsel ilişkilerinin rRNA genlerine güvenilir bir şekilde yansıdığı (gözlenebileceği) varsayımına dayanmaktadır. Bununla birlikte eğer bakteriler arasında kromozomal genlerin değişimi gerçekleşirse, genlere ait ağaçlar kesin olarak

tür ağaçlarını temsil etmeyebilir (Gaunt ve ark., 2001). Yapılan çalışmalar Rhizobia genomunda kimerik 16S rDNA dizilerinin bulunduğu dair kanıtlar ortaya koymuştur (Eardly ve ark., 1996). Ayrıca *Mesorhizobium* cinsi içerisindeki türler arasında 16S rDNA geninin tam kopya olarak transfer edilebildiği de tespit edilmiştir (Sullivan ve ark., 1996). Bu bulgular 16S rDNA baz dizisi filogenisinin yanıltıcı olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle 16S rDNA’da olduğu gibi tek gen filogenilerine bağlı analizlerde gen transfer etkisini belirleyebilmek için birden fazla lokus çalışılmalıdır. Bu yolla Rhizobia içerisindeki evrimsel ve ekolojik ilişkilerin daha detaylı olarak anlaşılabilmesi için DNA değişimi yapan tür veya cinsler belirlenebilir ve konsensüs ilişkileri ortaya çıkartılabilir (Turner ve Young, 2000; Gaunt ve ark., 2001). Bu çalışmada 16S rDNA’ya ek olarak bir **housekeeping** gen (kromozom üzerinde yer alan temel metabolik gen) olan *recA* geninin DNA baz dizi filogenisi de yapılmıştır. *RecA* geni, DNA rekombinasyon ve onarım sisteminin bir kısmını kodlar ve bu genin *Bacteria* içerisindeki filogenisi 16S rDNA ile tutarlılık gösterir (Gaunt ve ark., 2001).

2.4 Nodülasyon Süreci ve Genetik Temelleri

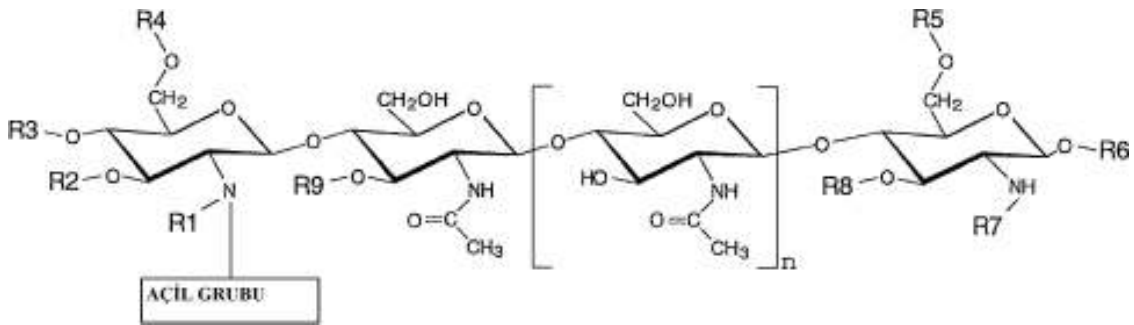
2.4.1 Nodülasyon (nod) Faktörleri ve Sentezlenmesinde Rol Oynayan Genler

Rhizobia tarafından salgılanan ve Nodülasyon faktörleri (Nod faktörleri) olarak isimlendirilen özel sinyal molekülleri nodülasyon sürecindeki erken etkilerin uyarılmasında temel bir rol oynamaktadır (Geurts ve Bisseling, 2002). Bu erken etkiler şu şekilde sıralanabilir:

- Nod faktörü uygulamasından birkaç saniye sonra, kılcık kök ucunda Ca^{2+} girişinin gerçekleşmesi ve sitosolik Ca^{2+} konsantrasyonunda artış. Bunun sonucu olarak da bir membran depolarizasyonunun oluşması.
- 20-30 dakika sonra köklerden peroksit salınmasının baskılanması ve kılcık kök hücreleri içerisindeki aktin ve mikrotübül ağının yeniden organizasyonu.
- Bunu takiben çekirdek çevresindeki bölgede stoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun periyodik değişiminin (Ca^{+} spiking) uyarılması ve sonrasında kılcık köklerde deformasyon oluşması, kortikal hücrelerde bölünmenin başlaması, kılcık köklerde kıvrılma ve enfeksiyon ipliğinin oluşmaya başlaması (Hirsch ve ark., 2001; Brewin, 2004).

Rhizobium-baklagil etkileşiminde özgünlük temel olarak konukçu bitki tarafından tanınan nod faktörlerince kontrol edilir. Nod faktörleri genellikle beta-(1,4) bağıyla bağlı, dört veya beş *N*-asetil-D-glukozamin (GlcNAC) parçası içeren bir oligosakkarit omurgadan oluşmaktadır. Bu oligosakkarit omurga kitin yapısına benzerlik gösterdiğinden Nod faktörlerine sıklıkla **lipo-kitin oligosakkaritler** (LCO) de denilmektedir. Rhizobia'da konukçu özgünlüğü Nod faktörlerindeki çeşitli varyasyonlar ile belirlenir (Şekil 2.2). Bu varyasyonlar;

- *N*-asetil-D-glukozamin birimlerinin sayılarındaki varyasyonlar. Genellikle bu birimlerin sayıları 3 ile 6 arasında değişim gösterir.
- Şekil 2.2'de R1-R9 arasında gösterilen, izolata özgü yer değiştirmeler.
- Bağlı yağ açıl zincirinin yapısındaki varyasyonlar (zincirin uzunluğu ve doymamışlık derecesi).
- Özel α,β -doymamış yağ asidi zincirlerinin varlığı veya yokluğu, şeklinde sıralanabilir (Spaink, 2000; Brewin, 2004).



Şekil 2.2 Rhizobia tarafından salgılanan nod faktörlerinin genel kimyasal yapısı (Spaink, 2000)

Konukçu bitki çeşitliliğini belirleyen bu türlü varyasyonlar ve yer değiştirmeler bakteri genomundaki konukçuya özel *nod* genleri tarafından kodlanır (Chaintreuil ve ark., 2001). Nodülasyon genlerinden ***nodABCD***, bütün Rhizobia'da bulunurken, diğerleri sadece bazı türlerde bulunur. *NodABCD* genleri tüm nod faktörlerinin lipooligosakkarit omurgalarının sentezinden sorumludurlar ve nodülasyon için kaçınılmaz olarak gereklidirler. Bunlara ek olarak ***nodI*** ve ***nodJ*** gibi genler Nod faktörlerinin bakteri hücrelerinden salınmasında rol alan **NodI** ve **NodJ** zar proteinlerini kodlamaktadır. Ayrıca ***nodL***, ***nodH*** gibi konukçuyu belirleyen genler, nodülasyon faktörlerindeki çeşitli yer değiştirmeleri belirlerler ve bu genlerdeki mutasyonlar

Rhizobiyal konukçu çeşitliliğinde değişmelerle sonuçlanabilir. Bu nedenle *nod* genleri ve *nod* faktörleri, nodülasyon ve konukçu çeşitliliğinde merkezi bir rol oynar (Debelle ve ark., 2001; Madigan ve ark., 2003). *Nod* faktörlerinin sentezlenmesinde ve salgılanmasında görev alan farklı genler ve bunların fonksiyonları Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 *Nod* faktörlerinin sentezlenmesinde ve salgılanmasında görev alan farklı genler (Krishnan ve Bennett, 2006)

	Nod Geni	Görevi
Regülasyon Genleri:		
	<i>nodD</i>	LsyR-transkripsiyonel aktivatör
	<i>nodV</i>	İki bileşenli regülasyon
	<i>nodW</i>	İki bileşenli regülasyon
	<i>nolA</i>	transkripsiyonel aktivatör
	<i>nolR</i>	LsyR tip regülatör
	<i>syrM</i>	LsyR tip regülatör
Glikozamin Omurganın Sentezinde Rol Alan Genler:		
	<i>nodB</i>	Deasetilaz
	<i>nodC</i>	UDP-GlcNAc transferaz
	<i>nodM</i>	D-glukozamin sentetaz
Yağ Asidi Sentezinde ve Bunların Nod Faktörlerinin İndirgenmemiş Ucuna Transferinde Rol Alan Genler:		
	<i>nodA</i>	N-açiltransferaz
	<i>nodE</i>	β-ketoaçil sentetaz
	<i>nodF</i>	Açıl taşıyıcı protein
Nod Faktörlerinin İndirgenmemiş Ucunun Modifikasyonunda Rol Alan Genler:		
	<i>nodS</i>	S-adenozil metionin metil transferaz
	<i>nodL</i>	6-O-asetil transferaz
	<i>nodU</i>	6-O-carbamoyl transferaz
	<i>nolO</i>	3-O-carbamoyl transferaz
Nod Faktörlerinin İndirgenmiş Ucunun Modifikasyonunda Rol Alan Genler:		
	<i>nodP</i>	ATP sülfürlaz
	<i>nodQ</i>	ATP sülfürlaz, APS kinaz
	<i>nodH</i>	Sulfotransferaz
	<i>nodZ</i>	Fucosil transferaz
	<i>nolK</i>	Epimeraz
	<i>nodX</i>	Asetil transferaz
	<i>noeE</i>	Sulfotransferaz
	<i>nolL</i>	O-asetil transferaz
	<i>noeI</i>	2-O-metil transferaz
Nod Faktörlerinin Salgılanmasında Rol Alan Genler		
	<i>nodI</i>	ATP-bağlayan protein
	<i>nodJ</i>	Zar proteini
	<i>nodT</i>	Zar proteini
	<i>nolFGHI</i>	Zar proteini

Tüm *Rhizobia*'da ortak olarak bulunan *nodABCD* genlerinden ***nodD*** bir **regülatör protein** olan ve diğer *nod* genlerinin transkripsiyonunu kontrol eden NodD'yi kodlar (Madigan ve ark., 2003). Diğer bir *nod* geni olan ***nodC***, **kitin sentetaz** homologudur ve ***N*-ačilglukozamil transferaz** olarak görev yapar, UDP-N-asetil glukozamin monomerlerini kitin benzeri omurgaya bağlar. Bir **deasetilaz** olan ***nodB*** ise kitin oligomerin uçtaki parçasından asetil grubunu uzaklaştırır (Ueda ve ark., 1995; Hirsch ve ark., 2001; Moulin ve ark., 2004). Nod faktörleri genel lipid metabolizmasından veya özel bir α,β -doymamış yağ asidi havuzundan gelen yağ asitleri ile asetillenir. Bir **ačiltransferaz** kodlayan ***nodA*** geni nod faktörünün oligosakkarit omurgasına transfer edilen N-ačil değişiminin tipini belirleyerek bu ayrımın yapılmasında kritik rol oynar. Bu nedenle NodA proteini nod faktör yapısını, konukçu çeşitliliğini belirler ve bu surette iyi bir nodülasyon markörüdür (Suominen ve ark., 2001; Chaintreuil ve ark., 2001). Ayrıca *nodA* geni genom içerisinde tek bir kopya halinde bulunur (Debelle ve ark., 2001). Bunlara ek olarak **NCBI** (National Center for Biotechnology Information) gibi uluslar arası moleküler veri tabanlarında farklı konukçulardan izole edilmiş çeşitli *Rhizobiyal* türlere ait *nodA* DNA dizileri mevcuttur. Bütün bu nedenlerden dolayı bu çalışmada izole edilen *Rhizobia* örneklerinin *nod* genlerinin genetik varyasyonlarını ve konukçu sınırlarını belirlemek için *nodA* geni seçilmiştir.

Rhizobiyal hücreler, yapısında doğal olarak 10 taneye kadar **plazmid** bulundurabilir. Bunlar, boyutları 100 kb'den daha **küçük plazmidler** veya 1000 kb'den büyük olabilen **mega plazmidler** olabilirler. Bazı örneklerde plazmidlerin ve mega plazmidlerin toplam uzunlukları kromozomun uzunluğuna eşit olabilmektedir, bu da *Rhizobia* genomunun neredeyse % 50'sinin kromozom üzerinde bulunmadığı anlamına gelmektedir (Kuykendall ve ark., 2005). *Nod* genlerinin bulundukları yerler farklı *Rhizobiyal* türlerde kromozomal veya plazmid DNA'sı olmak üzere değişiklik gösterir (Suominen ve ark., 2001). Hızlı gelişen *Rhizobiyal* türlerin genelinde bu genler büyük simbiyotik plazmidler üzerinde bulunurken, *Bradyrhizobium* izolatlarında ise kromozom üzerinde bulunur (Downie ve ark., 1988). Bu durumlardan farklı olarak Sullivan ve Ronson (1998), *Mesorhizobium loti*'nin simbiyotik genlerinin kromozom üzerinde bulunan 500 kb büyüklüğündeki bir dev transpozonda bulunduğunu ve bunun laboratuvar ortamında simbiyotik özelliği bulunmayan *Mesorhizobium* izolatlarına aktarılabildiğini göstermişlerdir. Bu yapıya da, Gram-negatif bakteriyal patojenlerdeki

patojenite adalarına atfen **simbiyotik ada** adını vermişlerdir. Nod operonlarının genomdaki yerlerinin yanı sıra, bu operon içerisindeki internal yapı da Rhizobiyal genomlarda farklılık gösterebilir (Suominen ve ark., 2001). *R. leguminosarum* ve *Ensifer meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*)’de olduğu gibi Rhizobiyal türlerin genelinde ortak *nod* genleri aynı operon içerisinde *nodABCIIJ* şeklinde, transkripsiyonu ayrı şekilde yapılan *nodD* ile bir arada bulunurlar (Scott ve ark., 1996). Buna karşın *R. etli*’de *nodA* geninin *nodDBC* genlerinden 20 kb uzakta, dolayısıyla farklı bir transkripsiyon birimi içerisinde olduğu belirlenmiştir (Vazquez ve ark., 1991). Benzer şekilde *Mesorhizobium loti*’de *nodB* geninin *nodACIIJ*’den farklı bir operonda bulunduğu belirlenmiştir (Scott ve ark., 1996).

Nod genleri Rhizobia’ya özgüdürler ve tüm Rhizobia’da bulunan *nodA*, *nodB*, *nodC* ve *nodD* genlerinin filogenileri birbirlerine ve *nifH* filogenisine benzerken 16S rDNA filogenisinden farklılık gösterir. Simbiyotik genler ile housekeeping genler arasındaki bu filogenetik uyumsuzluğun açıklanabilmesi için en olası hipotez Sym genlerinin lateral olarak transfer edilmeleridir (Haukka ve ark., 1998; Laguerre ve ark., 2001). Yapılan çeşitli çalışmalar *nod* gen filogenilerinin konukçu bitki (leghemoglobin proteini) filogenileri ile benzerlik gösterdiğini, bu nedenle *nod* genlerinin evriminin bir şekilde konukçu baklagil evrimi ile bağlantılı olabileceğini ortaya koymuştur (Ueda ve ark., 1995).

2.4.2 Baklagil Rhizobium Özgüllüğünü Sağlayan Diğer Faktörler

Nodülasyon sürecinde *Rhizobia* ve baklagil türleri arasındaki özgüllüğün belirlenmesinde *nod* faktörlerinin yanı sıra **flavonoidler** gibi diğer bazı faktörlerin de rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Kompleks organik moleküller olan flavonoidlerin vasküler bitkilerden 4000’den fazla çeşidi tanımlanmıştır ve bitkilerde gelişmenin düzenlenmesi, tozlaşmayı sağlayan böceklerin cezbedilmesi ve zararlı kontrolünü kapsayan çok sayıda fonksiyonu vardır (Hirsch ve ark., 2001; Madigan ve ark., 2003). Flavonoidlerin, **isoflavonoidler** adı verilen özel bir alt kümesi *Leguminosae* familyasına özgüdür ve bir bakteriyal transkripsiyonel regülatör olan NodD’yi aktive ederek *nod* faktörlerinin sentezinde yer alan diğer bakteriyal nodülasyon genlerinin transkripsiyonunu uyarır (Hirsch ve ark., 2001; Geurts ve Bisseling, 2002). İlginç şekilde *nodD* indükleyicileriyle yapısal olarak çok yakın ilişkili bazı flavonoidler, belirli Rhizobiyal türlerin *nod* genlerinin indüksiyonunu inhibe edebilir. Örneğin soya

fasulyesi (*Glycine max*) tarafından üretilen isoflavonoidler (**daidzein ve genistein**) *Bradyrhizobium japonicum nod* genlerinin indükleyicisidir, buna karşın *Ensifer meliloti nod* genlerinin ekspresyonunu inhibe eder (Hirsch ve ark., 2001). Bu özgünlük, Rhizobia'nın konukçusunu diğer baklagillerden ayırmasını sağlar. Bu durum Rhizobium-baklagil simbiyozunda bitki ve bakteri arasında gözlenen özgünlüğün bir kısmının bitki tarafından salınan flavonoidlerin kimyasal doğasında yatabileceği fikrini ortaya koymuştur. Ayrıca flavonoidler sadece *nod* genlerinin ekspresyonlarını uyarmakla kalmaz, ayrıca Rhizobiyal kemotaksiyi de uyarır (Hirsch ve ark., 2001). Nod faktörlerine ek olarak, baklagil lektinlerinin, bakteriyal eksopolisakkaritlerin, lipopolisakkaritlerin ve K-antijenlerinin de baklagil Rhizobia özgüllüğünde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Hirsch, 1999).

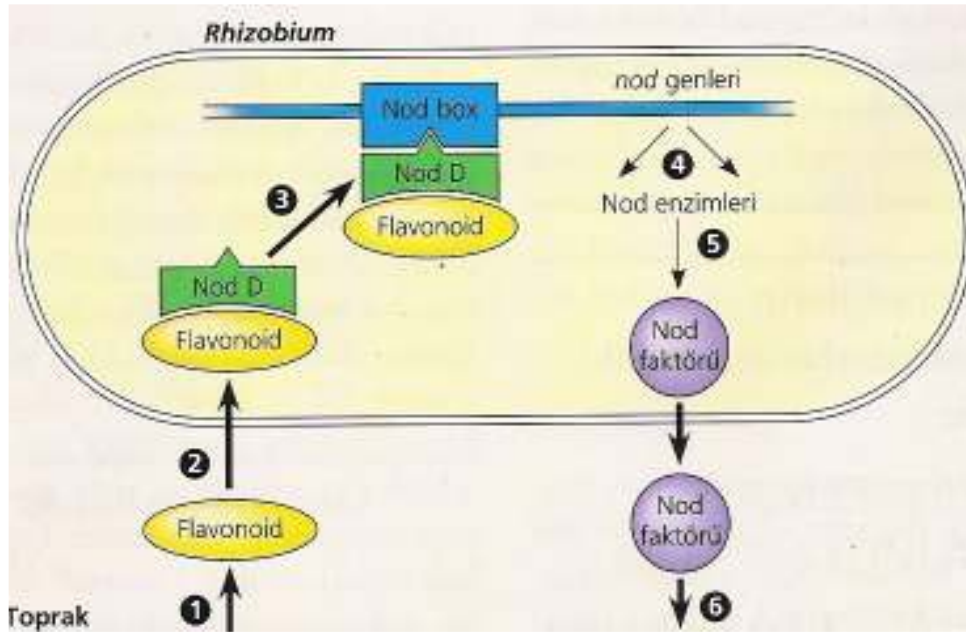
2.4.3 Kök Nodül Oluşumunun Basamakları

Rhizobia grubu bakteriler ve Baklagiller arasındaki karşılıklı etkileşimin ürünü olan kök nodüllerinin oluşum süreci aşağıdaki basamaklarla özetlenebilir;

- a) **Tanırma ve tutunma:** Bu aşama uygun Rhizobia ve baklagil türlerinin birbirlerini tanımasını ve Rhizobia hücrelerinin bitkinin kılcal köklerine tutunmasını kapsar. Baklagil ve Rhizobia arasındaki iletişim bitki kökleri tarafından **flavonoid** adı verilen moleküllerin salgılanmasıyla başlar. Bölüm 2.4.2'de açıklandığı gibi, belirli flavonoid türleri belirli Rhizobiyal türlerde **nodD** proteinini aktive ederek *nod* genlerinin ekspresyonlarını tetikler ve aynı zamanda Rhizobiyal kemotaksiyi uyarır. Rhizobia baklagil birlikteliğinde bakterilerin bitkiye tutunması, nodül oluşumunda ilk adımdır. Rhizobiada bulunan ve kalsiyum bağlayan özel bir adhezyon proteini olan **Rhicaadhesin**, bitkinin kılcal köklerinin yüzeyinde bulunan kalsiyum komplekslerine bağlanırlar. Ayrıca **Lektinler** olarak bilinen karbonhidrat içeren proteinler ve bitki hücre zarındaki özel **reseptörlerde** bitki-bakteri tutunmasında rol oynarlar (Hirsch ve ark., 2001; Campbell ve ark., 2006; Madigan ve Martinko, 2010).

b) Bakteri tarafından nodülasyon (Nod) faktörlerinin salgılanması: Bu aşama bir dizi alt basamağı kapsar (Şekil 2.3):

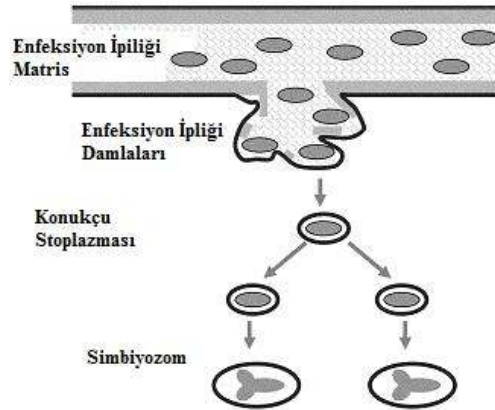
- Bitki köklerinden özel bir flavonoid yapısında olan bir sinyal molekül salgılanır. Bu molekül sadece bitkinin Rhizobia ortağı tarafından algılanır.
- Flavonoid, Rhizobia’da NodD olarak isimlendirilen bir gen regülatörünü aktiveleştirir.
- Bir transkripsiyon faktörü olan nodD, Nod kutusu olarak isimlendirilen bir DNA bölgesine bağlanır. Nod kutusu, Nod genlerinin transkripsiyonunu başlatır.
- Nod genlerinin ürünleri Nod faktörü olarak isimlendirilen, Rhizobia ve bitki arasındaki özgül bir sinyal olarak işlev gören, kitin benzeri bir maddenin üretiminde rol alan metabolik yol enzimleridir.
- Nod faktörü erken nodulin genlerinin aktiveleştirilmesi, enfeksiyon ipliğinin oluşması ve kortikal hücrelerin çoğalması gibi basamakları tetikler (Trevaskis ve ark., 2002; Campbell ve ark., 2006).



Şekil 2.3 Nod faktörlerinin sentezlenmesini uyaran moleküler süreç (Campbell ve ark., 2006)

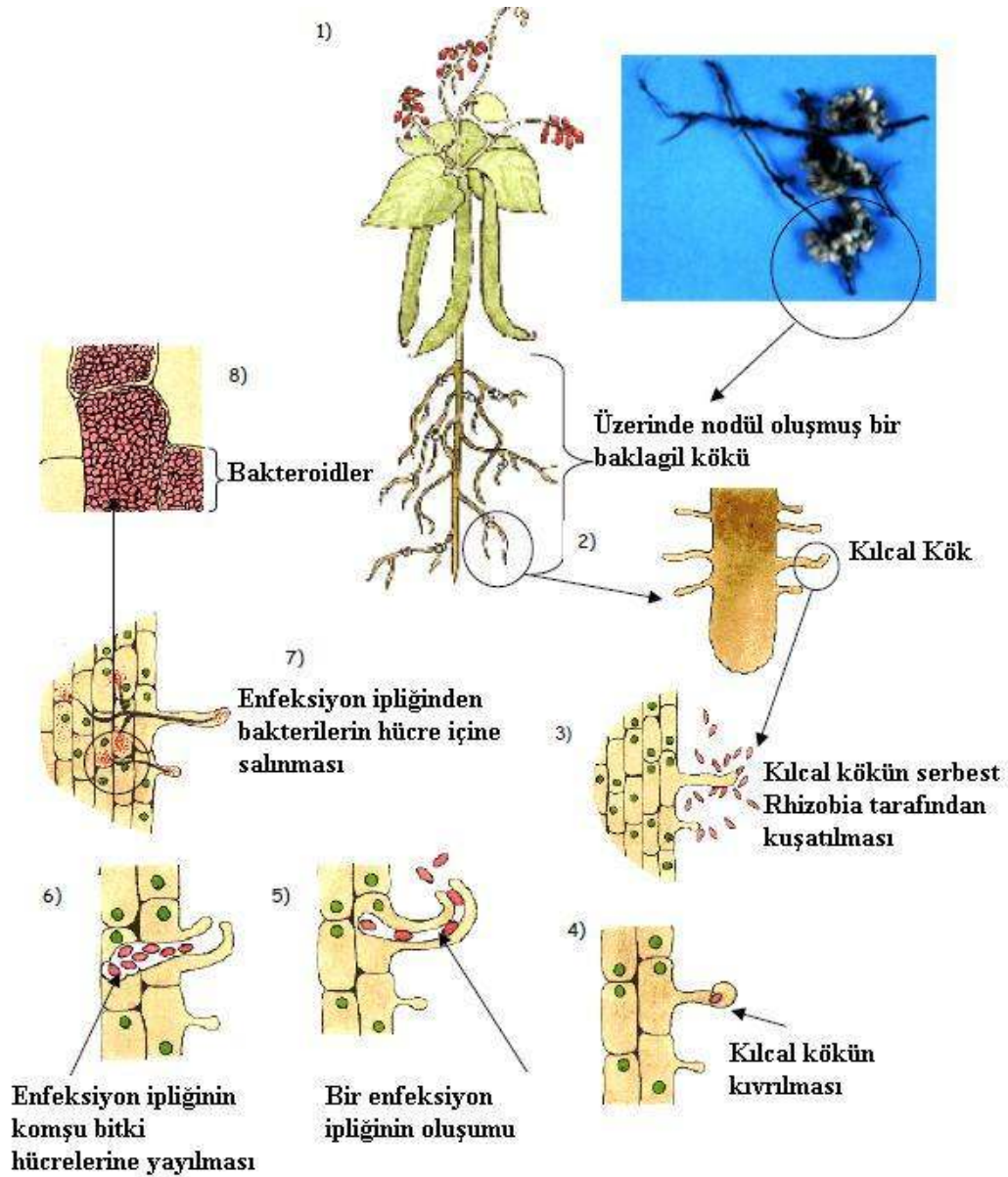
yukarıda açıklandığı gibi hücre duvarı üzerinde oluşan basınç, duvarda bölgesel çatlaklara ve kısmi parçalanmalara neden olarak bir giriş noktası oluşturur. Bu noktada hücre iskeletini oluşturan yapıların yeniden organizasyonu, enfeksiyon ipliği oluşumu için hücre içerisine doğru gelişen bir büyüme ucu oluşturur. Enfeksiyon cebi içerisindeki bakteriyel mikro koloninin salgıladığı yüksek konsantrasyondaki nod faktörü, enfeksiyon ipliğinin oluşmaya başlaması için gereklidir (Brewin, 2004; Oldroyd ve Downie, 2008).

- e) **Enfeksiyon ipliğinin uzaması ve ana kökün enfeksiyonu:** Bu esnada nod faktörlerinin etkisiyle bitki kökünün korteks bölgesinde, nodül premordiyum'unun oluşması için hücre bölünmelerini kapsayan bir takım değişiklikler meydana gelir. Bunu takiben kök yüzeyi ile korteks hücreleri arasında bir kanal olan enfeksiyon ipliği kortikal bölgeye doğru uzar. Uzayan bu enfeksiyon ipliği içerisinde bakteriler bölünür ve nodül premordiumundan türeyen korteks hücrelerine doğru hareket eder (Krishnan ve Bennett, 2006).
- f) **Bakteroidlerin ve Simbiyozomların oluşumu:** Bakteriler ile dolu iplik, nodül premordiumuna ulaştığında bitki zarı ile çevrilmiş Rhizobiyal hücreler, bitki sitoplazması içerisine salınır (Şekil 2.5) ve burada **Bakteroid** adı verilen morfolojik olarak farklı formlara dönüşürler. Bakteroidler bitki hücre zarından köken alan peribakteroid zar ile çevrilidir ve bütün bu yapı **simbiyozom** olarak adlandırılır. Simbiyozom içerisinde bakteroidler enzimatik olarak azotu amonyağa indirgerler (Krishnan ve Bennett, 2006).



Şekil 2.5 Rhizobiyal hücrelerin kök korteks hücreleri içerisine geçişi ve bacteroid oluşumu (Brewin 2004)

g) **Olgunlaşmış Kök nodüllerinin oluşumu:** Bakterilerin ve bitki hücrelerinin bölünmeye devam etmesiyle olgunlaşmış kök nodülleri oluşur (Şekil 2.6). Rhizobia içerisinde nodüllerin meristem dokusunun kalıcı veya geçici olmasına göre 2 tip nodül ayırt edilir. **Indeterminate nodüller** kalıcı bir apikal meristem dokusuna sahiptir, bu nedenle uzamış bir görüntüsü vardır. Buna karşın **determinate nodüller** geçici bir apikal meristem dokusuna sahiptir ve küresel bir şekle sahiptir (Schultze ve Kondorosi, 1998).



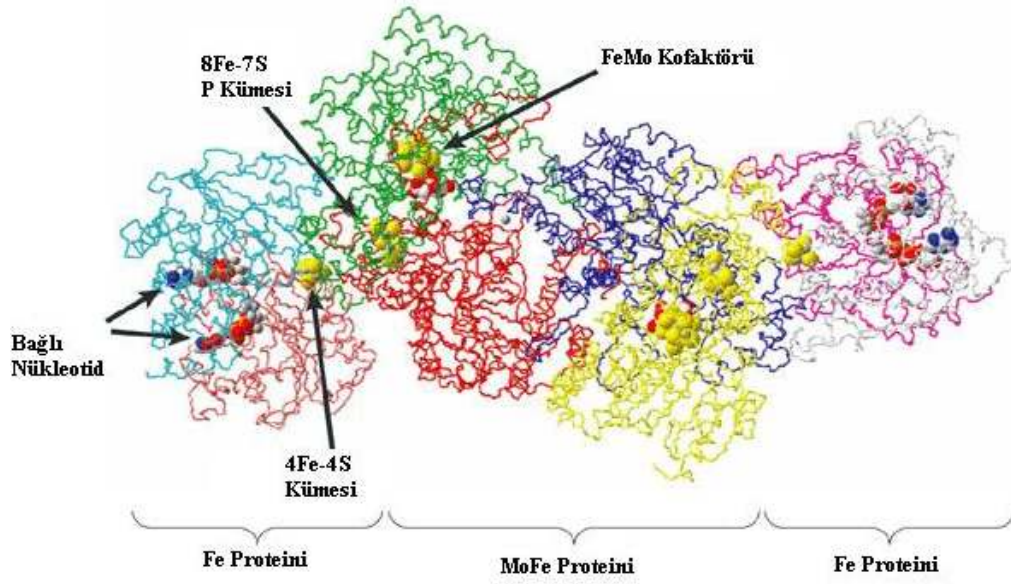
Şekil 2.6 Rhizobia'da nodülasyon süreci (<http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium.pdf>, 18.12.2009)

2.5. Azot Fiksasyon Süreci ve Genetik Temelleri

Gelişme için besin kaynağı olarak kullanılmak üzere, atmosferik azotun amonyağa biyolojik olarak dönüştürülmesi şeklinde tanımlanan **diazotrofi** (azot fiksasyonu), *Bacteria* ve *Archaea* domainlerinde yaygın olarak paylaşılan bir özellik olmasına karşın, *Eucarya* domainin de yer alan organizmalarda bulunmamaktadır (Sawada ve ark., 2003). Bu süreç ile ilgili olarak, serbest yaşayan bir diazotrof olan *Klebsiella pneumoniae* üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda büyük miktarda bilgi edinilmiştir. Bununla birlikte son yıllarda farklı Bacterial ve Archaeal diazotroftan çok sayıda yeni azot fiksasyon genleri (*nif*) tanımlanmış, klonlanmış, dizileri belirlenmiş ve analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler azot fiksasyonunun temel özelliklerinin organizmalar arasında sıkı bir şekilde korunduğu varsayımını doğurmuştur (Fani ve ark., 2000).

2.5.1 Nitrojenaz Enzimi ve Yapısı

Azotun amonyağa biyolojik olarak indirgenmesi süreci, **Dinitrojenaz** ve **Dinitrojenaz Redüktaz** adı verilen iki farklı proteinden oluşan kompleks bir metalloenzim olan **nitrojenaz enzim kompleksi** tarafından katalizlenir (Madigan ve Martinko, 2010). Enzimi oluşturan bu iki alt bileşen içerdikleri metal kompozisyonlarına bağlı olarak isimlendirilirler (Şekil 2.7). Bunlardan, demir (Fe) proteini olarak bilinen küçük homodimerik (γ_2) bileşen, Dinitrojenaz Redüktaz, ATP bağımlı elektron vericisi olarak görev yapar. Buna karşın molibdenyum-demir proteini (MoFe) olarak bilinen büyük bileşen Dinitrojenaz ise iki farklı alt birimden ($\alpha_2\beta_2$) oluşan bir heterotetramerdir. Büyük alt bileşen, **P kümesi** (bir [8Fe-7S] kümesi) ve substratın indirgendiği katalitik bölge olan **FeMo kofaktörü** (MoFe_7S_9 homositrat) olmak üzere iki tip metal çekirdek içerir (Dixon ve Kahn, 2004).



Şekil 2.7 Dinitrojenaz enziminin yapısı (Dixon ve Kahn, 2004)

Dinitrojenaz redüktaz, O_2 varlığında hızla ve geri dönüşümsüz olarak denatüre olmaktadır. Bu nedenle aeobik diazotrofik bakteriler azot fiksasyonu gerçekleştirebilmek için özel bir takım mekanizmalar geliştirmişlerdir, bunlar:

- Solunum hızının artırılarak O_2 'nin hızla tüketilmesi
- Hücreye O_2 girişini yavaşlatan mukoz tabaka oluşturulması
- *Cyanobacteria*'da olduğu gibi nitrojenazın özel bir tip hücrede (heterokist) bulundurulması
- Nitrojenazın özel bir protein ile kompleks oluşturarak (konformasyonel koruma) denatürasyondan korunması (Madigan ve Martinko, 2010).

Bu mekanizmalardan farklı olarak Rhizobia, nodüller içerisindeki oksijen seviyesini **leghemoglobin** ile kontrol etmektedir. Bu kırmızı renkli, demir içeren protein, hemoglobin ile benzer bir fonksiyon göstererek oksijen ile bağlanır. Bu durum bakteroidlerin metabolik faaliyetleri için yeterli oksijen varlığını sağlarken, nitrojenazın aktivitesini yok edebilecek serbest oksijen birikimini de engeller. Leghemoglobin'in bitki ve Rhizobia'nın karşılıklı etkileşimleri ile oluşturulduğuna ve dolayısıyla bu bitki ve bakterilerin tek başlarına leghemoglobin oluşturamadığına inanılmaktadır (<http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium.pdf>, 18.12.2009).

2.5.2 Azot Fiksasyonu İle İlgili Genler

Rhizobia'da bulunan azot fiksasyon genleri temel olarak *nif* ve *fix* genleri olmak üzere iki grupta incelenebilirler. *Nif* ve *fix* genleri nitrojenaz kompleksinin yapısal genlerinin yanı sıra FeMo-co genleri, elektron transport protein genleri ve bir dizi regülatör geni de kapsamaktadır (Madigan ve Martinko, 2010).

Rhizobiyal *nif* genleri 20 adet *Klepsiella pneumoniae nif* geninin yapısal homologlarıdır ve bu korunmuş *nif* genlerinin Rhizobia'da *K. pneumoniae*'deki fonksiyonlarına benzer rol oynadığı düşünülmektedir (Fischer, 1994). Bu genlerden *nifD* ve *nifK* dinitrojenazın sırasıyla α ve β alt birimlerini kodlayan, *nifH* ise dinitrojenaz redüktazın benzer iki alt birimini kodlayan yapısal genlerdir. Ayrıca *nifB*, *nifE* ve *nifN*'yi kapsayan bir dizi diğer gen MoFe-co'nun biyosentezinden sorumlu proteinleri kodlamaktadır. Bu genlere ek olarak bu metabolik yolu düzenleyici *nifA* geni bulunmaktadır (Fani ve ark., 2000; Masson-Boivin ve ark., 2009; Madigan ve Martinko, 2010).

Fix genleri terimi ise azot fiksasyonu için gerekli olan fakat *K. pneumoniae*'de homolog bir eşleniği bulunmayan genler için kullanılmaktadır. Bu genlerden *fixABCX* genlerinin ürünleri muhtemelen elektron transport proteinleri olarak görev yapmaktadır. Diğer bir *fix* gen grubu olan *fixNOQP* ürünlerinin, membran bağımlı sitokrom c içeren Sitokrom Oksidaz olduğu ve bu oksidaz kompleksin kök nodüllerindeki düşük oksijen koşulları altında bakteroidlerin solunumu için gerekli olduğu belirlenmiştir. Bu gen grubunun downstream ucunda ise membranda bulunan bir katyon pompasını kodladığı düşünülen *fixGHIS* gen grubu bulunmaktadır. (Fischer, 1994; Luyten ve Vanderleyden, 2000; Masson-Boivin ve ark., 2009).

Simbiyotik diazotrofi için gerekli *nod*, *nif* ve *fix* genleri pek çok Rhizobiyal türde **Sym plazmitler** (*pSym*) adı verilen ve farklı gruplar arasında transfer edilebilen plazmidler üzerinde bulunmaktadır, buna karşın *B. japonicum* ve *A. caulinodans*'da plazmid bulunmadığından, bu genler bu organizmaların kromozomu üzerinde yer almaktadırlar (Balows ve ark., 1991; Eardly ve ark., 1992; Fischer, 1994).

Azot fiksasyon genleri içerisinde en çok çalışılmış gen *nifH* genidir. Bu güne kadar yapılan çeşitli araştırmalarda farklı Rhizobiyal tür ve izolatlara ait *nifH* genlerinin DNA baz dizileri belirlenmiş ve filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar iki farklı sonuç ortaya koymuştur. Hennecke ve ark. (1985), Young (1992) ve Dobert ve ark. (1994) *nifH* gen filogenilerinin 16S rDNA'ya benzerlik

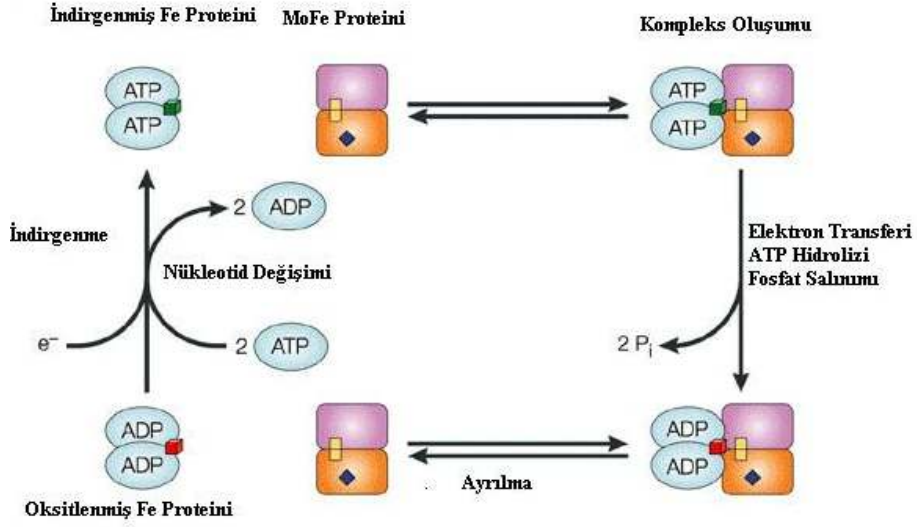
gösterdiğini, dolayısıyla da bu genlerin ortak bir evrimsel geçmişi paylaştığını belirtmişlerdir. Buna karşın Eardly ve ark. (1992) bu çalışmaların aksi bir sonuç ortaya koyarak, Sym plazmidlerinin izolatlar arasında horizontal olarak transfer edilebileceğini dolayısıyla da, Sym plazmid genlerinin filogenilerinin kromozomal gen filogenileri ile uyuşmasının beklenmemesi gerektiğini belirtmiştir. Haukka ve ark. (1998) *Mesorhizobium* ve *Ensifer* cinsi Rhizobiyal izolatları içeren geniş bir koleksiyondan elde ettikleri *nifH* ve *nodA* dizilerini, o döneme kadar yayınlanmış *nifH* ve *nodA* dizileri ile birlikte analiz etmişler ve sonuçta *nifH* filogenisinin 16S rDNA'ya değil diğer bir Sym plazmid geni olan *nodA*'ya benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca bu sonucun *nod* ve *nif* genlerinin sıklıkla aynı plazmid üzerinde birbirleri ile ilişkili olarak bulunması nedeniyle şaşırtıcı olmadığını ifade etmişlerdir. Laguerre ve ark. (2001)'da yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Farklı Rhizobiyal cinslere ait izolarlardan elde ettikleri *nifH* gen dizilerinin genel anlamda bir nodülasyon geni olan *nodC* ile benzer filogeni gösterdiğini, buna karşın 16S rDNA'dan farklı olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.5.3. Azot Fiksasyonunda Elektron Akış Basamakları

Azot gazı (N_2), atomları arasındaki üçlü bağ nedeni ile oldukça stabil bir yapıya sahiptir. Bu bağların aktivasyonu ve kopartılması **940 kJ** gibi yüksek miktarda enerji gerektiren bir süreçtir (Madigan ve ark., 2003). Azot fiksasyonunda süreç şu şekilde yürümektedir (Şekil 2.8):

- Azot indirgenmesinde ilk olarak elektronlar, düşük potansiyelli demir-kükürtlü proteinler olan **ferrodoksin** veya **flavodoksinden** Dinitrojenaz Redüktaza aktarılır.
- Bu esnada Dinitrojenaz Redüktaza her elektron döngüsü için iki molekül ATP bağlanır. ATP bağlanması Dinitrojenaz Redüktazın yapısını değiştirir ve indirgenme potansiyelini düşürür, böylece Dinitrojenaz Redüktazın Dinitrojenaz ile ilişkiye geçmesi sağlanır.
- Elektron, Dinitrojenaz Redüktazdan Dinitrojenazın P kümesine geçer, böylece Dinitrojenaz indirgenir ve buna bağlı olarak ATP hidrolizlenir bunun sonucu olarak da Dinitrojenaz Redüktaz, Dinitrojenaz'dan ayrılır.

- Dinitrojenazın P kümesinde yer alan elektron, buradan esas katalitik bölge olan FeMo-co bölgesine aktarılır ve Dinitrojenaz yeterince indirgenmediğinde, azotu bu bölgede amonyağa indirger. N_2 'nin NH_3 'e indirgenmesi için sadece altı elektron yeterlidir, buna karşın sekiz tane elektron tüketilir. Bunun nedeni her bir mol N_2 'nin indirgenmesi için iki elektronun H_2 şeklinde kaybedilmesidir (Dixon ve Kahn, 2004; Madigan ve Martinko, 2010).



Şekil 2.8. Nitrojenaz enzim aktivitesinin şematik mekanizması, (Dixon ve Kahn, 2004)

2.6 Konukçu Bitkiler Olarak Bakla, Bezelye, Fasulye ve Rhizobiyal Simbiyontları

Bakla'nın (*Vicia faba* L.) dünya genelindeki 57 farklı ülkede yaklaşık 6000 yıldır tarımının yapılmasına karşın, çoğunlukla Akdeniz bölgesinin yüksek yağış alan veya sulanan bölgelerinde buğdayla dönüşümlü olarak yetiştirilmektedir (Beck ve Duc, 1991; Tian ve ark., 2007). Eski medeniyetlerde, Amerika'dan fasulye türleri gelmeden önce önemli bir yiyecek ürünü olan bakla, bu önemini günümüzde de hala sürdürmektedir. Bakla'nın temel kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir: insan kullanımı için kurutulmuş tohum eldesi veya taze bakla, hayvan yemi, kurutulmuş tohumlardan un üretimi veya protein ekstraksiyonu için endüstriyel olarak işlenmesi. Bununla birlikte bakla'nın bazı varyeteleri Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA içeriği açısından (3,4-dihydroxy-phenylalanine) zengindir (Van Berkum ve ark., 1995). Bakla muhtemelen Ortadoğu ve Kuzey Afrika kökenlidir. Bakla'nın hiçbir yabani atasının

bilinmemesine karşın kültüre alınmasının 7000 yıl önce türlerin, güneyde Afrika kıyıları boyunca, kuzeyde İspanya içlerine, Kuzeybatıda Türkiye üzerinden Avrupa içlerine ve İran'a, Afganistan üzerinden Hindistan içlerine doğru yayılmasıyla gerçekleşmiştir (Mutch ve ark., 2003). Dolayısıyla Türkiye bakla'nın olası gen merkezlerinden veya dünyaya dağılmasındaki merkez rotalardan birisidir.

Bakla da diğer pek çok baklagil türü gibi Rhizobia grubu toprak bakterileri ile simbiyotik azot fiksasyonu gerçekleştirir. Bu simbiyotik birliktelik dış kaynaklı azot gübreleri olmaksızın bakla üretimine olanak sağlar. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) *Vicia*, *Pisum*, *Lens* ve *Lathyrus* cinslerinden oluşan Viciae kabilesinin, dolayısıyla da bakla'nın spesifik simbiyontudur (Laguerre ve ark., 2003; Mutch ve ark., 2003; Shamseldin ve ark., 2009). *Rlv* genellikle boyutları 30 ila 800 kb olabilen 1 ila 10 plazmit içerir. Nodül oluşumu (*nod*) ve azot fiksasyonu (*nif*, *fix*) için gerekli genlerin çoğu geleneksel olarak simbiyotik plazmit veya *pSym* olarak adlandırılan bir plazmit üzerinde taşınmaktadır. Yapılan bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bakla'nın nodülasyon için rekabeti tetiklediğini ve karışık bir toprak popülasyonu içerisindeki belirli bir grup Rhizobia tarafından enfekte edildiğini ortaya koymuştur. Dolayısıyla bakla'dan izole edilen Rhizobiyal izolatlar *Rlv*'nin diğer izolatlarından net bir şekilde ayrılmaktadır (Van Berkum ve ark., 1995). *Rlv* bu güne kadar, **Hollanda**, **İngiltere**, **Fas**, **Kanada**, **İspanya** (Van Berkum ve ark., 1995), **Fransa** (Laguerre ve ark., 2003), **Ürdün** (Mutch ve ark., 2003), **İtalya** (Moschetti ve ark., 2005), **Çin** (Tian ve ark., 2007), **Peru** (Santillana ve ark., 2008) ve **Mısır'ı** (Van Berkum ve ark., 1995; Shamseldin ve ark., 2009) kapsayan, dünya'nın farklı ülkelerinde yetiştirilen baklalar'dan izole edilmiştir ve bakla'nın dünya genelindeki yaygın mikrosimbiyontudur. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar *Rlv*'ye ek olarak farklı Rhizobiyal türlerin de bakla ile aktif nodüller oluşturabildiğini ortaya koymuştur. Shamseldin ve ark. (2009) Mısır'da bakla kök nodüllerinden izole ettikleri örneklerin *Rhizobium rubi*, *R. etli* ve *Ensifer meliloti* türlerine ait olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca Tian ve ark. (2007)'da, bakla nodüllerinden elde ettikleri bazı izolatların *R. etli*'ye yakın tanımlanmamış bir taksona ait olduklarını belirtmişler ve bu türü daha sonra *R. fabae* olarak tanımlamışlardır (Tian ve ark., 2008). Bakla'nın dünya genelinde yaygın olarak üretilmesine ve büyük ekonomik önemine karşın baklayla simbiyotik ilişkiye giren Rhizobia'nın biyolojik çeşitliliğini belirlemeye yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada seçilmiş bir diğer konukçu bitki olan bezelye (*Pisum sativum* L.) yüz yıllardır insan besini ve hayvan yemi amaçlı olarak yetiştirilmektedir. Bütün bu zaman boyunca bezelye ırkları bu amaçlara uygun olarak seçilmiş ve sonuçta dünya genelinde binlerce varyetesi ortaya çıkmıştır. Bu varyeteler; hayvan yemi olarak yetiştirilen tarla bezelyeleri, taze sebze olarak insan tüketimi için yetiştirilen market bezelyeleri, dondurma veya konserve amaçlı yetiştirilen yeşil bezelyeler ve kısmen insan tüketimi, çoğunlukla da hayvan yemi amaçlı üretilen kuru bezelye olarak sınıflandırılabilirler (Cousin, 1997). Yapılan çalışmalarla bezelye için dört olası gen merkezi tanımlanmıştır. Bunlar; **Habeşistan (Etiyopya) gen merkezi**, Türkiye, Yunanistan, eski Yugoslavya ve Lübnan'ı içeren **Akdeniz gen merkezi**, İran, Irak ve Kafkasya'yı içeren **Yakın Doğu gen merkezi** ve Kuzey Batı Hindistan, Pakistan, Rusya ve Afganistan'ı kapsayan **Orta Asya gen merkezidir** (Davies ve ark., 1985). Dolayısıyla Türkiye tıpkı bakla da olduğu gibi bezelye'nin de olası gen merkezlerinden birisi ve dünyaya yayılmasında önemli bir geçittir. Daha önce belirttiğimiz gibi *Rlv*, Viciae kabilesindeki diğer bitkiler gibi bezelye'nin de spesifik simbiyontudur ve bu güne kadar **ABD, Kore, Çin, Peru, İtalya, Finlandiya, Yugoslavya** gibi dünyanın farklı ülkelerinden rapor edilmiştir (Van Berkum, ve ark., 1995; Laguerre ve ark., 2003; Moschetti ve ark., 2005; Kwon ve ark., 2005; Santillana ve ark., 2008; Yang ve ark., 2008).

Ayrıca Young ve ark. (1982)'de yaptıkları çalışmada, Türkiye'den bezelye'den izole ettikleri bir örneği (TOM 3624) de *Rlv* olarak tanımlamışlardır. Fakat bu çalışmada teşhis, günümüz kriterlerinden ziyade çapraz aşılama yöntemi ile yapıldığından sonuç tartışmaya açıktır. Son yıllarda yapılan araştırmalar bezelye'nin *Rlv*'ye ek olarak farklı Rhizobiyal türler ile de simbiyotik birliktelik oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu araştırmalarda; Yang ve ark. (2008) Çin'den, Santillana ve ark. (2008) Peru'dan bezelye kök nodüllerinden izole ettikleri bazı Rhizobiyal izolatların *R. etli*'ye benzerlik gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Buna karşın bu izolatların taşıdıkları *pSym*'in kökenini belirlemeye yönelik bir çalışma yapmamışlardır. Bezelye dünya tarımı için çok önemli bir ürün olmasına karşın, tıpkı bakla'da olduğu gibi bu bitki ile de simbiyotik birliktelik kuran Rhizobiyal izolatların genetik çeşitliliğini belirlemeye yönelik yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada mikrosimbiyontları incelenen bir diğer konukçu bitki olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) dünyada doğrudan insan tüketimine yönelik yetiştirilen en

önemli baklagildir (Beebe ve ark., 2001). *Phaseolus* cinsine ait yaklaşık **50** tür bilinmektedir ve bunlardan, *P. vulgaris* (Common Bean), *P. coccineus* (Scarlet Runner Bean), *P. acutifolius* (Tepary Bean), *P. coccineus subsp. polyanthus* (bilinen yaygın bir adı yoktur) ve *P. lunatus* (Lima Fasulyesi) kültüre alınarak yiyecek olarak kullanılmıştır. Bu türler içerisinde *P. vulgaris* en yaygın biçimde ekilen fasulye türüdür. Fasulye'nin, Orta Amerika'da ve Güney Antlar'da olmak üzere Amerika kıtasında iki gen merkezi vardır ve kültüre alınması bu iki gen merkezinde yaklaşık 4000 yıl önce *P. vulgaris* ekotiplerinden daha büyük tohumlu olanlarının seçilmesi yoluyla birbirinden bağımsız olarak başlamıştır (Gepts, 1990; Kaplan ve Lynch, 1999; Martinez-Romero, 2003). Fasulye tohumları Avrupa'ya Amerika kıtasının 1492'deki keşfinden sonra ithal edilmiştir ve 60 yılda yaygın bir şekilde yetiştirilmeye başlanmıştır (Sessitsch ve ark., 1997). Fasulye'nin Asya'ya taşınmasıyla ilgili olarak iki yaygın teori bulunmaktadır. Bunların ilkinde, fasulye Asya'ya, Kuzey Afrika ülkeleri, Türkiye, İran ve Kafkas ülkeleri üzerinden taşınmıştır; ikinci teoriye göre ise İspanya'dan Doğu Avrupa ülkelerine, buradan da Rusya üzerinden Asya'ya taşınmıştır ve sonuçta 17'inci yüz yılda dünyanın neredeyse tamamına yayılmıştır (Akçin, 1988). Bununla birlikte Türkiye'de fasulye tarımının ne zaman başladığına dair kesin bir kayıt bulunmamasına karşın, Evliya Çelebi'nin seyahatnamesinde yemeklik baklagiller içerisinde Fasulye'den bahsetmemesi bu bitkinin yurdumuzda yaklaşık 250 yıllık bir geçmişinin olduğunu işaret etmektedir (Şehirali, 1988).

Fasulye pek çok Rhizobiyal tür ile etkin bir biçimde nodül oluşturan göreceli olarak hoş görülmesi bir konukçudur (Andrade ve ark., 2002). Fasulye'de nodül oluşturan Rhizobia'nın taksonomisi, bu konukçuda nodül oluşturma yeteneğine dayanılarak tanımlanan *Rhizobium phaseoli*'den sonra aşamalı olarak değişmiştir (Mhamdi ve ark., 1999). Jordan, 1984'de yayımlanan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin ilk baskısında fasulyeyi nodüle eden bakterileri, bezelyeyi ve yoncaı nodüle eden bakteriler ile aynı tür içerisindeki (*Rhizobium leguminosarum*) farklı bir biyolojik varyeteye (bv. *phaseoli*) yerleştirmiştir. Her ne kadar fasulye izolatları aynı biyolojik varyeteye yerleştirilmişse de, iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezinde protein şablonları, antibiyotik dirençliliği, serolojik tiplendirme, DNA-DNA hibridizasyon verileri, plazmit profili ve eksopolisakkarit yapılarını kapsayan çalışmalar *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*'nin heterojen bir grup olduğunu ortaya koymuştur (Segovia ve ark., 1993). Takip eden yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, simbiyotik

plazmitlerindeki farklılıklara bağlı olarak Meksika ve Güney Amerika kökenli *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* izolatları içerisinde Tip I ve Tip II olmak üzere iki grup belirlenmişlerdir (Martinez-Romero ve ark., 1985; Martinez-Romero ve ark., 1987; Martinez-Romero ve ark., 1988). Daha sonra Martinez-Romero ve ark. (1991) Tip II izolatlarını *Rhizobium tropici*, Segovia ve ark. (1993) Tip I Amerika izolatlarını *R. etli* bv. *phaseoli* adıyla yeni birer tür olarak tanımlamışlardır. Ayrıca Segovia ve ark. (1993), bir *R. etli* pSym plazmitinin horizontal transfer ile bir *R. leguminosarum*'a geçmesi sonucunda Avrupa kökenli *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* izolatlarının oluştuğunu belirtmişlerdir. Amarger ve ark. (1997) Fransa'nın çeşitli bölgelerinden izole ettikleri fasulye izolatlarından *R. giardinii* bv. *phaseoli* ve *R. gallicum* bv. *phaseoli* adında iki yeni tür tanımlamışlardır. Yine aynı dönemde İspanyada topraktan fasulyede aktif nodüller oluşturan ve soya fasulyesin'den izole edilen *E. fredii*'nin 16S rDNA alleleline benzer bir *Ensifer* izolatı elde edilmiştir (Herrera-Cervera ve ark., 1999). Diğer bir sıra dışı rapor da Grange ve Hungria (2004)'dan gelmiştir. Araştırmacılar Brezilya'dan, fasulyede aktif nodüller oluşturan ve *Mesorhizobium plurifarum* 16S rDNA alleleline benzer iki *Mesorhizobium* izolatı bildirmişleridir. Valverde ve ark. (2006) Portekiz'de yetiştirilen fasulye bitkisi nodüllerinden izole ettikleri bakterilerden *R. lusitanum* adı altında yeni bir tür tanımlamışlardır. Son olarak da Ramirez-Bahena ve ark. (2008) koleksiyonlarında bulunan ve fasulye'den izole edilmiş ATCC 14482 kodlu izolatın bilinen Rhizobiyal türlerden farklı olduğunu belirlemiş ve bu türü *R. phaseoli* olarak tanımlamışlardır. Dolayısıyla günümüzde en az dokuz Rhizobiyal tür fasulye'nin mikrosimbiontu olarak tanımlanmaktadır.

Fasulye ile simbiyotik ilişkiye giren Rhizobiyal türlerin dünya genelindeki yayılışı şu şekilde özetlenebilir; fasulye'nin yaygın ve en çok bilinen mikro simbiyontlarından biri olan *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, **Fransa** (Laguerre ve ark., 1993) ve **İspanya** (Herrera-Cervera ve ark., 1999) gibi Avrupa ülkelerden izole edilmiştir ve daha önceden de belirtildiği gibi Avrupa kökenli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte **Etioyopya** (Beyene ve ark., 2004), **Brezilya** (Andrade ve ark., 2002; Grange ve Hungria, 2004), **Tunus** (Mhamdi ve ark., 1999) gibi Avrupa kıtası dışındaki ülkelerden de rapor edilmiştir. Bir diğer yaygın simbiyont olan *R. etli* bv. *phaseoli* **Meksika**, **Kolombiya**, ve **Güney Antlardaki** yabani ve kültüre alınmış fasulyelerin dominant simbiyontudur ve bu durum *R. etli*'nin bu bölgede fasulye ile beraber evrimleştiği fikrini doğurmuştur (Silva ve ark., 2003; Aguilar ve ark., 2004). Bunun

yanında *R. etli* bv. *phaseoli* Avrupa'da; **İspanya** (Herrera-Cervera ve ark., 1999), **Fransa** (Laguerre ve ark., 1993), **Avusturya** (Sessitsch ve ark. 1997), Afrika'da; **Orta Afrika** (Tjahjoleksono, 1993: Diouf ve ark. (2000)'den), **Senegal** (Diouf ve ark., 2000), **Gambia** (Diouf ve ark., 2000), **Tunus** (Mhamdi ve ark., 2002; Mnasri ve ark., 2007), **Mısır** (Shamseldin ve Werner, 2007) ve **Etiyopya** (Beyene ve ark., 2004) ve Orta Doğu'da **Ürdün** (Tamimi ve Young, 2004) gibi dünyanın farklı bölgelerinde de rapor edilmiştir. Benzer şekilde *R. tropici* de Güney Amerika kökenlidir, **Brezilya** (Andrade ve ark., 2002; Grange ve Hungria, 2004) ve **Arjantin**'den (Aguilar ve ark., 1998) rapor edilmiştir. Buna ek olarak *R. tropici*, **Fransa** (Amarger ve ark., 1994), **Fas** (Dagutat ve Steyn, 1995: Diouf ve ark. (2000)'den), **Kenya** (Anyango ve ark., 1995), **Orta Afrika** (Tjahjoleksono, 1993: Diouf ve ark. (2000)'den), **Ürdün** (Tamimi ve Young, 2004), **Senegal** ve **Gambiya**'yı (Diouf ve ark., 2000) kapsayan farklı ülkelerden de izole edilmiştir. *R. gallicum* ve *R. giardinii* ilk olarak **Fransa**'dan izole edilmiş ve tanımlanmışlardır (Amarger ve ark., 1997), ve daha sonra **İspanya**'dan (Herrera-Cervera ve ark., 1999), ve **Tunus**'dan (Mhamdi ve ark., 2002; Mnasri ve ark., 2007) rapor edilmişlerdir. Aynı zamanda bu türlerden *R. gallicum* **Avusturya**'dan (Sessitsch, ve ark., 1997) ve **Mısır**'dan (Shamseldin ve Werner, 2007) da izole edilmiştir. Fasulyeyle simbiyotik ilişkiye giren diğer bir tür olan *R. lusitanum* ise bu güne kadar sadece ilk olarak tanımlandığı **Portekiz**'den izole edilmiştir (Valverde ve ark., 2006). Beklentilerin dışında bir fasulye simbiyontu olan *Ensifer* spp. ilk olarak **İspanya**'dan (Herrera-Cervera ve ark., 1999) ve daha sonra ise **Brezilya**'dan (Grange ve Hungria, 2004) ve **Tunus**'dan (Mnasri ve ark., 2007) izole edilirken, yine bir diğer sıra dışı izolat olan *Mesorhizobium* spp. ise bu güne kadar sadece **Brezilya**'dan rapor edilmiştir (Grange ve Hungria, 2004).

Anadolu gerek tarihte ilk tarımsal faaliyetlerin yapıldığı Mezopotamya bölgesinde yer alması gerekse de ekonomik açıdan önemli pek çok bitkinin olası gen merkezi veya dünyaya dağılmasında geçit vazifesi görmesi nedeniyle bu bitki türlerinin ve dolaylı olarak da Rhizobia gibi bu bitkilerle etkileşimde bulunan diğer organizma türlerinin evrimleşmelerinde ve dünyaya yayılmalarında büyük öneme sahiptir. Rhizobia'nın özel konukçusu ile konukçusunun gen merkezinde beraber evrimleştiği düşünülmektedir (Martinaz-Romero ve Caballero-Mellado, 1996). Bu açıdan değerlendirildiğinde **bakla** (Mutch ve ark., 2003), **bezelye** (Davies ve ark., 1985), **mercimek** (Muehlbauer ve ark., 1985), **nohut** (Singh, 1997) gibi olası gen merkezi

Türkiye veya içerisinde bulunduğu Ortadoğu olan baklagillerin, mikro simbiyontu olan Rhizobiyal tür ile ilk etkileştiği ve beraber evrimleştiği yer yine bu bölge olmalıdır. Dolayısıyla bu çalışmada izole edilen Rhizobiyal izolatlar ait veriler bu bakterilerin ve Rhizobium-baklagil simbiyozunun nasıl evrimleştiği ve dünya geneline nasıl dağıldığına dair önemli bilgiler verecektir. Türkiye'nin bütün bu önemine karşın, yurdumuzda yetiştirilen bakla, bezelye, mercimek, nohut, fasulye, soya fasulyesi gibi ekonomik açıdan önemli baklagillerin veya yayılış gösteren yabancı baklagillerin mikrosimbiyontlarının günümüz kriterlerine göre teşhisi ve biyolojik çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik güncel ve yeterli herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Küçük ve ark. (2006) Eskişehir'den fasulye'den izole ettikleri Rhizobiyal örnekleri çeşitli fenotipik özellikleri ve plazmit içerikleri açısından incelemişler fakat bu izolatların moleküler olarak teşhislerini yapmamışlardır. Dolayısıyla izolatların hangi tür yada türlere ait oldukları bilinmemektedir. Türkiye'den yapılan bir diğer çalışmada Ögütçü ve ark. (2009) Erzurum'da yetişen yabancı nohut türlerinden izole ettikleri Rhizobiyal örnekleri rep-PZR yöntemi kullanarak analiz etmişler ve izolatları *R. leguminosarum* subsp. *ciceri* olarak tanımlamışlardır. Ancak bu sonuç oldukça şüphelidir, çünkü kullandıkları rep-PZR yöntemi kimliği bilinmeyen izolatların genetik varyasyonlarının belirlenmesi ve ön gruplama yapılması için yeterli iken, izolatların teşhisi için yeterli değildir. Aynı zamanda çalışmada Rhizobiyal türlere ait tip suşların kullanılmaması da oluşturulan kladlar hakkında yorum yapmayı şüpheli hale getirmiştir. Bu çalışmalar dışında yurdumuzda bu güne kadar yapılan araştırmalar daha ziyade tarımsal amaçlı inokülasyon çalışmaları ve biyolojik kontrol çalışmaları olup mikrosimbiyont teşhisleri günümüzde geçerliliğini yitirmiş olan çapraz-aşılama anlayışına göre yapılmıştır (Özkoç ve Çakmakçı, 1992; Özkoç ve Deliveli, 2001; Çiftçi, 2006 a, b). Bu bağlamda bu çalışma öncül bir çalışma olup bundan sonra ülkemizde bu yönde yapılacak olan çalışmalara yol gösterici olacaktır, ayrıca dünya literatürüne önemli girdiler sağlayacaktır. Bu çalışmadan hedeflenen sonuçlar kısaca şu şekilde sıralanabilir;

- Samsun, Sinop, Amasya ve Ordu illerinde yetiştirilen bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinde yayılış gösteren kök nodül bakterilerinin teşhisleri ve biyolojik çeşitliliklerinin belirlenmesi.
- Elde edilen Rhizobiyal izolatlar ait 16S rDNA ve *recA* allellerinin, aynı konukçulardan fakat farklı ülkelerden izole edilmiş Rhizobiyal örnekler

(EMBL ve NCBI gibi uluslararası veri tabanlarından elde edilecek gen dizileri) ile karşılaştırılması ve yapılacak filogenetik analizler ile izolatların coğrafik orijinlerinin ve konukçuya bağlı olarak ülkeler ve hatta kıtalar arasında nasıl yayıldıklarının belirlenmesi.

- Belirlenen *nodA* ve *nifH* allellerinin birbirleri ve veri tabanlarından indirilen diğer alleller ile karşılaştırılması yoluyla yapılacak filogenetik analizlerle, bakterilerin taşıdıkları simbiyotik plazmitlerin kökenlerinin ve bakteriler arasındaki olası lateral transfer durumlarının araştırılması.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Örnekleme ve Bitki Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada Samsun, Ordu, Sinop ve Amasya illerinde yetiştirilen bakla (*Vicia faba* L.), fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ve bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkilerinin kökleri ile simbiyotik birliktelik oluşturan kök nodül bakterilerinin (*Rhizobia*) teşhisi ve içerdikleri nodülasyon (*nod*) ve azot fiksasyon (*nif*, *fix*) genlerinin genetik varyasyonlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla örnekleme alanları olarak, belirtilen illerin farklı ekolojik ve coğrafik özellikler gösteren ilçeleri seçilmiştir (Çizelge 3.1; Şekil 3.1). Örneklemler belirtilen bitkilerin çiçeklenme dönemleri olan ve dolayısıyla da kök nodüllerinin en aktif oldukları Nisan-Mayıs (bakla ve bezelye) ve Temmuz-Ağustos (fasulye) aylarında yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Bakla, bezelye ve fasulye Bitki örneklerinin toplandığı il ve ilçeler

SAMSUN	SİNOP	ORDU	AMASYA
Merkez	Merkez	Merkez	Merkez
Bafra	Gerze	Ünye	Suluova
Alaçam-Yakakent	Erfelek	Fatsa-Bolaman	Gümüşhacıköy
Çarşamba	Ayancık	Tekkiraz	Göynücek
Havza	Kepez	Çayıralan	Taşova
Vezirköprü	Boyabat	Çamaş	Merzifon
Ladik	Durağan	Gölköy	
Terme	Çöve	Mesudiye	

Örnekleme için seçilen sağlıklı bitkiler rizosfer toprağıyla birlikte, köküne ve dolayısıyla kök nodüllerine zarar verilmeden plastik poşetlere alınarak laboratuara getirilmiştir. Laboratuara getirilen bitki örneklerinin kök nodüllerinden *Rhizobium* izolasyonu en geç 24 saat içerisinde yapılmıştır.



Şekil 3.1. Samsun, Sinop, Ordu ve Amasya illerinden Örnekleme yapılan ilçeler. Farklı renklerdeki kutular her bir ilde örnekleme yapılan ilçeleri göstermektedir (Kırmızı: Samsun, Mavi: Ordu, Yeşil: Sinop, Kahverengi: Amasya)

3.2. Kök Nodüllerinden Rhizobium İzolasyonu

Çizelge 3.1’de belirtilen lokaliteleri temsilen toplanan bitki örneklerinin her birinden ikişer tane sağlıklı ve aktif (pembe renkli, düzgün morfolojili) nodül seçilerek izolasyona tabi tutulmuştur. Nodüllerden Rhizobium izolasyonu Elkan (1987) ve Somasegaran ve Hoben (1985)’da belirtilen yöntemlere göre aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- Öncelikle bitki kökleri akan suyun altında yıkanarak toprak kalıntılarından tamamen temizlenmiştir. Seçilen nodüller her iki tarafında birer parça kök kalacak şekilde (nodülleri zarar vermeden pens ile tutabilmek için) kesilerek tekrar akan suyun altında yıkanmıştır.
- Temizlenen nodüller % 95’lik etanol de yaklaşık 10 saniye bekletilmiş, böylece nodüllerin yüzeyindeki mumsu tabaka uzaklaştırılmış ve yüzey gerilimi kırılmıştır.
- Nodüller yüzey sterilizasyonu için asitleştirilmiş civa klorürde (Bkz 3.5.1) nodüllerin büyüklüklerine bağlı olarak 3-5 dakika yüzdürülmüşlerdir.
- Yüzey sterilizasyonu yapılan nodüller, civa klorürün fazlasının uzaklaştırılması için 5 steril saf su serisinden geçirilmişlerdir.

- Nodüller steril bir pens ile ringer çözeltisi içeren tüplerde ezilmiş ve bir öze yardımı ile içerik YMA (Yeast Extract Mannitol Agar, Bkz 3.5.2) ortamına çizgi plaka yöntemi kullanılarak aşılانmıştır.
- Aşılان petrilere 26°C’de 2-7 gün inkübe edilmiş ve Rhizobia olabileceğı düşünölen tipik koloniler (halkasal, dışbükey, mukuslu, parlak, opak, beyaz-bej renkli koloniler; Kuykendall ve ark., 2005) yeni bir YMA ortamına pasajlanmıştır.

YMA ortamına yapılan seri pasajlamalar ile saflaştırılan izolatlar % 20’lik gliserol (Bkz 3.5.3) içerisinde -20 °C’de stoklanmıştır.

3.3. Geleneksel Yöntemler ile Kök Nodöl Bakterilerinin Ön Teşhisleri

Kök nodüllerinden izole edilen bakterilerin moleköl karakterizasyonları yapılmadan önce gerçek bir Rhizobia’mı yoksa kontaminasyon mu olduklarını anlamak için bir dizi geleneksel test uygulanmıştır.

3.3.1. Gram Boyama

Rhizobia grubu bakteriler 0.5-1 × 1.2-3 µm ebatlarında, çomak şekilli, gram negatif hücrelerdir (Kuykendall ve ark., 2005). İzole edilen bakterilerin bu özelliklere uygunluğunun belirlenmesi için örnekler gram boyama metodu kullanılarak boyanmış ve incelenmişlerdir. Boyama aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır (Pollack ve ark. 2002):

- 24-48 saatlik taze bakteri kültüründen temiz bir lam üzerine bir miktar alınarak preparat hazırlanmıştır.
- Lamin alt tarafı üç defa alevden geçirilerek bakteriler lama yapıştırılmıştır.
- Lamin üstü birinci boya olan kristal viyole (Bkz. 3.5.4) ile kaplanmış ve bu şekilde 1 dakika bekletilmiştir.
- Boya dökölerek fazlası saf su ile atılmıştır.
- Lamin üzeri gram iyodin çözeltisi (Bkz. 3.5.5) ile kaplanıp hemen dökölmüş ve daha sonra tekrar gram iyodin ile kaplanarak 1 dakika bekletilmiştir.
- Lam tekrar saf su ile yıkanmıştır.
- Lam 10 saniye alkol-iyot (Bkz. 3.5.6) karışımı ile muamele edilmiş ve ardından hemen saf su ile yıkanmıştır.

- Daha sonra lamın üzeri kontrast boya olan sulu bazik fuksin (Bkz. 3.5.7) ile kaplanmış ve 30 saniye beklenmiştir.
- Boyanın fazlası döküldükten sonra lam son olarak tekrar saf su ile yıkanmış ve kurutulduktan sonra 10×100'lük büyütmede incelenmiştir.

3.3.2. Brom-Cresol Purple İçeren Pepton Glukoz Agarda Gelişim

Rhizobia izolatları Brom-Cresol Purple içeren Pepton Glukoz Agarda (Bkz. 3.5.8) çok zayıf biçimde gelişirler ve çok az pH değişimine neden olurlar. Bu ortamda 28 °C'de iki günlük inkübasyonda koloni oluşumu, gözlenebilir bir pH değişimi Rhizobia için karakteristik değildir ve bir kontaminasyonu işaret eder. Bu nedenle bu ortam kontaminasyon varlığını kontrol etmek için iyi bir araçtır (Kuykendall ve ark., 2005).

Elde edilen izolatlar Brom-Cresol Purple içeren Pepton Glukoz Agar ortamına aşılanarak 28°C'de iki gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda koloni oluşumu veya ortam pH'sında değişim (ortamın mor renginin sarıya dönmesi) görülen izolatlar kontamine olarak değerlendirilmiş ve tekrar saflaştırılmışlardır.

3.3.3. Nodülasyon (Otantikasyon) Testi

İzolatların *nod* ve *nif* (Sym plazmid veya Simbiyotik ada) gen komplekslerini içerip içermediklerini anlamak için nodülasyon (otantikasyon) testi uygulanmıştır. Bu işlem Vincent (1970)'de belirtilen esaslara göre yapılmıştır. Bunun için:

- 200 ml hacmindeki süt şişeleri veya 150 ml hacmindeki geniş ağızlı özel tüplerin içerisine hacmin yarısı kadar fide agar (Bkz 3.5.9) konularak şişe veya tüpün ağzı bir alüminyum folyo ile kapatılmıştır.
- Folyo üzerinde, fideyi tüpe yerleştirmek için ve fide çözeltisi (Bkz. 3.5.10) takviyesi yapabilmek için iki delik açılmış ve bu delikler pamuk ile kapatılmıştır. Oluşturulan bu düzenek 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve daha sonra besi yerinin yatık olarak donması için uygun bir açıda 24 saat eğik olarak bekletilmiştir.
- Konukçuya ait tohumlar % 1'lik NaOCl'de (Bkz. 3.5.11) 3 dakika yüzdürülüp steril edildikten sonra sterilantın fazlasının uzaklaştırılması için 5 steril saf su serisinden geçirilmiştir.

- Steril tohumlar daha sonra su agarı (Bkz. 3.5.12) ortamına alınarak 25 °C’de karanlıkta çimlendirilmişlerdir.
- Fideler, kökleri tüpün ağız kısmındaki folyonun deliğinden içeriye girecek şekilde tüplere yerleştirilmiş ve şişenin içerisine fide çözeltisi eklenmiştir.
- Test edilecek bakterilerin YMB (Bkz. 3.5.13) ortamında, 28 °C’de 2 gün inkübe edilmesiyle elde edilen inokulumlardan şişelere 1’er ml ilave edilmiştir. Daha sonra şişeler bitkilerin köklerinin ışık almaması için folyo ile kaplanmıştır. Her izolat için bu düzenek üç tekerrürlü olarak hazırlanmıştır.
- Bu şekilde oluşturulan düzenekler bir iklim odasında 25 °C’de, 10 saat karanlık ve 14 saat aydınlık ışıklanma periyodunda aktif kök nodülleri oluşuncaya kadar (20-30 gün) bekletilmişlerdir.
- Süre sonunda konukçu bitkilerin köklerinde aktif nodüller oluşturan izolatlar çalışmaya dahil edilmişlerdir.

3.4. Moleküler Yöntemler ile Kök Nodül Bakterilerinin Tanımlanması

3.4.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

Geleneksel yöntemler kullanılarak Rhizobia oldukları belirlenen izolatlardan genomik DNA izolasyonu için Maniatis ve ark. (1982) ile Temizkan ve Arda (2004)’da belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bunun için;

- Bakteriler steril Falcon tüpleri içerisinde bulunan 5 ml Tripton Yeast Ekstrakt (TY, bkz 3.5.14) ortamına aşılıp 28 °C’de 24 saat 225 rpm hıza ayarlı çalkalayıcılı inkübatörde (Zhicheng, Çin) geliştirilmişlerdir.
- İnkübasyon süresi sonunda bakteri kültüründen 1.5 ml alınarak bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüp 10.000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenip (Sigma) bakterilerin çökmesi sağlanmıştır.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 567 µl TE tamponu (Bkz 3.5.17) içerisinde tekrar çözünmüştür.
- Tüpün içerisine %10’luk SDS (Bkz 3.5.18) stoğundan 30 µl ve 20 mg/ml’lik proteinaz K (Bkz 3.5.19) çözeltisinden 3 µl eklenerek karıştırılmış ve 37 °C’de 1 saat bekletilmiştir.

- Süre sonunda tüplere 5 M NaCl (Bkz 3.5.20) çözeltisinden 100 µl eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra tüplere CTAB/NaCl (Bkz 3.5.21) çözeltisinden 80 µl eklenerek karıştırılmış ve 65 °C’de 10 dakika bekletilmiştir.
- Tüplere, içerisindeki sıvı ile eşit hacimde kloroform/izoamil alkol (Bkz 3.5.22) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 10.000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenmişlerdir.
- Üstte kalan şeffaf, temiz faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp üzerine eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol (Applichem, Darmstadt, Almanya) eklenmiştir. Karıştırılan tüpler 10.000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenmişlerdir.
- Üstte kalan faz tekrar dikkatlice yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 0.6 hacim izopropanol (Amresco, Ohio, ABD) eklenmiştir. Tüp DNA çökünceye kadar çok yavaş biçimde çalkalanmıştır.
- Tüpler 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiş ve DNA çöktürülmüştür.
- DNA, 50 µl %70’lik etanol (Bkz 3.5.23) ile yıkanmış ve alkol hemen uzaklaştırılmıştır.
- Tüpler, DNA tamamen kuruyuncaya kadar ağızları açık şekilde bir desikatörde bekletilmişlerdir.
- Tüplere 50 µl TE tamponu eklenerek DNA’nın çözünmesi sağlanmıştır.
- Tüplerin içerisine 30 mg/ml’lik RNaz (Bkz 3.5.24) stoğundan 1 µl eklenip 37 °C’de 3 saat bekletilmiştir.
- Süre sonunda tüplere 100 µl ddH₂O, 1/10 hacim NaAC (bkz 3.5.25) ve 1 hacim izopropanol eklenmiştir. Tüpler DNA çökünceye kadar çok yavaş biçimde çalkalanmış ve daha sonra 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
- Tüpteki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra DNA 50 µl %70’lik etanol ile yıkanmış ve alkol hemen uzaklaştırılmıştır.
- Tüpler, DNA tamamen kuruyuncaya kadar ağızları açık şekilde bir desikatörde bekletilmişlerdir.
- Tüplere 50 µl steril ddH₂O eklenerek DNA’nın tamamen çözünmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen genomik DNA’lar bir gece +4 °C’de bekletildikten sonra -20 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.4.2. RFLP Analizi İçin 16S rDNA Amplifikasyonu

Elde edilen ve geleneksel yöntemler ile Rhizobia oldukları belirlenen izolatların moleküler teşhisleri için 16S rDNA geni kullanılmıştır. Genin PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile *in-vitro* amplifikasyonu fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') (Weisburg ve ark., 1991) primer çifti kullanılarak yapılmıştır. 50 µl amplifikasyon karışımı; 1X Green GoTaq Flexi PCR Buffer, 0.8 mM dNTP karışımı (her bir bazdan 0.2 mM), 1.5 mM MgCl₂, yukarıda belirtilen primerlerin her birinden 0.4 pmol, 1.25 ünite GoTaq DNA polimeraz (Promega), <0.5µg kalıp DNA ve ddH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı için 95 °C'de 5 dakika ön denatürasyon, her bir döngü için 95 °C'de 45 saniye denatürasyon, 55 °C'de 45 saniye primer bağlanması, 72 °C'de 2 dakika uzama basamaklarını içeren 35 döngü ve 72 °C'de 4 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır. Amplifikasyon MGW-Biotech (Almanya) marka termal cycler kullanılarak yapılmıştır.

3.4.3. 16S rDNA-RFLP Analizi İçin PZR Amplifikasyon Ürünlerinin Saflaştırılması

16S rDNA PZR amplifikasyon ürünlerinin RFLP analizlerinde kullanılmak üzere saflaştırılması işlemi QIAquick (QIAGEN) saflaştırma kiti kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapılmıştır:

- Bir mikrosantrüfjü tüpü içerisine konan 100 µl PZR ürününe 5 hacim (500 µl) PB tamponu eklenmiş ve vorteksle (Fisons, WhirliMixer, Almanya) karıştırılmıştır.
- Kit ile birlikte gelen QIAquick spin kolon yine kitle birlikte gelen 2 ml'lik tüpler içerisine yerleştirilmiştir.
- Hazırlanan örnek PB tampon karışımı, QIAquick spin kolon içerisine alınmış ve tüp 13.000 rpm'de 60 saniye santrüfjülenmiştir.
- Santrüfjü işlemi sonunda tüp içerisinde biriken sıvı dökülmüş ve QIAquick spin kolon tekrar aynı tüp içerisine yerleştirilmiştir.
- Yıkama için QIAquick spin kolon içerisine 0.75 ml PE tamponu eklenmiş ve tüpler 13.000 rpm'de 1 dakika santrüfjülenmiştir.
- Santrüfjü işlemi sonunda tüp içerisindeki sıvı dökülmüş ve QIAquick spin kolon tekrar aynı tüp içerisine yerleştirilmiştir. PE tamponunun tamamen

uzaklaştırılması için tüp ikinci defa 13.000 rpm’de fakat bu sefer 2 dakika santrifüjlenmiştir.

- QIAquick spin kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 50 µl EB tamponu eklenmiştir. Tüp 13.000 rpm’de 60 saniye santrifüjlenmiş ve böylece saflaştırılmış PZR ürünleri elde edilmiştir.
- Saflaştırılmış PZR ürünleri bölüm 3.4.9’da açıklanacağı gibi agaroz jel elektroforezde yürütülerek kontrol edilmiş ve kullanılabilece kadar -20 °C’de saklanmıştır.

3.4.4. 16S rDNA-RFLP (Restriksiyon Fragmantleri Uzunluk Polimorfizmi) Analizi

Elde edilen Rhizobiyal izolatların genetik varyasyonlarını belirlemek ve buna bağlı bir ön gruplama yapabilmek için Laguerre ve ark., (1994)’de belirtilen *HinfI* (New England BioLabs), *MspI* (Fermentas), *NdeII* (Promega), *CfoI* (Promega) ve ek olarak *PstI* (Sigma) enzimleri kullanılarak 16S rDNA-RFLP analizi yapılmıştır. Kesme işlemi için reaksiyonlar toplamda 10 µl olacak şekilde Çizelge 3.2’de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2 16S rDNA PZR-RFLP analizlerinde kullanılan restriksiyon enzimleri için kullanılan reaksiyon karışımları

<i>HinfI</i> (New England BioLabs)	
Saflaştırılmış PZR Ürünü	5 µl
10X NE Buffer 2	1 µl
Enzim (10U/µl)	1 µl
100X BSA	0.1 µl
ddH ₂ O	2.9 µl

<i>CfoI</i> (Promega)	
Saflaştırılmış PZR Ürünü	5 µl
10X NE Buffer 2	1 µl
Enzim (10U/µl)	1 µl
100X BSA	0.1 µl
ddH ₂ O	2.9 µl

<i>NdeII</i> (Promega)	
Saflaştırılmış PZR Ürünü	5 µl
10X NE Buffer 2	1 µl
Enzim (10U/µl)	1 µl
100X BSA	0.1 µl
ddH ₂ O	2.9 µl

<i>PstI</i> (Sigma)	
Saflaştırılmış PZR Ürünü	5 µl
10X Buffer SH	1 µl
Enzim (10U/µl)	1 µl
100X BSA	0.1 µl
ddH ₂ O	2.9 µl

<i>MspI</i> (Fermentas)	
Saflaştırılmış PZR Ürünü	5 µl
10X NE Buffer 2	1 µl
Enzim (10U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	3 µl

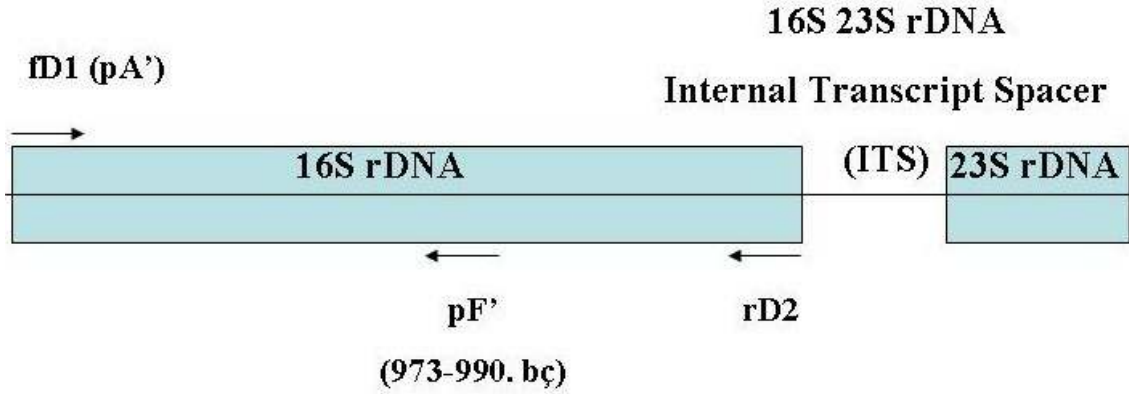
Belirtilen şekillerde hazırlanan reaksiyon tüpleri 37 °C’ye ayarlı etüvde 6 saat bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler, reaksiyonların inhibisyonları için firma tarafından önerilen sıcaklık derecelerinde ve sürelerde (*HinfI*: 67 °C’de 20 dakika, *MspI*: 67 °C’de

20 dakika, *NdeII*: 67 °C’de 20 dakika, *CfoI*: 67 °C’de 20 dakika, *PstI*: 80 °C’de 20 dakika) bekletilmişlerdir.

Restriksiyon ürünü bantların elektroforetik ayrımları için 10 µl’lik reaksiyon karışımının tamamı 2 µl yükleme tamponu (Fermentas 6X Loading dye) ile karıştırılmış ve %1’lik 100 ml TBE (Tris-Borat-EDTA; Bkz. 3.5.26) tamponu içerisinde 2.5 gr Metaphore agaroz (Lonza, ABD) eritilmesiyle hazırlanan jelle yüklenmiştir. Jel, 80 volt akım verilerek 2.5 saat boyunca koşturulmuştur. Jel daha sonra ethidium bromür (Bkz 3.5.27) içeren suda 30 dakika bekletilerek boyanmış ve boyanın fazlası jelin saf suda bir süre bekletilmesi ile uzaklaştırılmıştır. Boyanan jel GeneGenius BioImaging sistem kullanılarak görüntülenmiştir.

3.4.5. DNA Dizileme İçin 16S rDNA Amplifikasyonu

Seçilen izolatlardan DNA dizileme için 16S rDNA amplifikasyonu üç farklı primer ile yapılmıştır (Şekil 3.2). Bu primerlerden ikisi, bölüm 3.4.2’de açıklanan fd1 (pA’) ve rD1 primerleri, üçüncüsü ise yine fd1 (pA’) primeri ile çift olarak kullanılan pF’ (5’-ACG AGC TGA CGA CAG CCA-3’) (Zhang ve ark., 1999) primeridir. pF’ primeri, *R. leguminosarum* tip suşu olan USDA 2370 izolatının 16S rDNA’sının 973-990’ıncı bazları arasına bağlanarak genin ekspresyon yönünün tersi ucuna doğru amplifikasyonunu gerçekleştirmektedir (Şekil 3.2). fd1 (pA’) ve rD2 primer çifti için PZR amplifikasyonu bölüm 3.4.2’de açıklandığı şekliyle yapılmıştır. fd1 (pA’) / pF’ primer çifti için 50 µl amplifikasyon karışımı; 1X Green GoTaq Flexi PCR Buffer, 0.8 mM dNTP karışımı (her bir bazdan 0.2 mM), 1.5 mM MgCl₂, yukarıda belirtilen primerlerin her birinden 0.4 pmol, 1.25 ünite GoTaq DNA polimeraz (Promega), <0.5µg kalıp DNA ve ddH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı için 95 °C’de 3 dakika ön denatürasyon, her bir döngü için 95 °C’de 1 dakika denatürasyon, 55 °C’de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C’de 1 dakika uzama basamaklarını içeren 35 döngü ve 72 °C’de 5 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır. Amplifikasyon MGW-Biotech (Almanya) marka termal cycler kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.2 16S rDNA dizilemesi için kullanılan primerler ve bağlandığı bölgeler

3.4.6. *recA* Amplifikasyonu

Bu çalışmada bakterilerin teşhisi için 16S rDNA genine ek olarak bir housekeeping gen olan *recA* geni de kullanılmıştır. Bu gen bölgesinin PZR ile *in-vitro* amplifikasyonu için *recA*-Forward (5'-CGK CTS GTA GAG GAY AAA TCG GTG GA- 3') ve *recA*-Reverse (5'-CGR ATC TGG TTG ATG AAG ATC ACC AT- 3') (Gaunt ve ark., 2001) primer çifti kullanılmıştır. 50 µl amplifikasyon karışımı; 1X Green GoTaq Flexi PCR Buffer, 0.8 mM dNTP karışımı (her bir bazdan 0.2 mM), 1.5 mM MgCl₂, yukarıda belirtilen primerlerin her birinden 0.4 pmol, 1.25 ünite GoTaq DNA polimeraz (Promega), <0.5µg kalıp DNA ve ddH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı için 95 °C'de 5 dakika ön denatürasyon, her bir döngü için 95 °C'de 45 saniye denatürasyon, 50 °C'de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C'de 1 dakika uzama basamaklarını içeren 30 döngü ve 72 °C'de 2 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır. Amplifikasyon MGW-Biotech (Almanya) marka termal cykler kullanılarak yapılmıştır.

3.4.7. *nodA* Amplifikasyonu

Bu çalışmada elde edilen *Rhizobia* izolatlarının içerdikleri *nod* gen kompleksinin, buna bağlı olarak da izolatların biyolojik varyetelerinin (biovar.) belirlenmesi için *nodA* geni kullanılmıştır. İzolatlardan *nodA* geni amplifikasyonu için bu genin 14'üncü bazından başlayarak *nodB*'nin 88'inci bazına kadar olan bölgeyi çoğaltan *nodA*-1 (5'-TGC RGT GGA ARN NCT GGG AAA-3') ve *nodA*-2 (5'-GGN CCG TCR TCR AAW GTC ARG TA-3') primer çifti kullanılmıştır (Haukka ve ark., 1998). 50 µl

amplifikasyon karışımı; 1X Green GoTaq Flexi PCR Buffer, 0.8 mM dNTP karışımı (her bir bazdan 0.2 mM), 1.5 mM MgCl₂, yukarıda belirtilen primerlerin her birinden 0.4 pmol, 1.25 ünite GoTaq DNA polimeraz (Promega), <0.5µg kalıp DNA ve ddH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı için 95 °C’de 5 dakika ön denatürasyon, her bir döngü için 95 °C’de 45 saniye denatürasyon, 49 °C’de 45 saniye primer bağlanması, 72 °C’de 45 saniye uzama basamaklarını içeren 35 döngü ve 72 °C’de 5 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır.

Kullanılan *nodA* primerleri dejeneratif primerler oldukları için genom üzerinde birden çok bölgeye bağlanarak PZR sonunda istenilen bölgenin yanında farklı bölgelerin de amplifikasyonuna neden olmuştur. Oluşan bu ekstra ürünlerden kurtulmak için, 20 µl PZR ürünü ve 100 bp DNA markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder) bölüm 3.4.9’da açıklanacağı şekilde % 2’lik agaroz jellere yüklenerek 100V akımda koşturulmuştur. Ethidiyum bromür içeren suda boyanan jel bir U.V. transüliminatöre (Vilber Laurmat, Fransa) konularak istenilen DNA bandı (yaklaşık 660 bç) steril bir bistüri ile kesilmiştir. Kesilen jel parçası, içerisinde 50 µl steril ddH₂O bulunan mikrosantrifüj tüplerine konmuş ve tüpler bu şekilde birkaç saat bekletilmiştir. Bu şekilde jel içerisindeki DNA’nın ddH₂O içerisine difüze olması sağlanmıştır. Elde edilen bu DNA içerikli sudan 10 µl alınarak kalıp DNA olarak kullanılmış ve yukarıda belirtilen koşullarda ikinci bir PZR karışımı hazırlanmıştır. Böylece sadece istenilen genin (*nodA*) amplifikasyonu yapılmıştır (Haukka ve ark., 1998).

Yukarıda belirtilen nodA-1/nodA-2 primer çiftinin işe yaramadığı Rhizobia izolatlarından *nodA* amplifikasyonu için, geri primer olarak nodA-2 yerine nodA-3 (5’-TCA TAG CTC YGR ACC GTT CCG-3’) primeri kullanılmıştır. Bu primer, *Mesorhizobium* sp. 7653R izolatının ve veri bankalarındaki mevcut *nodA* dizilerinin 980-960’ıncı bazları arasına uygun olarak dizayn edilmiştir (Zhang ve ark., 2000). 50 µl amplifikasyon karışımı; 1X Green GoTaq Flexi PCR Buffer, 0.8 mM dNTP karışımı (her bir bazdan 0.2 mM), 1.5 mM MgCl₂, yukarıda belirtilen primerlerin her birinden 0.4 pmol, 1.25 ünite GoTaq DNA polimeraz (Promega), <0.5µg kalıp DNA ve ddH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı için 97 °C’de 2 dakika ön denatürasyon, her bir döngü için 92 °C’de 40 saniye denatürasyon, 56 °C’de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C’de 1,5 dakika uzama basamaklarını içeren 35 döngü ve 72 °C’de 5 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır.

3.4.8. *nifH* Amplifikasyonu

Rhizobiyal izolatlarının içerdikleri azot fiksasyon (*nif* ve *fix*) gen komplekslerinin tanımlanması ve bu komplekslerin izolatlar arasındaki olası lateral dağılımlarının belirlenmesi için *nifH* geni kullanılmıştır. Bu genin fasulye izolatlarından *in-vitro* amplifikasyonu için alternatif olarak iki farklı primer çifti kullanılmıştır. Amplifikasyonlar öncelikle *nifH* geninin sırasıyla 25-50 ve 787-808'inci bazları arasındaki yaklaşık 780 bç'lik bölgenin amplifikasyonunu gerçekleştiren nifHF (5'-TAC GGN AAR GGS GGN ATC GGC AA -3') / nifHI (5'-AGC ATG TCY TCS AGY TCN TCC A -3') primeri ile yapılmıştır (Laguerre ve ark., 2001). 50 µl PZR amplifikasyon karışımı; 1X Green GoTaq Flexi PCR Buffer, 0.8 mM dNTP karışımı (her bir bazdan 0.2 mM), 1.5 mM MgCl₂, yukarıda belirtilen primerlerin her birinden 0.6 pmol, 1.25 ünite GoTaq DNA polimeraz (Promega), <0.5µg kalıp DNA ve ddH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı için 95 °C'de 5 dakika ön denatürasyon, her bir döngü için 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 59 °C'de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C'de 1 dakika uzama basamaklarını içeren 40 döngü ve 72 °C'de 5 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır.

Kullanılan primerler dejeneratif primer olduğundan PZR sonucunda birden fazla bölgenin amplifikasyonu gerçekleşmiştir. Oluşan bu ekstra ürünlerden kurtulmak için, 20 µl PZR ürünü ve 100 bp DNA markör (GeneOn 100 bp DNA Ladder) bölüm 3.4.9'da açıklanacağı şekilde % 2'lik agaroz jellere yüklenerek 100V akımda koşturulmuştur. Ethidiyum bromürlü suda boyanan jel bir U.V. transüliminatöre (Vilber Laurmat, Fransa) konularak istenilen DNA bandı (yaklaşık 780 bç) steril bir bistüri ile kesilmiştir. Kesilen jel parçası, içerisinde 50 µl steril ddH₂O bulunan mikrosantrifüj tüplerine konmuş ve tüpler bu şekilde birkaç saat bekletilmiştir, böylelikle jel içerisindeki DNA'nın su içerisine geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen bu DNA içerikli sudan 10 µl alınarak kalıp DNA olarak kullanılmış ve yukarıda belirtilen koşullarda ikinci bir PZR karışımı hazırlanmıştır. Böylece sadece istenilen genin (*nifH*) amplifikasyonu yapılmıştır (Haukka ve ark., 1998). Yukarıda açıklanan nifHF/nifHI primerleri ile çok sayıda ve istenilen 780 bp'lik banda yakın ekstra bantlar veren fasulye örnekleri için alternatif olarak Eardly ve ark. (1992)'de önerilen nifH1 (5'-AAGTGC GTGGAGTCCGGTGG -3') / nifH2 (5'- GTTCGGCAAGCATCTGCTCG -3') primerleri kullanılmıştır. Bu primerler 256 ve 856'ıncı bazlar arasındaki 600 bp'lik bir bölgenin amplifikasyonunu yapmaktadır. Bu primerler ile hazırlanan 50 µl PZR

amplifikasyon karışımı için yukarıda belirtilen içerikten farklı olarak 1.75 mM MgCl₂ kullanılmıştır. Amplifikasyon programı için ise 95 °C’de 5 dakika ön denatürasyon, her bir döngü için 95 °C’de 45 saniye denatürasyon, 53 °C’de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C’de 1 dakika uzama basamaklarını içeren 40 döngü ve 72 °C’de 5 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır. Ekstra bantlar oluşması durumunda yukarıda açıklanan bant kesme işlemi uygulanmıştır.

Bakla ve bezelye izolatlarından *nifH* amplifikasyonu için ileri primeri olarak bu çalışmada dizayn ettiğimiz nifHctg (5’- CTC ATC GTC GGC TGT GAC CC -3’) ve geri primeri olarak da nifHI (Laguerre ve ark., 2001) kullanılmıştır. NifHctg primeri NCBI veri tabanından indirdiğimiz 3841 kodlu *R. leguminosarum* bv. *viciae* izolatının pRL10 sym plazmidi üzerinde bulunan nifH haplotipi (accession no: NC_008381) kullanılarak dizayn edilmiştir. NifHctg / nifHI primer çifti *nifH* geninin sırasıyla 106-125 ve 787-808’inci bazlarına bağlanarak bu bölgeler arasındaki yaklaşık 700 nükleotidin amplifikasyonunu gerçekleştirmektedir. 50 µl PZR amplifikasyon karışımı; 1X Green GoTaq Flexi PCR Buffer, 0.8 mM dNTP karışımı (her bir bazdan 0.2 mM), 1.5 mM MgCl₂, yukarıda belirtilen primerlerin her birinden 0.6 pmol, 1.25 ünite GoTaq DNA polimeraz (Promega), <0.5µg kalıp DNA ve ddH₂O kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı için 95 °C’de 3 dakika ön denatürasyon, her bir döngü için 94 °C’de 1 dakika denatürasyon, 59 °C’de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C’de 1 dakika uzama basamaklarını içeren 40 döngü ve 72 °C’de 5 dakika son uzama basamakları uygulanmıştır. Amplifikasyon MGW-Biotech (Almanya) marka termal cycler kullanılarak yapılmıştır.

3.4.9. İzole edilen genomik DNA’ların ve PZR Ürünlerinin Elektroforetik İncelenmeleri

İzole edilen genomik DNA’ların, PZR ürünlerinin ve 16S rDNA saflaştırma ürünlerinin kontrol edilmesinde % 1’lik, bant kesme uygulamalarında ise % 2’lik agaroz jel kullanılmıştır. Bu jelin hazırlanması için %1 (veya %2) (w/v) oranında agaroz (Prona) 1X TBE tamponu içerisine eklenerek mikrodalga fırında eritilmiştir. Agaroz, sıcaklığı yaklaşık 60-65°C’ye düştüğünde içerisine istenilen boyuttaki tarak yerleştirilmiş elektroforez tablasına dökülmüş ve donana kadar bekletilmiştir. Amplifikasyonları yapılan PZR ürünlerinin kontrol edilmesi için, PZR ürününden 3 µl doğrudan (Amplifikasyonda kullanılan Green GoTaq Flexi PCR Buffer içerisinde

yükleme tamponu da bulundurduğundan PZR ürünlerinin jellere yüklenmesi için ayrıca yükleme tamponu kullanılmamıştır) hazırlanan agaroz jellere yüklenmiştir. Genomik DNA'ların ve 16S rDNA saflaştırma ürünlerinin kontrol edilmesi için ise 1 µl Fermantas 6X Loading Dye: 1 µl genomik DNA veya saflaştırma ürünü: 4 µl ddH₂O dan oluşan karışım agaroz jellere yüklenmiştir. PZR ürünleri ve 16S rDNA saflaştırma ürünlerinin yüklendiği jellere 100 bç'lik (1 µl Fermantas 6X Loading Dye: 1 µl Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder: 4 µl ddH₂O), Genomik DNA'ların yüklendiği jellere ise 1 kb'lık DNA markör karışımları da (1 µl Fermantas 6X Loading Dye: 1 µl Amresco 1 kb DNA Ladder: 4 µl ddH₂O) yüklenmiş ve böylece ürünlerin büyüklükleri yaklaşık olarak belirlenmiştir. Jeller 100 V akım uygulanarak yaklaşık 30-60 dakika koşturulmuş ve ethidium-bromürlü su (bkz. 3.5.27) içeren kapta 30 dakika bekletilerek boyanmıştır. Yaklaşık 5 dakika saf su da bekletilerek boyanın fazlası uzaklaştırıldıktan sonra jeller GeneGenius BioImaging sistem kullanılarak görüntülenmiştir.

3.4.10. 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* Genleri İçin DNA Dizileme

16S rDNA-RFLP analizi sonucunda seçilen *Rhizobium* izolatları için 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* genlerinin DNA dizilemeleri MacroGen Inc. (Kore) firması tarafından ticari olarak yapılmıştır. Her bir gen için okuma iki yönlü olarak yapılmış, böylelikle genin DNA dizisi kontrollü ve doğru bir şekilde elde edilmiştir. DNA dizilemeleri için kullanılan primerler Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* genlerinin DNA dizilemeleri için kullanılan primerler

Gen	Dizileme için kullanılan primerler
16S rDNA	fD1(pA')/rD1 ve pA'/pF'
<i>recA</i>	recA-Forward/recA-reverse
<i>nodA</i>	nodA-1/nodA-2 veya nodA-1/nodA-3
<i>nifH</i>	nifH-F/nifH-I; nifHctg-/nifH-I veya nifH1/nifH2

3.4.11. DNA Dizilerinin İşlenmesi ve Filogenetik Analizler

16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* genlerinin her birisi için ilerleyen ve gerileyen primerler (Çizelge 3.3) kullanılarak yapılan okumalar sonucu elde edilen DNA dizileri, LASERGENE 99 programının SEQMAN II modülü (Applied Biosystems) kullanılarak birleştirilmiş ve kontrol edilmiştir. Filogenetik analizler için veri seti oluşturulması amacıyla, farklı *Rhizobiyal* türlere veya izolatlara ait 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* gen dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından

bulunarak indirilmiştir (Çizelge 3.4-7). Belirtilen genler için veri setleri oluşturulurken Rhizobiyal türlere ait tip suşların DNA dizilerinin yanı sıra, seçilen konukçulara ait farklı coğrafyalardan izole edilen Rhizobia örneklerinin de DNA dizileri kullanılmıştır. Veri setleri oluşturulduktan sonra dizilerdeki homolog bazların hizalanması için ClustalX (Thompson ve ark., 1997) programı kullanılmıştır. Optimizasyon amaçlı yapılan denemelerde ClustalX programı için, Hall (2004)'de önerilen ikili ve çoklu karşılaştırma parametre değerlerinin programın orijinal parametre değerlerine oranla daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir, bu nedenle bu çalışmada Hall (2004)'de önerilen parametre değerleri kullanılmıştır. Bu değerler; ikili karşılaştırma parametreleri için; Gap Opening: 10.00, Gap Extension: 0.10 ve çoklu hizalama parametreleri için; Gap Opening: 10.00, Gap Extension: 0.20'dir (Hall, 2004). Program tarafından hizalamaları yapılan veri setleri BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak tekrar kontrol edilmiş, gerek görülen bölgeler düzeltilmiş ve indel bölgeleri içeren kolonlar uzaklaştırılmıştır. Filogenetik analizler öncesinde veri seti için en uygun baz değişim modelinin belirlenmesi için jModelTest v. 0.1 (Posada, 2008) programı kullanılarak Akaike Information Criterion (AIC: Akaike, 1974) ve Basian Information Criterion (BIC) analizleri yapılmıştır. Bu analizler veri setlerine dış grup eklenerek ve eklenmeden ikişer kez yapılmıştır. ModelTest analizinin bir veri seti için birden fazla tipte baz değişim modeli önermesi durumunda önerilen her model için filogenetik ağaçlar oluşturulmuş ve en yüksek Bootstrap değerini veren ağaç bu çalışmada gösterilmiştir.

İzolatlar arasındaki evrimsel ilişkilerin belirlenmesi için Neighbor-Joining (NJ: Saitou ve Nei, 1987), Maksimum Parsimony ve Maksimum Likelihood (ML) olmak üzere üç farklı algoritma kullanılmıştır. NJ analizleri PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) programı kullanılarak, AIC ve BIC analizleri sonucu elde edilen tüm baz değişim modelleri için yapılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaçların güvenilirliklerini belirlemek amacıyla 10000 tekerrürlü olmak üzere Bootstrap analizleri yapılmış, % 50'nin üzerinde desteklenen düğümler için Bootstrap değerleri ağaçlar üzerinde gösterilmiştir.

Maksimum-Likelihood analizi PYHML v. 3.0 (Guindon ve Gascuel, 2003) programı kullanılarak yapılmıştır. Analizler AIC ve BIC testleri kullanılarak belirlenen baz değişim modellerinin her birisi için ayrı ayrı yapılmıştır. Bootstrap analizleri yine aynı program kullanılarak 1000 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen

Bootstrap ağaçlarının konsensüs ağacı PHYLIP v. 3.68 (Felsenstein, 1989) programı içerisindeki Consense opsiyonu kullanılarak oluşturulmuştur.

Parsimony analizi de benzer şekilde PAUP 4.0b10 programı kullanılarak yapılmıştır. Analizler heuristik araştırma metodu, Branch-Swapping ve Tree-Bisection-Connection algoritmaları kullanılarak rasgele 10 tekrarlı olarak yapılmıştır. Uzunlukları, Consistency indeksleri (CI), Retention indeksleri (RI) ve Homoplasy indeksleri (HI) eşit olan birden fazla en kısa ağaç elde edildiğinde, bu ağaçların strict ve %50 majority rule konsensüs ağaçları yine aynı program kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen ağaçların istatistiksel güvenilirliğini belirlemek için yukarıda belirtilen algoritmalar kullanılarak 1000 tekerrürlü Bootstrap analizi yapılmış ve yine aynı program ile Bootstrap strict konsensus ağacı elde edilmiştir. Ağaçlar üzerinde, %50'nin üzerinde desteklenen düğümler için Bootstrap değerleri gösterilmiştir.

Filogenetik analizler sonucunda kromozomal genler olan 16S rDNA, *recA* ve *pSym* genleri olan *nodA*, *nifH* ağaçlarında uyumsuzluk belirlenen izolatlar için olası lateral transferlerin belirlenmesi amacıyla Incongruence Length Difference: ILD (Farris ve ark., 1994) testi yapılmıştır. ILD testi filogeni için informatif genlerin tespiti ve bakterial türler arasında lateral gen transferlerinin belirlenmesini kapsayan bir dizi filogenetik problemin çözümü için uygulanmaktadır (Zelwer ve Daubin, 2004). Bu testte parsimony algoritması kullanılarak, test edilecek genler ayrı ayrı, birleştirilmiş ve rastgele birleştirilmiş veri setleri şeklinde analiz edilir ve en kısa ağaçların basamak sayıları hesaplanır, daha sonra da bu basamak sayıları karşılaştırılır (Darlu ve Lecointre, 2002). Eğer birleştirilmiş ağaçların toplam uzunlukları orijinal ağaçlarınkinden önemli ölçüde ($P < 0.05$) fazla ise bu durum genlerin arasında sadece şans ile açıklanamayacak kadar büyük uyumsuzluğun varlığını yani farklı evrimsel hikayeleri işaret eder ve bu genler birleştirilmeden, ayrı olarak değerlendirilirler (Eardly ve ark., 2005). Bu çalışmada ILD testleri PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) programı kullanılarak, Heuristik araştırma metodu, Branch-Swapping ve Tree-Bisection-Connection algoritmaları ile rastgele 10 tekrarlı olarak yapılmıştır. ILD testleri için Parsimony analizi toplamda 1000 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Çizelge 3.4 Filogenetik analizlerinde kullanılan Rhizobium izolatlarının 16S rDNA erişim numaraları

	İzolat	Erişim No	Konukçu	Orijin	Kaynak
<i>Rhizobium leguminosarum</i> ^T	USDA 2370	U29386	<i>P. sativum</i>	A.B.D.	Van Berkum ve ark., 1996
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ATCC 14480	AY509900	<i>Trifolium sp.</i>	A.B.D.	Ramirez-Bahena ve ark., 2008
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	USDA 2671	U29388	<i>P. vulgaris</i>		Van Berkum ve ark., 1996
<i>R. etli</i> ^T	CFN42	U28916	<i>P. vulgaris</i>	Meksika	Van Berkum ve ark., 1996
<i>R. fabae</i> ^T	CCBAU 33202	DQ835306	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., 2008
<i>R. hainanense</i> ^T	CCBAU 57015	U71078	<i>D. sinuatum</i>	Çin	Chen ve ark., 1997
<i>R. gallicum</i> ^T	R602sp ^T	U86343	<i>P. vulgaris</i>	Fransa	Amarger ve ark., 1997
<i>R. mongolense</i> ^T	USDA 1844	U89817	<i>M. ruthenica</i>	Moğolistan	Van Berkum ve ark., 1998
<i>R. yanglingense</i> ^T	SH 22623	AF003375		Çin	Tan ve ark., 2001
<i>R. indigoferae</i> ^T	CCBAU 71042	AF364068	<i>I. amblyantha</i>	Çin	Wei ve ark., 2002
<i>R. sullae</i> ^T	IS123	Y10170	<i>H. coronarium</i>	-	Squartini ve ark., 2002
<i>R. rhizogenes</i> ^T	IFO 13257	D01257	-	-	Young ve ark., 2001
<i>R. lusitanum</i> ^T	P1-7	AY738130	<i>P. vulgaris</i>	Portekiz	Valverde ve ark., 2006
<i>R. tropici</i> ^T	CIAT 899	U89832	<i>P. vulgaris</i>	-	Van Berkum ve ark., 1996
<i>R. pisi</i> ^T	DSM 30132	AY509899	<i>P. sativum</i>	Peru	Ramirez-Bahena ve ark., 2008
<i>R. phaseoli</i> ^T	ATCC 14482	EF141340	<i>P. vulgaris</i>	-	Ramirez-Bahena ve ark., 2008
<i>Rhizobium spp.</i>	Mim-2	DQ648574	<i>Mimosae spp.</i>	-	Chen, yayımlanmamış
<i>Rhizobium spp.</i>	PEPSM13	DQ196418	<i>P. sativum</i>	Peru	Santillana ve ark., 2008
<i>Rhizobium spp.</i>	PEPSM15	DQ196417	<i>P. sativum</i>	Peru	Santillana ve ark., 2008
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 85025	EU256423	<i>Vicia sativa</i>	Tibet	Hou ve ark., 2009b
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 83268	EF549382	<i>V. faba</i>	Çin	Han ve ark., 2008c
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 85022	EU256422	<i>V. tibetica</i>	Tibet	Hou ve ark., 2009b
<i>Rhizobium spp.</i>	XtP1	EU637927	<i>P. sativum</i>	Çin	Yang ve ark., 2008
<i>Rhizobium spp.</i>	RRE6	AY946012	<i>O. sativa</i>	Hindistan	Singh ve ark., 2006
<i>Rhizobium spp.</i>	ARPV02	AY196964	<i>P. vulgaris</i>	Arjantin	Abril ve ark., yayımlanmamış
<i>Rhizobium spp.</i>	USDA 2667	U47303	<i>P. vulgaris</i>	-	Buttery ve ark., 1997
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 03321	DQ835293	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., yayımlanmamış
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 43229	DQ835308	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., yayımlanmamış
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 03058	DQ835296	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., yayımlanmamış
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 81106	DQ835292	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., yayımlanmamış
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 23131	DQ835304	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., yayımlanmamış
<i>Rhizobium spp.</i>	PEVF01	DQ196416	<i>V. faba</i>	Peru	Santillana ve ark., 2008

Çizelge 3.5 Filogenetik analizlerinde kullanılan *Rhizobium* izolatlarının *recA* erişim numaraları

	İzolat	Erişim No	Konukçu	Orijin	Kaynak
<i>Rhizobium leguminosarum</i> ^T	USDA 2370	AJ294376	<i>P. sativum</i>	A.B.D.	Gaunt ve ark., 2001
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ATCC 14480	EF113135	<i>T. pratense</i>	A.B.D.	Santillana ve ark., 2008
<i>R. phaseoli</i> ^T	ATCC 14482	EF113136	<i>P. vulgaris</i>	-	Santillana ve ark., 2008
<i>R. pisi</i> ^T	DSM 30132	EF113134	<i>P. sativum</i>	Peru	Santillana ve ark., 2008
<i>R. etli</i> bv. <i>phaseoli</i> ^T	CFN42	AJ294375	<i>P. vulgaris</i>	Meksika	Gaunt ve ark., 2001
<i>R. rhizogenes</i> ^T	IFO 13257	AJ294374	-	-	Gaunt ve ark., 2001
<i>R. tropici</i> ^T sub. sp. A	USDA 9039	AJ294372	<i>P. vulgaris</i>	Meksika	Gaunt ve ark., 2001
<i>R. tropici</i> sub. sp. B	USDA 9030	AJ294373	<i>P. vulgaris</i>	Meksika	Gaunt ve ark., 2001
<i>R. lusitanum</i> ^T	P1-7	DQ431674	<i>P. vulgaris</i>	Portekiz	Valverde ve ark., 2006
<i>R. yanglingense</i> ^T	SH22623	AY907359	<i>G. multiflora</i>	Çin	Vinuesa ve ark., 2005
<i>R. mongolense</i> ^T	USDA 1844	AY907358	<i>M. ruthenica</i>	Moğolistan	Vinuesa ve ark., 2005
<i>R. huautlense</i>	CCBAU 65798	EU622118	<i>S. cannabiana</i>	Çin	Wang ve ark., yayımlanmamış
<i>R. huautlense</i> ^T	SO2	AY688601	<i>S. herbacea</i>	Meksika	Vinuesa ve ark., 2005
<i>R. galegae</i> ^T	USDA 4128	AJ294378	<i>G. orientalis</i>	Finlandiya	Gaunt ve ark., 2001
<i>R. sullae</i> ^T	IS123	FJ816279	<i>H. coronarium</i>	-	Han ve ark., yayımlanmamış
<i>R. fabae</i> ^T	CCBAU 33202	EF579941	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., 2008
<i>R. mesosinicum</i> ^T	CCBAU25010	EU120732	-	Çin	Gaunt ve ark., 2001
<i>S. fredii</i> ^T	USDA 205	AJ294379	-	-	Gaunt ve ark., 2001
<i>Rhizobium</i> spp.	CCBAU 03058	GQ323681	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium</i> spp.	CCBAU 23131	GQ323661	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium</i> spp.	CCBAU 81106	GQ323671	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium</i> spp.	CCBAU 85025	EU288687	<i>V. sativa</i>	Tibet	Hou ve ark., 2009b

Çizelge 3.5 Devamı

<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 85022	EU288686	<i>V. tibetica</i>	Tibet	Hou ve ark., 2009b
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 03321	GQ323673	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium spp.</i>	CCBAU 43229	GQ323665	<i>V. faba</i>	Çin	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium spp.</i>	PEVF01	EF113122	<i>V. faba</i>	Peru	Santillana ve ark., 2008
<i>Rhizobium spp.</i>	J-1	GQ323691	<i>V. faba</i>	Ürdün	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium spp.</i>	Nvf4	GQ323695	<i>V. faba</i>	Ürdün	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium spp.</i>	VF39	AY907362	<i>V. faba</i>	Almanya	Vinuesa ve ark., 2005
<i>Rhizobium spp.</i>	USDA 2489	GQ323684	<i>V. faba</i>	Kanada	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium spp.</i>	USDA 2503	GQ323690	<i>V. faba</i>	İspanya	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium spp.</i>	USDA 2502	GQ323689	<i>V. faba</i>	İspanya	Tian ve ark., 2010
<i>Rhizobium spp.</i>	KIM5s	AY907360	<i>P. vulgaris</i>	ABD	Vinuesa ve ark., 2005
<i>Rhizobium spp.</i>	IE950	AY907460	<i>P. vulgaris</i>	Meksika	Silva ve ark., 2005
<i>Rhizobium spp.</i>	GR12	AY907361	<i>P. vulgaris</i>	İspanya	Vinuesa ve ark., 2005
<i>Rhizobium spp.</i>	IE4771	AY907464	<i>P. vulgaris</i>	Meksika	Silva ve ark., 2005

Çizelge 3.6 Filogenetik analizlerinde kullanılan Rhizobium izolatlarının *nodA* erişim numaraları

	İzolat	Erişim No	Konukçu	Orijin	Kaynak
<i>R. gallicum</i> bv. <i>phaseoli</i>	PhD12	AJ300237	<i>P. vulgaris</i>	Fransa	Moulin, yayımlanmamış
<i>R. giardinii</i> bv. <i>phaseoli</i>	Ro84	AJ300239	<i>P. vulgaris</i>	Fransa	Moulin, yayımlanmamış
<i>R. etli</i> bv. <i>phaseoli</i> ^T	CFN 42	NC_004041	<i>P. vulgaris</i>	Meksika	Gonzalez ve ark., 2003
<i>R. etli</i> bv. <i>phaseoli</i>	CIAT 652	CP001076	-	-	Gonzalez ve ark., yayımlanmamış
<i>R. tropici</i> bv. <i>phaseoli</i>	CFN299	X98514	<i>P. vulgaris</i>	ABD	Debelle ve ark., 1996
<i>R. tropici</i> bv. <i>mimosae</i>	UPRM 8021	EU490517	<i>M. ceratonia</i>	Porto Riko	Elliott ve ark., 2009
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	ICMP2672	DQ100403	<i>P. vulgaris</i>	Y. Zelanda	Weir, B.S., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ICMP 5377	EF115496	<i>S. flavescens</i>	Japonya	Weir, B.S., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	12.5	GQ374373	-	Polonya	Mazur ve ark., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ICMP 2668	DQ100412	<i>T. repens</i>	Y. Zelanda	Weir, B.S., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	201ZG	DQ286900	-	Hırvatistan	Zafran ve ark., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	VT608	FJ715818	<i>V. tetrasperma</i>	Güney Kore	Kim ve ark., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	VAS602	FJ650409	<i>V. angustifolia</i>	Güney Kore	Kim ve ark., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	3841	AM236084	-	-	Young ve ark., 2006
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	ICMP 5943	DQ100408	<i>V. sativa</i>	Y. Zelanda	Weir, B.S., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	301ZG	DQ286867	-	Hırvatistan	Zafran ve ark., yayımlanmamış
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	ICMP 14642	DQ100409	<i>S. chathamica</i>	Y. Zelanda	Weir, B.S., yayımlanmamış
<i>Sinorhizobium</i> spp.	47-1	FJ800053	<i>P. vulgaris</i>	Tunus	Mnasri ve ark., 2009
<i>Sinorhizobium</i> spp.	LILM4H41	FJ800056	<i>P. vulgaris</i>	Tunus	Mnasri ve ark., 2009
<i>Sinorhizobium</i> spp.	1H1	FJ800057	<i>P. vulgaris</i>	Tunus	Mnasri ve ark., 2009

Çizelge 3.7 Filogenetik analizlerinde kullanılan Rhizobium izolatlarının *nifH* erişim numaraları

	İzolat	Erişim No	Konukçu	Orijin	Kaynak
<i>Rhizobium leguminosarum</i> ^T	USDA 2370	DQ450935	<i>P. sativum</i>	A.B.D.	Laranjo ve ark., 2008
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	3841	NC_008381	<i>P. sativum</i>	İngiltere	Young ve ark., 2006
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	SU329	K00490	-	-	Scott ve ark., 1983
<i>R. etli</i> bv. <i>phaseoli</i> ^T	CFN42	NC_004041	<i>P. vulgaris</i>	Meksika	Gonzalez ve ark., 2003
<i>R. etli</i> bv. <i>phaseoli</i>	CIAT652	NC_010996	<i>P. vulgaris</i>		Gonzalez ve ark., yayımlanmamış
<i>R. etli</i> bv. <i>phaseoli</i>	Olivia4	M55227	<i>P. vulgaris</i>	Belize	Eardly ve ark., 1992
<i>R. etli</i> bv. <i>mimosae</i>	Mim2	AF107621	<i>Mimosa affinis</i>		Wang ve ark., 1999
<i>R. lusitanum</i> ^T	P1-7	AY943644	<i>P. vulgaris</i>	Portekiz	Valverde ve ark., 2006
<i>R. gallicum</i> ^T	R602sp	AF218126	<i>P. vulgaris</i>	Fransa	Laguerre ve ark., 2001
<i>R. tropici</i> ^T sub. sp. A	CIAT 899	M55225	<i>P. vulgaris</i>	-	Eardly ve ark., 1992
<i>B. japonicum</i> ^T	USDA 110	BA000040	<i>G. max</i>	A.B.D	Kanenko ve ark., 2002

3.5. Kullanılan Çözeltiler ve Besi Yerleri

3.5.1. Asitleştirilmiş Civa Klorür (% 0.1)

Kök nodüllerinin yüzey sterilizasyonu için kullanılan civa klorür Elkan (1987)'ye göre hazırlanmıştır:

Civa (Carlo Erba, İtalya): 0.1 gr

Konsantre HCl (Merck, Darmstadt, Almanya): 0.5 ml

dH₂O: 100 ml

3.5.2. Yeast Ekstrakt Mannitol Agar (YMA)

Rhizobia grubu bakterilerin genel üretimi için kullanılan YMA ortamı Somasegaran ve Hoben (1985)'e göre hazırlanmıştır:

K₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya): 0.5 gr

MgSO₄. 7H₂O (Kimetsan, Türkiye): 0.2 gr

NaCl (Carlo Erba, İtalya): 0.1 gr

Mannitol (Merck, Darmstadt, Almanya): 10 gr

Maya ekstraktı (LabM Lancashire, İngiltere): 0.5 gr

dH₂O: 1000 ml

Agar (Merck, Darmstadt, Almanya): 15 gr

Hazırlanan ortamın pH'sı agar eklenmeden önce 6.8'e ayarlanmış ve agar eklendikten sonra 121 °C de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.5.3. Gliserol Stok (%20)

YMB ortamında 28 °C'de 24 saat geliştirilen kültürlerden 750 µl alınarak içerisinde %80'lik 250 µl gliserol bulunan steril vidalı tüplere (1.5 ml) aktarılmıştır. Tüpler iyice vorteksenerek karıştırılmış ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra -20 °C'deki derin dondurucuda (MyBio) muhafaza edilmiştir.

3.5.4. Kristal Viyole

Boya çözeltisi Vincent (1970)'e göre hazırlanmıştır:

Kristal viyole (Carlo Erba, İtalya): 10 gr

Amonyum oksalat monohidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya): 4 gr

Etanol (J.T. Baker, Deventer, Hollanda): 100 ml
dH₂O: 400 ml

Kristal viyole ve amonyum oksalat 100 ml etanol içerisinde çözöldükten sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Boya çözeltisi daha sonra kaba filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve çökeltilerden arındırılmıştır. Hazırlanan boya ışık almayan bir şişe içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.5.5. Gram İyodin Çözeltisi

İyot çözeltisi Vincent (1970)'e göre hazırlanmıştır:

İyodin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya): 1 gr
Potasyum İyodit (Carlo Erba, İtalya): 2 gr
Etanol (J.T. Baker, Deventer, Hollanda): 25 ml
dH₂O: ≈75 ml

İyodin ve potasyum iyodit 25 ml etanol içerisinde çözöldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti daha sonra kaba filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve çökeltilerden arındırılmıştır. Hazırlanan Gram iyodin çözeltisi ışık almayan bir şişe içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.5.6. Alkol-İyot Karışımı

Karışım Vincent (1970)'e göre hazırlanmıştır:

Gram İyodin Çözeltisi (Bkz. 3.5.5): 5 ml
Etanol (J.T. Baker, Deventer, Hollanda): 95 ml

Gram İyodin Çözeltisi ve etanol yukarıda belirtilen oranlarda karıştırılmış ve karırım ışık almayan bir şişe içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.5.7. Safranin

Boya çözeltisi Vincent (1970)'e göre hazırlanmıştır:

Safranin: 2,5 gr

Etanol (J.T. Baker, Deventer, Hollanda): 100 ml

dH₂O: 100 ml

Safranin 100 ml etanol içerisinde çözöldükten sonra bu çözöltiden 10 ml alınarak son hacim distile suya ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Boya çözöltisi daha sonra kaba filtre kağıdından geçirilerek süzülmüş ve çökeltilerden arındırılmıştır. Hazırlanan boya ışık almayan bir şişe içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.5.8. Brom-Cresol Purple İçeren Pepton Glukoz Agar

Brom-cresol purple boya stok çözöltisi hazırlamak için 1 gr toz boya (Surechem Products Ltd., İngiltere) 100 ml etanol içerisinde çözölmüştür. İzolatların saflıklarını kontrol etmek için kullanılan Brom-Cresol Purple İçeren Pepton Glukoz Agar besi ortamı Somasegaran ve Hoben (1985)'e göre hazırlanmıştır:

Glikoz (Dekstroz: Merck, Darmstadt, Almanya): 5 gr

Pepton (LabM, Lancashire, İngiltere): 10 gr

Agar (Merck, Darmstadt, Almanya): 15 gr

Tartılan içeriğe yukarıda açıklanan Brom-cresol purple stok çözöltisinden 10 ml eklenmiş ve toplam hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan ortam 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve steril petri kaplarına dökölmüştür.

3.5.9. Fide Agar

Nodölasyon testlerinde fidelerin geliştirilmesi için aşağıda içeriği belirtilen Jensen ortamı kullanılmıştır (Vincent, 1970).

CaHPO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya): 1 gr

K₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya): 0.2 gr

MgSO₄. 7H₂O (Kimetsan, Türkiye): 0.2 gr

NaCl (Carlo Erba, İtalya): 0.2 gr

FeCl₃ (Merch, Darmstadt, Almanya): 0.1 gr

dH₂O: 1000 ml

Ortam hazırlandıktan sonra içerisine aşağıda belirtilen iz element çözeltilerinden 1'er ml ilave edilmiş ve pH'sı 6.8'e ayarlanmıştır. 15 gr/lit oranında agar (Merch, Darmstadt, Almanya) ilave edildikten sonra ortam ısıtılarak agarın erimesi sağlanmıştır. Besi ortamı nodülasyon teslerinin yapılacağı şişelere aktarıldıktan sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

İz element çözeltisi:

H₃BO₃ (Merch, Darmstadt, Almanya): % 0,05 (gr/lit)

MnCl₂ (Carlo Erba, İtalya): % 0,05 (gr/lit)

ZnCl₂ (Aklar Kimya, Türkiye): % 0,005 (gr/lit)

Na₂MoO₄ 2H₂O (Merch, Darmstadt, Almanya): % 0,005 (gr/lit)

CuSO₄ (Carlo Erba, İtalya): % 0,005 (gr/lit)

CaCl₂ (Aklar Kimya, Türkiye): 10 ppm

3.5.10. NaOCl (%1'lik)

Nodülasyon testinde kullanılacak konak bitki tohumlarının yüzey sterilizasyonu NaOCl (%1'lik) ile yapılmıştır. Sterilantı hazırlamak için ticari olarak satılan çamaşır suları %5 konsantrasyonda kabul edilmiş ve %1'lik olacak şekilde steril dH₂O ile sulandırılmıştır.

3.5.11. Su Agarı

Nodülasyon testinde kullanılacak konak bitki tohumlarının çimlendirilmesi için su agarı ortamı kullanılmıştır. Bu ortam için 15 gr agar agar (Merch, Darmstadt, Almanya) tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan ortam 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve steril petri kaplarına dökülmüştür.

3.5.12. Fide Çözeltisi

Fide çözeltisi 3.5.9'da açıklanan Fide agarın içeriğinden agarın çıkartılması ile hazırlanmıştır (Vincent, 1970).

3.5.13. Yeast Extract Mannitol Broth (YMB)

YMB ortamı 3.5.2'de açıklanan YMA ortamının içeriğinden agar agarın çıkartılması ile hazırlanmıştır (Somasegaran ve Hoben, 1985).

3.5.14. Tripton Yeast Ekstrakt (TY)

TY ortamı hazırlamak için, 6 gr tripton (LabM, Lancashire, İngiltere), 3 gr Maya ekstraktı (LabM Lancashire, İngiltere) ve 4,5mM CaCl_2 (Merch, Darmstadt, Almanya) saf su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra içerisine 15 gr/lit oranında agar agar (Merch, Darmstadt, Almanya) eklenmiş ve saf su ile son hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan ortam 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve steril petri kaplarına dökülmüştür (Ditta ve ark., 1987).

3.5.15. Tris-Cl

100 ml 1 M Tris-Cl hazırlamak için 12.11 gram Tris baz (Sigma, Steinheim, Almanya) 80 ml ddH₂O içerisinde çözülmüş ve pH'sı gerekli miktarda konsantre HCl (Merch, Darmstadt, Almanya) eklenerek 8'e ayarlanmıştır. Son hacim ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmış ve pH değeri son olarak ölçülerek kontrol edilmiştir (Sambrook ve Russell, 2001).

3.5.16. EDTA (0.5 M) pH 8

100 ml 0.5 M EDTA (Sigma, Steinheim, Almanya) çözeltisi hazırlamak için 14.6 gram EDTA (Sigma, Steinheim, Almanya) tartılarak 80 ml ddH₂O ya eklenmiştir. Çözelti bir taraftan manyetik karıştırıcıda karıştırılırken diğer taraftan NaOH (Carlo Erba, İtalya) granülleri çözelti içerisine eklenerek pH 8'e ayarlanmıştır. Çözelti ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmış ve son olarak pH'sı kontrol edilmiştir. Hazırlanan çözelti 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Durmaz ve ark., 2001).

3.5.17. 10X Tris-EDTA (TE) tamponu, pH 8

100 ml 10X TE tamponu hazırlamak için 10 ml pH 8.0 Tris-Cl (100 mM) ve 2 ml pH 8.0 EDTA (10 mM) 88 ml ddH₂O ile karıştırılmış ve tampon 121 °C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 1X TE tamponu hazırlamak için stok 1/10 oranında sulandırılmıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

3.5.18. %10'luk SDS

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

3.5.19. ProteinazK (20 mg/ml)

0.02 gram (20 mg) proteinazK (Promega, Madison, WI, ABD) tartılarak TE (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) tamponu ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. ProteinazK vortekslenip iyice çözündükten sonra 100 µl'lik paylara ayrılmış ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir. ProteinazK oldukça hassas olduğundan mümkün olduğu kadar taze hazırlanıp kullanılmaya özen gösterilmiştir.

3.5.20. NaCl (5 M)

100 ml 5 M NaCl çözeltisi hazırlamak için, granül haldeki NaCl (Carlo Erba, İtalya)'den 29.22 gr tartılarak üzeri ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.5.21. CTAB (Setil trimetil amonyum bromür)/NaCl

100 ml CTAB/NaCl çözeltisi hazırlamak için 4.1 gram NaCl (Carlo Erba, İtalya) tartılarak 90 ml ddH₂O içerisinde çözülmüştür. Bu çözeltinin içerisine 10 gr CTAB (Sigma, Steinheim, Almanya) eklendikten sonra 65 °C'ye kadar ısıtılmış ve karıştırılarak CTAB'ın çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözelti ddH₂O ile 100 ml ye tamamlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

3.5.22. Kloroform/izoamil alkol (24:1)

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

3.5.23. Etanol (%70)

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

3.5.24. 30 mg/ml RNaz (RibonükleazA)

0.03 gr RibonükleazA (Sigma) tartılarak bir mikrosantrüfuj tüpüne alınmıştır ve 1X TE tamponu (bkz. 3.5.17) ile üzeri 1 ml'ye tamamlanmıştır.

3.5.25. 3M pH 5.2 Sodyum Asetat (NaAC)

Çözelti Sambrook ve Russell (2001)'e göre hazırlanmıştır. 40,83 gr Sodyum asetat (NaAC 3H₂O; Amresco, Ohio, ABD) yaklaşık 80 ml ddH₂O da çözünerek pH'sı glasiyel asetik asit (Merck, Darmstadt, Almanya) ile 5.2'ye ayarlanmıştır. Daha sonra üzeri ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmış ve tekrar pH'sı ölçülmüştür. Hazırlanan çözelti 121 °C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.5.26. TBE (Tris-Borat-EDTA)

10 X TBE tamponu Maniatis ve ark. (1982)'ye göre hazırlanmıştır:

Trizma Base (Sigma, Steinheim, Almanya): 108 gr

Borik Asit (Merck, Darmstadt, Almanya): 55 gr

0.5M pH: 8 EDTA (bkz. 3.5.16): 40 ml

Tartılan içerik ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 1X TBE tamponu hazırlamak için stok 1/10 oranında sulandırılmıştır.

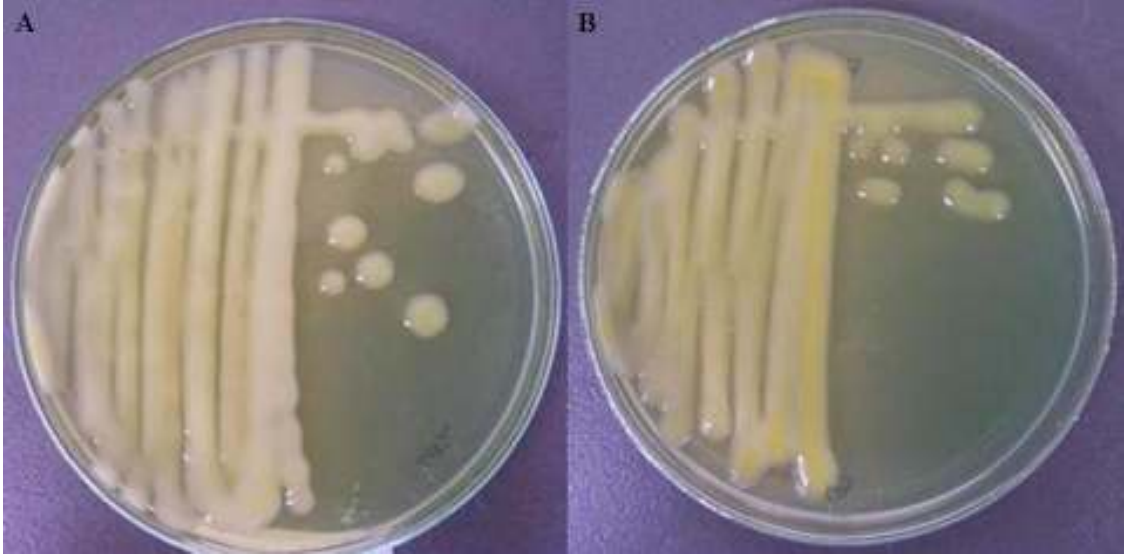
3.5.27. Ethidium-Bromür

DNA bantlarını boyamak için kullanılan Ethidium-Bromür çözeltisi, hazır olarak satın alınan stoğun (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) % 1 v/v oranında sulandırılmasıyla (ddH₂O ile) hazırlanmıştır. Kullanılan Ethidium-Bromür çözeltisi kullanım sıklığına bağlı olarak en az haftada bir yenilenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Örnekleme ve Kök Nodüllerinden *Rhizobium* İzolasyonu

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda Samsun, Sinop, Ordu ve Amasya illerine ait Çizelge 3.1’de belirtilen lokalitelerin tamamından, Nisan-Mayıs ayları süresince bakla (*Vicia faba* L.) ve bezelye (*Pisum sativum* L.), Temmuz-Ağustos ayları süresince de fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitki örnekleri toplanmıştır. Toplanan bitki örneklerinin köklerinden seçilen sağlıklı nodüllerden yapılan izolasyonlar sonucunda 30 tane bakla’dan, 30 tane bezelye’den ve 30 tane de fasulye’den olmak üzere toplam 90 adet *Rhizobium* olabilecek tipik bakteri örneği elde edilmiş ve stoklanmıştır (Şekil 4.1).



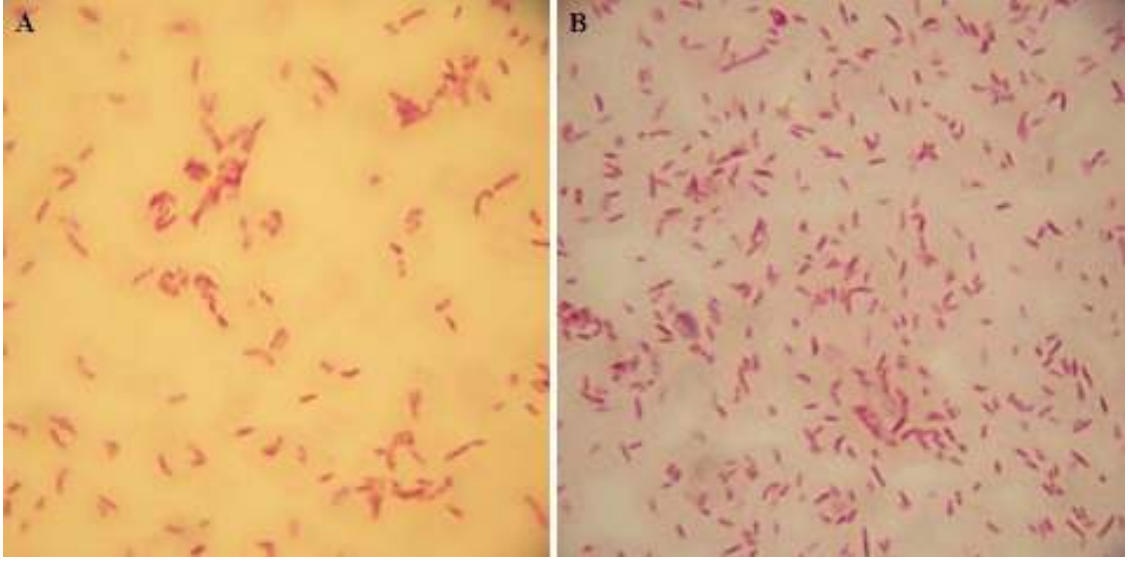
Şekil 4.1 Sırasıyla fasulye ve bakla kök nodüllerinden izole edilen (A) CTG-412 (*Rhizobium phaseoli*), (B) CTG-59 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*), izolatlarının YMA ortamındaki koloni görünimleri

İzole edilen 90 adet *Rhizobium* olabilecek bakteri örneğinin genel kültürel özelliklerinin belirlenmesi için izolatlar, aynı zamanda izolasyon için de kullanılan Brom Thimol Mavisi içeren Yeast Ekstrakt Mannitol Agar (YMA) ortamına aşılantılmışlardır. Sonuçta izolatların tamamı Kuykendall (2005)’de Rhizobiyal koloniler için belirtilen dışbükey, halkasal, parlak ve mukuslu yapıyı göstermişler ve YMA ortamında asit oluşturarak ortam rengini yeşilden sarıya dönüştürmüşlerdir. Bu sonuç izolatların hızlı gelişen ve asit üreten Rhizobiyal cinsler (*Rhizobium*, *Ensifer* veya *Mesorhizobium*) içerisinde yer alan türlerden birine ait olduklarını göstermektedir.

4.2 Geleneksel Yöntemler ile Kök Nodül Bakterilerinin Ön Teşhisleri

4.2.1 Gram Boyama

Yapılan Gram boyamalar sonucunda, elde edilen tüm izolatların Kuykendall ve ark. (2005)'de belirtilen ve *Rhizobiaceae* familyasının tipik karakteristikleri olan, ortalama $0.5-0.1 \times 1.2-3 \mu\text{m}$ hücre ebatı, çomak hücre şekli ve Gram negatif boyanma özelliklerine sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.2 A - B).



Şekil 4.2 (A) Fasulye'den izole edilen *Rhizobium phaseoli* (CTG-412) izolatının Gram boyama sonucu 10x100'lük büyütmedeki mikroskopik görüntüsü (B) Bakla'dan izole edilen *R. leguminosarum* bv. *viciae* (CTG-59) izolatının Gram boyama sonucu 10x100'lük büyütmedeki mikroskopik görüntüsü

Ayrıca yapılan Gram boyamalar sonucunda kültürlerde, izolasyon veya takip eden aşamalarda hatalardan kaynaklanabilecek bir Gr (+) veya kokkus, spirillum vb. farklı hücre morfolojisine sahip bakteri kontaminasyonlarının bulunmadığı da belirlenmiştir.

4.2.2 Brom-Cresol Purple İçeren Pepton Glukoz Agarda Gelişim

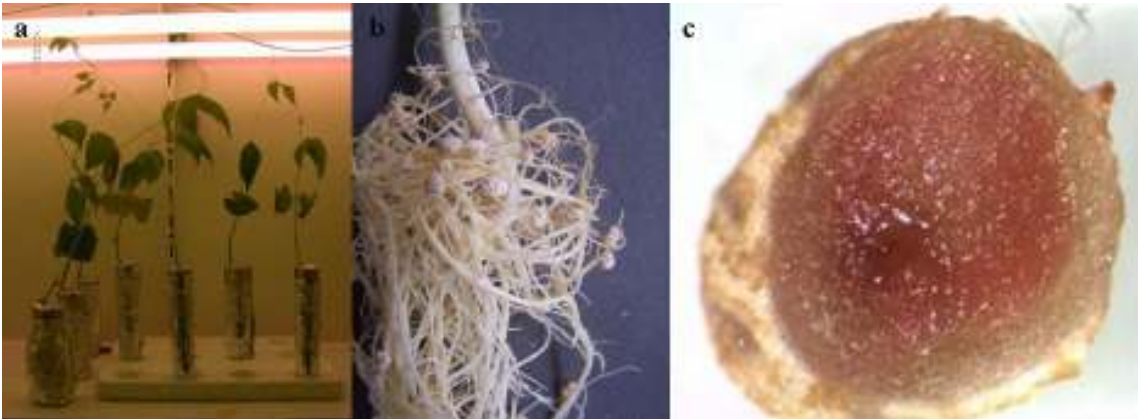
Brom-Cresol Purple içeren PGA ortamına aşıl原因 90 izolatın hiçbirisi 28 °C'de, 48 saatlik inkübasyon sonucunda üreme göstermemiş ve ortam pH'sında değişime neden olmamıştır (Şekil 4.3). Gram boyama ile birlikte bu testten elde edilen sonuçlar, izole edilen örneklerin gerçek birer Rhizobia olabileceklerini ve herhangi bir kontaminant içermediklerini ortaya koymuştur.



Şekil 4.3 Brom-Cresol Purple içeren PGA ortamına aşılınmış ve 28 °C’de 48 saat inkübe edilmiş bir kontaminantın ve bir Rhizobia (*R. phaseoli*) izolatının (CTG-412) gelişimi

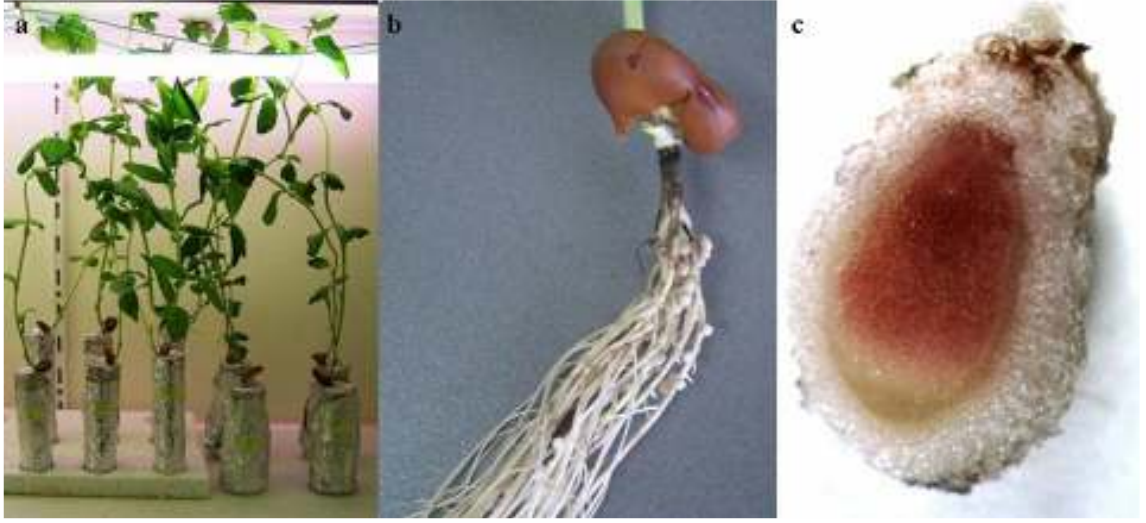
4.2.3 Nodülasyon (Otantikasyon) Testi

Elde edilen izolatların nodülasyon ve azot fiksasyon genleri içerip içermediğini anlamak için yapılan nodülasyon testleri sonucunda, fasulye’den izole edilen tüm bakterilerin fasulye bitkisi kökleri üzerinde geçici meristem dokusuna sahip, küresel, determinate nodüller oluşturduğu gözlenmiştir. Bu sonuç bakterilerin nodülasyon (*nod*, *noe* ve *nol*) genleri içerdiğini göstermektedir (Şekil 4.4a-b). Aynı zamanda oluşan bu nodüllerin pembe renkli olduğu, yani içerisinde leghemoglobin bulundurduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4c). Bu sonuç nodüllerin, dolayısıyla da içerisindeki bakteroidlerin azot fiksasyonu açısından aktif olduklarını yani izolatların azot fiksasyon genleri olan *nif* ve *fix* genlerini bulundurduğunu göstermiştir.



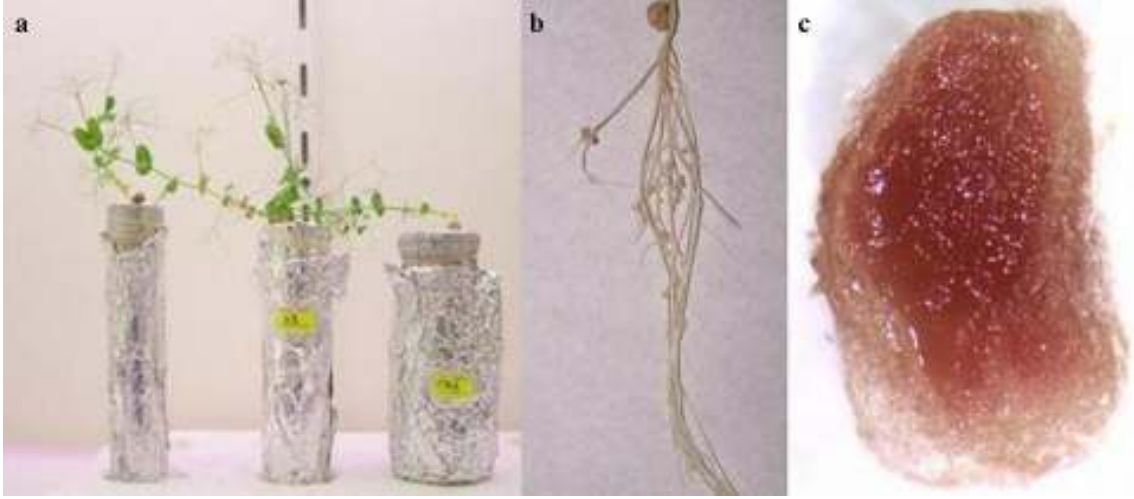
Şekil 4.4 (a) Fasulye’den izole edilen Rhizobia izolatları için yapılan bir nodülasyon denemesi, **(b)** CTG-403 izolatının fasulye kökünde oluşturduğu aktif nodüller, **(c)** CTG-403 izolatının fasulye kökünde oluşturduğu aktif bir determinate nodülün iç yapısı

Benzer şekilde bakla'dan izole edilen tüm bakteri örneklerinin bakla kökleri üzerinde kalıcı meristem dokusuna sahip, uzun, indeterminate nodüller oluşturduğu gözlenmiştir. Bu sonuç bakterilerin nodülasyon (*nod*, *noe* ve *nol*) genleri içerdiğini göstermektedir (Şekil 4.5a-b). Ayrıca tüm bakterilerin, bakla üzerinde oluşturduğu nodüllerin pembe renkte olduğu yani leghemoglobin bulundurduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5c). Bu sonuç da, izolatların genomlarında azot fiksasyon (*nif* ve *fix*) genlerini bulundurduklarını göstermektedir.



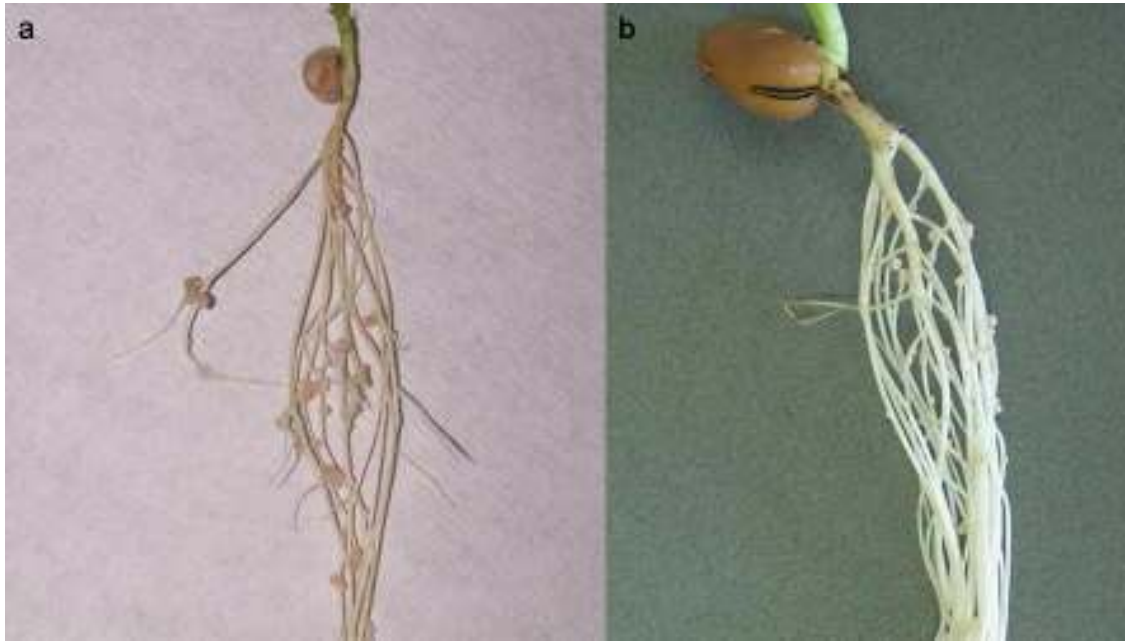
Şekil 4.5 (a) Bakla'dan izole edilen Rhizobia izolatları için yapılan bir nodülasyon denemesi, (b) Bakla'dan izole edilen CTG-59 izolatının bakla kökünde oluşturduğu aktif nodüller, (c) CTG-59 izolatının bakla kökünde oluşturduğu aktif bir indeterminate nodülün iç yapısı

Benzer şekilde bezelye'den izole edilen bakteri örneklerinin tamamı bezelye kökleri üzerinde nodüller oluşturmuştur. Bu nodüller kalıcı meristem dokusuna sahip, uzun, indeterminate nodüller şeklindedir. Bu sonuç bezelye'den izole edilen bu bakterilerin genomlarında nodülasyon (*nod*, *noe* ve *nol*) genleri içerdiğini göstermektedir (Şekil 4.6a-b). Ayrıca tüm bakterilerin, bezelye üzerinde oluşturduğu nodüllerin pembe renkte olduğu yani leghemoglobin bulundurduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6c). Bu sonuç izolatların genomlarında azot fiksasyon (*nif* ve *fix*) genlerinin bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6 (a) Bezelye'den izole edilen Rhizobia izolatları için yapılan bir nodülasyon denemesi, (b) Bezelye'den izole edilen CTG-1 izolatının bezelye kökünde oluşturduğu aktif nodüller, (c) CTG-1 izolatının bezelye kökünde oluşturduğu aktif bir indeterminate nodülün iç yapısı

Yukarıda belirtilen nodülasyon testlerine ek olarak Viciae kabilesine ait olan bakla ve bezelye bitkilerinin köklerinden izole edilen bakteriler için çapraz aşılama denemeleri de yapılmıştır. Bu amaçla bezelye kök nodüllerinden izole edilen ve bu bitkide aktif nodüller oluşturdukları belirlenen, (*nodA* ve *nifH* genlerinin baz dizileri belirlenmiş) CTG-1, CTG-13, CTG-74, CTG-110, CTG-114, CTG-202, CTG-203 ve CTG-205 izolatları bakla köklerine aşılanmıştır (Şekil 4.7a-b).



Şekil 4.7 (a) Bezelye'den izole edilen CTG-1 izolatının bezelye kökünde oluşturduğu aktif (pembe renkli) nodüller, (b) CTG-1 izolatının bakla kökünde oluşturduğu aktif (pembe renkli) fakat küçük nodüller

Benzer şekilde bakla kök nodüllerinden izole edilen ve bu bitkide aktif nodüller oluşturdukları belirlenen (*nodA* ve *nifH* genlerinin baz dizileri belirlenmiş) CTG-23, CTG-35, CTG-40, CTG-59, CTG-68, CTG-301, CTG-303 ve CTG-308 izolatları ise bezelye köklerine aşılanmıştır. Denemeler sonucunda bakla'dan izole edilen bakterilerin bezelye köklerinde, bezelye'den izole edilen bakterilerin ise bakla köklerinde pembe yani azot fiksasyonu açısından aktif, indeterminate nodüller oluşturdukları belirlenmiştir. Fakat bu nodüllerin, izolatların orijinal konukçularının kökleri üzerinde oluşturdukları nodüllere oranla çok daha küçük ve daha az sayıda oldukları görülmüştür (Şekil 4.7a-b).

Yukarıda belirtilen; Brom Thimol Blue içeren YMA'da gelişim, Gram boyama, Brom-Cresol Puple içeren Pepton Glikoz Agar da gelişim gibi ön teşhis testleri ve nodülasyon testlerini içeren geleneksel yöntemler ile *Rhizobia* oldukları belirlenen ve çalışmaya dahil edilen bakteri örneklerinin kodları, izole edildikleri konukçuları ve bu konukçuların toplandıkları lokaliteler Çizelgeler 4.1-3'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Bezelye (*P. sativum* L.) köklerinden alınan nodüllerden izole edilen Rhizobia izolatlarının kodları ve bitki örneklerinin toplandıkları lokaliteler

İzolat	İl	Lokalite	İzolat	İl	Lokalite	İzolat	İl	Lokalite	İzolat	İl	Lokalite
CTG-1	Ordu	Merkez	CTG-36	Samsun	Merkez	CTG-73	Sinop	Gerze	CTG-205	Amasya	Merkez
CTG-5	Ordu	Çamaş	CTG-46	Samsun	Çarşamba	CTG-74	Sinop	Ayancık	CTG-204	Amasya	Merzifon
CTG-9	Ordu	Gölköy	CTG-65	Samsun	Bafra	CTG-76	Sinop	Erfelek	CTG-206	Amasya	Suluova
CTG-13	Ordu	Çayıralan	CTG-110	Samsun	Kavak	CTG-78	Sinop	Merkez	CTG-207	Amasya	Taşova
CTG-18	Ordu	Tekkiraz	CTG-202	Samsun	Yakakent	CTG-109	Sinop	Durağan	CTG-203	Amasya	G. hacıköy
CTG-25	Ordu	Bolaman	CTG-211	Samsun	Terme	CTG-114	Sinop	Çöve	CTG-208	Amasya	Göynücek
CTG-32	Ordu	Ünye	CTG-213	Samsun	Vezirköprü	CTG-210	Sinop	Boyabat			
CTG-201	Ordu	Mesudiye	CTG-212	Samsun	Ladik	CTG-209	Sinop	Kepez			

Çizelge 4.2 Bakla (*V.faba* L.) köklerinden alınan nodüllerden izole edilen Rhizobia izolatlarının kodları ve bitki örneklerinin toplandıkları lokaliteler

İzolat	İl	Lokalite	İzolat	İl	Lokalite	İzolat	İl	Lokalite	İzolat	İl	Lokalite
CTG-2	Ordu	Merkez	CTG-35	Samsun	Merkez	CTG-59	Sinop	Boyabat	CTG-304	Amasya	Merkez
CTG-6	Ordu	Çamaş	CTG-40	Samsun	Vezirköprü	CTG-61	Sinop	Durağan	CTG-302	Amasya	Merzifon
CTG-12	Ordu	Çayıralan	CTG-45	Samsun	Çarşamba	CTG-63	Sinop	Merkez	CTG-305	Amasya	Suluova
CTG-17	Ordu	Tekkiraz	CTG-51	Samsun	Terme	CTG-68	Sinop	Erfelek	CTG-303	Amasya	Taşova
CTG-23	Ordu	Bolaman	CTG-65	Samsun	Bafra	CTG-108	Sinop	Gerze	CTG-301	Amasya	G. hacıköy
CTG-29	Ordu	Ünye	CTG-77	Samsun	Yakakent	CTG-112	Sinop	Çöve	CTG-306	Amasya	Göynücek
CTG-307	Ordu	Gölköy	CTG-107	Samsun	Kavak	CTG-113	Sinop	Ayancık			
CTG-308	Ordu	Mesudiye	CTG-111	Samsun	Ladik	CTG-309	Sinop	Kepez			

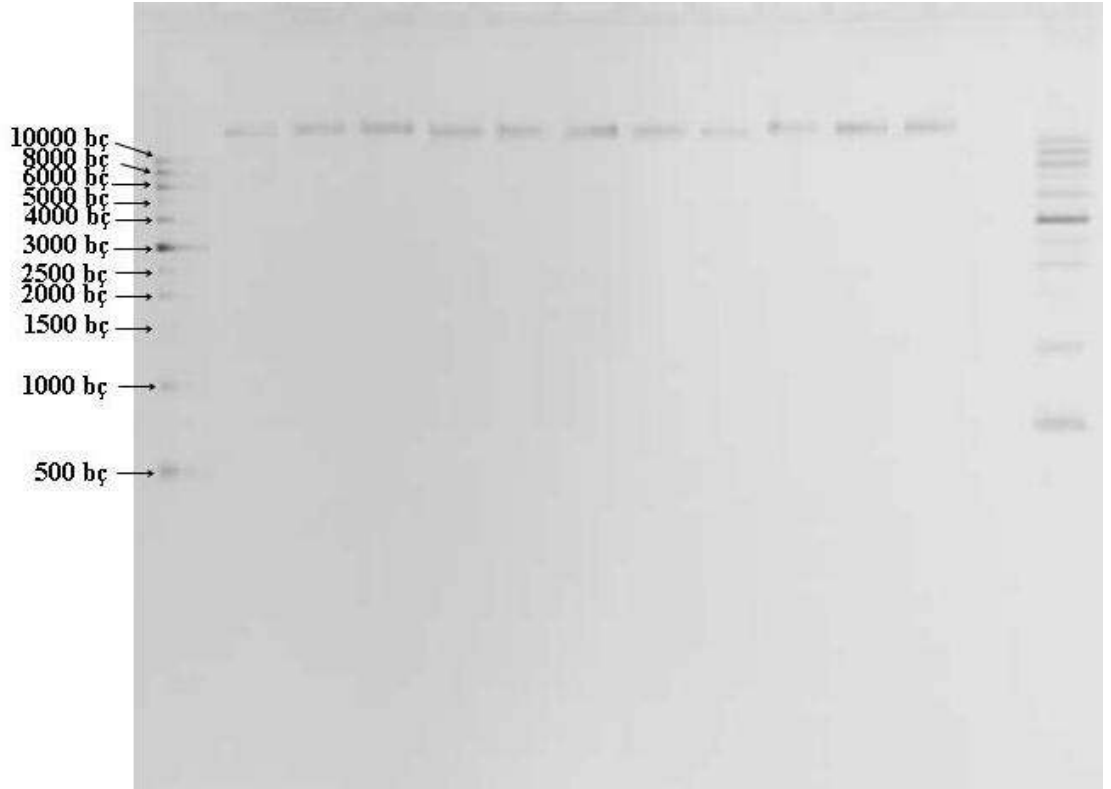
Çizelge 4.3 Fasulye (*P. vulgaris* L.) köklerinden alınan nodüllerden izole edilen Rhizobia izolatlarının kodları ve bitki örneklerinin toplandıkları lokaliteler

İzolat	İl	Lokale	İzolat	İl	Lokale	İzolat	İl	Lokale	İzolat	İl	Lokale
CTG-401	Ordu	Merkez	CTG-409	Samsun	Merkez	CTG-422	Sinop	Boyabat	CTG-425	Amasya	Merkez
CTG-406	Ordu	Çamaş	CTG-416	Samsun	Vezirköprü	CTG-423	Sinop	Durağan	CTG-427	Amasya	Merzifon
CTG-405	Ordu	Çayıralan	CTG-412	Samsun	Çarşamba	CTG-417	Sinop	Merkez	CTG-426	Amasya	Suluova
CTG-404	Ordu	Tekiraz	CTG-413	Samsun	Terme	CTG-418	Sinop	Erfelek	CTG-429	Amasya	Taşova
CTG-402	Ordu	Bolaman	CTG-410	Samsun	Bafra	CTG-419	Sinop	Gerze	CTG-428	Amasya	G. hacıköy
CTG-403	Ordu	Ünye	CTG-411	Samsun	Yakakent	CTG-424	Sinop	Çöve	CTG-430	Amasya	Göynücek
CTG-407	Ordu	Gölköy	CTG-414	Samsun	Kavak	CTG-420	Sinop	Ayancık			
CTG-408	Ordu	Mesudiye	CTG-415	Samsun	Ladik	CTG-421	Sinop	Kepez			

4.3 Moleküler Yöntemler ile Kök Nodül Bakterilerinin Tanımlanması

4.3.1 Rhizobia İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu

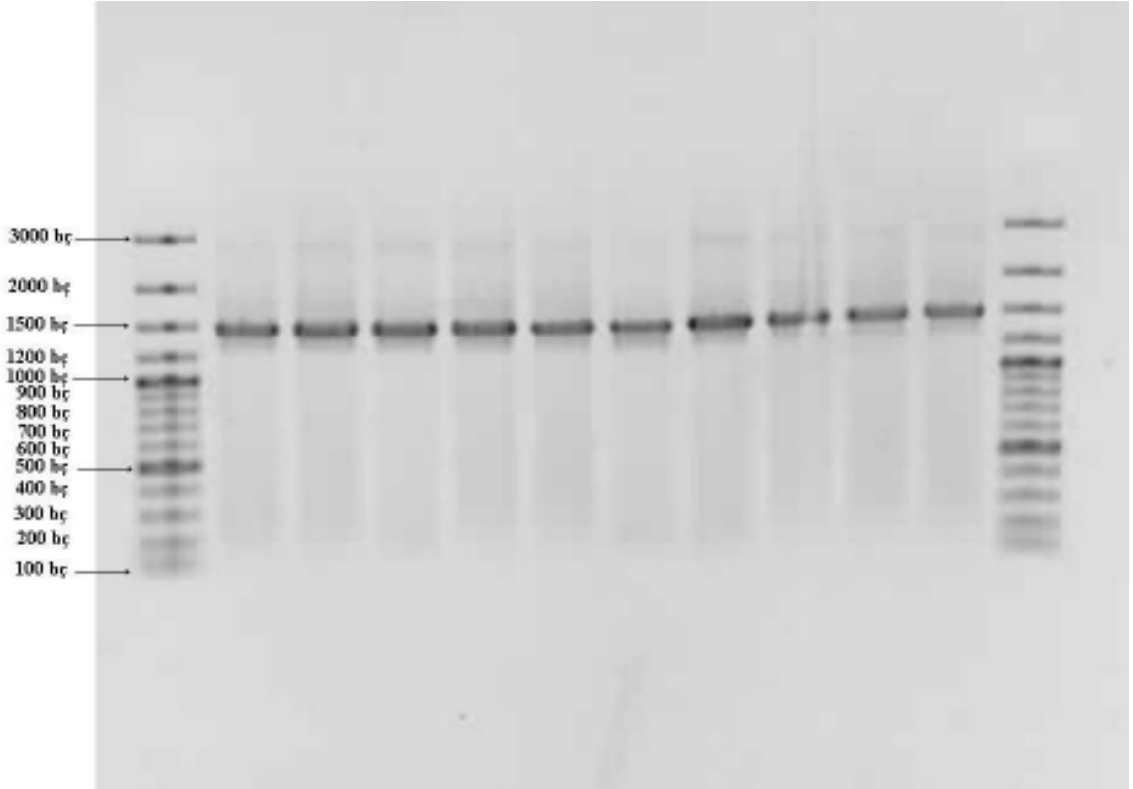
Geleneksel yöntemler ile Rhizobia oldukları belirlenen izolatların moleküler olarak teşhislerinin yapılması için öncelikle izolatlardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.8). Örnekler kültüre alındıklarında bol miktarda eksopolisakkarit oluşturduklarından DNA izolasyonu bu eksopolisakkaritleri bağlayarak çöktüren CTAB/NaCl yöntemi kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon sonucunda proteinler, RNA, eksopolisakkaritler ve diğer hücre bileşenleri uzaklaştırılmış ve saf genomik DNA elde edilmiştir. Genomik DNA'lar çalışmalar için kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 4.8 Bakla'dan izole edilen bazı Rhizobia izolatlarına ait genomik DNA örnekleri: Markör (Amresco 1 kb DNA Ladder), CTG-12, -17, -23, 29, 59, 68, 107, 303, 307, 308, 309, Markör (Amresco 1 kb DNA Ladder)

4.3.2 16S rDNA-RFLP Analizi için Rhizobia İzolatlarından 16S rDNA Amplifikasyonu

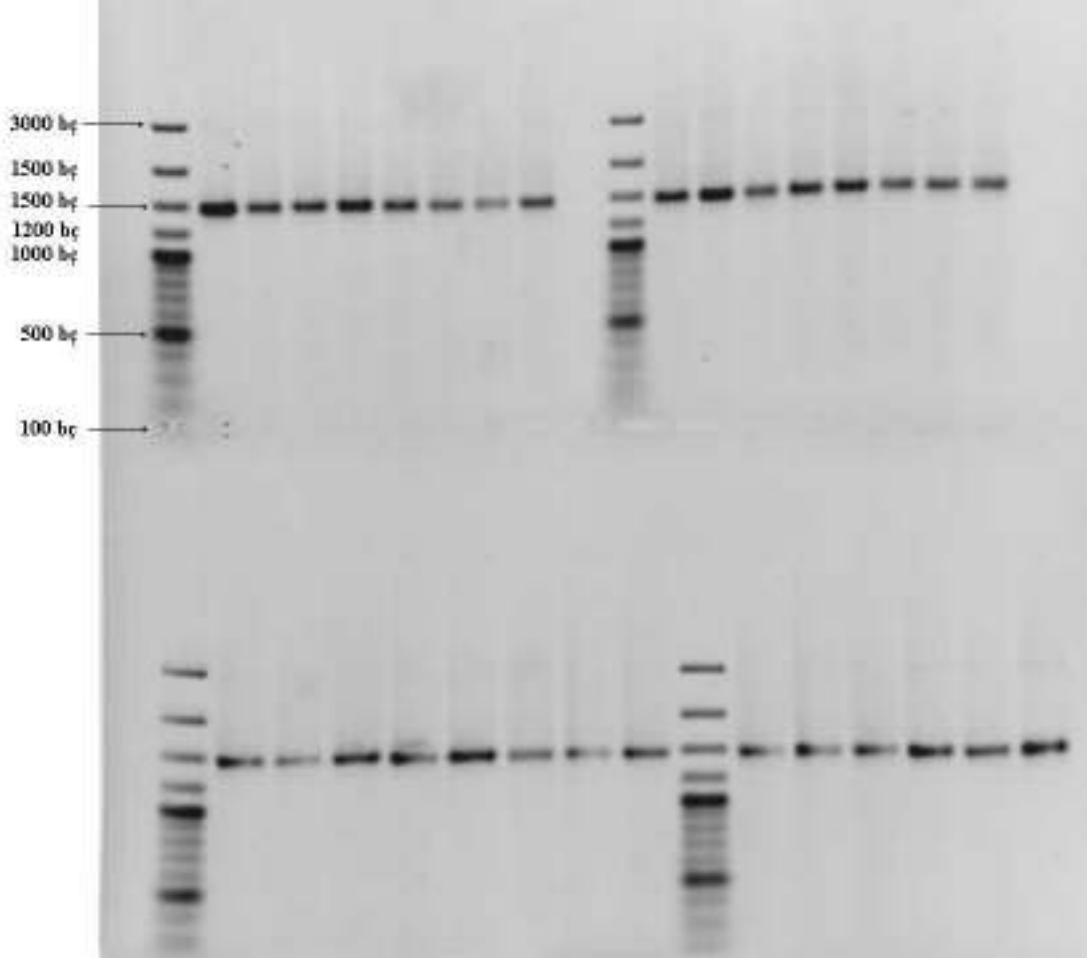
İzole edilen Rhizobia örneklerinin RFLP analizleri için 16S rDNA amplifikasyonları, fD1-rD1 primer çifti kullanılarak Bölüm 3.4.2’de açıklandığı gibi yapılmış ve sonuçta, fasulye nodüllerinden izole edilen, CTG-410, CTG-412, CTG-420, CTG-422, CTG-423, CTG-424, CTG-429 ve CTG-430 dışındaki tüm Rhizobia izolatlarından beklenen 1500 bp’lik DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 4.9). Yukarıda belirtilen izolatlarda 16S rDNA’ya ek olarak yaklaşık 750 bç büyüklüğünde ikinci bir bant gözlenmiştir. Bu izolatlar için primer bağlanma sıcaklığı 55 °C’den 56 °C’ye çıkartılarak PZR koşulları değiştirilmiş ve ekstra bant elimine edilmiştir.



Şekil 4.9 Bezelye’den izole edilen bazı Rhizobia izolatlarına ait 16S rDNA amplifikasyon ürün örnekleri: Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder), CTG-13, -46, -74, -78, -110, -202, -209, -211, -212, -213, Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder)

4.3.3 16S rDNA PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

RFLP analizlerinde kullanılmak üzere, elde edilen 90 adet Rhizobia izolatına ait 16S rDNA-PZR ürünleri, QIAquick (QIAGEN) PCR Purification Kit'i kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu şekilde ürün DNA diğer PZR bileşenlerinden ayrılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Bezelye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin saflaştırılmış 16S rDNA amplifikasyon ürünleri: **Üst sıra:** Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bp Plus DNA Ladder), CTG-1, 25, 32, 18, 13, 5, 9, 201, Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bp Plus DNA Ladder), 36, 64, 202, 46, 211, 110, 212, 213, **Alt sıra:** Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bp Plus DNA Ladder), CTG-78, 76, 73, 74, 209, 210, 109, 114, Markör (Fermentas, GeneRuler, 100 bp Plus DNA Ladder), 205, 206, 204, 203, 207, 208

4.3.4 RFLP Analizleri ile *Rhizobium* İzolatlarının Ön Gruplaması

4.3.4.1 Bezelye'den İzole edilen *Rhizobium* Örneklerinin 16S rDNA-RFLP ile Ön Gruplaması

Samsun, Sinop, Ordu ve Amasya illerinden (Çizelge 3.1) toplanan bezelye bitkilerinden izole edilen 30 (Çizelge 4.1) adet kök nodül bakterisinin *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* (Laguerre ve ark., 1994) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan 16S rDNA-RFLP analizleri sonucunda bu izolatların tamamının aynı restriksiyon şablonunu verdiği, dolayısıyla da aynı türe ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11). İzolatlar *CfoI* restriksiyon enzimi ile kesildiklerinde birer tane yaklaşık 340 bp, 190 bp, 150 bp, 130 bp ve 100 bp'lik ikişer tane de yaklaşık 280 bp'lik toplam 7 bant, *HinfI* ile kesildiklerinde birer tane 1100 bp, 200 bp ve 100 bp'lik toplam 3 bant, *MspI* ile kesildiklerinde birer tane yaklaşık 500 bp, 400 bp, 220 bp, 160 bp ve 120 bp'lik toplam 5 bant, *NdeII* ile kesildiklerinde ise birer adet 700 bp, 250 bp, 90 bp, 70 bp ve ikişer adet yaklaşık 180 bp'lik toplam 6 bant oluşturmuşlardır. İzolatların tamamı bu aynı şablonu verdiğinden 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* DNA dizi analizleri için her ilden, coğrafik olarak varyasyon gösterebilecek lokalitelerden izole edilmiş ikişer örnek seçilmiştir. DNA dizileme için seçilen izolatlar; Ordu'dan CTG-1 (Merkez) ve CTG-13 (Çayıralan), Samsun'dan CTG-110 (Kavak) ve CTG-202 (Alaçam-Yakakent), Sinop'dan CTG-74 (Ayancık) ve CTG-114 (Çöve) ve Amasya'dan CTG-203 (Gümüşhacıköy) ve CTG-205 (Merkez)'dir.

4.3.4.2 Bakla'dan İzole edilen *Rhizobium* Örneklerinin 16S rDNA-RFLP ile Ön Gruplaması

Samsun, Sinop, Ordu ve Amasya illerinden (Çizelge 3.1) toplanan bakla bitkilerinden izole edilen 30 adet (Çizelge 4.1) kök nodül bakterisinin *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* (Laguerre ve ark., 1994) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılan 16S rDNA-RFLP analizleri sonucunda izolatların tamamının birbirleri ile aynı şablonu verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12). İzolatlar *CfoI* restriksiyon enzimi ile kesildiklerinde birer tane yaklaşık 340 bp, 190 bp, 150 bp, 130 bp ve 100 bp'lik ikişer tane de yaklaşık 280 bp'lik toplam 7 bant, *HinfI* ile kesildiklerinde birer tane 1100 bp, 200 bp ve 100 bp'lik toplam 3 bant, *MspI* ile kesildiklerinde birer tane yaklaşık 500 bp, 400 bp, 220 bp, 160 bp ve 120 bp'lik toplam 5 bant, *NdeII* ile kesildiklerinde ise birer

adet 700 bç, 250 bç, 90 bç, 70 bç ve ikişer adet yaklaşık 180 bç'lik 6 bant oluşturmuşlardır. İzolatlar arasında herhangi bir varyasyon bulunmadığı için 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* DNA dizi analizleri için her ilden birbirine en uzak olan, bu nedenle de coğrafik olarak varyasyon gösterebilecek ikişer izolat seçilmiştir. DNA dizileme için seçilen izolatlar; Ordu'dan CTG-23 (Fatsa-Boloman) ve CTG-308 (Mesudiye), Samsun'dan CTG-35 (Merkez) ve CTG-40 (Vezirköprü) ve Sinop'dan CTG-59 (Boyabat) ve CTG-68 (Erfelek) ve Amasya'dan CTG-301 (Gümüşhacıköy) ve CTG-303 (Taşova)'dır.

4.3.4.3 Fasulye'den İzole edilen *Rhizobium* Örneklerinin 16S rDNA-RFLP ile Ön Gruplaması

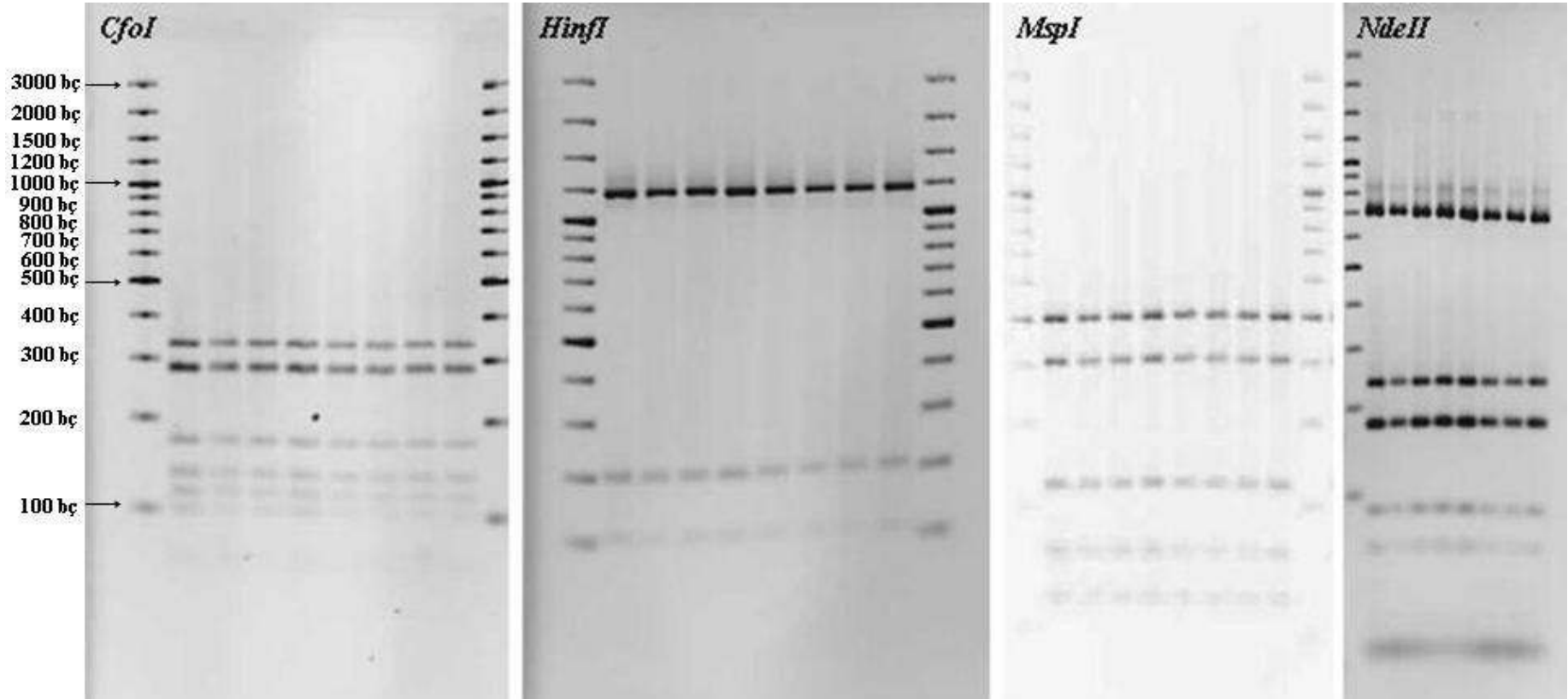
Çizelge 3.1'de belirtilen lokalitelerden toplanan fasulye bitkilerinden izole edilen 30 (Çizelge 4.1) adet kök nodül bakterisinin *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* (Laguerre ve ark., 1994) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak 16S rDNA-RFLP analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda üç farklı fenotip ortaya çıkmıştır. İzolatların tümü *CfoI* ve *MspI* enzimleri ile kesildiğinde aynı şablonu ortaya koymuştur. İzolatlar *CfoI* restriksiyon enzimi ile kesildiklerinde birer tane yaklaşık 340 bç, 190 bç, 150 bç, 130 bç ve 100 bç'lik ikişer tane de yaklaşık 280 bç'lik toplam 7 bant, *MspI* ile kesildiklerinde ise birer tane yaklaşık 500 bç, 400 bç, 220 bç, 160 bç ve 120 bç'lik toplam 5 bant oluşturmuşlardır. Buna karşın *HinfI* enzimi iki farklı şablon ortaya koymuştur. Bunların ilkinde (*HinfI* Şablon A), Samsun izolatlarından CTG-409, CTG-410, CTG-411 ve CTG-412, Sinop fasulye izolatlarının tamamı ve Amasya fasulye izolatlarından CTG-429 ve CTG-430 *HinfI* ile kesildiğinde yaklaşık 1200 ve 200 bç'lik iki bant oluşmuştur. Diğer izolatlar ise (*HinfI* Şablon B) yaklaşık 1100, 200 ve 100 bç büyüklüğünde 3 bant oluşturmuşlardır (Şekil 4.13).

Benzer Şekilde *NdeII* enzimi ile yapılan analiz sonucunda da iki farklı şablon oluşmuştur (*NdeII* Şablon A ve *NdeII* Şablon B). Sinop fasulye izolatlarının tamamı, Samsun izolatlarından CTG-409, CTG-410, CTG-411, CTG-412 ve Amasya fasulye izolatlarından CTG-429 ve CTG-430 *NdeII* Şablon A'yı göstermişlerdir. Bu şablonda izolatlar bir tane yaklaşık 700 bç, iki tane yaklaşık 190 bç ve birer tane de 90 ve 80 bç'lik toplam 5 bant oluşturmuşlardır. Buna karşın geriye kalan fasulye izolatlarının oluşturdukları *NdeII* Şablon B'de ise izolatlar, birer tane yaklaşık 700 bç, 230 bç, 190 bç, 90 bç ve 80 bç'lik toplam 5 bant oluşturmuşlardır.

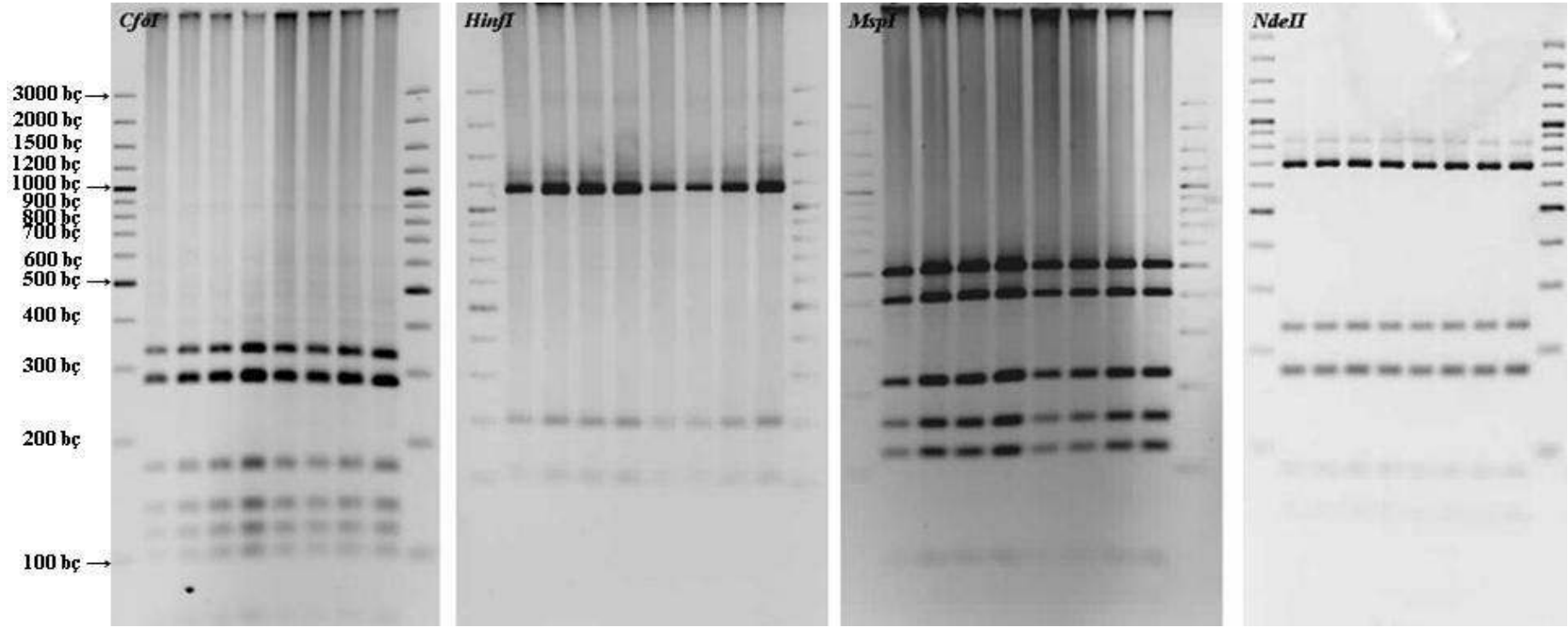
Laguerre ve ark. (1994)'nın önerdiği enzim seti *R. etli* ve son yıllarda tanımlanan *R. phaseoli* türlerini ayırmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada fasulye'den izole edilen ve bakla ve bezelye'den izole edilen Rhizobiyal izolatların (*Rhizobium leguminosarum*) gösterdiği 16S rDNA-RFLP şablonundan farklı bir şablon gösteren izolatlar (CTG-409, -410, -411, -412, -417, -418, -419, -420, -421, -422, -423, -424, -429, -430) *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII*'ye ek olarak *PstI* enzimi ile de kesilmişlerdir. Tip suşlar ve veri tabanından indirilen izolatlar ile yapılan teorik 16S rDNA-RFLP analizinde bu enzimin bu iki türü ayırabildiği belirlenmiştir.

Enzim, *R. etli* 16S rDNA hapotipini kesmezken *R. phaseoli*'yi tek noktada keserek yaklaşık 570 bp ve 930 bp'lik iki bant oluşturmaktadır. Sonuçta *PstI* ile kesildiklerinde CTG-409, -410, -411, -412, -418, -419 izolatlarının *R. phaseoli*; CTG-417, -420, -421, -422, -423, -424, -429, -430 izolatlarının ise *R. etli*'ye benzer 16S rDNA-RFLP şablonu verdiği belirlenmiştir.

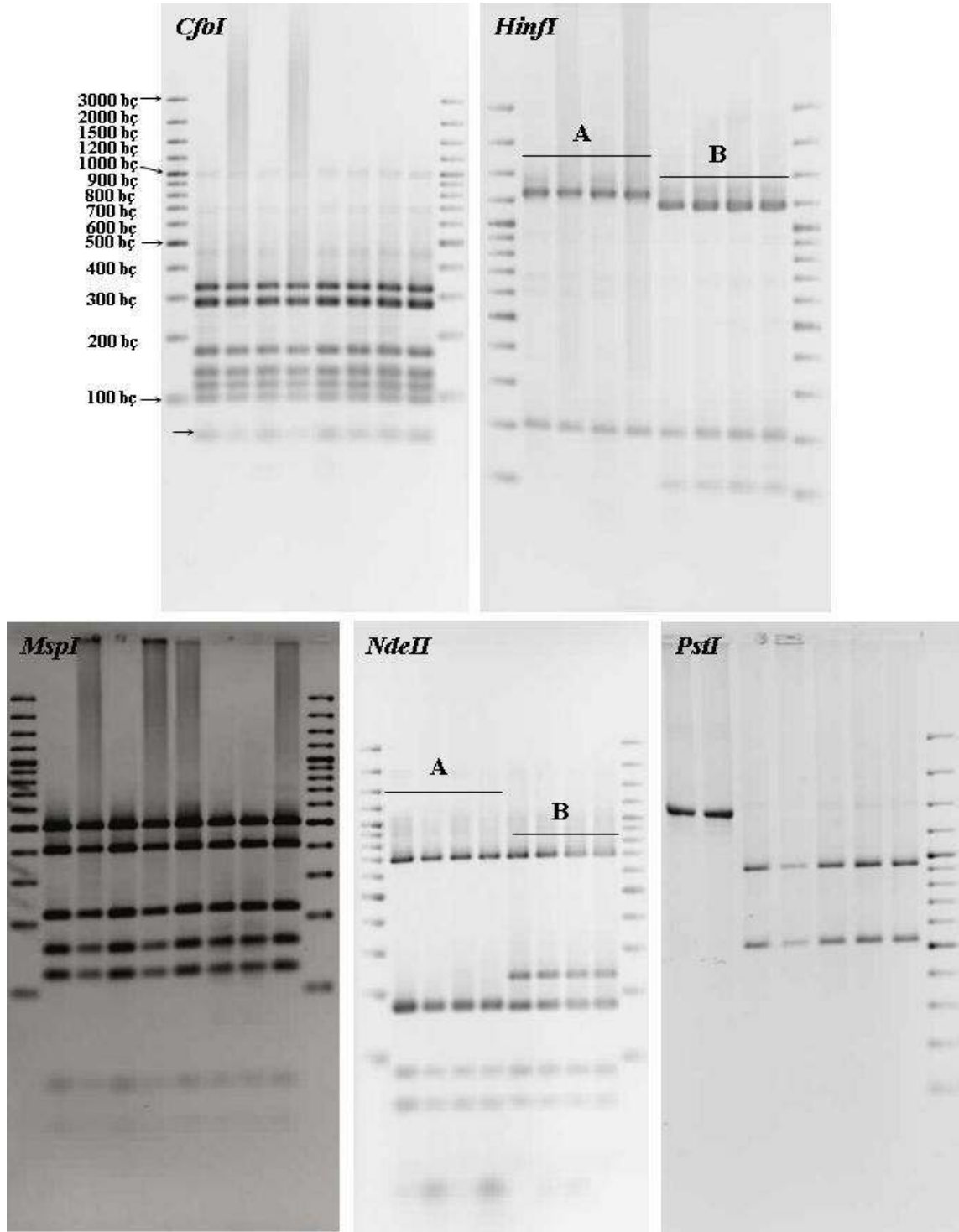
Sonuçta her ilden, farklı lokaliteleri ve elde edilen bu üç farklı şablonu temsilen birer örnek 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* DNA dizilemesi için seçilmiştir. Bu izolatlar, Samsun'dan CTG-412 (Çarşamba) ve CTG-416 (Vezirköprü), Ordu'dan CTG-403 (Ünye) ve CTG-407 (Gölköy), Sinop'tan CTG-419 (Gerze) ve CTG-423 (Durağan) ve Amasya'dan CTG-427 (Merzifon) ve CTG-430 (Göynücek)'dir.



Şekil 4.11 Sinop ve ilçelerinden toplanan bezelye bitkilerinden izole edilen kök nodül bakterileri (CTG-78, -76, -73, -74, -209, -210, -109, -114) için sırasıyla *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilen 16S rDNA RFLP şablonları



Şekil 4.12 Ordu ve ilçelerinden toplanan bakla bitkilerinden izole edilen kök nodül bakterileri (CTG-2, -23, -29, -17, -12, -6, -307, -308) için sırasıyla *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilen 16S rDNA RFLP şablonları



Şekil 4.13 Samsun ve ilçelerinden toplanan fasulye bitkilerinden izole edilen kök nodül bakterileri (CTG-409, -410, -411, -412, -413, -414, -415, -416) için sırasıyla *CfoI*, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilen RFLP şablonları ve Sinop'tan Fasulye nodüllerinde izole edilen kök nodül bakterileri (CTG-418, -419, -420, -421, -422, -423, -424) için *PstI* restriksiyon enzimi kullanılarak elde edilen RFLP şablonu

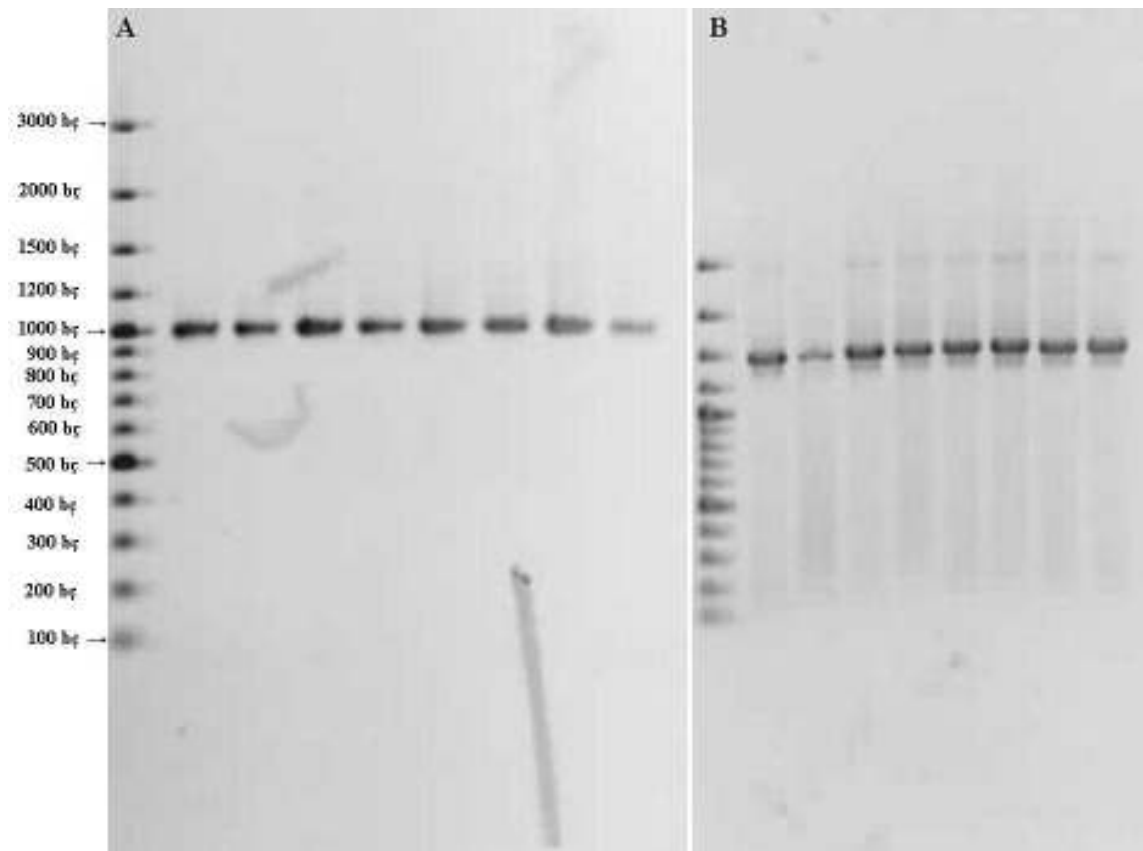
Çizelge 4.4’de 16S rDNA RFLP analizleri sonucunda bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinden izole edilen Rhizobiyal izolatlarından, 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* DNA dizilemesi için seçilen temsilci izolatlar görülmektedir. Bu temsilci izolatların seçilmesinde 16S rDNA RFLP şablonlarına ek olarak izolatların elde edildiği bitki örneklerinin toplandıkları lokalitelerde göz önünde tutulmuştur.

Çizelge 4.4 16S rDNA, *recA*, *nodA* ve *nifH* DNA dizilemeleri için seçilen Rhizobia izolatları

FASULYE (<i>P. vulgaris</i> L.)	BAKLA (<i>V. faba</i> L.)	BEZELYE (<i>P. sativum</i> L.)
CTG-403 Ordu, Ünye	CTG-23 Ordu, Fatsa-Bolaman	CTG-1 Ordu, Merkez
CTG-407 Ordu, Gölköy	CTG-35 Samsun, Merkez	CTG-13 Ordu, Çayıralan
CTG-412 Samsun, Çarşamba	CTG-40 Samsun, Vezirköprü	CTG-74 Sinop, Ayancık
CTG-416 Samsun, Vezirköprü	CTG-59 Sinop, Boyabat	CTG-110 Samsun, Kavak
CTG-419 Sinop, Gerze	CTG-68 Sinop, Erfelek	CTG-114 Sinop, Çöve
CTG-423 Sinop, Durağan	CTG-301 Amasya, G. Hacıköy	CTG-202 Samsun, Alaçam- Yakakent
CTG-427 Amasya, Merzifon	CTG-303 Amasya, Taşova	CTG-203 Amasya, Gümüşhacıköy
CTG-430 Amasya, Göynücek	CTG-308 Ordu, Mesudiye	CTG-205 Amasya, Merkez

4.3.5 16S rDNA Dizileme Analizleri

Bakla, bezelye ve fasulye kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* örneklerinden 16S rDNA-RFLP analizleri sonucunda seçilen toplam 24 izolatın (Çizelge 4.4) 16S rDNA dizilemeleri için RZR amplifikasyonları bölüm 3.4.5’de belirtildiği gibi fD1(pA’)/pF’ ve fD1(pA’)/rD1 primer çiftleri kullanılarak yapılmış ve sonuçta izolatların tümünden sırasıyla yaklaşık 1000 bç ve 1500 bç’lik tek bir bant elde edilmiştir (Şekil 4.14A-B). İzolatların 16S rDNA dizilemeleri yine aynı primer çiftleri kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.14 DNA dizileme için seçilen bezelye *Rhizobium* izolatlarından **A)** fD1(pA’)/pF’ ve **B)** fD1(pA’)/rD1 primer çiftleri kullanılarak yapılan 16S rDNA amplifikasyon ürünleri, (soldan sağa: Fermentas, GeneRuler, 100 bç Plus DNA Ladder, CTG-1, -13, -74, -110, -114, -202, -203, -205)

Elde edilen diziler birleştirilerek 16S rDNA’ya ait ortalama 1250 bç’lik bölgenin DNA dizisi belirlenmiştir. Bu diziler Çizelge 3.1’de belirtilen, *Rhizobiyal* türlere ait tip örneklerin ve farklı lokalitelerden izole edilmiş Bakla, Bezelye ve Fasulye kök nodül bakterilerinin 16S rDNA gen dizileri ile hizalanmış ve toplam 1220 bç’lik hizalanmış bir bölge üzerinden filogenetik analizler yürütülmüştür. Elde edilen veri setine en uygun baz değişim modelini belirlemek üzere jModelTest v.0.1 (Postada, 2008) programı

kullanılarak Akaike Information Criterion (AIC) ve Basian Information Criterion (BIC) analizleri yapılmıştır. Bu analizler, veri setine dış grup (*Ensifer kummerowiae*) eklenerek ve eklenmeden ikişer kez yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen baz değişim modelleri, I (frequency of invariable sites) ve G (Gamma Correction) değerleri Çizelge 4.5’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 16S rDNA veri seti için yapılan AIC ve BIC testlerinin sonuçları

Dış Grup Dahil			Dış Grup Hariç		
	AIC	BIC		AIC	BIC
Model	TIM2	HKY	Model	TPM2uf	HKY
I	0.798	0.871	I	0.796	0.873
G	0.966	-	G	1.035	-

16S rDNA haplotipleri arasındaki ilişkileri ortaya koymak üzere, PAUP v 4.0b10 kullanılarak Çizelge 4.5’de belirtilen baz değişim modelleri ile uzaklık analizi yapılmış ve Neighbor-joining (NJ) ağaçları oluşturulmuştur. Elde edilen ağaçların istatistiksel güvenilirliklerinin belirlenmesi için yine aynı program ile 10 000 tekrarlı Bootstrap analizleri de yapılmıştır. Şekil 4.15’de, oluşturulan ağaçlardan en yüksek Bootstrap değerini gösteren HKY+I (Dış Grup Dahil) baz değişim modeline göre çizilmiş NJ ağacı görülmektedir.

Filogenetik ilişkilerin belirlenebilmesi için NJ analizlerine ek olarak Maksimum-Likelihood (ML) algoritması da kullanılmıştır. Çizelge 4.5’de belirtilen baz değişim modelleri kullanılarak dört farklı ML ağacı oluşturulmuş ve her ağaç için 1000 tekerrürlü Bootstrap analizi yapılmıştır. Şekil 4.16’da bu ağaçlardan genel olarak en yüksek Bootstrap değerini gösteren HKY+I (Dış Grup Dahil) modeli ile çizilen ML ağacı görülmektedir.

Haplotipler arasındaki ilişkileri göstermek için diğer bir algoritma olarak Maksimum-Parsimony (MP) analizi de kullanılmıştır. Analizlerde, hizalaması yapılan 1220 karakterden 1115 tanesinin izolatlar arasında korunmuş olduğu ve varyasyon gösteren karakterlerden de 45 tanesinin Parsimony analizinde kullanılabilir olmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla MP analizleri 60 karakter üzerinden yürütülmüştür. Analizler sonucunda uzunlukları 158, Consistency indeksleri (CI) 0.759494, Retention indeksleri (RI) 0.869863, Homoplasy indeksleri (HI) 0.240506 olan 126 ağaç elde edilmiştir. Bu ağaçların strict (Şekil 4.17) ve %50 majority rule (Şekil 4.18) konsensüs ağaçları oluşturulmuştur. Elde edilen MP ağacının istatistiksel olarak güvenilirliğini belirlemek

için 1000 tekerrürlü olarak Bootstrap analizi yapılmış ve ağaç üzerinde % 50'nin üzerinde desteklenen düğümler için Bootstrap değerleri belirtilmiştir.

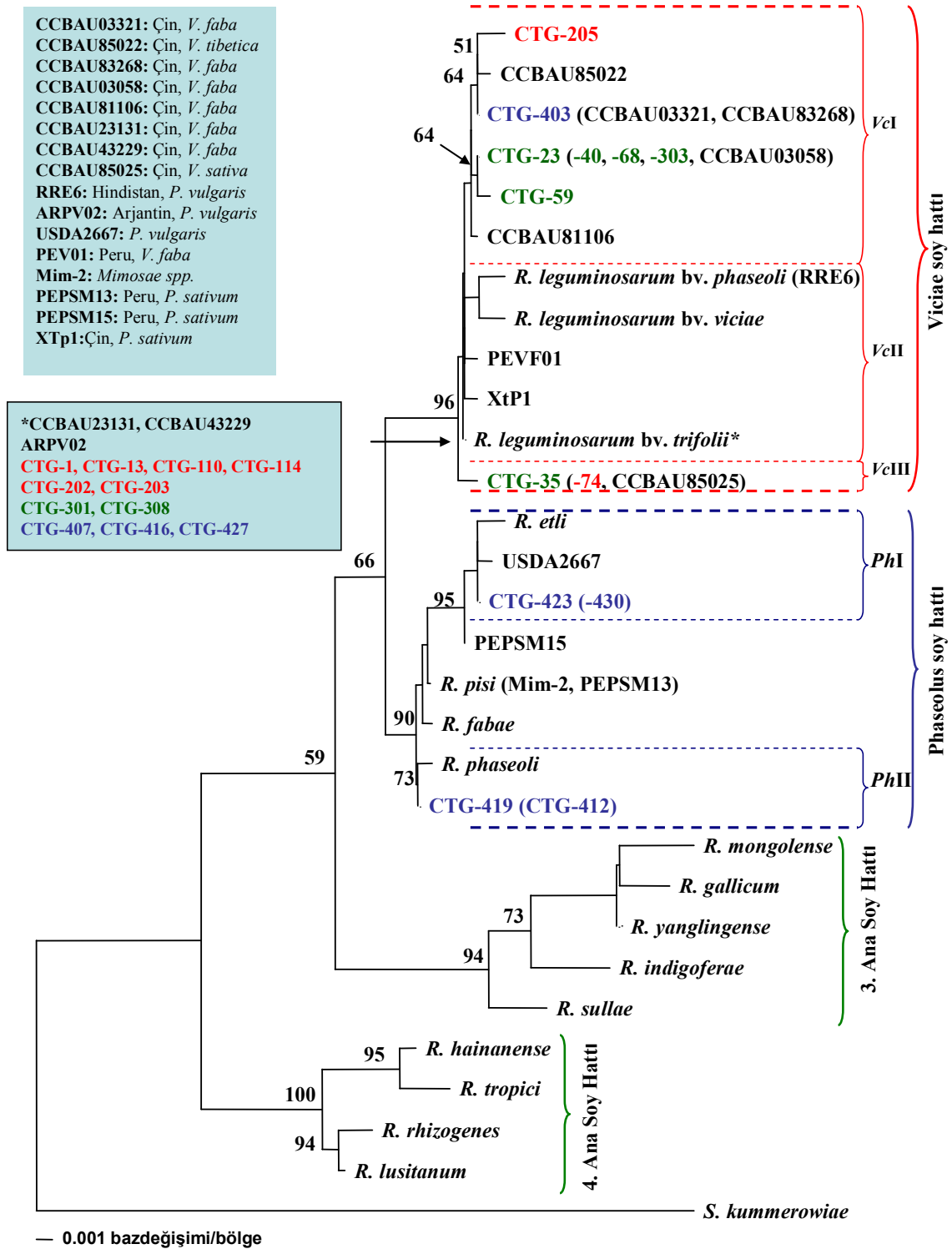
16S rDNA baz dizileri kullanılarak, NJ (Şekil 4.15), ML (Şekil 4.16) ve MP (Şekil 4.17-18) algoritmalarına göre oluşturulan filogenetik ağaçlarda dört ana soy hattı belirlenmiştir. Bu çalışmada bakla, bezelye ve fasulye'den izole edilen Rhizobiyal izolatlar bu ana soy hatlarından iki tanesinde yer almıştır. Bakla'dan ve bezelye'den izole edilen bakterilerin yer aldığı soy hattı, bu bitkilerin Viciae kabilesinde yer almasına atfen **“Viciae ana soy hattı”**, fasulye'den izole edilen izolatların yer aldığı soy hattı da yine aynı sebepten **“Phaseolus ana soy hattı”** olarak isimlendirilmiştir.

Bakla ve bezelye'den izole edilen Rhizobiyal izolatların tümü *R. leguminosarum* (bv. *viciae*, bv. *trifolii* ve bv. *phaseoli*) izolatları ile ilişkili bulunmuş ve bu izolatlar ile birlikte Viciae ana soy hattını oluşturmuşlardır. NJ ve ML ağaçlarında Viciae soy hattı içerisinde üç farklı alt grup belirlenmiş, buna karşın MP analizi bu ayrımı tam olarak desteklememiştir (Şekil 4.17). Bu alt gruplardan birincisini (*VcI*): bakla'dan izole edilen CTG-23, CTG-59, CTG-68, CTG-303, bezelye'den izole edilen CTG-205, fasulye'den izole edilen CTG-403 izolatları ile Çin'den *Vicia* türlerinden izole edilmiş CCBAU85022 (*V. tibetica*), CCBAU03321 (*V. faba*), CCBAU83268 (*V. faba*), CCBAU81106 (*V. faba*) ve CCBAU03058 (*V. faba*) izolatları oluşturmuştur. Bu alt grupta sadece Türkiye ve Çin kökenli ve ağırlıklı olarak *Vicia* türlerinden izole edilmiş izolatlar bulunmaktadır, dolayısıyla konukçu ve lokalite açısından oldukça homojen bir alt gruptur. Buna karşın ikinci alt grubu (*VcII*) ise bezelye'den izole edilen CTG-1, CTG-13, CTG-110, CTG-114, CTG-202, CTG-203, fasulye'den izole edilen CTG-407, CTG-416, CTG-427 ve bakla'dan izole edilen CTG-301, CTG-308 izolatları ile *R. leguminosarum* tip suşu olan USDA 2370 (A.B.D, *P. sativum*), RRE6 (Hindistan, *P. vulgaris*), ARPV02 (Arjantin, *P. vulgaris*), USDA 2671 (ABD, *P. vulgaris*), XtP1 (Çin, *P. sativum*), CCBAU43229 (Çin, *V. faba*), CCBAU23131 (Çin, *V. faba*), ATCC 14480 (ABD, *Trifolium spp.*) ve PEVF01 (Peru, *V. faba*) izolatları oluşturmaktadır. Dolayısıyla *VcII* alt grubu gerek lokalite gerekse de konukçu açısından daha heterojen bir yapı oluşturmuştur. Alt grup *VcI* ve *VcII*'nin ayrımları ML ağaçında %83'lük Bootstrap değeri ile desteklenmiştir. Üçüncü alt grupta ise (*VcIII*), bakla'dan izole edilen CTG-35 ve bezelye'den izole edilen CTG-74 izolatları ile Çin'den *V. sativa*'dan izole edilen CCBAU85025 (Çin, *V. sativa*) izolatu bulunmaktadır. Bu alt grup, *VcI* ve *VcII* alt gruplarına oranla daha atasal bir karakter göstermiş ve bu gruplardan NJ

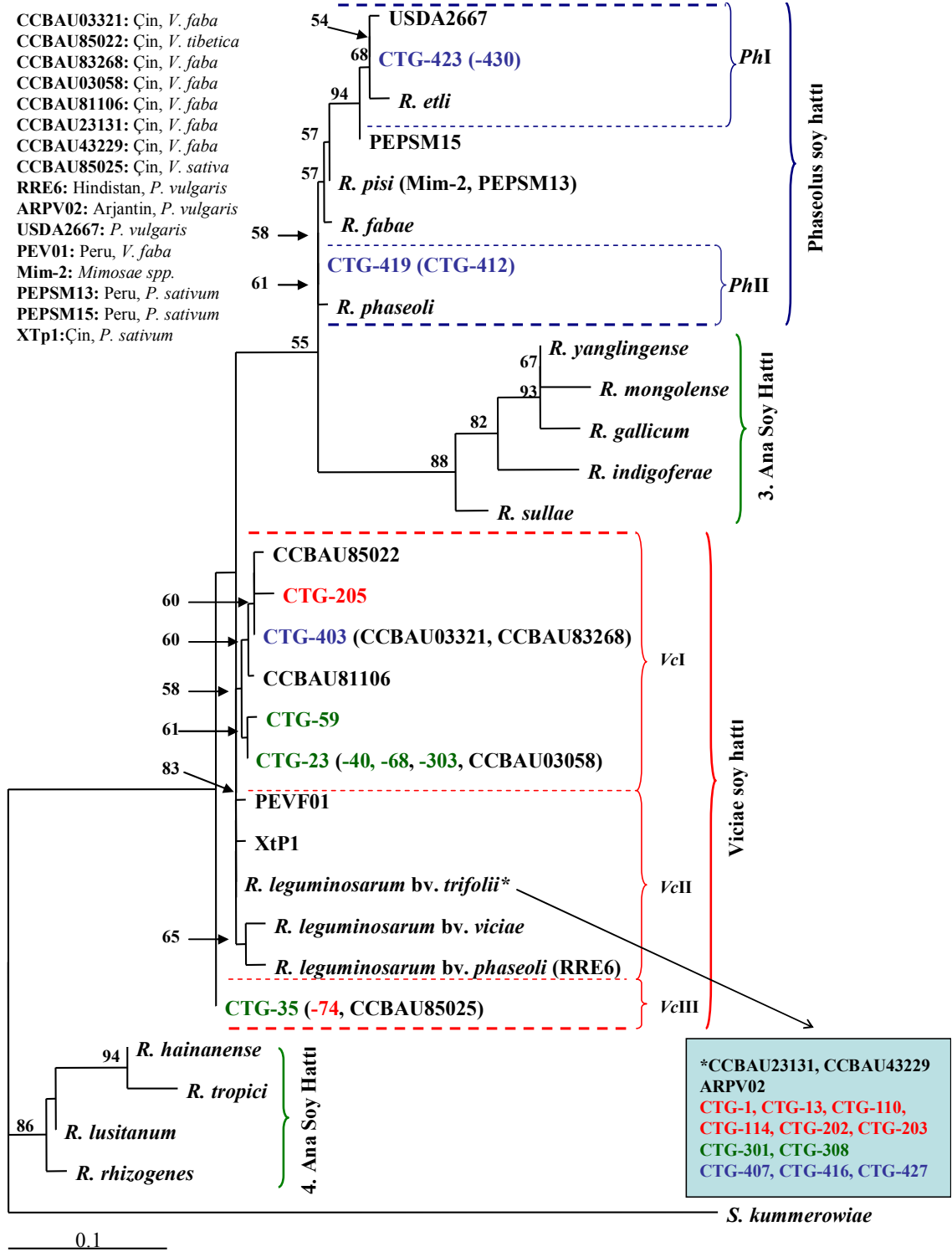
ağacında % 96'lık Bootstrap değeri ile ayrılmıştır. MP analizlerinde strict konsensüs ağacı NJ ve ML analizlerinde gözlenen bu ayrımı desteklememiştir. Buna karşın %50 Majority Rule Konsensüs ağacında ise *VcI* alt grubu bu ana soy hattındaki izolatlardan ayrılmış fakat diğer analizlerde *VcII* alt grubu içerisinde yer alan USDA 2671 ve USDA 2370 izolatları da bu alt grup içerisinde çıkmıştır. Dolayısıyla *VcI* alt grubu %50 Majority Rule Konsensüs ağacında da büyük oranda desteklenmiş buna karşın alt gruplar *VcII* ve *VcIII*'ün ayrımı gözlenmemiştir.

Phaseolus ana soy hattı ise *R. etli*, *R. pisi*, *R. fabae* ve *R. phaseoli* tip suşları ile bu türler ile ilişkili izolatlardan oluşmuştur. Bu çalışmada izole edilen örnekler Phaseolus ana soy hattı içerisinde iki alt grupta toplanmıştır (*PhI* ve *PhII*). Fasulye'den izole edilen CTG-423 ve CTG-430 izolatları ABD'den *P. vulgaris*'den izole edilmiş USDA 2667 ve *R. etli* tip suşu olan CFN42 ile birlikte *PhI* alt grubunu oluşturmuşlardır. Bu alt grup Phaseolus ana soy hattındaki diğer izolatlardan NJ ve ML ağaçlarında sırasıyla %95 ve %94'lük Bootstrap değerleri ile ayrılmıştır. Buna karşın yine fasulye'den izole edilen CTG-412 ve CTG-419 izolatları *R. phaseoli* tip suşu (ATCC 14482) ile benzerlik göstererek ayrı bir alt grup oluşturmuşlardır (*PhII*). Bu alt grubun Phaseolus ana soy hattındaki diğer izolatlardan ayrımı NJ ve ML ağaçlarında sırasıyla %90 ve %58'lik Bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. Bununla birlikte *PhII* alt grubu %50 majority Rule Konsensüs MP ağacında 3. ana soy hattı ile yakın ilişkili olarak bulunmuştur.

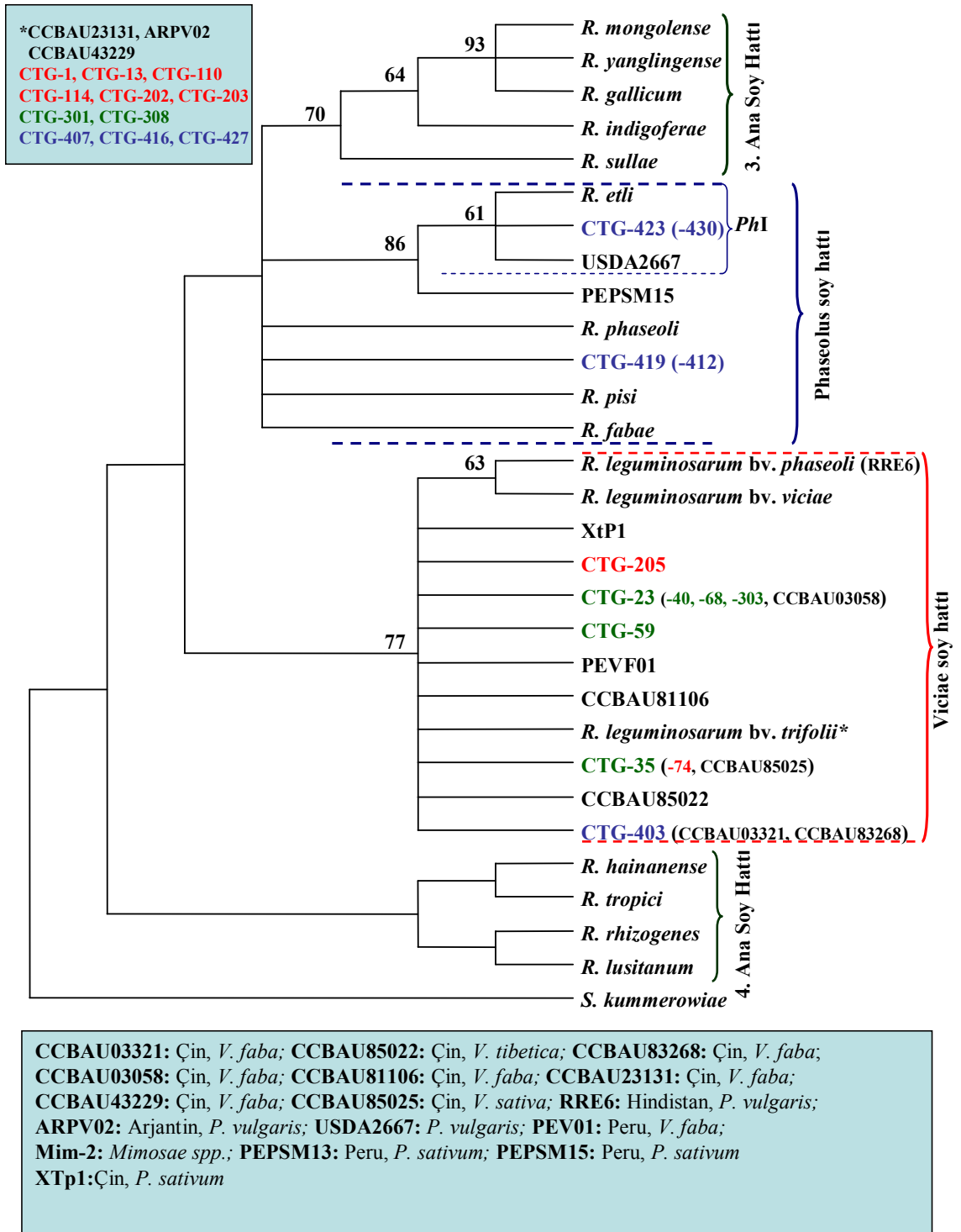
Ağaçlardaki 3. ana soy hattını *R. mongolense*, *R. yanglingense*, *R. gallicum*, *R. indigoferae* ve *R. sullae* tip suşları, 4. ana soy hattını ise *R. hainanense*, *R. tropici*, *R. rhizogenes* ve *R. lusitanum* tip suşları oluşturmuştur. Bu dört ana soy hattı, oluşturulan dört ağaçta da gözlenmiştir. NJ ağacında *Viciae* (*R. leguminosarum*) ve Phaseolus ana soy hatları (*R. etli*, *R. pisi*, *R. fabae*, *R. phaseoli* türleri) diğer soy hatlarına oranla daha yakın ilişkili (monofiletik) olarak belirlenmiş (%66 Bootstrap) buna karşın MP ve ML ağaçlarında ise Phaseolus ana soy hattı 3. ana soy hattı ile yakın ilişkili olarak belirlenmiş, *Viciae* ana soy hattı ise bu iki soy hattı ile ilişkili olarak görülmüştür (% 58 Bootstrap). Ağaçlar arasındaki bu topolojik farklılıklar algoritmalarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.



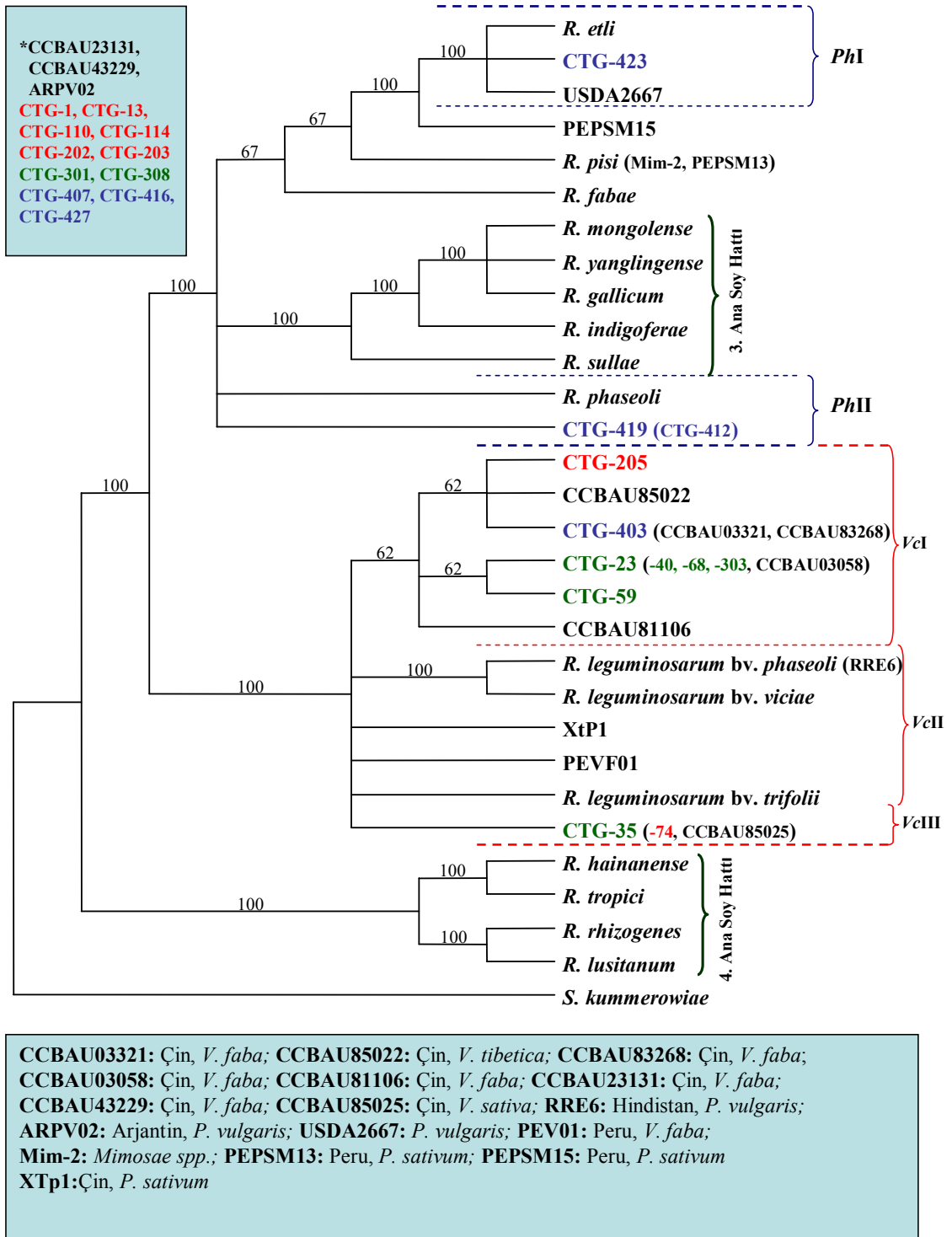
Şekil 4.15 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve veri tabanından indirilen baklagil simbiyontlarının (Çizelge 3.4) kısmi 16S rDNA dizilerine bağlı filogenetik ilişkilerini gösteren ağaç. Bu ağaç HKY+I (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak Neighbor-Joining algoritmasına göre çizilmiş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



Şekil 4.16 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve veri tabanından indirilen baklagil simbiyontlarının (Çizelge 3.4) kısmi 16S rDNA dizilerine bağlı filogenetik ilişkilerini gösteren ağaç. Bu ağaç HKY+I (Dış Grup Dahil) baz değişim modeli kullanılarak Maksimum-Likelihood algoritmasına göre çizilmiş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



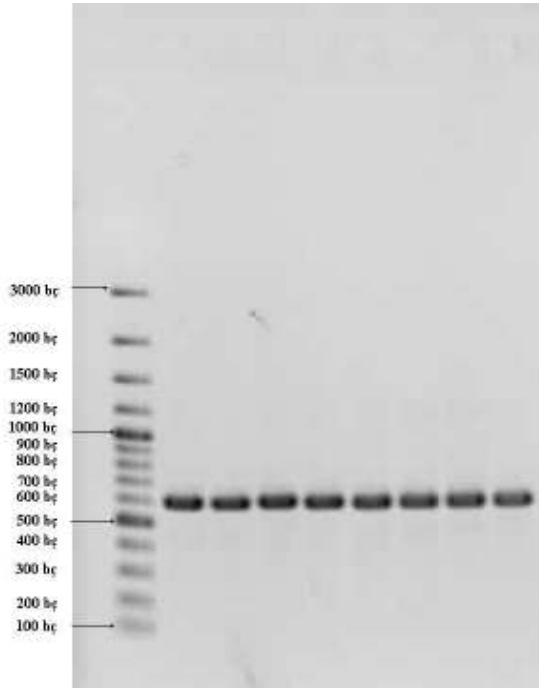
Şekil 4.17 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.4’de belirtilen 16S rDNA haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizi sonucu oluşturulan eşit uzunluktaki 126 ağacın strict konsensüs ağacı. Bu ağaç üzerinde sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



Şekil 4.18 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.4’de belirtilen 16S rDNA haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizi sonucu oluşturulan eşit uzunluktaki 126 ağacın %50 Majority Rule konsensüs ağacı. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir

4.3.6 *recA* Geni için DNA Dizileme Analizleri

DNA dizileme için seçilen toplam 24 Rhizobia izolatının (Çizelge 4.4) *recA* genlerinin RZR amplifikasyonları bölüm 3.4.6’da belirtildiği gibi *recA*-Forward / *recA*-Reverse primer çifti kullanılarak yapılmış ve sonuçta izolatların tümünden yaklaşık 600 bp büyüklüğünde tek bir ürün elde edilmiştir (Şekil 4.19). Elde edilen ürünlerin DNA dizilemeleri yine *recA*-Forward / *recA*-Reverse primer çifti kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 4.19 DNA dizileme için seçilen bezelye izolatlarından *recA* amplifikasyon ürünleri: soldan sağa: Fermentas, GeneRuler, 100 bp Plus DNA Ladder, CTG-1, -13, -74, -110, -114, -202, -203, -205

Seçilen Rhizobia izolatlarına ait *recA* dizileri, Çizelge 3.5’de belirtilen Rhizobium örneklerine ait *recA* gen dizileri ile hizalanmış ve indel bölgeleri uzaklaştırılmıştır. Sonuçta toplam 415 bp’lik hizalanmış bir bölge üzerinden filogenetik analizler yürütülmüştür. Elde edilen veri setine en uygun baz değişim modelini belirlemek üzere Akaike Information Criterion (AIC) ve Basian Information Criterion (BIC) analizleri yapılmıştır. Bu analizler, veri setine dış grup (*Ensifer fredii*) eklenerek ve eklenmeden ikişer kez yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen baz değişim modelleri, I ve G değerleri Çizelge 4.6’da gösterilmektedir.

Oluşturulan *recA* veri setinin Neighbor-Joining (NJ) analizleri PAUP v. 4.0b10 kullanılarak, yukarıda belirtilen baz değişim modellerinin tümü için ayrı ayrı yapılmıştır. Oluşturulan ağaçların istatistiksel olarak güvenilirliklerini test etmek için

yine aynı program ile 10 000 tekrarlı Bootstrap analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda HKY+I+G (Dış Grup Dahil) modeli ile oluşturulan NJ ağacının en yüksek Bootstrap değerlerini verdiği belirlenmiş ve bu çalışmada gösterilmiştir (Şekil 4.20).

Çizelge 4.6 *recA* veri seti için yapılan AIC ve BIC testlerinin sonuçları

Dış Grup Dahil			Dış Grup Hariç		
	AIC	BIC		AIC	BIC
Model	HKY	HKY	Model	GTR	HKY
I	0.625	0.625	I	0.645	0.651
G	1.603	1.603	G	2.224	2.133

RecA haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkilerin ortaya konması için NJ'ye ek olarak Maksimum-Likelihood (ML) analizleride yapılmıştır. Bu analizler PHYML v. 3.0 programı ile Çizelge 4.6'da belirtilen baz değişim modelleri kullanılarak yapılmıştır. Aynı program kullanılarak, oluşturulan ağaçlar için 1000 tekerrürlü Bootstrap analizleri de yapılmış ve sonuçta en yüksek Bootstrap değerlerini HKY+I+G (Dış Grup Dahil) modeli ile oluşturulan ML ağacının verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.21).

RecA haplotipleri arasındaki ilişkileri göstermek için diğer bir algoritma olarak Maksimum-Parsimony (MP) analizi de kullanılmıştır. MP analizleri PAUP v. 4.0b10 kullanılarak Heuristic araştırma algoritması ile yapılmıştır. Analizlerde, hizalaması yapılan 415 karakterden 273 tanesinin haplotipler arasında varyasyon göstermediği, varyasyon gösteren karakterlerin 22 tanesinin ise parsimonik olarak bilgi içermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla MP analizleri 120 karakter üzerinden yürütülmüştür. Sonuçta, uzunlukları (493), CI (0.427992), RI (0.642586) ve HI (0.572008) değerleri eşit, en kısa 1461 ağaç elde edilmiştir. Aynı program kullanılarak bu ağaçların strict (Şekil 4.22) ve % 50 Majority rule (Şekil 4.23) konsensüs ağaçları oluşturulmuştur. Daha sonra oluşturulan MP ağacının istatistiksel olarak güvenilirliklerinin belirlenmesi için 1000 tekerrürlü olarak Bootstrap analizi yapılmıştır.

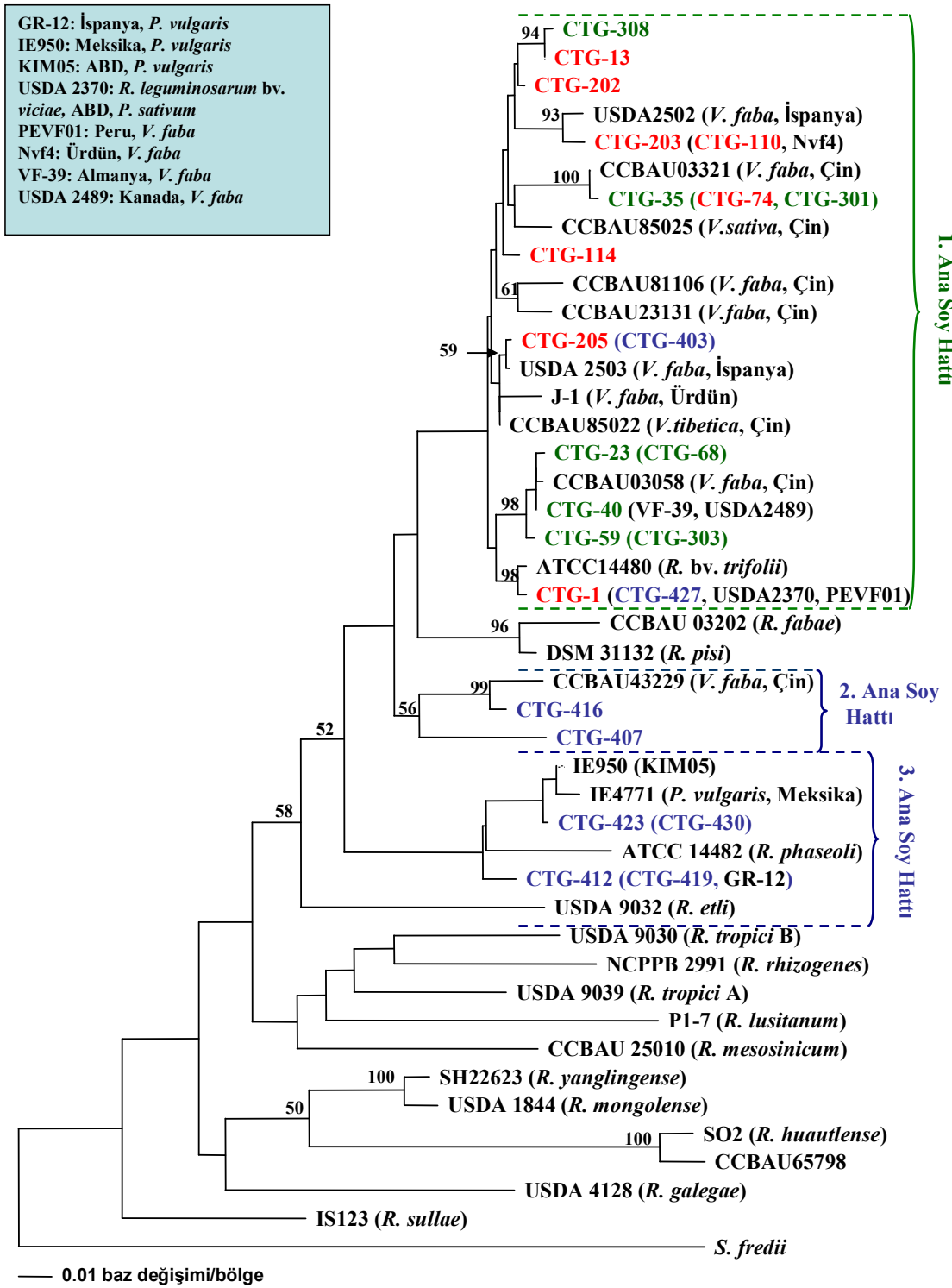
Oluşturulan dört ağaçta da görülebileceği gibi, bu çalışmada izole edilen *Rhizobia* örnekleri *recA* haplotipleri açısından temel olarak üç ana soy hattına ayrılmışlardır. Bu soy hatlarından birincisini (1. Ana Soy Hattı) *R. leguminosarum* (bv. *viciae*^T, bv. *trifolii*) *recA* haplotipine yakın, fasulye, bakla ve bezelye'den izole edilmiş *Rhizobium* izolatları oluşturmuştur. Bu çalışmada bakla'dan izole edilen CTG-23, CTG-40, CTG-59, CTG-68, CTG-303 izolatları ile Çin'den bakla'dan izole edilmiş CCBAU03058, Almanya'dan bakla'dan izole edilmiş VF39 ve Kanada'dan bakla'dan

izole edilmiş USDA2489, her üç algoritmayla oluşturulan ağaçta da monofiletik bir grup oluşturmuş ve 1. ana soy hattı içerisinde diğer bakla ve bezelye izolatlarından net bir şekilde ayrılmışlardır. Bu alt grup yalnızca bakla izolatları içermesi nedeniyle konukçu çeşidi açısından homojen bir yapı göstermiştir.

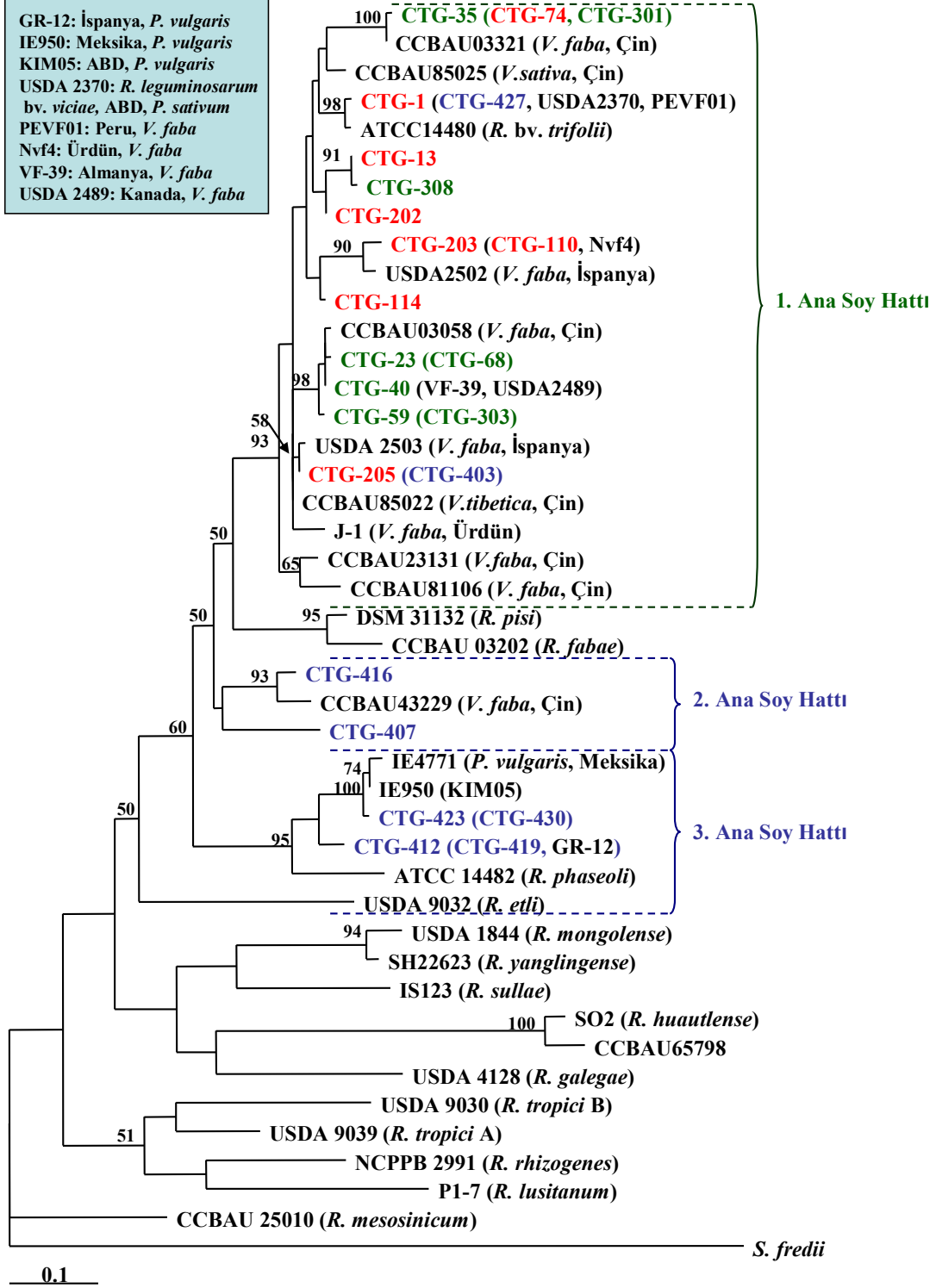
Bu alt gruba ek olarak, oluşturulan her dört filogenetik ağaçta da; bakla'dan izole edilen CTG-308 izolatu bezelye'den izole edilen CTG-13 ve CTG-202 ile; bezelye'den izole edilen CTG-110 ve CTG-203, Nvf-4 (Ürdün, *V. faba*) ve USDA 2502 (İspanya, *V. faba*) izolatları ile; bakla'dan izole edilen CTG-35, CTG-301 ve bezelye'den izole edilen CTG-74, CCBAU03321 (Çin, *V. faba*) ve CCBAU85025 (Çin, *V. sativa*) izolatları ile; bezelye'den izole edilen CTG-205 ve fasulye'den izole edilen CTG-403, USDA 2503 (İspanya, *V. faba*), J-1 (Ürdün, *V. faba*) ve CCBAU85022 (Çin, *V. tibetica*) izolatları ile; bezelye'den izole edilen CTG-1 ve fasulye'den izole edilen CTG-427 ise ATCC 14480 (ABD, *Trifolium pratense*), USDA 2370 (ABD, *P. sativum*), PEVF01 (Peru, *V. faba*) izolatları ile yakın ilişkili bulunmuştur. Birinci ana soy hattı içerisinde oluşan bu alt gruplar her dört ağaçta da gözlenmiştir. Buna karşın bu alt grupların bir birleri ile olan ilişkileri kullanılan algoritmaya bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Ayrıca bu alt gruplar arasındaki ayrımlar çok düşük Bootstrap değerleri (< %5) ile desteklenmiştir. Genel anlamda bu ana soy hattı içerisindeki *recA* haplotipleri arasında, bakla'dan izole edilen CTG-23, CTG-40, CTG-59, CTG-68, CTG-303, CTG-304, CCBAU03058, VF39, USDA2489 izolatlarının oluşturduğu alt grup dışındaki alt gruplarda konukçu ve lokaliteye bağlı anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

İkinci temel soy hattını fasulye'den izole edilen CTG-407, CTG-416 ve CCBAU43229 (Çin, *V. faba*) izolatları oluşturmuştur. Bu izolatlar oluşturulan dört filogenetik ağaçta da bilinen Rhizobiyal türlere ait *recA* haplotiplerinden tamamen farklı, bağımsız, yeni bir *recA* soy hattı oluşturmuşlardır (Şekil 4.19-20). Bununla birlikte MP analizinde (strict konsensüs ve %50 majority rule konsensüs) CTG-407, CTG-416 ve CCBAU43229'dan bağımsız ayrı bir soy hattı oluşturmuştur (Şekil 4.20).

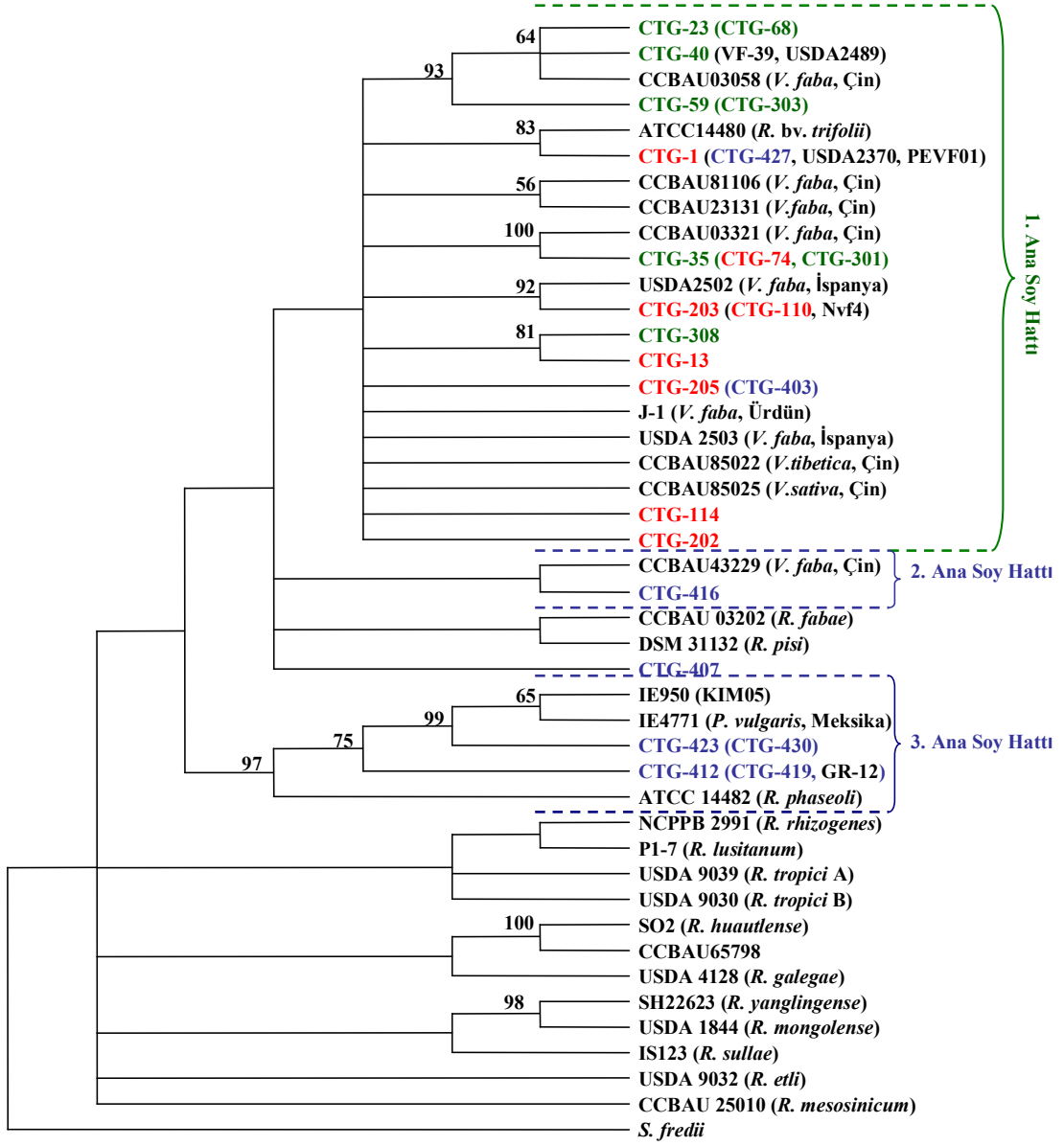
Üçüncü ana soy hattını ise fasulye'den izole edilmiş ve *R. phaseoli* ile ilişkili *recA* haplotipine sahip, CTG-412, CTG-419, CTG-423 ve CTG-430 izolatları oluşturmuştur. Bu soy hattının diğer soy hatlarından ayrımı NJ, ML ve MP %50 majority rule konsensüs ağaçlarında sırasıyla % 52, % 60 ve % 100'lük bootstrap değeri ile desteklenmiştir.



Şekil 4.20 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.5’de belirtilen *recA* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Neighbor-Joining ağacı. Bu ağaç HKY+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



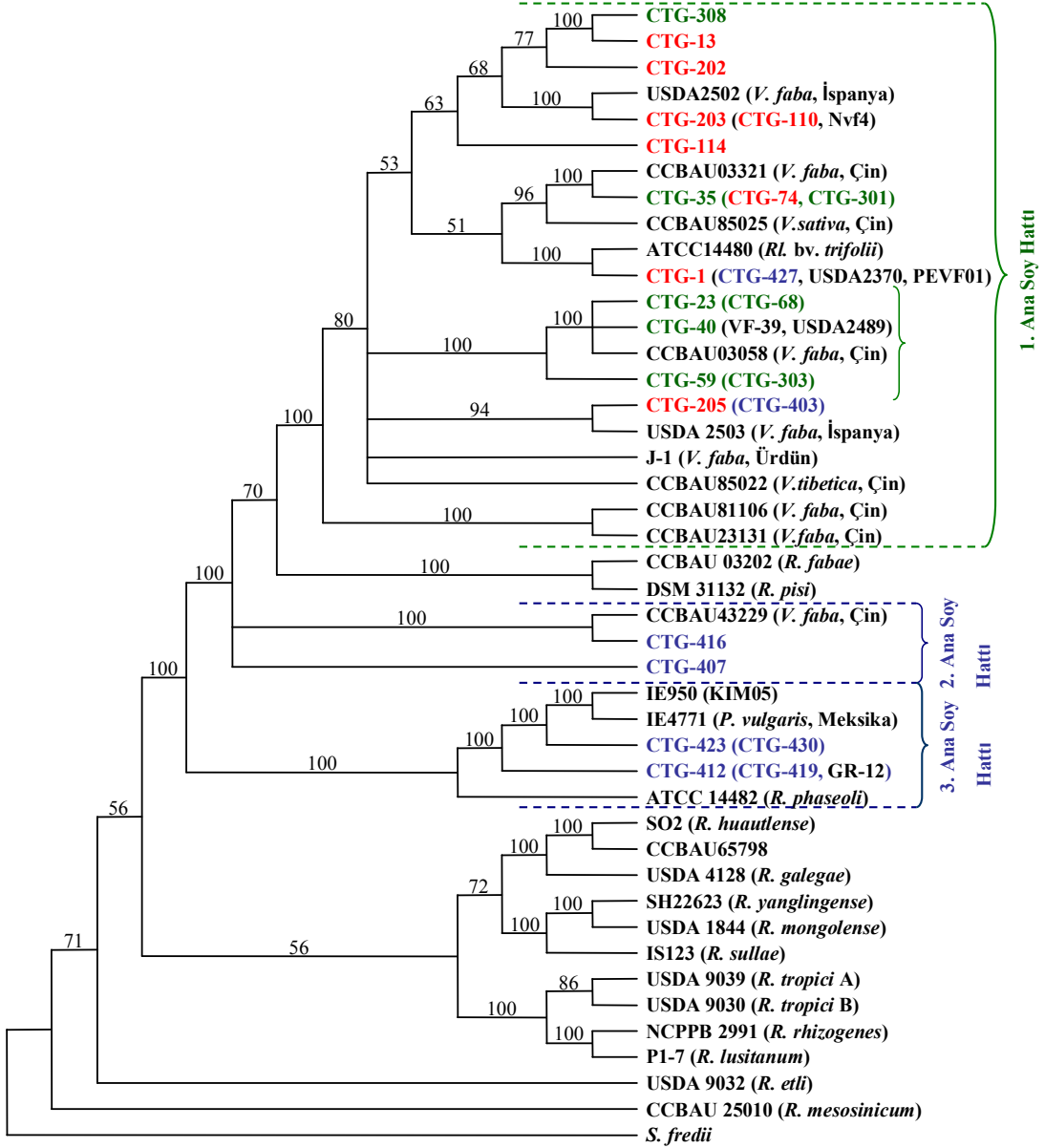
Şekil 4.21 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.5’de belirtilen *recA* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Likelihood ağacı. Bu ağaç HKY+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



GR-12: İspanya, *P. vulgaris*
 IE950: Meksika, *P. vulgaris*
 KIM05: ABD, *P. vulgaris*
 USDA 2370: *R. leguminosarum* bv. *viciae*, ABD, *P. sativum*
 PEVF01: Peru, *V. faba*
 Nvf4: Ürdün, *V. faba*
 VF-39: Almanya, *V. faba*
 USDA 2489: Kanada, *V. faba*

Şekil 4.22 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.5’de belirtilen *recA* haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizi sonucu oluşturulan eşit uzunluktaki 1461 ağacın strict konsensüs ağacı. Bu ağaç üzerinde sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir

Majority rule

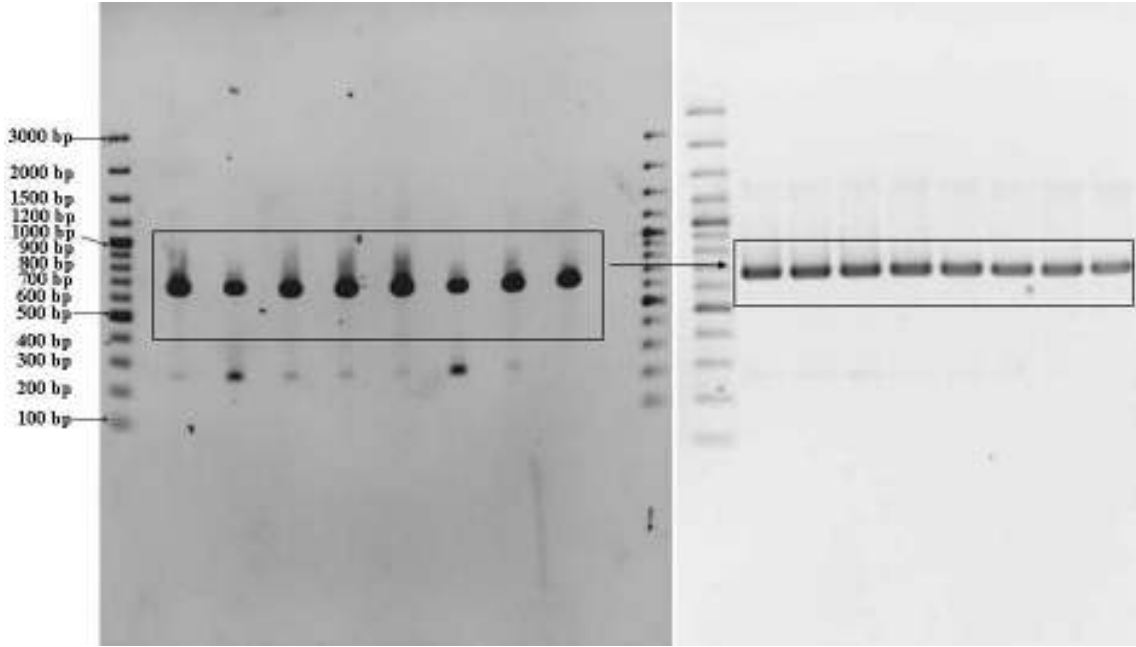


GR-12: İspanya, *P. vulgaris*
 IE950: Meksika, *P. vulgaris*
 KIM05: ABD, *P. vulgaris*
 USDA 2370: *R. leguminosarum* bv. *viciae*, ABD, *P. sativum*
 PEVF01: Peru, *V. faba*
 Nvf4: Ürdün, *V. faba*
 VF-39: Almanya, *V. faba*
 USDA 2489: Kanada, *V. faba*

Şekil 4.23 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.5’de belirtilen *recA* haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizi sonucu oluşturulan eşit uzunluktaki 1461 ağacın %50 Majority Rule konsensüs ağacı. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir

4.3.7 *nodA* DNA Dizileme Analizleri

DNA dizileme için seçilen toplam 24 *Rhizobium* izolatının *nodA* genlerinin RZR amplifikasyonları bölüm 3.4.7’de belirtildiği gibi yapılmıştır. *nodA*-1/*nodA*-2 primer çifti kullanılarak yapılan PZR amplifikasyonları sonucunda bakla ve bezelye izolatlarının tümünden yaklaşık 660 bp’lik beklenen ürün ve bunun yanında da yaklaşık 250 bp’lik özgün olmayan bir amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.21a). Bölüm 3.4.7’de açıklandığı gibi yapılan bant kesme uygulamasından sonra elde edilen ürünler 2. PZR için kalıp DNA olarak kullanılmış ve ekstra bantlar elimine edilmiştir (Şekil 4.21b).



Şekil 4.24

(a) DNA dizileme için seçilen *Rhizobium* bakla izolatlarından (CTG-23, -35, -40, -59, -68, -301, -303, -308) *nodA*1/*nodA*2 primer çifti kullanılarak yapılan *nodA* amplifikasyon ürünleri.

(b) 1. PZR amplifikasyon ürünlerinden kesilen bantların (kare içerisinde) kalıp olarak kullanıldığı 2. PZR amplifikasyonunun ürünleri. Bu ürünler DNA dizileme için kullanılmıştır

Buna karşın fasulye izolatlarından *nodA*-1/*nodA*-2 primer çifti ile beklenen büyüklükte bir ürün elde edilememiştir. Fasulye izolatları için alternatif olarak *nodA*-1/*nodA*-3 primerleri kullanılmış ve yaklaşık 600 bp’lik beklenen ürün ve bunun yanında da yaklaşık 250 bp’lik özgün olmayan bir amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Bölüm 3.4.7’de açıklandığı gibi yapılan bant kesme uygulamasından sonra elde edilen ürünler 2. PZR için kalıp DNA olarak kullanılmış ve ekstra bantlar elimine edilmiştir. İzolatların *nodA* genleri için DNA dizilemeleri, bakla ve bezelye izolatları için *nodA*-

1/nodA-2, fasulye izolatları için ise nodA-1, nodA-3 primer çiftleri kullanılarak yapılmıştır.

Elde edilen *nodA* DNA dizileri ve Çizelge 3.6'da belirtilen Rhizobia örneklerine ait *nodA* haplotiplerinin homolog bölgeleri hizalanmış ve toplam 501 baz çiftlik hizalanmış bir bölge üzerinden filogenetik analizler yürütülmüştür. Elde edilen veri setine en uygun baz değişim modelini belirlemek üzere jModelTest 0.1.1 kullanılarak Akaike Information Criterion (AIC) ve Basian Information Criterion (BIC) analizleri yapılmıştır. Bu analizler, veri setine dış grup (*Azorhizobium spp.*) eklenerek ve eklenmeden ikişer kez yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen baz değişim modelleri, I ve G değerleri Çizelge 4.7'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.7 *nodA* veri seti için yapılan AIC ve BIC testlerinin sonuçları

Dış Grup Dahil			Dış Grup Hariç		
	AIC	BIC		AIC	BIC
Model	TPM2uf	HKY	Model	TPM2uf	HKY
I	0.176	-	I	0.267	-
G	0.924	0.532	G	1.297	0.512

NodA haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkilerin ortaya konması için Çizelge 4.7'de belirtilen baz değişim modelleri kullanılarak Neighbor-Joining (NJ) ve Maksimum-Likelihood (ML) analizleri yapılmıştır. Ayrıca oluşturulan ağaçların istatistiksel olarak güvenilirliklerini belirlemek üzere NJ için 10000, ML için 1000 tekrarlı olmak üzere Bootstrap analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda NJ algoritması için HKY+G (Dış Grup Hariç) ve ML algoritması için ise TPM2uf+I+G (Dış Grup Dahil) modelleri ile oluşturulan ağaçların en yüksek Bootstrap değerlerini verdiği belirlenmiş ve bu nedenle de bu çalışmada gösterilmişlerdir (Şekil 4.25-26). *NodA* haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek üzere kullanılan bir diğer method olan Maksimum-Parsimony (MP) analizlerinde ise, hizalaması yapılan 501 karakterden 176 tanesinin haplotipler arasında varyasyon göstermediği, varyasyon gösteren karakterlerin 46 tanesinin ise parsimonik olarak bilgi içermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla MP analizleri 279 karakter üzerinden yürütülmüştür. Sonuçta, uzunlukları (763), CI (0.706422), RI (0.875694) ve HI (0.293578) değerleri eşit, en kısa 15 ağaç elde edilmiş ve bu ağaçların strict (Şekil 4.27) ve % 50 Majority rule (Şekil 4.28) konsensüs ağaçları oluşturulmuştur. Daha sonra oluşturulan MP ağacının istatistiksel

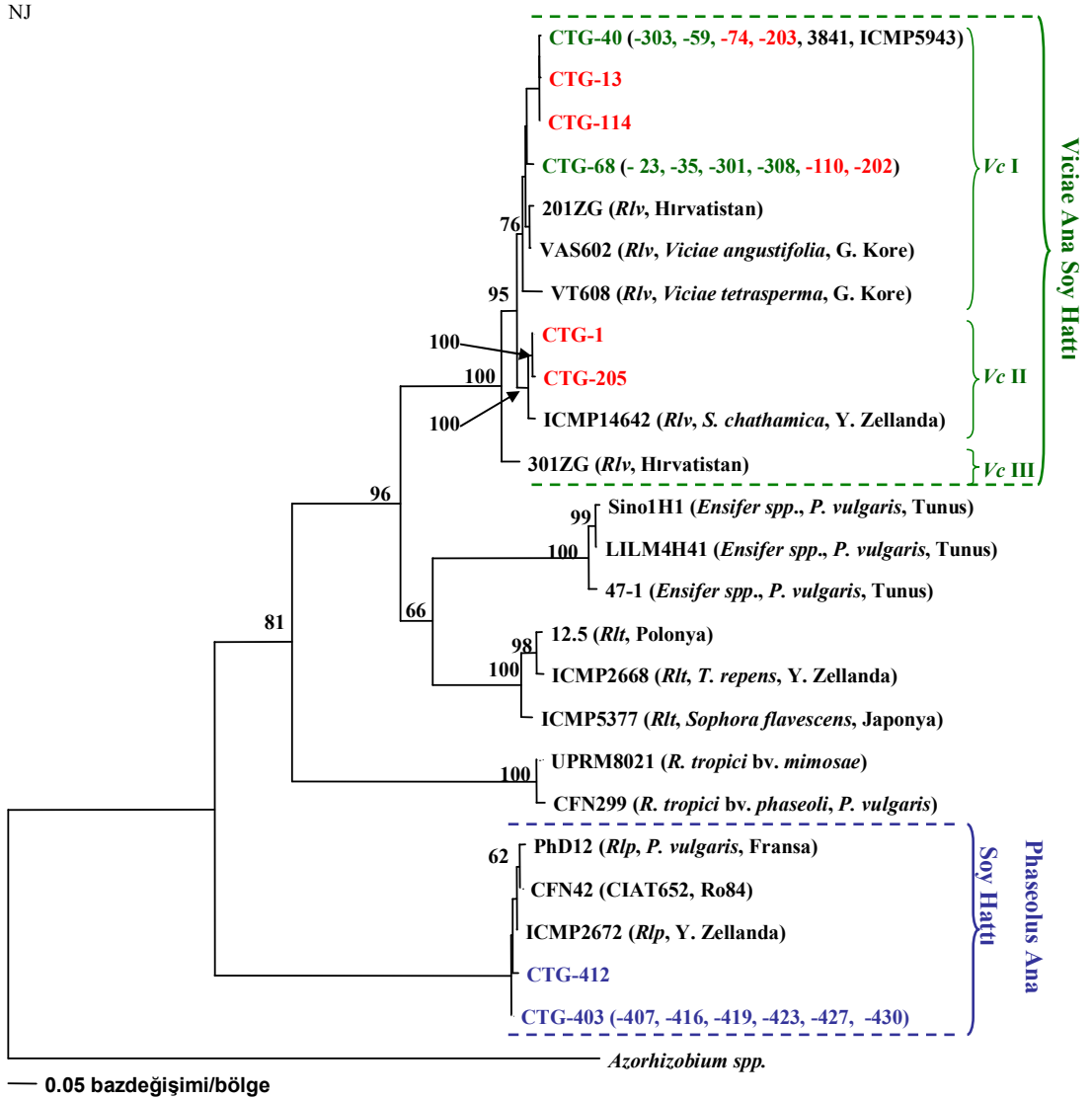
olarak güvenilirliğinin belirlenmesi için 1000 tekerrürlü Bootstrap analizi yapılmış ve ağaç üzerinde gösterilmiştir.

Seçilen Rhizobia izolatlarının *nodA* genlerinin baz dizileri kullanılarak yapılan NJ (Şekil 4.25), ML (Şekil 4.26) ve MP (Şekil 4.27-28) analizleri sonucunda, izolatların iki ana soy hattında toplandığı belirlenmiştir.

Bu soy hatlarından ilkinin bakla ve bezelye'den izole edilen *R. leguminosarum* bv. *viciae* izolatları oluşturmuştur. Bu izolatlarda kendi içerisinde alt soy hatlarına (*VcI*, *VcII*, *VcIII*) ayrılmışlardır. Bakla'dan izole edilen CTG-40 (**Bu izolat ile aynı *nodA* haplotipi gösteren; bakla'dan izole edilen CTG-59, CTG-303, bezelye'den izole edilen CTG-74 ve CTG-203, İngiltere'den *P.sativum*'dan izole edilmiş 3841 ve Y. Zelanda'dan *V. sativa*'dan izole edilmiş ICMP 5943**), yine bakla'dan izole edilen CTG-68 (**Bu izolat ile aynı *nodA* haplotipi gösteren; bakla'dan izole edilen CTG-23, CTG-35, CTG-301, CTG-308 ve bezelye'den izole edilen CTG-110, CTG-202**), bezelye'den izole edilen CTG-13 ve CTG-114, VT608 (*V. tetrasperma*, Güney Kore), VAS602 (*V. angustifolia*, Güney Kore) ve 201ZG (Hırvatistan) izolatları *VcI* alt soy hattını oluşturmuşlardır.

Bununla birlikte bezelye'den izole edilen CTG-1 ve CTG-205 izolatlarının *nodA* genleri Yeni Zelanda'dan *Sophora sp.*'den izole edilmiş ICMP14642 *nodA* haplotipi ile aynı monofiletik grupta yer almış ve *VcII* alt soy hattını oluşturmuştur. Bu alt soy hattında CTG-1 ve CTG-205 haplotipleri arasındaki ayrım NJ, ML, MP Strict Konsensüs ve MP %50 Majority Rule Konsensüs ağaçlarında sırasıyla %100, %100, %98 ve % 100'lük Bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. Bu iki izolatın oluşturduğu monofiletik grup, grubun üçüncü izolatı olan ICMP14642'den yine belirtilen sırayla %100, %99, %98, %100'lük Bootstrap değerleri ile ayrılmıştır. Dolayısıyla bu alt soy hattı kendi içerisinde oldukça tutarlı bir yapı oluşturmuştur. Alt soy hatları *VcI* ve *VcII*'nin ayrımları NJ, ML, MP Strict Konsensüs ve MP %50 Majority Rule Konsensüs ağaçlarında sırasıyla %95, %98, %87 ve %100'lük Bootstrap değerleri ile desteklenmiş, dolayısıyla bu iki alt soy hattı tüm algoritmalarda net olarak ayrılmıştır. Üçüncü alt soy hattını (*VcIII*) ise Hırvatistan'dan izole edilmiş 301ZG izolatına ait *nodA* haplotipi oluşturmuştur. Bu alt soy hattı *Viciae* ana soy hattı içerisindeki diğer iki alt soy hattına oranla daha atasal bir özellik göstermiştir ve oluşturulan tüm filogenetik ağaçlarda %100'lük bir Bootstrap değerleri ile ayrılmıştır.

Ana soy hatlarından ikincisini (Phaseolus Ana Soy Hattı) ise fasulye'den izole edilen CTG-403, CTG-407, CTG-412, CTG-416, CTG-419, CTG-423, CTG-427, CTG-430, PhD12 (*P. vulgaris*, Fransa), CFN42 (*P. vulgaris*, Meksika), CIAT652 (*P. vulgaris*), Ro84 (*P. vulgaris*, Fransa) ve ICMP2672 (*P. vulgaris*, Y. Zellanda) izolatları oluşturmuştur. Bu çalışmada fasulye'den izole edilen izolatlardan CTG-412 dışındakiler tamamen bir birleri ile aynı *nodA* haplotipini göstermiş ve fasulye'den izole edilmiş *R. etli* bv. *phaseoli*, *R. gallicum* bv. *phaseoli*, *R. giardinii* bv. *phaseoli*, ve *R. leguminosarum* bv. *phaseoli nodA* haplotipleri ile aynı monofiletik grup içerisinde yer almıştır. CTG-412 fasulye'den izole edilen diğer izolatlar ile genel anlamda aynı monofiletik grup içerisinde yer alsa da, bu izolatlardan ve fasulye'den izole edilmiş tip suşlara ait *nodA* haplotiplerinden daha farklı bir haplotip göstermiştir. Bu ayrım ML, MP strict konsensüs ve MP %50 Majority Rule konsensüs ağaçlarında %100'lük Bootstrap değerleri ile de desteklenmiştir. Bu gruptan ayrı olarak Tunus'dan izole edilmiş ve fasulye'de aktif nodüller oluşturan *Ensifer sp.* izolatlarından elde edilmiş *nodA* haplotipleri ise gerek bu çalışmada elde edilen gerekse de yukarıda belirtilen türlere ait tip suşlardan elde edilmiş *nodA* haplotiplerden tamamen farklı bir soy hattı oluşturmuştur. Benzer şekilde *R. tropici* bv. *phaseoli* izolatları da ayrı bir hat oluşturmuştur. Dolayısıyla fasulye'de nodül oluşturan Rhizobiyal türlerin *nodA* haplotipleri birbirinden bağımsız üç farklı soy hattı oluşturmaktadır ve bu çalışmada Fasulye'den izole edilen örnekler temel olarak *R. etli* (CFN 42) *nodA* haplotipi ile benzerlik göstermiştir.



CFN 42: *R. etli* bv. *phaseoli* *P. vulgaris*, Meksika

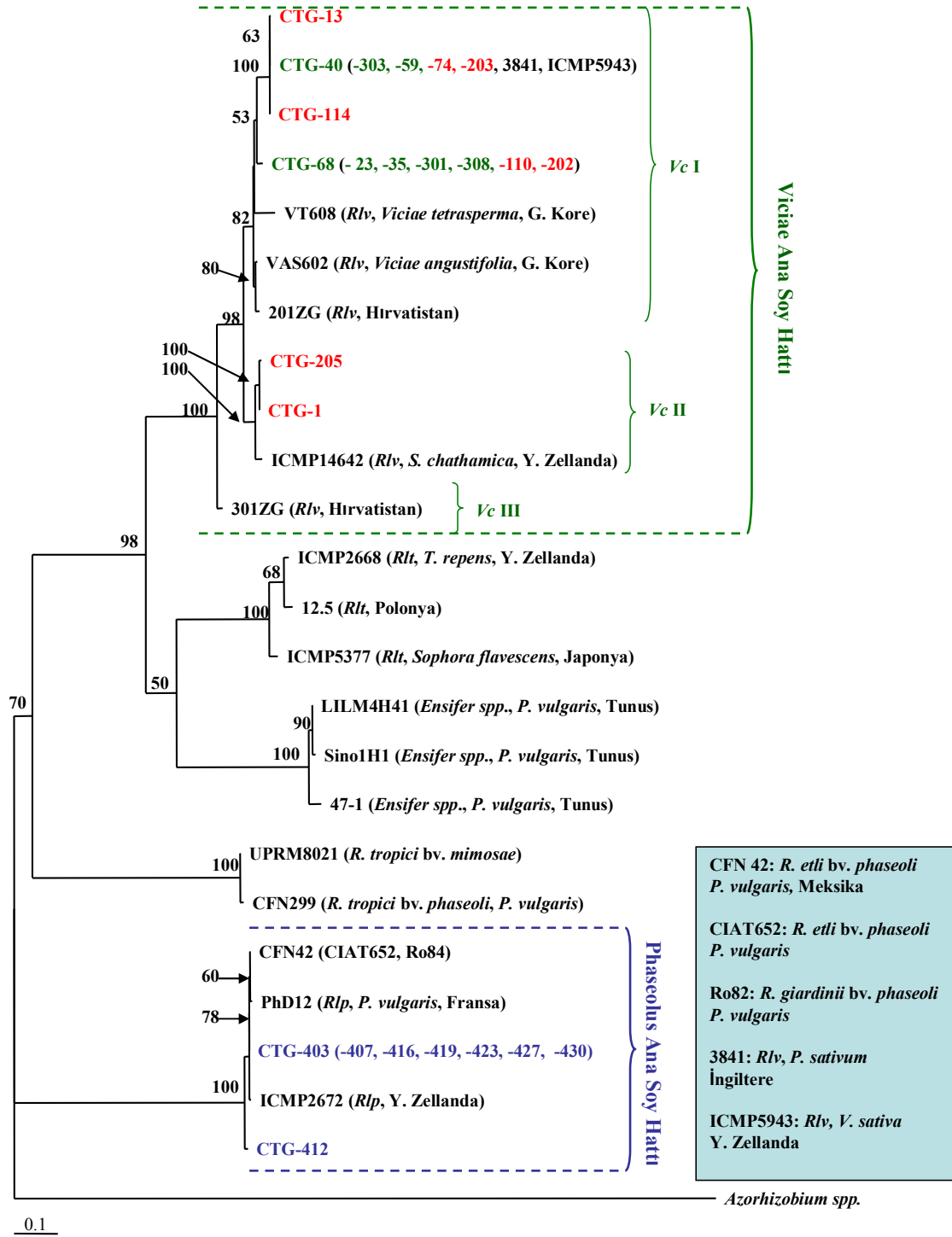
CIAT652: *R. etli* bv. *phaseoli*, *P. vulgaris*

Ro82: *R. giardinii* bv. *phaseoli*, *P. vulgaris*

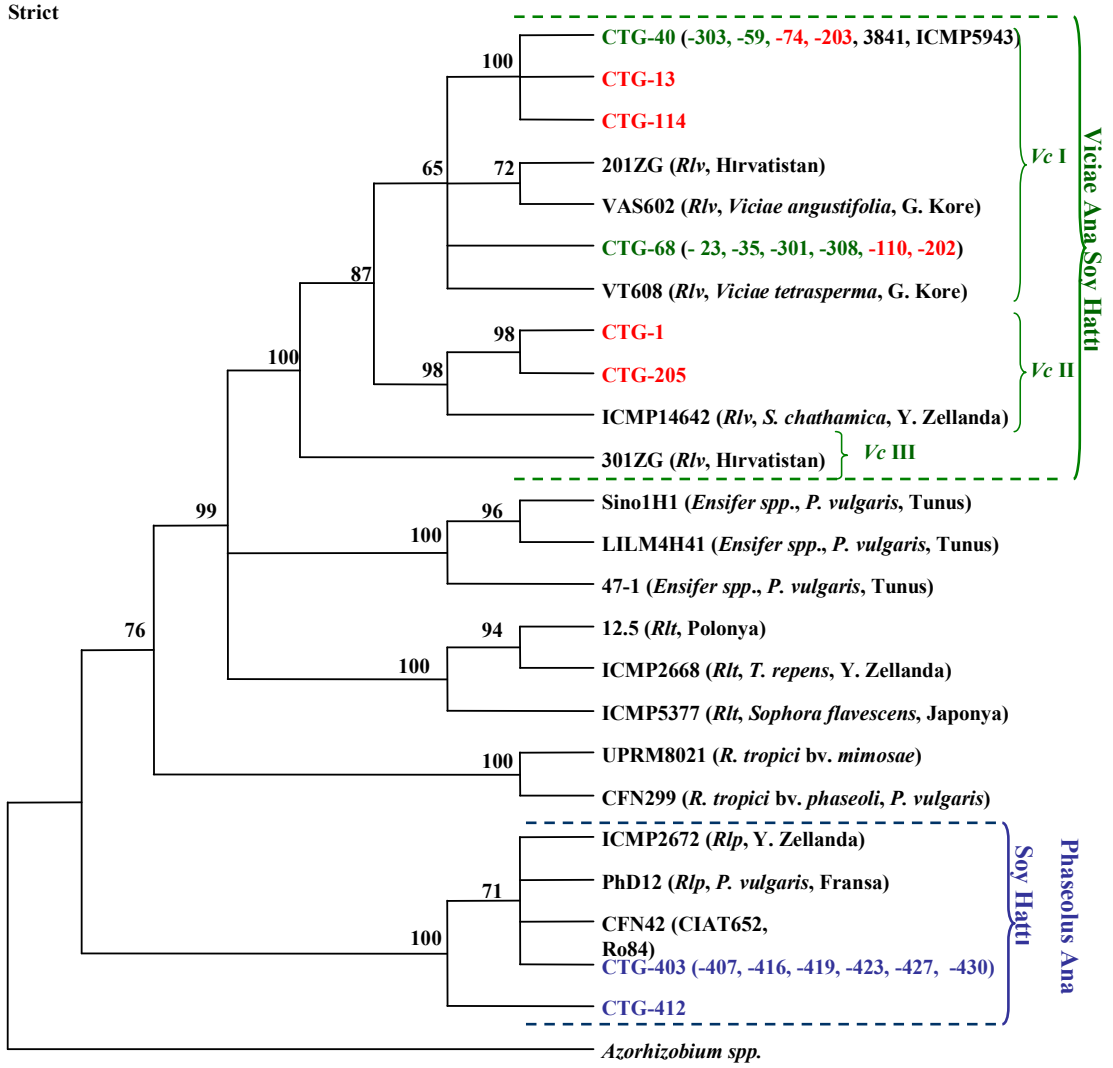
3841: *Rlv*, *P. sativum*, İngiltere

ICMP5943: *Rleguminosarum* bv. *viciae*, *V. sativa*, Y. Zellanda

Şekil 4.25 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.6'da belirtilen *noda* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Neighbor-Joining ağacı. Bu ağaç HKY+G (Dış grup hariç) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla'dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye'den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye'den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



Şekil 4.26 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobia* örneklerinin ve Çizelge 3.6’da belirtilen *nodA* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Likelihood ağacı. Bu ağaç TPMuf2+I+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



CFN 42: *R. etli* bv. *phaseoli* *P. vulgaris*, Meksika

CIAT652: *R. etli* bv. *phaseoli*, *P. vulgaris*

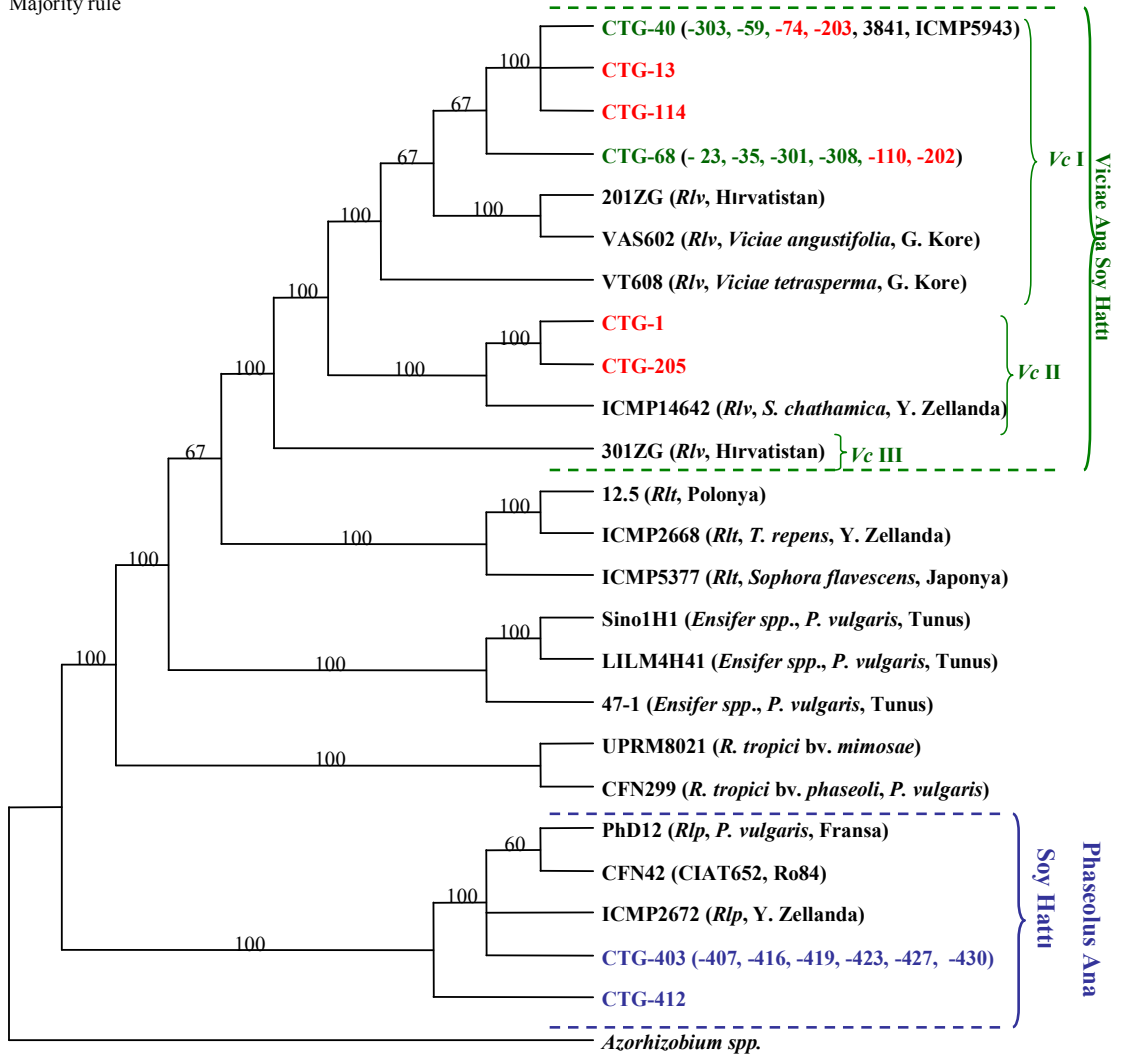
Ro82: *R. giardinii* bv. *phaseoli*, *P. vulgaris*

3841: *Rlv*, *P. sativum*, İngiltere

ICMP5943: *Rleguminosarum* bv. *viciae*, *V. sativa*, Y. Zellanda

Şekil 4.27 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.6’da belirtilen *nodA* haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizleri sonucunda elde edilen eşit uzunluktaki 15 ağacın Strict konsensüs ağacı. Bu ağaç üzerinde sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir

Majority rule

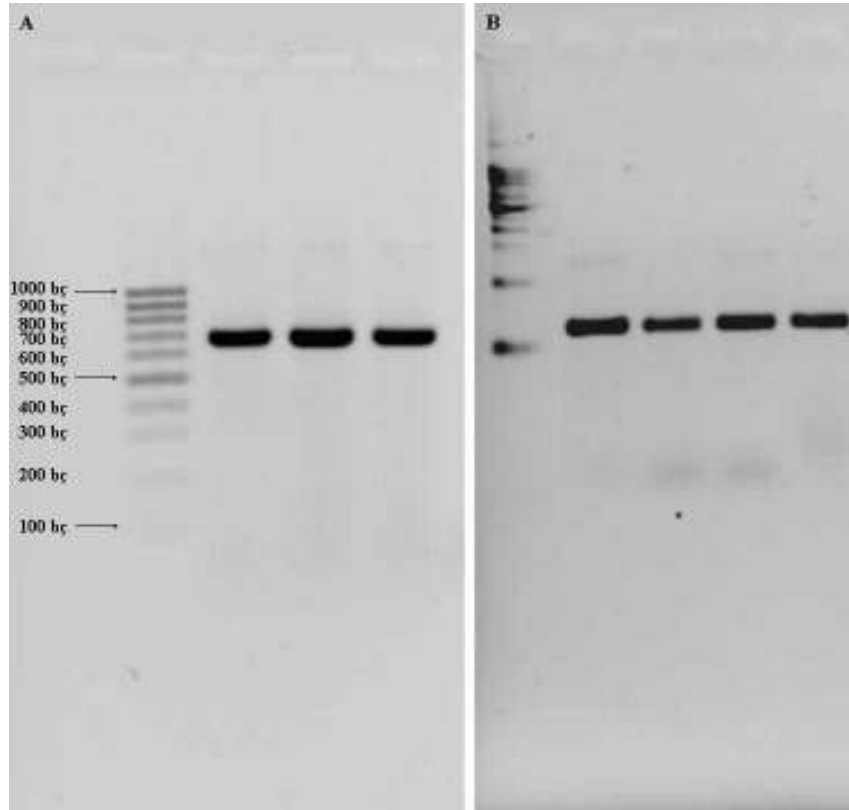


CFN 42: *R. etli* bv. *phaseoli* *P. vulgaris*, Meksika
 CIAT652: *R. etli* bv. *phaseoli*, *P. vulgaris*
 Ro82: *R. giardinii* bv. *phaseoli*, *P. vulgaris*
 3841: *Rlv*, *P. sativum*, İngiltere
 ICMP5943: *Rleguminosarum* bv, *viciae*, *V. sativa*, Y. Zelandia

Şekil 4.28 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobia örneklerinin ve Çizelge 3.6’da belirtilen *nodA* haplotiplerinin Maksimum-Parsimony analizleri sonucu elde edilen eşit uzunluktaki 15 ağacın %50 Majority Rule konsensüs ağacı. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir

4.3.8 *nifH* DNA Dizileme Analizleri

Rhizobiyal izolatların azot fiksasyon genleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için seçilen *nifH* geninin PZR amplifikasyonları bölüm 3.4.8’de belirtildiği gibi yapılmıştır. NifHctg/nifHI primer çifti kullanılarak yapılan PZR amplifikasyonları sonucunda bakla ve bezelye izolatlarının tümünden yaklaşık 800 bp’lik beklenen ürün elde edilmiştir (Şekil 4.29a), buna karşın fasulye izolatlarından ise bu primer çifti kullanılarak bir ürün elde edilememiştir. Fasulye izolatlarından *nifH* amplifikasyonu için öncelikle nifHF/nifHI primer çifti kullanılmıştır. Bu primerler ile yapılan amplifikasyonlarda izolatlarından istenilen büyüklükteki 780 bp’lik bandın yanı sıra farklı büyüklüklerde özgün olmayan amplifikasyon ürünleri de elde edilmiştir. CTG-403, CTG-407, CTG-412, CTG-416 ve CTG-430 izolatları için 3.4.8’de açıklandığı gibi yapılan bant kesme uygulamasından sonra elde edilen ürünler, 2’inci PZR uygulaması için kalıp DNA olarak kullanılmış ve böylece ekstra bantlar elimine edilmiştir (Şekil 4.29b).



Şekil 4.29

(A) DNA dizileme için seçilen bazı Rhizobium bakla ve bezelye izolatlarından (BIORON 100 bp DNA Ladder, CTG-68, -203, -205) nifHI/nifHctg primer çifti kullanılarak yapılan *nifH* amplifikasyon ürünleri.

(B) CTG-403, CTG-407, CTG-416 ve CTG-430 izolatlarından nifHF/nifHI primerleri kullanılarak yapılan *nifH* amplifikasyon ürünleri (Bant kesme sonrası 2. PZR)

Buna karşın CTG-419, CTG-423 ve CTG-427 izolatlarında ekstra ürünlerden bazıları hedef banda (780 bp) çok yakın büyüklükte çıkmıştır ve bu nedenle bant kesme uygulaması sağlıklı bir şekilde yapılamamıştır. Bu izolatlar için alternatif bir primer çifti, nifH1/nifH2 amplifikasyonlar ve DNA dizileme için kullanılmıştır.

Bu çalışmada belirlediğimiz *nifH* baz dizileri ve Çizelge 3.7’de belirtilen Rhizobiyal örneklerine ait *nifH* haplotiplerinin homolog bölgeleri hizalanmış ve toplam 366 baz çiftlik hizalanmış bölge üzerinden filogenetik analizler yürütülmüştür. Oluşturulan *nifH* veri setine en uygun evrimsel modeli belirlemek üzere yapılan ModelTest analizi sonucunda elde edilen baz değişim modelleri, I ve G değerleri Çizelge 4.8’de gösterilmektedir.

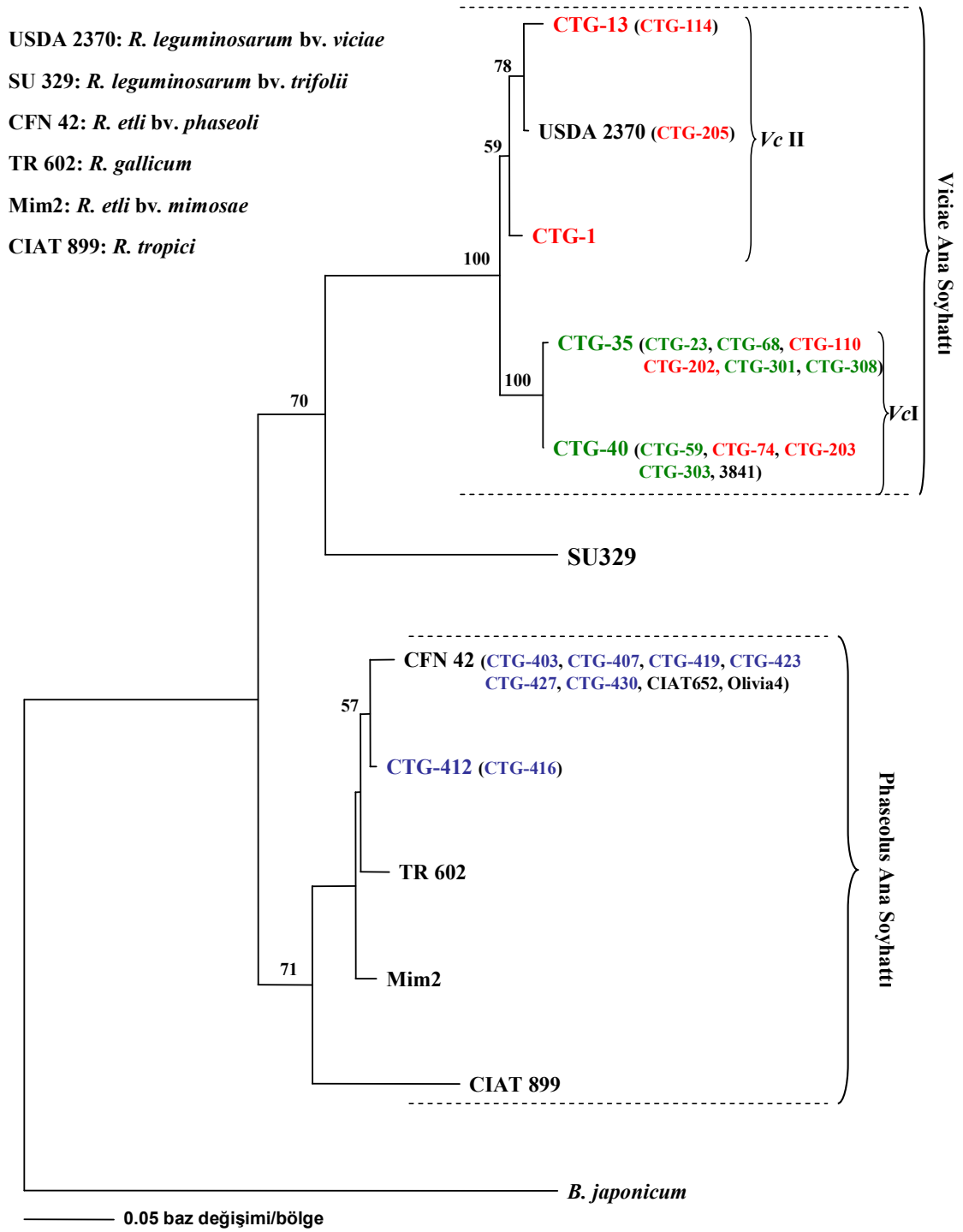
Çizelge 4.8 *nifH* veri seti için yapılan AIC ve BIC testlerinin sonuçları

Dış Grup Dahil			Dış Grup Hariç		
	AIC	BIC		AIC	BIC
Model	TIM3	TIM3ef	Model	TrN	TrN
I	-	-	I	0.642	0.642
G	0.334	0.422	G	-	-

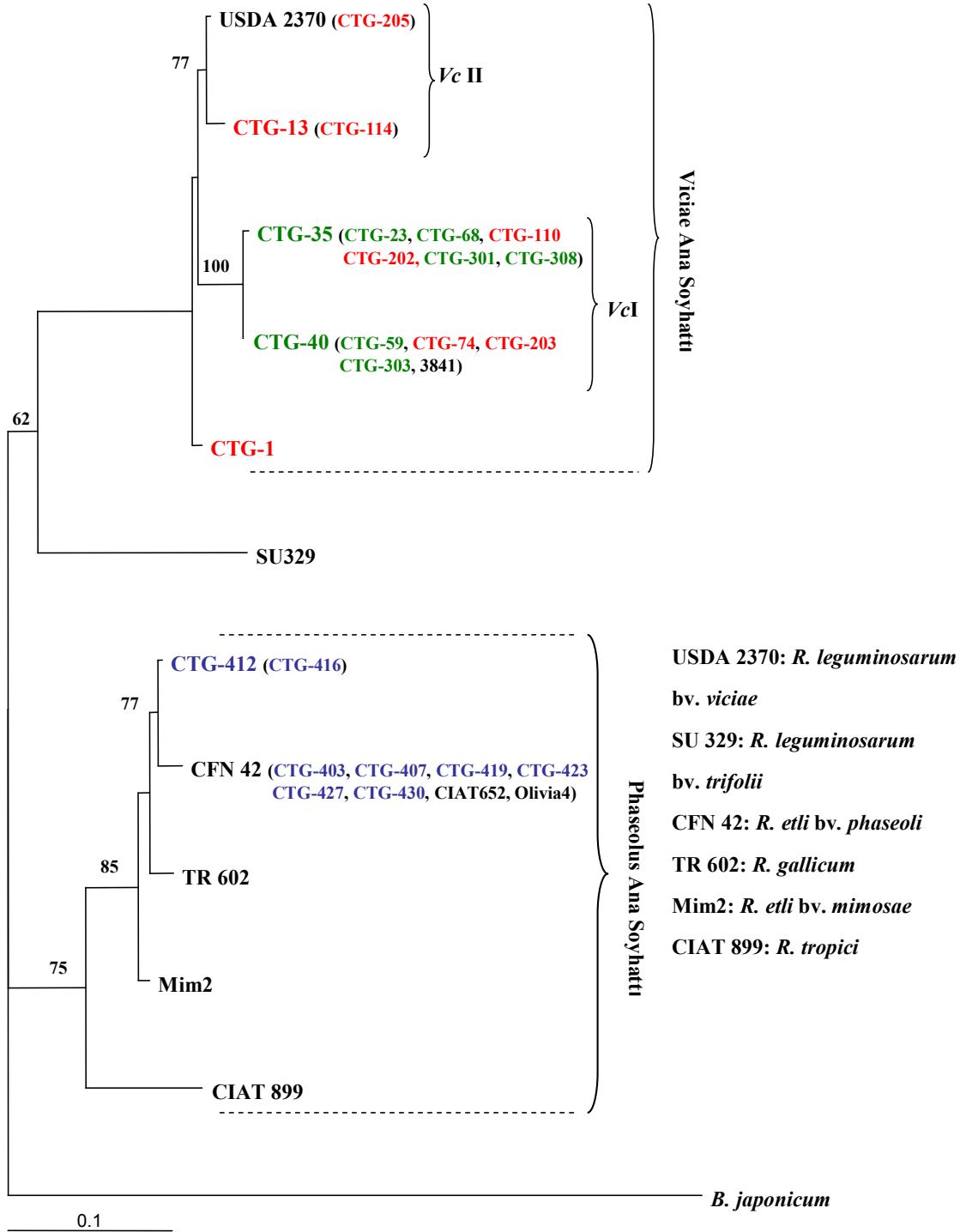
Rhizobiyal *nifH* haplotipleri arasındaki evrimsel ilişkilerin belirlenmesi için Çizelge 4.8’de belirtilen baz değişim modelleri kullanılarak NJ ve ML analizleri yapılmış ve oluşturulan NJ ve ML ağaçlarının istatistiksel olarak güvenilirliklerini göstermek içinde sırasıyla 10 000 ve 1000 tekrarlı Bootstrap analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda NJ ve ML algoritmalarının her ikisi içinde TIM3ef+G (Dış Grup Dahil) modeli ile oluşturulan ağaçların en yüksek Bootstrap değerlerini verdiği belirlenmiş ve bu nedenle de bu çalışmada gösterilmişlerdir (Şekil 4.30-31).

Kullanılan bir diğer algoritma olan Parsimony analizinde ise, hizalaması yapılan 366 bazdan 233 tanesinin tüm örneklerde aynı olduğu, varyasyon gösteren karakterlerden 60 tanesinin ise parsimonik olarak bilgi içermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla Parsimony analizleri 73 karakter üzerinden yürütülmüş ve neticede, uzunlukları (213), CI (0.789), RI (0.808) ve HI (0.211) değerleri birbirine eşit, en kısa 2 ağaç elde edilmiştir. Bu en kısa 2 ağacın strict ve % 50 Majority rule konsensüs ağaçları sırasıyla Şekil 4.32 ve Şekil 4.33 gösterilmektedir. 1000 tekerrürlü olarak yapılan Bootstrap analizinin sonucunda, %50’nin üzerinde desteklenen düğümler için Bootstrap değerleri parsimony strict konsensüs ağacı üzerinde gösterilmiştir.

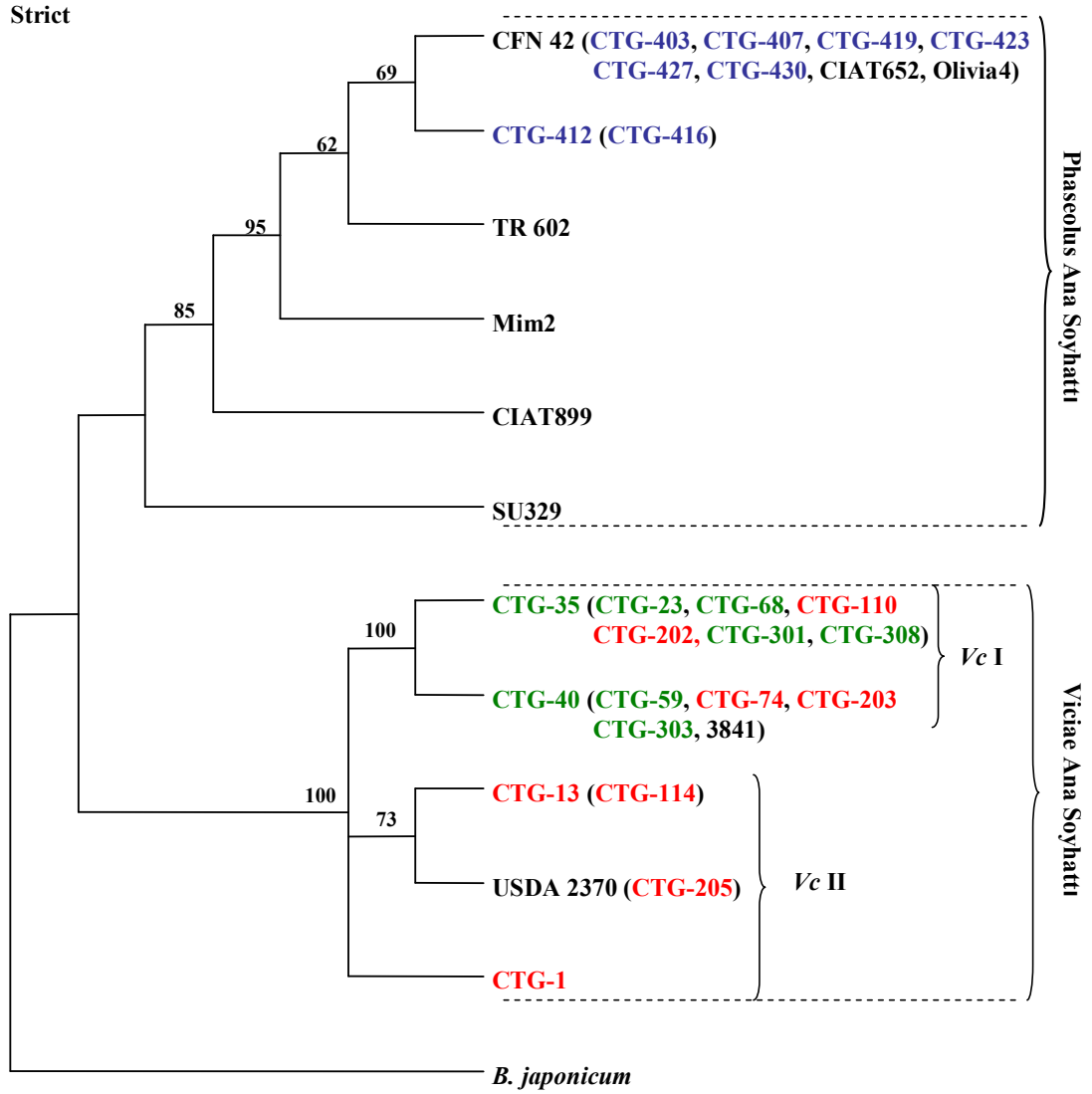
Oluşturulan NJ (Şekil 4.30), ML (Şekil 4.31) ve Parsimony (Şekil 4.32-33) ağaçlarında izolatların *nifH* haplotiplerine göre iki ana soy hattında toplandığı belirlenmiştir. Bu soy hatlarından ilkinin bakla ve bezelye'den izole edilen *R. leguminosarum* bv. *viciae* izolatları oluşturmuştur (*Viciae* ana soy hattı). Bu izolatlarda kendi içerisinde iki alt soy hattına (*VcI* ve *VcII*) ayrılmıştır. Bakla'dan izole edilen CTG-40 (Bu izolat ile aynı *nifH* haplotipi gösteren; bakla'dan izole edilen CTG-59, CTG-303, bezelye'den izole edilen CTG-74 ve CTG-203, İngiltere'den *P. sativum*'dan izole edilmiş 3841), yine bakla'dan izole edilen CTG-68 (Bu izolat ile aynı *nifH* haplotipi gösteren; bakla'dan izole edilen CTG-23, CTG-35, CTG-301, CTG-308 ve bezelye'den izole edilen CTG-110, CTG-202) *VcI* alt soy hattını oluşturmuşlardır. *VcI* içerisindeki bu iki grubun ayrımı NJ, ML, MP strict konsensüs ve MP %50 majority rule konsensüs ağaçlarının tümünde %100'lük bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. *Viciae* ana soy hattı içerisindeki ikinci alt grup olan *VcII* ise Amerika'dan bezelye'den izole edilmiş *R. leguminosarum* tip suşu USDA 2370 ve bu çalışmada bezelye'den izole edilen CTG-1, CTG-13, CTG-114, CTG-205 izolatlarından oluşmuştur. MP ağacında CTG-1 izolatı *VcI* ve *VcII*'den farklı üçüncü bir alt soy hattı oluşturmuştur bu ayrımın algoritma farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. *NifH* filogenisindeki ikinci ana soy hattını ise (*Phaseolus* Ana Soy Hattı) fasulye'den izole edilen CTG-403, CTG-407, CTG-412, CTG-416, CTG-419, CTG-423, CTG-427, CTG-430, CFN42 (*P. vulgaris*, Meksika), CIAT652 (*P. vulgaris*), Olivia-4 (*P. vulgaris*, Belize), CIAT-899 (*P. vulgaris*), Mim2 (*Mimosa affinis*) ve R602 (*P. vulgaris*, Fransa) izolatları oluşturmuştur. Bu çalışmada fasulye'den izole ettiğimiz Rhizobiyal örneklerinden, CTG-412 ve CTG-416 hariç tümü *R. etli* tip suşu olan CFN42 ve yine Amerika kıtasından fasulye'den izole edilmiş CIAT652 ve Olivia-4 izolatları ile aynı *nifH* haplotipini göstermiştir. CTG-412 ve CTG-416 izolatları her ne kadar farklı bir *nifH* haplotipi gösterebilirler de yukarıda belirtilen izolatlar ile aynı monofiletik grup içerisinde yer almışlardır. *Phaseolus* ana soy hattı içerisindeki diğer izolatlar olan Mim2 ve R602'nin yukarıda belirtilen gruptan ayrımları bootstrap ağaçlarında desteklenmemiştir. Bununla birlikte yine fasulye'den tanımlanmış *R. tropici*'nin *nifH* haplotipi *Phaseolus* ana soy hattı içerisindeki diğer örneklerden belirgin olarak farklılık göstermiştir, bu ayrım NJ, ML, MP strict konsensüs ve MP %50 majority rule konsensüs ağaçlarında; %71, %75, %85, %100' lük Bootstrap değerleri ile desteklenmiştir.



Şekil 4.30 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobium örneklerinin ve Çizelge 3.7’de belirtilen *nifH* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Neighbor-Joining ağacı. Bu ağaç TIM3ef+G (Dış grup Dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



Şekil 4.31 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* örneklerinin ve Çizelge 3.7’de belirtilen *nifH* haplotiplerinin filogenetik ilişkilerini gösteren Maksimum-Likelihood ağacı. Bu ağaç TIM3ef+G (Dış grup dahil) baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir



USDA 2370: *R. leguminosarum* bv. *viciae*

SU 329: *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

CFN 42: *R. etli* bv. *phaseoli*

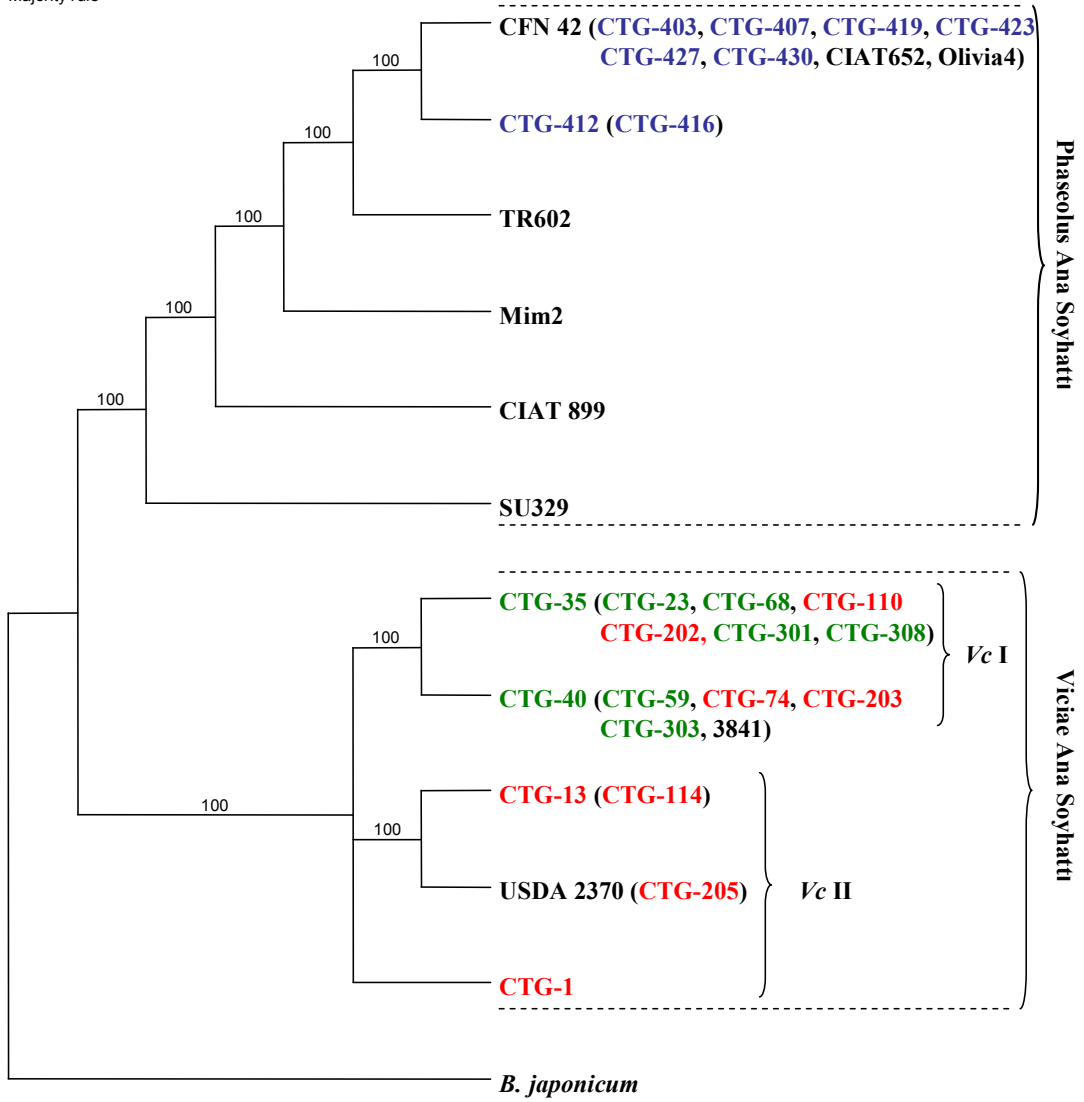
TR 602: *R. gallicum*

Mim2: *R. etli* bv. *mimosae*

CIAT 899: *R. tropici*

Şekil 4.32 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen Rhizobium örneklerinin ve Çizelge 3.7’de belirtilen *nifH* haplotiplerinin Parsimony analizleri sonucunda elde edilen eşit uzunluktaki 2 ağacın Strict konsensüs ağacı. Bu ağaç üzerinde sadece %50’nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için Bootstrap değerleri belirtilmiştir. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir

Majority rule

USDA 2370: *R. leguminosarum* bv. *viciae*SU 329: *R. leguminosarum* bv. *trifolii*CFN 42: *R. etli* bv. *phaseoli*TR 602: *R. gallicum*Mim2: *R. etli* bv. *mimosae*CIAT 899: *R. tropici*

Şekil 4.33 Bakla, bezelye ve fasulye nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* örneklerinin ve Çizelge 3.7’de belirtilen *nifH* haplotiplerinin parsimony analizleri sonucu elde edilen eşit uzunluktaki 2 ağacın %50 Majority Rule konsensüs ağacı. Ağaçta bakla’dan izole edilen örnekler yeşil, bezelye’den izole edilen örnekler kırmızı ve fasulye’den izole edilen örnekler ise mavi renk ile belirtilmiştir

4.3.9 16S rDNA-*recA* Birleştirilmiş Filogeni

16S rDNA ve *recA* filogenilerinde uyumsuzluk gözlenen izolatlarda olası lateral gen transferlerinin belirlenmesi için ILD (Incongruous Length Difference) testi uygulanmıştır. Bu test PAUP v. 4.0b10 ile Maksimum-Parsimony algoritması, Heuristic araştırma metodu kullanılarak 1000 tekerrürlü olarak yapılmıştır. ILD testi, 16S rDNA'ları *R. leguminosarum* ile ilişkili çıkan buna karşın *recA* genleri bu türe oldukça uzak bir grupta çıkan CTG-407, CTG-416 ve CCBAU43229 izolatları ve bunlara ek olarak *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. pisi*, *R. fabae* ve *E. fredii* (dış grup) tip suşları kullanılarak yapılmıştır. ILD testi sonucunda *p* değeri 0.036 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.9). Bu sonuca göre, $p < 0.05$ olduğundan bu iki genin birbirleri ile uyumlu olmadıkları, benzer bir evrimsel geçmişi paylaşmadıkları sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.9 *R. leguminosarum* ile ilişkili izolatlar için ILD test sonuçları

*Orijinal ağacın uzunluğu

Ağaç Uzunlukları	Ağaç Sayısı
188	2
189*	34
190	140
191	322
192	401
193	101
p-değeri: 1 - (964 / 1000) = 0.036	

İkinci bir ILD testi de, 16S rDNA'ları *R. etli* tip suşu, *recA*'ları ise *R. phaseoli* tip suşu ile ilişkili çıkan CTG-423 ve CTG-430 izolatları ve bunlara ek olarak CTG-412 (*R. phaseoli*), CTG-419 (*R. phaseoli*) izolatları, *R. etli*, *R. phaseoli* ve *R. tropici* (dış grup) tip suşları kullanılarak yapılmıştır. ILD testi sonucunda *p* değeri 0.005 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre, $p < 0.05$ olduğundan bu iki genin birbirleri ile uyumlu olmadıkları, benzer bir evrimsel geçmişi paylaşmadıkları sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.10 *R. etli* ve *R. phaseoli* ile ilişkili izolatlar için ILD test sonuçları

*Orijinal ağacın uzunluğu

Ağaç Uzunlukları	Ağaç Sayısı
154*	5
155	19
156	121
157	397
158	458
p-değeri: 1 - (995 / 1000) = 0.005	

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi illerinden Samsun, Sinop, Ordu ve Amasya’da yetiştirilen bakla (*V. faba* L.), bezelye (*P. sativum* L.) ve fasulye (*P. vulgaris* L.) bitkilerinin kökleri ile simbiyotik birliktelik oluşturan Rhizobia grubu bakterilerin biyolojik çeşitliliklerinin ve içerdikleri nodülasyon (*nod*, *nol* ve *noe*) ve azot fiksasyon (*nif* ve *fix*) genlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla bu dört ilde belirlenen toplam 30 lokaliteden bitki örnekleri toplanmış ve kök nodüllerinden yapılan izolasyonlar sonucunda 30 tane bakla’dan, 30 tane bezelye’den ve 30 tane’de fasulye’den olmak üzere toplam 90 adet Rhizobiyal örnek elde edilmiştir.

Somasegaran ve Hoben (1985) ve Kuykendall ve ark. (2005), Gram boyama ve Brom Cresol Purple içeren Pepton Glukoz Agar ortamında gelişim testlerinin Rhizobium izolatları içerisindeki olası bir kontaminasyonu belirlemede etkili birer yöntem olduğunu belirtmişler ve Rhizobiyal çalışmalarda kullanılmasını önermişlerdir. Bu çalışmada izole edilen ve bu iki test ile saf olduklarına kanaat getirilen 90 adet Rhizobiyal izolatta çalışmanın takip eden aşamalarında da herhangi bir kontaminasyon izine rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar literatürlere uygun olarak bu testlerin Rhizobiyal çalışmalardaki olası kontaminasyonları belirlemedeki güvenilirliklerini ve uygulanmalarındaki gerekliliği ortaya koymuştur. Yapılan nodülasyon testleri sonucunda, elde edilen tüm izolatların orijinal konukçularının kökleri üzerinde aktif nodüller oluşturdukları, dolayısıyla da nodülasyon ve azot fiksasyon genleri taşıdıkları belirlenmiştir. Çapraz aşılama kavramı çerçevesinde yapılan nodülasyon denemelerinde, Viciae kabilesi içerisinde yer alan bakla’dan izole edilen bakterilerin aynı kabiledede yer alan bezelye’de, bezelye’den izole edilen bakterilerin ise bakla’da aktif ancak nispeten küçük ve az sayıda nodüller oluşturdukları belirlenmiştir. İlerleyen bölümlerde tartışılacağı gibi bu çalışmada bakla ve bezelye kök nodüllerinden izole edilen izolatların tümü *Rlv* (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) olarak tanımlanmıştır. *Vicia*, *Lathyrus*, *Pisum* ve *Lens* cinslerini kapsayan Viciae kabilesinin doğal mikrosimbiyontu olan *Rlv*’nin bu cinslere ait tüm türleri nodüle ettiği düşünülmektedir (Mutch ve Young, 2004). Bununla birlikte yapılan çeşitli çalışmalar bu genellemeye tezat oluşturabilecek sonuçlar ortaya koymuştur.

Young ve ark. (1982) yaptıkları çalışmada, Türkiye’yi de kapsayan farklı ülkelerden topladıkları 375 bezelye bitkisini, İngiltere’den izole ettikleri 3 ve

Türkiye’den izole ettikleri 1 (TOM) *Rlv* izolatu ile enfekte etmişler ve sonuçta TOM izolatının test edilen bitkilerin tümünü nodüle ettiğini buna karşın İngiltere izolatlarının ise 40 Afganistan bitki örneğinden 16’sını ve 37 Türkiye bitki örneğinden 36 tanesini nodüle ettiğini belirlemişlerdir (24 Afganistan ve 1 Türkiye ırkı İngiltere kökenli *Rlv* izolatları ile nodüle olmamıştır). Dolayısıyla bu bitki için olası gen merkezi olan Türkiye-Afganistan bölgesinden gelen bezelye örnekleri yine bu bölgeden köken alan TOM izolatu tarafından nodüle edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar bu özgünlüğün nedeninin bezelye’deki *sym-2* (Geurts ve ark., 1997) ve Rhizobia’daki *nodX* (Davis ve ark., 1988) genlerinden kaynaklandığını göstermiştir (Firmin ve ark., 1993). Bezelye daha sonradan kültüre alınıp yetiştirildiği ve yayıldığı bölgelerde alternatif bir *sym-2* alleli geliştirerek *nodX* geni içermeyen daha geniş bir *Rlv* popülasyonu ile simbiyotik birliktelik oluşturmuştur. Bu nedenle *nodX* geni içermeyen ve dünyanın diğer bölgelerinden gelen bezelye bitkilerini nodüle eden İngiltere *Rlv* izolatları Afganistan ve Türkiye bezelye bitkileri ile nodülasyon yapmamıştır. Bu sonuç Bezelye ve *Rlv* arasında lokaliteye bağlı bir özgünlük ortaya koymuştur (Mutch ve Young, 2004).

Bu çalışmaya ek olarak yapılan diğer bazı araştırmalar *Rlv* popülasyonları içerisindeki özel genotiplerin (popülasyon alt grupları) *Viciae* kabilesi içerisindeki belirli konukçu türlerini (veya tersi olarak belirli konukçu türlerinin belirli *Rlv* genotiplerini) tercih ettiğini ortaya koymuştur. Özellikle bezelye ve bakla yerel Rhizobiyal genotiplerin seçiminde birbirleri ile tezatlıklar göstermektedir. Yapılan çalışmalarda elde edilen bazı kanıtlar bakla’nın nodülasyon rekabetinde belirleyici olduğunu ve karışık bir toprak popülasyonu içerisindeki belirli bir *R. leguminosarum* bv. *viciae* grubu tarafından enfekte edildiğini bu nedenle de bakla’dan izole edilen Rhizobiyal izolatların *Rlv*’nin diğer izolatlarından rahatlıkla ayrılabilceğini işaret etmektedir (Hynes ve O’Connell, 1990; Laguerre ve ark., 1992; Van Berkum ve ark., 1995; Evans ve ark., 1996; Laguerre ve ark., 2003). Dolayısıyla *Rlv* ile konukçusu arasında gerek lokaliteye gerekse de konukçu ve bakteri popülasyonu seçimine bağlı bir özgünlük bulunmaktadır. Bu durum bu çalışmada izole edilen bakla izolatlarının bezelye de, bezelye izolatlarının ise bakla da neden daha az sayıda ve daha küçük nodüller oluşturduğuna bir açıklama getirmektedir. İzole edilen bakla ve bezelye izolatları arasında nodülasyon kapasitesi ve etkinlik açısından konukçu bitkiye bağlı bir seçim ve özgülleşme bulunmaktadır.

Elde edilen izolatların moleküler olarak teşhislerinin yapılması için ilk olarak klasik fenol-kloroform yöntemi ile genomik DNA izolasyonu yapılmış fakat izolatların çok miktarda eksopolisakkarit (mukus) oluşturması nedeniyle yeterince saf genomik DNA elde edilememiştir. Bu sebeple alternatif metod olarak bu eksopolisakkaritleri bağlayarak çöktüren ve daha saf bir DNA elde edilmesini sağlayan CTAB/NaCl metodu kullanılmıştır. Rhizobium gibi çok miktarda mukus oluşturan organizmalar ile çalışılırken genomik DNA izolasyonunda bu metodun kullanılması çok daha iyi bir sonuç vermektedir.

16S rDNA PZR-RFLP (Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi) Rhizobiyal çalışmalarda, onlarca veya yüzlerce izolattan oluşan geniş bir bakteri koleksiyonundaki genetik varyasyonu belirlemek ve DNA dizilemeleri öncesinde izolatlar içinde bir ön grupta yapabilmek için kullanışlı bir metottur (Lindström ve ark., 2006). Bu metod Rhizobia'da ilk olarak Laguerre ve ark. (1994) tarafından uygulanmıştır. Araştırmacılar o döneme kadar tanımlanmış Rhizobiyal türlerin *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* veya *CfoI*, *HinfI*, *RsaI*, *MspI* (veya *NdeII*) enzim setlerinden bir tanesinin kullanılmasıyla birbirinden ayrılabilceğini belirtmişlerdir. Günümüze kadar pek çok araştırmacı önerilen bu enzim setlerini değiştirmeden veya kısmen modifiye ederek kullanmışlardır. Bu çalışmaların bazılarında: Grange ve ark. (2004) Brezilya'dan Fasulye'den izole ettikleri Rhizobiyal izolatların ön gruplamaları için *CfoI*, *HinfI*, *RsaI*, *MspI* ve *NdeII* enzim setini kullanmış ve ön gruplamayı takiben yaptıkları DNA dizileme analizleri ile izolatları *R. etli*, *E. fredii*, *R. leguminosarum*, *R. tropici* ve *M. plurifarum* olarak tanımlamışlardır. Moschetti ve ark. (2005) İtalya'dan *Vicia*, *Pisum* ve *Lathyrus* cinslerine ait türlerden izole ettikleri Rhizobium'ları *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* enzim seti kullanarak *Rlv* olarak tanımlamışlardır. Shamseldin ve ark. (2009) Mısır'da bakla'dan izole ettikleri izolatların ön gruplaması için *CfoI*, *HinfI*, *MspI* enzimlerini kullanmış ve izolatları *Rlv* ve *Ensifer spp.* olarak tanımlamışlardır.

Bu çalışmada da enzim seti olarak, Laguerre ve ark. (1994) tarafından önerilen *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* kullanılmıştır. Analizler sonucunda bakla'dan ve bezelye'den izole edilen tüm izolatların aynı şablonu verdiği ve dolayısıyla da aynı türe ait oldukları belirlenmiştir. Daha sonra tartışılacağı gibi temsilci izolatlar için yapılan 16S rDNA ve *recA* DNA dizilemeleri ve filogenetik analizler bu izolatların *Rlv* olduklarını ortaya koymuştur. Bakla ve bezelye izolatları için elde edilen RFLP şablonu, *Rlv* tip suşunun (USDA 2370) BioEdit v. 7 kullanılarak oluşturulan teorik RFLP şablonu ile

karşılaştırıldığında, *HinfI*, *MspI* ve *NdeII* şablonlarının aynı olduğu buna karşın *CfoI* şablonunda ise bir farklılığın bulunduğu belirlenmiştir. USDA 2370 izolatı *CfoI* restriksiyon enzimi ile kesildiğinde gözlenen yaklaşık 450 bp'lik bant bu çalışmada elde edilen izolatlarda gözlenememiş bunun yerine tip suşa ait RFLP şablonunda bulunmayan yaklaşık 280 bp ve 170 bp'lik iki bant gözlenmiştir. Bu sonuç bu bölgeden izole edilen *Rlv*'lerin 16S rDNA'larında bir nokta mutasyon meydana geldiğini ve *CfoI* enzimi için ekstra bir kesim noktası oluştuğunu (5'...GCG/C...3') veya tersi olarak tip suşun bir mutasyon ile bu tanıma bölgesini kaybettiğini göstermektedir. USDA 2370 ve bu çalışmada elde edilen izolatların 16S rDNA'ları hizalandığında Orta Karadeniz *Rlv* izolatlarının 16S rDNA'larının 321'inci bazında bir transversiyon nokta (C→G) mutasyonu meydana geldiği ve ekstra bir *CfoI* kesme noktası oluştuğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu enzim seti *R. leguminosarum* türü içerisindeki varyasyonları da ortaya koyabilmektedir. Fasulye izolatlarında yapılan 16S rDNA PZR-RFLP analizinde ise üç farklı şablon dolayısıyla da üç farklı olası tür elde edilmiştir. Bu şablonların ilki bakla ve bezelye'den izole edilen Rhizobiyal izolatlar ile (*R. leguminosarum*) benzerlik göstermiştir. Fasulye'den izole edilen *R. leguminosarum* izolatlarında da bakla ve bezelye'den izole edilen *R. leguminosarum*'lardaki *CfoI* kesim noktasını etkileyen mutasyon bulunmaktadır. Dolayısıyla bu mutasyonun görülme sıklığı Orta Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren *R. leguminosarum* izolatlarında oldukça fazladır. Fasulye'den izole edilen 30 Rhizobiyal örneğin 16 tanesi bu şablonu göstermiştir.

BioEdit v. 7 kullanılarak Rhizobiyal türlere ait tip suşların 16S rDNA dizileri ile yapılan sanal 16S rDNA PZR-RFLP uygulamasında, kullanılan bu 4 enzimin Rhizobiyal türleri birbirinden ayırdığı belirlenmiştir. Buna karşın 16S rDNA dizileri veri tabanlarından indirilen ve filogenetik analizlerde *R. etli* ile ilişkili olarak bulunan (bkz. Şekil 4.15-18) USDA2667 ve PEPSM15 gibi izolatların yine sanal RFLP uygulamalarında *R. phaseoli*'ye ait RFLP şablonunu verdiği belirlenmiştir. *R. etli* ve *R. phaseoli* tip suşları *HinfI*, *MspI*, *NdeII* restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde tamamen aynı RFLP şablonunu vermekte, buna karşın *CfoI*'de ise bir varyasyon bulunmaktadır. *R. phaseoli* *CfoI* ile kesildiğinde 334 pb, 280 bp, 278 bp, 172 bp, 135 bp, 115 bp, 99 bp ve 45 bp'lik 8 bant oluşturmakta, buna karşın *R. etli*'de ise 278 ve 172 bp'lik iki bant yerine 450 bp'lik tek bir bant görülmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi *R. etli* (CFN-42) tip suşu hariç bu türle ilişkili çıkan izolatlar 16S rDNA PZR-RFLP denemelerinde *R. phaseoli*'ye ait şablonu vermiştir. Bu izolatlara ait 16S rDNA dizileri hizalandığında

323'üncü bazında bir transversiyon nokta (C→G) mutasyonu meydana geldiği ve ekstra bir *CfoI* kesme noktası olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde bu çalışmadan elde edilen izolatlarda da bu durum gözlenmiştir. Tip suşlar ve veri tabanından indirilen *R. etli* ve *R. phaseoli* izolatları ile yapılan denemelerde *PstI* enziminin bu iki türü net şekilde ayırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle, *R. phaseoli* 16S rDNA PZR-RFLP şablonu gösteren örnekler için *R. etli* ayırımı yapabilmek üzere Laguerre ve ark. (1994) tarafından önerilen *CfoI*, *HinfI*, *MspI*, *NdeII* restriksiyon enzim setine ek olarak *PstI* enzimi de kullanılmıştır. Analizler sonucunda fasulye'den izole edilen 30 Rhizobiyal örneğin 8 tanesinin *R. etli*, 6 tanesinin *R. phaseoli* ve yukarıda belirtildiği gibi 16 tanesinin ise *R. leguminosarum* ile benzer 16S rDNA PZR-RFLP şablonu oluşturduğu belirlenmiştir.

16S rDNA PZR-RFLP analizleri sonucunda oluşturulan gruplar içerisinde seçilen temsilci izolatlar için 16S rDNA dizilemeleri yapılmış ve 1220 bp'lik hizalanmış bir bölge üzerinden filogenetik analizler yürütülmüştür. Rhizobiyal türlere ait tip suşlar ile yapılan hizalamalar sonucunda 16S rDNA'nın dizisi belirlenen bölgesi dışında kalan yaklaşık 250 bp'lik bölgesinin *Rhizobium* cinsi içerisindeki türler arasında çok büyük oranda korunduğu dolayısıyla da sistematik anlamda bilgi verici olmadığı belirlenmiştir.

Bu güne kadar bakla ve bezelye ile simbiyotik birliktelik kuran kök nodül bakterilerinin biyolojik çeşitliliklerini belirlemeye yönelik moleküler tabanlı çok sayıda çalışma bulunmamaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi *R. leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*) bakla ve bezelye'yi de içerisine alan Viciae kabilesindeki bitkilerin (*Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus*) doğal simbiyontudur (Laguerre ve ark., 2003). Bu güne kadar *Rlv*, Hollanda, İngiltere, Fas, Kanada, İspanya (Van Berkum ve ark., 1995), Fransa (Laguerre ve ark., 2003), Ürdün (Mutch ve ark., 2003), İtalya (Moschetti ve ark., 2005), Çin (Tian ve ark., 2007), Peru (Santillana ve ark., 2008) ve Mısır'ı (Van Berkum ve ark., 1995; Shamseldin ve ark., 2009) kapsayan dünyanın farklı ülkelerinde yetiştirilen bakla bitkilerinden ve ABD, Kore, Çin, Peru, İtalya, Finlandiya, Yugoslavya da yetiştirilen bezelye bitkilerinden (Van Berkum, ve ark., 1995; Laguerre ve ark., 2003; Moschetti ve ark., 2005; Kwon ve ark., 2005; Santillana ve ark., 2008; Yang ve ark., 2008) rapor edilmiştir. Bu çalışmada 16S rDNA filogenilerinden elde edilen sonuçlar, Türkiye'nin Orta Karadeniz Bölgesinde de tıpkı dünyanın genelinde olduğu gibi bakla ve bezelye'nin yaygın mikro simbiyontunun *Rlv* olduğunu ortaya koymuştur. Oluşturulan NJ (Şekil 4.15), ML (Şekil 4.16) ve MP (Şekil 4.17-18) ağaçlarında bakla

ve bezelye'den izole edilen örneklerin tamamı *R. leguminosarum* tip suşu (USDA 2370) ve diğer *R. leguminosarum* izolatları ile ilişkili çıkmıştır.

Bu bölümün ilk kısmında da açıklandığı gibi yapılan çalışmalar *Rlv* popülasyonları içerisindeki özel genotiplerin (popülasyon alt grupları) *Viciae* kabilesi içerisindeki belirli konukçu türlerini (veya tersi olarak belirli konukçu türlerinin belirli *Rlv* genotiplerini) tercih ettiğini ortaya koymuştur. Bu seçilimin özellikle Bakla da görüldüğü ve bu bitkiden izole edilen *Rlv* izolatlarının diğer *Rlv* izolatlarından ayrılabilceği belirtilmiştir (Hynes ve O'Connell, 1990; Van Berkum ve ark., 1995). Bu çalışmada da uygulanan nodülasyon testlerinden bu bulguları destekleyen veriler elde edilmiştir. Benzer şekilde 16S rDNA baz dizisi filogenisi de bu hipotezi destekleyen bir şablon ortaya koymuştur. Bu çalışmada Bakla'dan izole edilen bakterilerden CTG-35, CTG-301 ve CTG-308 dışındaki örneklerin tümü, Çin'den *Vicia* türlerinden (*V. faba*, *V. sativa*, *V. tibetica*) izole edilmiş izolatlar ile birlikte bir monofiletik grup oluşturmuş, bezelye ve fasulye'den izole edilen *R. leguminosarum* (CTG-205 ve CTG-403 hariç) izolatlarından ayrılmıştır. Bu ayrım ML (Şekil 4.16) ağaçında %83'lük Bootstrap değeri ile desteklenmiştir. Benzer şekilde NJ ve MP %50 Majority Rule Konsensüs ağacında da bu ayrım belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda nodülasyon testleri ile fenotipik olarak gösterilen *Rlv*-bakla özgüllüğü moleküler seviyede ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur.

16S rDNA baz dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizlerde, bu çalışmada bakla ve bezelye'den izole edilen CTG-35 ve CTG-74 izolatlarının dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilen bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinden izole edilmiş *R.leguminosarum* örneklerine göre daha atasal bir karakter gösterdiği ve Çin'den izole edilmiş CCBAU85025 izolatı ile birlikte *R. leguminosarum* içerisindeki (*Viciae* ana soy hattı) en ilkel alt grubu (*VcIII*) oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca, oluşturulan filogenetik ağaçlarda *R. leguminosarum* içerisinde gözlenen alt grupların hepsinde (Şekil 4.15-18) bu çalışmada elde edilen izolatlara ait örneklerin bulunması da bölgemizde bulunan *R. leguminosarum* izolatlarının çok yüksek bir tür içi varyasyona sahip olduğunu göstermiştir. Türkiye, bakla ve bezelye bitkileri için olası bir gen merkezi veya dünyaya yayılmalarındaki temel rotalardan birisidir (Davies ve ark., 1985; Mutch ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda Rhizobiyal izolatların konukçu tohumları üzerinde farklı lokalitelere taşınabildiği gösterilmiştir (Perez-Ramirez ve ark., 1998; Alvarez-Martinez ve ark., 2009). Rhizobiyal türlerin konukçuları ile birlikte

konukçunun gen merkezinde evrimleştiği ve bu noktadan dünyaya yayıldığı, ayrıca türlerin gen merkezlerinde en yüksek genetik çeşitliliği gösterdiği hipotezleri göz önüne alınırsa (Martinez-Romero ve Caballero-Mellado, 1996), bu çalışmada elde edilen veriler dünya genelinde bakla ve bezelye ile simbiyotik birliktelik kuran *R/v* izolatlarının bir şekilde Türkiye'nin de içerisinde bulunduğu Orta Doğu kökenli olabileceğini yani bu bölgeden, bakla ve bezelye tohumları üzerinde veya farklı yollarla dünyaya yayılmış olabileceğini ortaya koymaktadır.

Fasulye pek çok Rhizobiyal tür ile etkin bir biçimde nodül oluşturan göreceli olarak hoş görülmesi bir konukçudur (Andrade ve ark., 2002). Bu türlerin sayısı yapılan yeni araştırmalar sonucu her geçen yıl daha da artmaktadır. Bu çalışmada elde edilen fasulye izolatları içerisinde üç farklı 16S rDNA PZR-RFLP şablonu belirlenmiş ve bu şablonları temsilen seçilen izolatlar için 16S rDNA dizilemeleri yapılmıştır. Yapılan filogenetik analizlerde bu izolatların *R. leguminosarum*, *R. etli* ve *R. phaseoli* türleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15-18). Fasulye bitkisi Güney Amerika kökenlidir ve *R. etli* bv. *phaseoli* bu kıtada gerek yabani gerekse de kültüre alınmış fasulye bitkilerinden yaygın olarak izole edilmiştir. Bu sonuç *R. etli*'nin fasulye ile birlikte bu bölgede beraber evrimleştiği hipotezini doğrulamıştır (Silva ve ark., 2003; Aguilar ve ark., 2004). 16. yüzyıl da Amerika'nın keşfinden sonra fasulye tohumları ticaret yoluyla dünya geneline yayılmış ve *R. etli* izolatları da tohumlar ile birlikte taşınmıştır. Perez-Ramirez ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada *R. etli* izolatlarının *P. vulgaris* testasında doğal olarak taşınabildiklerini belirlemişlerdir. Benzer şekilde *R. etli* bu dönemlerde Güney Amerika ile ticari ilişkileri bulunan Fransa ve Avusturya gibi Avrupa ülkelerinden ve bu ülkelerin uzun süre sömürgesi olarak kalmış Orta Afrika, Senegal, Gambiya, Tunus, Mısır, Etiyopya ve Ürdün gibi Afrika ve Orta Doğu ülkelerinden de izole edilmiştir (Laguerre ve ark., 1993; Tjahjoleksono, 1993; Sessitsch ve ark. 1997; Diouf ve ark., 2000; Mhamdi ve ark., 2002; Beyene ve ark., 2004; Tamimi ve Young, 2004; Mnasri ve ark., 2007; Shamseldin ve Werner, 2007)

Daha önce de belirtildiği gibi Evliya Çelebi'nin seyahatnamesinde yemeklik baklagiller içerisinde fasulye'den bahsetmemesi bu bitkinin yurdumuzda yaklaşık 250 yıllık bir geçmişinin olduğunu işaret etmektedir (Şehirli, 1988). Bu çalışmada fasulye'den izole edilen bakteriler içerisinde *R. etli* ve *R. phaseoli* izolatlarının bulunması bu bitkinin ülkemize Batı Avrupa veya Afrika üzerinden taşınarak gelmiş olabileceğini göstermektedir.

Bu bölgede yetiştirilen fasulye bitkilerinden *R. etli* ve *R. phaseoli*'ye ek olarak *R. leguminosarum* izolatları da izole edilmiştir. Bu türün Ordu ve Amasya illerinin genelinde yaygın olduğu, buna karşın Samsun ilinde iç kesimlerde yayılış gösterdiği, Sinop ilinde ise muhtemelen bulunmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmada fasulye'den elde edilen *R. leguminosarum* izolatları ABD'den *Trifolium sp*'den izole edilen ATCC 14480 izolatı ile benzer bir 16S rDNA haplotipi göstermiş ve Amerika kıtasından tanımlanan diğer *R. leguminosarum* izolatlarından (USDA 2370, USDA 2671 ve PEVF01) daha atasal bir karakter oluşturmuştur. Bu durum *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*'nin Avrupa kökenli bir izolat olduğu ve ticaret yoluyla veya farklı yollarla Amerika'ya daha sonradan taşındığı hipoteziyle uyumaktadır.

Rhizobia içerisinde, kimerik 16S rDNA gen dizilerinin varlığına ve *Mesorhizobium* türleri arasında 16S rDNA'nın tam kopya olarak transfer edildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Eardly ve ark., 1996; Sullivan ve ark., 1996). Bu bulgular Rhizobia'nın 16S rDNA'ya bağlı filogenilerinin yanıltıcı olabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle Rhizobia içerisindeki evrimsel ve ekolojik ilişkilerin daha detaylı bir biçimde anlaşılabilmesi için olabildiği kadar çok genin analiz edilmesi gerekmektedir (Turner ve Young, 2000). Bu amaçla son yıllarda yapılan çalışmalarda Rhizobiyal izolatlar arasındaki ilişkilerin ortaya konması için *atpD*, *recA*, *gsI*, *gsII*, gibi temel metabolik yol genleride kullanılmaktadır (Turner ve Young, 2000; Gaunt ve ark., 2001). Yapılan bu çalışmada da filogenetik analizler için 16S rDNA'ya ek olarak DNA rekombinasyon ve onarım sisteminin bir kısmını kodlayan *recA* geni kullanılmıştır. Bu konuda yapılan ilk ve en kapsamlı çalışmada, Eisen (1995) α -, β -, γ -, δ - ve ε -*Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, yüksek GC içeriğine sahip Gram pozitifler ve *Deinococcus-Thermus* grubunun 16S rDNA ve *recA* gen dizilerini uzaklık ve MP algoritmaları ile analiz etmiş ve her iki genin bir biri ile genel olarak uyumlu olduğunu bulmuştur. Ayrıca bu genlerin yakın, orta ve uzak ilişkili organizmaların ilişkilendirilmesinde benzer ayırım gücüne sahip olduğunu belirtmişlerdir. Gaunt ve ark. (2001) farklı Rhizobiyal cins ve türleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında da benzer bir sonuç elde etmişler, Rhizobia içerisinde *recA* ve *atpD* gen filogenilerinin 16S rDNA ile benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen izolatlara ait *recA* gen filogenisi (Şekil 4.20-23) bazı istisna izolatlar hariç (CTG-407 ve CTG-416) genel anlamda 16S rDNA filogenisi (Şekil 4.15-18) ile benzerlik göstermiştir ve bu bağlamda mevcut literatürler ile

uyumludur. Bu istisna izolatlarından CTG-407 ve CTG-416, 16S rDNA filogenisinde bakla ve bezelye'den izole edilen Rhizobiyal izolatlar (*R. leguminosarum*) ile aynı monofiletik grup içerisinde yer almışlar, buna karşın *recA* filogenisinde ise bu izolatlardan tür düzeyinde farklılık gösteren, nispeten uzak ilişkili bir monofiletik grup oluşturmuşlardır. Bu durum farklı şekillerde açıklanabilir:

- Bir *R. leguminosarum* olan, CTG-407, CTG-416 ve CCBAU43229 (*V. faba*, Çin)'un ortak atasına ait *recA* geni diğer *R. leguminosarum* izolatlarından (ve aynı izolatın 16S rDNA geninden) bağımsız bir evrimsel yol izlemiş ve bu gen için ayrı bir soy hattı oluşturmuştur.
- Bu izolatlar *Rhizobium* cinsi içerisinde yeni ve tanımlanmamış bir türü oluşturmaktadır, fakat genomu içerisinde *R. leguminosarum*'dan lateral transfer ile elde edilmiş bir 16S rDNA kopyası vardır.
- Bu izolatlar birer *R. leguminosarum* izolatıdır fakat genomlarında lateral transfer ile yeni ve tanımlanmamış bir Rhizobiyal türden elde edilmiş bir *recA* kopyası taşımaktadırlar.

Daha önce de açıklandığı gibi mevcut çalışmalar gerek genel anlamda bakteriler (Eisen, 1995), gerekse de özel olarak Rhizobia (Gaunt ve ark., 2001) içerisinde 16S rDNA ve *recA* genleri arasında benzer bir evrimsel sürecin işlediğini ve bu genler arasında filogenetik anlamda bir uyum bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla aynı izolata ait 16S rDNA ve *recA* genleri arasında bu izolatlarda olduğu gibi büyük bir uyumsuzluk daha önce rapor edilmemiştir. Bu nedenle birinci hipotez mevcut bilgiler ışığında oldukça zayıftır. Bu güne kadar *Rhizobium* cinsi içerisinde 16S rDNA'nın farklı türler arasında tam kopya olarak transfer edildiğine dair bir kayıt bulunmamaktadır. Buna karşın bu durum bir başka Rhizobiyal cins olan *Mesorhizobium* da gösterilmiştir (Sullivan ve ark., 1996). Dolayısıyla bu bulgu bu tip transferlerin *Rhizobium* cinsi içerisindeki türler arasında da olabileceğini işaret etmektedir. Bu çalışmada CTG-407, CTG-416 ve CCBAU43229 izolatlarının 16S rDNA ve *recA* genleri kullanılarak yapılan ILD testinde, bu izolatların söz konusu genleri arasında bir uyumsuzluğun ($p=0.036$) varlığı gösterilmiştir. Bu sonuç bu genlerden bir tanesinin lateral transfer ile farklı bir Rhizobiyal gruptan geldiği hipotezini net bir biçimde desteklemektedir. Bu nedenle ikinci ve üçüncü hipotezler ilkinde oranla daha olasıdır.

Yukarıdakine benzer bir durum fasulye'den izole edilen CTG-423 ve CTG-430 izolatlarında da gözlemlenmiştir. Bu izolatlar 16S rDNA filogenilerinde *R. etli* (CFN 42) tip suşu ile benzerlik göstermişler, buna karşın *recA* filonilerinde ise *R. phaseoli* tip suşu ile aynı monofiletik grup içerisinde yer almışlardır. Bu sonuç yine lateral transfer olasılığını akla getirmiştir. Bu durumu gözlemlemek amacıyla yapılan ILD testinde yine bir uyumsuzluk belirlenmiştir ($p=0.005$). Bu sonuç *R. etli* ve *R. phaseoli* türleri arasında bir lateral gen transferinin (16S rDNA veya *recA*) gerçekleştiğini işaret etmektedir. Elde edilen bu sonuçlar *Rhizobium* cinsine ait farklı türler arasındaki lateral gen transferlerine dair ilk kanıtlardır.

16S rDNA ağaçlarındaki ve *recA* ağaçlarındaki ana soy hatları genel olarak karşılaştırıldığında bu grupların aynı Rhizobiyal izolatları içerdiği görülür. Dolayısıyla bu iki gen daha önce Eisen (1995) ve Gaunt ve ark. (2001)'da belirtildiği gibi tür ve daha üstü kategorilerde uyum göstermektedir. Buna karşın tür içi veya popülasyonlar seviyesinde değerlendirildiğinde, bu iki gen arasında böylesi bir uyumdan bahsetmek oldukça güçtür. 16S rDNA filogenisinde *Viciae* soy hattı içerisindeki alt gruplardan sadece CTG-23, CTG-40, CTG-59, CTG-68, CTG-303, CCBAU03058'in oluşturduğu alt grup *recA* filogenetik ağaçlarında da net olarak ilişkili çıkmış ve diğer izolatlardan ayrılmıştır. Buna karşın bu grup dışında kalan izolatlar arasındaki ilişkiler iki gende birbirinden farklılık göstermiştir. Örneğin *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ile aynı 16S rDNA haplotipine sahip olan CTG-13, CTG-202 ve CTG-318 *recA* haplotipleri açısından *R. leguminosarum* bv. *trifolii*'den tamamen farklı bir haplotip ve tür içi soy hattı göstermiştir.

Elde edilen bu sonuçlar Rhizobia içerisinde özellikle yakın ilişkili türler veya aynı türe ait izolatlar arasında konjugasyon, transdüksiyon veya transposable elementler ile lateral gen transferlerinin olabildiğini, bu nedenle de izolatlar arasındaki filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde ortaya konabilmesi için birden fazla gen ile çalışılmasının gerekliliğini bir kez daha ortaya koymuştur.

Oluşturulan *recA* ağaçlarında özellikle bakla (CTG-35, -301, -308 haricinde) izolatları Çin'den, Almanya'dan ve Kanada'dan izole edilmiş bakla izolatları ile birlikte oldukça homojen bir grup oluşturmuş, bezelye izolatları ise *Rlv* içerisindeki farklı popülasyonlar (soy hatları) içerisinde bakla izolatları ile birlikte yer almıştır. Bu bulgu daha önce bakla-*Rlv* arasında 16S rDNA filogenisi ile de gösterilen özgünlüğü desteklemektedir. Ancak *R. leguminosarum* bv. *viciae* popülasyonları ve konukçusu

arasındaki bu özgünlüğün net biçimde ortaya konması için daha fazla sayıda genin (housekeeping genleri ve 16S-23S rDNA ITS) karşılaştırmalı olarak analiz edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Daha önce belirtildiği gibi Nod faktörlerinin *N*-asetil oligosakkarit omurgalarının sentezi tüm *Rhizobia* da bulunan *nodABC* genleri tarafından kontrol edilir. Bu genlerden *nodA*, kitin oligosakkarit omurgaya bir açıl zincirinin transferinden sorumlu NodA proteinini kodlar ve bu surette Nod faktör yapısını, konukçu çeşitliliğini belirler ve bu nedenle iyi bir nodülasyon markörüdür (Suominen ve ark., 2001; Chaintreuil ve ark., 2001). Yukarıda belirtilen Nod genleri filogenetik açıdan birbirleriyle ve azot fiksasyon genleriyle (*nifH*) benzerlik gösterirken 16S rDNA'dan oldukça farklıdırlar. Simbiyotik genler ile housekeeping genler arasındaki bu filogenetik uyumsuzluğun nedeni simbiyotik genlerinin lateral olarak transfer edilebilmeleridir (Haukka ve ark., 1998; Laguerre ve ark., 2001). Yapılan çeşitli çalışmalar *nod* gen filogenilerinin konukçu bitki (leghemoglobin proteini) filogenileri ile benzerlik gösterdiğini, bu nedenle *nod* genlerinin evriminin bir şekilde konukçu baklagil evrimi ile bağlantılı olabileceği ortaya koymuştur (Ueda ve ark., 1995). Bu çalışmada elde edilen verilerde bu sonuçları destekler niteliktedir. *NodA* baz dizileri kullanılarak oluşturulan NJ (Şekil 4.25), ML (Şekil 4.26), MP Strict Konsensüs (Şekil 4.27) ve MP %50 Majority Rule Konsensüs (Şekil 4.28) ağaçlarına bakıldığında, *nodA* haplotiplerinin bakteri türünden ziyade, bakterinin izole edildiği konukçu ile ilişkili olduğu görülmektedir. Örneğin bu çalışmada fasulye'den izole edilen ve 16S rDNA ve *recA* filogenileri sonucunda *R. leguminosarum* (CTG-403, CTG-407, CTG-416, CTG-427), *R. etli* (CTG-423, CTG-430) ve *R. phaseoli* (CTG-412, CTG-419) türleri ile ilişkili bulunan izolatların, CTG-412 hariç hepsinin aynı *nodA* haplotipini taşıdığı belirlenmiştir. CTG-412 izolatu da *nodA* haplotipi açısından diğer fasulye izolatları ile aynı monofiletik grup (*Phaseolus* ana soy hattı) içerisinde yer almıştır.

Yine bu çalışmada bakla ve bezelye'den izole edilen ve 16S rDNA ve *recA* filogenileri ile *R. leguminosarum* olarak teşhis edilen *Rhizobia* izolatları *nodA* haplotipleri açısından, veri tabanlarından indirilen ve dünyanın farklı bölgelerindeki bakla ve bezelye'lerden izole edilmiş *R. leguminosarum* izolatları ile monofiletik bir grup (*Viciae* ana soy hattı) oluşturmuştur (Şekil 4.25-28). Bu grup *Trifolium* ve *Phaseolus* türlerinden izole edilmiş *R. leguminosarum* izolatlarının *nodA* haplotiplerinden tamamen farklı bir soy hattı oluşturmuştur. Bu sonuçlar açık şekilde

nodülasyon ile ilgili genlerin (*nod*, *nol*, *noe*) daha önceki çalışmalarla da ortaya konduğu gibi (Ueda ve ark., 1995; Haukka ve ark., 1998; Laguerre ve ark., 2001) kromozomal genlerden (dolayısıyla bakteri türlerinden) bağımsız olduğunu, bu genlerin daha ziyade konukçu ile paralel bir evrimsel süreç geçirdiğini ve bu genlerin, dolayısıyla da bu genleri taşıyan plazmitlerin (*pSym*) lateral transferler ile farklı Rhizobiyal türler arasında dağıldığını net olarak ortaya koymaktadır.

Segovia ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada Avrupa kökenli *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* izolatlarının, Güney Amerika kökenli bir tür olan *R. etli*'ye ait *pSym* plazmitinin horizontal transfer ile bir *R. leguminosarum*'a geçmesi sonucunda oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Şekil 4.25-28'de görülebileceği gibi Avrupa'dan fasulye'den izole edilen Rhizobiyal izolatların tamamı *R. etli* tip suşu olan CFN 42 ile aynı veya benzer *nodA* haplotipleri taşımaktadır. Aynı şekilde bu çalışmada izole edilen ve *R. leguminosarum*, *R. etli* ve *R. phaseoli* olarak tanımlanan izolatlar da bu tip suş ile benzer bir *nodA* haplotipi taşımaktadır. Bu sonuç iki olası senaryoyu ortaya koymaktadır:

- Bu çalışmada izole edilen *R. etli* ve *R. phaseoli* izolatları Güney Amerika kökenlidir ve tahminen 250 yıl kadar önce Avrupa veya Afrika üzerinden fasulye tohumları ile taşınarak bölgemize gelmiş ve bitki ile birlikte yayılmışlardır. Daha sonra bölgemizde var olan yerel *R. leguminosarum* izolatlarına lateral transfer ile Sym plazmitlerini aktararak bu izolatları fasulye'yi nodüle edebilen *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* haline getirmişlerdir.
- İkinci senaryo ise *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* izolatlarının da tıpkı *R. etli* izolatları gibi bölgemize tohumlar ile muhtemelen Avrupa'dan gelmesidir.

Bu çalışmada fasulye'den izole edilen *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* izolatları (CTG-403, CTG-407, CTG-416, CTG-427) yine bu çalışmada bakla ve bezelye'den izole edilen *R. leguminosarum* bv. *viciae* izolatlarından bazıları ile aynı 16S rDNA ve *recA* haplotiplerini göstermiştir. Bu sonuçlar fasulye'den izole edilen bu *R. leguminosarum* izolatlarının muhtemelen yerel izolatlar olduklarını ve fasulye'yi nodüle edebilme özelliğini (ilgili Sym plazmidi) daha sonradan kazandıklarını ortaya koyan ilk senaryoyu daha muhtemel hale getirmektedir.

Daha önce belirtildiği gibi, yapılan çalışmalar *Rlv* popülasyonları içerisindeki özel genotiplerin *Viciae* kabilesi içerisindeki belirli konukçu türlerini tercih ettiğini ortaya koymuştur. Bu özgünlük Bakla (*V. faba*) için özellikle belirtilmiş ve bu bitkiden izole edilen *Rlv* izolatlarının diğer *Rlv* izolatlarından ayrılabilmesi öne sürülmüştür (Hynes ve O'Connell, 1990; Van Berkum ve ark., 1995). Bu çalışmada yapılan nodülasyon testleri, 16S rDNA baz dizisi filogenisi ve kısmen de *recA* filogenisi bakla ve *Rlv* arasındaki bu özgünlüğü teyit etmiştir. *NodA* geninin daha önce açıklandığı gibi konukçu tipini belirleme de kilit bir rol oynaması bu geni bakla'yı tercih eden *Rlv* izolatlarını diğer *Rlv* izolatlarından (bu çalışmada bezelye'den izole edilen *Rlv* izolatları) ayırmak konusunda teorik olarak ideal bir markör yapmıştır. Yapılan *nodA* baz dizisi filogenilerinde *Rlv* izolatları arasında (*Viciae* ana soy hattı) üç farklı alt soy hattı (*VcI*, *VcII*, *VcIII*) belirlenmiştir. Fakat beklenmedik şekilde bu soy hatlarının ayırımında konukçu tipinin bir rol oynamadığı, hatta bazı bakla ve bezelye izolatlarının aynı *nodA* haplotipini taşıdığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu bulgu, *Rlv* popülasyonları ve konukçuları arasındaki tercihin simbiyotik elementler kadar genomik alt yapıya da bağlı olduğu var sayımını desteklemektedir (Laguerre ve ark., 2003).

Daha önce belirtildiği gibi azot fiksasyon genleri içerisinde en çok çalışılan nitrojenazın küçük alt birimi; dinitrojenaz redüktazın yapısal geni olan *nifH* dir. Çeşitli araştırmacılar yaptıkları çalışmalarla farklı bakteri türlerinden ve özel olarak farklı Rhizobiyal türlerden bu geni klonlamış, DNA dizilerini belirlemiş ve filogenetik ilişkilerini ortaya koymuşlardır. Bu araştırmacılardan bazıları *pSym* üzerinde bulunan *nifH*'nin kromozomal bir gen olan 16S rDNA ile benzer bir evrimsel süreç geçirdiğini dolayısıyla da filogenetik olarak benzerlik gösterdiklerini belirtmişlerdir (Hennecke ve ark., 1985; Young 1992; Dobert ve ark., 1994). Bununla birlikte diğer bazı araştırmacılar bu durumun aksini belirtmişlerdir. Bu çalışmalardan birinde Eardy ve ark. (1992) *pSym*'in izolatlar arasında horizontal olarak transfer edilebileceğini dolayısıyla da, *pSym* genlerinin filogenilerinin kromozomal gen filogenileri ile uyuşmasının beklenmemesi gerektiğini belirtmişlerdir. Bu konudaki diğer bir çarpıcı çalışma Haukka ve ark. (1998) tarafından *Mesorhizobium* ve *Sinorhizobium* cinsleri üzerinde yapılmış ve sonuçta *nifH* filogenisinin 16S rDNA'ya değil diğer bir *pSym* geni olan *nodA*'ya benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Benzer bir çalışmada Laguerre ve ark. (2001) farklı Rhizobiyal cinslere ait izolatlardan elde ettikleri *nifH* gen dizilerinin *nodC* ile

benzer filogeni gösterdiğini, buna karşın 16S rDNA'dan farklı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada analizleri yapılan kromozomal ve plazmid (*pSym*) genlerinin filogenetik ağaçları karşılaştırıldığında *nodA* ve *nifH* ağaçlarının birbirleri ile neredeyse tamamen uyduğu görülmektedir. Bakla ve bezelye izolatlarından birbiri ile aynı *nodA* haplotipini taşıyan izolatların paralel olarak aynı *nifH* haplotiplerini de taşıdıkları belirlenmiştir. Buna bağlı olarak *nodA* ve *nifH* filogenilerinde gözlenen *Viciae* ana soyhattı ve bu soy hattı içerisindeki alt gruplar (*VcI* ve *VcII*) birkaç istisna hariç (CTG-13 ve CTG-114) büyük oranda uyuşmuştur. *NodA* ve *nifH* filogenilerindeki bu benzerlik *Phaseolus* ana soy hattında da bire bir gözlenmiştir. Yukarıda belirttiğimiz gibi bu çalışmada fasulye'den izole ettiğimiz ve *R. leguminosarum*, *R. etli* ve *R. phaseoli* olarak tanımladığımız örnekler *R. etli* tip suşu (CFN42) ve diğer bir Amerika kökenli *R. etli* izolatu olan CIAT 652 ile benzer *nodA* haplotipi göstermiş ve bu izolatlar ile aynı monofiletik grup içerisinde yer almıştır. Benzer şekilde bu izolatların *nifH* genleri de CFN42 ve Amerika kökenli iki *R. etli* bv. *phaseoli* izolatu (CIAT652 ve Olivia-4) ile aynı çıkmıştır. Bütün bu sonuçlar *pSym* genleri olan nodülasyon (*nod*) ve azot fiksasyon (*nif*) genlerinin birbirleri ile paralel evrimleştiklerini ve kromozomal genlerden bağımsız olduklarını savunan teoriyi desteklemektedir. Ayrıca *nodA* ve *nifH* genlerinden elde edilen veriler, fasulye tohumları veya benzeri yollarla bölgemize taşınmış Güney Amerika kökenli *R. etli* izolatlarına ait *Sym* plazmidlerin bölgemizdeki yerel izolatlara da lateral transfer ile geçtiğini net olarak ortaya koymaktadır. Bu veriler yukarıda belirtilen teorilerden ikincisi ile tam olarak uyumaktadır, yani *pSym* üzerinde bulunan genler (nodülasyon ve azot fiksasyon genleri gibi) farklı Rhizobiyal türler arasında lateral olarak transfer edilebildiğinden kromozomal genlerden bağımsız olarak birbirleri ile paralel bir evrim geçirirler.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, Samsun, Ordu, Amasya ve Sinop illerinde yetiştirilen bakla (*V. faba*), bezelye (*P. sativum*) ve fasulye (*P. vulgaris*) bitkilerinin kökleriyle simbiyotik birliktelik oluşturan Rhizobia grubu bakterilerin biyolojik çeşitliliklerinin belirlenmesi ve içerdikleri nodülasyon (*nod*, *nol*, *noe*) ve azot fiksasyon (*nif*, *fix*) genlerinin tiplendirilerek bu genlerin dolayısıyla simbiyotik plazmidlerin (*pSym*) izolatlar arasındaki olası lateral dağılımlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler genel olarak şu şekilde özetlenebilir:

- *Rhizobium leguminosarum* gibi yüksek oranda eksopolisakkarit oluşturan izolatlardan genomik DNA izolasyonunda geleneksel DNA izolasyon yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle Rhizobiyal çalışmalarda CTAB/NaCl yöntemi saf genomik DNA elde etmek için daha kullanışlı bir yöntemdir.
- Yaptığımız 16S rDNA PZR-RFLP analizleri, Rhizobiyal çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *HinfI*, *MspI*, *NdeII*, *CfoI* restriksiyon enzim setinin (Laguerre ve ark., 1994) *R. etli* ve son yıllarda tanımlanan *R. phaseoli* türlerini ayırmada yetersiz kaldığını göstermiştir. Bu nedenle özellikle fasulye'den izole edilen Rhizobiyal izolatlar ile yapılan çalışmalarda bu enzimlere ek olarak söz konusu iki türü ayırdığını belirlediğimiz *PstI* restriksiyon enzimi de kullanılmalıdır.
- Yapılan 16S rDNA PZR-RFLP analizleri ve 16S rDNA baz dizisi filogenisi sonucunda, Orta Karadeniz Bölgesinde bakla ve bezelye bitkilerinin kökleri ile simbiyotik birliktelik oluşturan Rhizobiyal izolatların *R. leguminosarum* türü ile ilişkili izolatlar oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan nodülasyon testleri ve *nodA* filogenileri bu izolatların genomlarında, Viciae kabilesi içerisindeki bitkiler ile simbiyotik birliktelik kurmalarını sağlayan uygun simbiyotik plazmidi (*pSym*) içerdiklerini de göstermiştir. Dolayısıyla bu izolatlar *Rhizobium leguminosarum* türünün üç biyolojik varyetesinden (bv. *viciae*, bv. *trifolii*, bv. *phaseoli*) biri olan *R. leguminosarum* bv. *viciae*'ye aittirler.
- Yapılan nodülasyon testleri bakla'dan izole edilen izolatların bezelye'de, bezelye'den izole edilen izolatların ise bakla'da aktif ancak nispeten küçük nodüller oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuç özellikle bakla'nın belirli Rhizobiyal izolatlar ile seçici bir etkileşim içerisinde girdiği hipotezi ile uyumludur. Bakla ve belirli *Rlv* izolatları arasındaki bu özgünlük bu çalışmada

16S rDNA ve *recA* gen filogenileri ile de büyük oranda gösterilmiştir ve bu sonuçlar bakla ve *Rlv* arasındaki özgüllüğe dair ilk moleküler kanıtlardır. Buna karşın beklenilenin aksine *nodA* filogenisinde *Rlv* içerisinde konukçuya bağlı bir alt soyhattı ayrımı gözlenmemiştir. Bu sonuç özgünlüğün beklenenin aksine nodülasyon genlerinden değil daha önce bazı araştırmacılarında ileri sürdüğü gibi kromozomal genlerden kaynaklanabileceği olasılığını beraberinde getirmiştir. Konukçu ve izolatlar arasındaki bu tip ikili ilişkiler, gerek dünyada gerekse de yurdumuzda ekolojik tarım fikri çerçevesinde sıklıkla denenilen Rhizobia inokülasyon (doğal azot gübreleri) çalışmalarının başarıya ulaşmasında büyük önem taşımaktadır. Bu güne kadar yapılan denemelerden istenilen düzeyde başarılı sonuçlar elde edilememesinin temel nedeni konukçu ve bakteriler arasındaki bu tip olası özgünlük ilişkilerinin göz ardı edilmesi olabilir. Bu nedenle bakla ve belirli *Rlv* izolatları arasındaki bu seçici özgüllüğün doğasını anlayabilmek için daha detaylı deneyler yapılmalıdır, bu şekilde ülkemiz ve bölgemiz için büyük ekonomik önem taşıyan bu baklagillere yönelik daha aktif dolayısıyla da kimyasal azot gübrelerine alternatif olabilecek inokülanlar üretilebilir.

- Bu çalışmada seçilen bir diğer konukçu bitki olan fasulye'den izole edilen Rhizobiyal izolatlar ise 16S rDNA PZR-RFLP analizleri ve 16S rDNA baz dizisi filogenisi sonucunda *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* bv. *phaseoli* ve *R. phaseoli* olmak üzere üç farklı tür ile ilişkili bulunmuşlardır.
- Fasulye izolatlarının coğrafik olarak dağılımına bakıldığında: ***R. phaseoli*** türünün sadece Samsun ve Sinop illerinin kıyı ilçelerinde yayılış gösterdiği buna karşın ***R. etli***'nin Sinop ve Amasya'nın genelinde; ***R. leguminosarum***'un ise Samsun ilinin iç ilçelerinde ve Ordu ve Amasya'nın genelinde yayılış gösterdiği belirlenmiştir. Bu şablon belirli Rhizobiyal türlerin belirli coğrafik bölgeleri tercih ettiği ve bu bölgelerde yayılış gösterdiği fikrini akla getirmektedir. Yapılacak ek çalışmalarla bu dağılım tablosunun rastgelemi gerçekleştiği yoksa belirli edafik ve coğrafik faktörlerin bir sonucu mu olduğu araştırılmalıdır. Bu amaçla bu üç türün (*R. etli* bv. *phaseoli*, *R. phaseoli* ve *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*) farklı ekolojik koşullara tutunma ve rekabet konusundaki yetenekleri; farklı sıcaklık, pH ve tuz derecelerinde gelişim testleri gibi fizyolojik testler ve bu fizyolojik koşullarda nodülasyon rekabeti gibi ekolojik testler yapılarak

araştırılmalıdır. Bu testler sonucunda belirlenecek ekolojik valensi yüksek türlerden veya izolatlardan inokulant denemeleri yapılabilir.

- 16S rDNA haplotipleri *R. etli* tip suşu (CFN-42) ile ilişkili çıkan fasulye izolatları; CTG-423 ve CTG-430, yapılan *recA* filogenisinde *R. phaseoli* tip suşu (ATCC10004) ile daha yakın ilişkili olarak bulunmuşlardır. Bu sonuçlar üzerine olası bir lateral transferi araştırmak için yapılan ILD testinde, bu izolatların 16S rDNA ve *recA* genlerinin birbirleri ile uyumsuz oldukları bulunmuştur ($p<0.05$). Dolayısıyla bu iki Rhizobiyal tür arasında (*R. etli* ve *R. phaseoli*) kromozomal genler (16S rDNA veya *recA*) lateral olarak transfer edilebilmektedir. Buna benzer bir durum yine fasulye izolatları olan CTG-407 ve CTG-416'da da gözlemlenmiştir. Bu izolatlar 16S rDNA filogenisinde diğer *R. leguminosarum* (bv. *viciae*, bv. *trifolii*) izolatları ile ilişkili çıkmalarına karşın, *recA* filogenisinde Çin'den bakla'dan izole edilmiş CCBAU43229 izolatı ile birlikte, bilinen Rhizobiyal türlerden farklı yeni bir monofiletik grup oluşturmuşlardır. Yine olası bir lateral transferi araştırmak için yapılan ILD testinde bu izolatların 16S rDNA ve *recA* genlerinin birbirleri ile uyumsuz oldukları bulunmuştur ($p<0.05$). Dolayısıyla *R. etli* ve *R. phaseoli* türlerinde olduğu gibi *R. leguminosarum* ve tanımlanmamış bu yeni olası Rhizobiyal tür arasında da 16S rDNA veya *recA* genlerinin lateral olarak transfer edildiği belirlenmiştir. Benzer bir durum daha önce *Mesorhizobium* cinsi içerisinde gözlemlense de *Rhizobium* cinsi için bu tespit bir ilktir. Dolayısıyla bu sonuçlar Rhizobia içerisinde 16S rDNA ve *recA* gibi kromozomal genlerin lateral transferlerinin yaygın olduğunu ve bu nedenle de bakteri teşhis ve sınıflandırmasında çeşitli araştırmacıların daha önceden belirttiği gibi tek gen filogenilerinin yanıltıcı olabileceğini birkez daha ortaya koymaktadır. Bu surette bakterilerin teşhis ve sınıflandırılmalarında genomun genelini temsil edecek şekilde olabildiği kadar çok genin kullanılmasının gerekliliği *Rhizobium* cinsi için net bir şekilde ortaya konmuştur.
- Yapılan *nodA* filogenisi fasulye'den izole edilen *R. leguminosarum*, *R. etli* ve *R. phaseoli* izolatlarının (CTG-412 hariç) tamamen aynı *nodA* haplotipini (dolayısıyla aynı *pSym*) taşıdığını göstermiştir. Bu sonuç bu bölgede yayılış gösteren bu üç farklı Rhizobiyal tür arasında *Sym* plazmidlerin transfer edildiğinin de açık şekilde ortaya koymaktadır. Ayrıca bu haplotip Meksika'dan

fasulye'den tanımlanan *R. etli* tip suşunun (CFN42) *nodA* haplotipi ile aynı monofiletik grup içerisinde yer almıştır.

- *nodA* filogenisine benzer şekilde *nifH* filogenisinde de bu çalışmada elde edilen isolatlar Güney Amerika kökenli *R. etli* ile aynı (CTG-403, CTG-407, CTG-419, CTG-423, CTG-427, CTG-430) veya benzer (CTG-412, CTG-416) haplotip göstermişlerdir ve bir monofiletik grup oluşturmuşlardır. Bu sonuçlar Orta Karadenizde yayılım gösteren ve fasulye'yi nodüle eden Rhizobiyal isolatların veya en azından bu isolatların taşıdıkları simbiyotik plazmidlerinin Güney Amerika kökenli *R. etli* ile olan ilişkisini dolayısıyla dış kaynaklı olduklarını ve bir kez daha ortaya koymuştur.
- Bu çalışmadan elde edilen veriler Sym plazmid genleri olan nodülasyon ve azot fiksasyon genlerinin paralel evrimleştiklerini ve kromozomal genlerden bağımsız olduklarını net olarak ortaya koymuştur. Sym plazmidlerin dolayısıyla da bu plazmidler üzerinde bulunan *nod* ve *nif* genlerinin farklı Rhizobiyal türler arasında lateral olarak transfer edilebildiği göz önünde bulundurulursa bu sonuç doğaldır. Bu genlerin evrimlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için konukçu bitki genleri ile karşılaştırmalı filogenetik analizler yapılmalıdır.
- Daha önce belirtildiği gibi fasulye Güney Amerika kökenlidir ve bu bölgedeki yaygın simbiyontu *R. etli*'dir. Buna ek olarak bu çalışmada elde edilen diğer bir tür olan *R. phaseoli*'de Güney Amerika fasulye isolatlarından tanımlanmıştır. Elde ettiğimiz veriler bu türlerin bölgemizde Sinop ilinin genelinde, Samsun'un kıyı ilçelerinde ve kısmende Amasya'da yayılım gösterdiğini işaret etmektedir. Buna karşın Ordu ilinin tamamında ve Samsun'un iç ilçelerinde ise bu türlerin yerini *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* türü almıştır. Bu sonuç fasulye bitkisinin Türkiye'ye olası giriş noktalarından birisinin yüzyıllardan beri deniz ticaretinin yoğun olarak yapıldığı liman şehirleri olan Sinop ve Samsun illeri olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla tohumlar ile taşınan orijinal türler (*R. etli* ve *R. phaseoli*) bu bölgelerde yayılım göstermiş ancak iç bölgelere ve doğuya gidildikçe bu isolatlardan simbiyotik plazmidlerini lateral transfer ile alan yerel *R. leguminosarum* isolatları baskın tür olarak ortaya çıkmıştır.
- Bu güne kadar Türkiye'de yayılım gösteren kök nodül bakterilerinin (Rhizobia) biyolojik çeşitliliğini belirlemeye yönelik, günümüz modern bakteri sistematığının kullanıldığı bir çalışma yapılmamıştır. Bu surette bu çalışma

Türkiye de bir ilktir ve bu nedenle de bakla, bezelye ve fasulye'den izole edilmiş Rhizobiyal türlere yönelik Türkiye'den ilk kayıtları barındırmaktadır.

7. LİTERATÜRLER

- Aguilar, O.M, Lopez, M.V., Riccillo, P.M., Gonzalez, R., Pagano, M., Grasso, D.H., Pühler, Favelukes, G., 1998. Prevalence of the *Rhizobium etli*-Like Allele in Genes Coding for 16S rRNA among the Indigenous Rhizobial Populations Found Associated with Wild Beans from the Southern Andes in Argentina. *Applied And Environmental Microbiology*, 64 (9), 3520-3524.
- Aguilar, O.M., Riva, O., Peltzer, E., 2004. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101 (37), 13548-13553.
- Akaike, H., 1974. A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19, 716-723.
- Akçin, A., 1988. *Yemeklik Dane Baklagiller*. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 377 s, Konya.
- Alvarez-Martinez, E.R., Valverde, A., Ramirez-Bahena, M.H., Garcia-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P.F., Santillana, N., Zuniga, D., Peix, A., Velazquez, E., 2009. The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Archives of Microbiology*, 191, 659–668.
- Amarger, N., Bours, M., Revoy, E., Allard, M.R., Laguerre, G., 1994. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant and Soil*, 161, 147-156.
- Amarger, N., Macheret, V., Laguerre G., 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 996-1006.
- Andrade, D. S., Murphy, P. J. And Giller, K. E., 2002. The Diversity of *Phaseolus*-Nodulating Rhizobial Population Is Altered by Liming of Acid Soils Planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8), 4025-4034.

- Anyango, B., Wilson, K.J., Beynon, J.L., Giller, K.E., 1995. Diversity Of Rhizobia Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Two Kenyan Soils with Contrasting pHs. *Applied And Environmental Microbiology*, 61 (11), 4016-4021.
- Ballows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., 1991. *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, s 2672, New York, ABD.
- Beattie, G.A., 2006. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. *In Plant Associated Bacteria*. (Editör: S.S. Gnanamanickam), s: 1-57, Springer, Hollanda.
- Beck, D., Duc, G., 1991. Improving N₂-fixation in faba bean: *Rhizobium* inoculation and N nutrition. *Options Méditerranéennes*, 10, 97-103.
- Beebe, S., Rengifo, J., Gaitan, E., Duque, M.C., Tohme, J., 2001. Diversity and Origin of Andean Landraces of Common Bean. *Crop Science*, 41, 854-862.
- Benson, D.R., 1982. Isolation of Frankia Strains from Alder Actinorhizal Root Nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(2), 461-465.
- Berge O, Lodhi A, Brandelet G, Santaella, C., Roncato, M.A., Christen, R., Heulin, T., Achouak, W., 2009. *Rhizobium alarii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and nonlegume rhizospheres. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 367-72.
- Beyene, D., Kassa, S., Ampy, F., Asseffa, A., Gebremedhin, T., Van Berkum, P., 2004. Ethiopian soils harbor natural populations of rhizobia that form symbioses with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Archives of Microbiology*, 181, 129-136.
- Bouzar, H., Jones, J.B., 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1023-1026.
- Brewin, N.J., 2004. Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium-Legume Symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23 (4), 293-316.
- Buttery, B.R., Park, S., Van Berkum, P., 1997. Effects of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar and Rhizobium strain on plant growth, seed yield and nitrogen content. *Canadian Journal of Plant Science*, 77, 347-351.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., 2006. *Biyoloji*. Palme Yayıncılık, 1247 s, Ankara
- Casida, L.E.J., 1982. *Ensifer adhaerens* gen nov. sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32, 339-345.

- Chaintreuil, C., Boivin, C., Dreyfus, B., Giraud, E., 2001. Characterization of the common nodulation genes of the photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. ORS285 reveals the presence of a new insertion sequence upstream of *nodA*. FEMS Microbiology Letters, 194, 83-86.
- Chen, W.X., Yan, G.H., Li, J.L., 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 38, 392-397.
- Chen, W.X., Li, G.S., Qi, YI, Wang, E.T., Yuan, H.L., Li, J.L., 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. Isolated from the Root Nodules of *Astragalus sinicus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 275-280.
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., Li, Y., 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, 153-159.
- Chen, W.X., Tan, Z.Y., Gao, J.L., Li, Y., Wang, E.T., 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. International Journal of Systematic Bacteriology, 47, 870-873.
- Chen, W.M., James, E.K., Prescott, A.R., Kierans, M., Sprent, J.I., 2003. Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. Molecular Plant Microbe Interactions, 16, 1051-1061.
- Chen, W.M., James, E.K., Coenye, T., Jui-Hsing, C.J.H., Barrios, E., de Faria, S.M., Elliott, G.N., Sheu, S.Y., Sprent, J.I., Vandamme, P., 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1847-1851.
- Chen, W.M., de Faria, S.M., James, E.K., Elliott, G.N., Lin, K.Y., Chou, J.H., Shih, S.Y., Cnockaert, M., Sprent, J.I., Vandamme, P., 2007. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 1055-9105.

- Chen, W.M., de Faria, S.M., Chou, J.H, James, E.K., Elliott, G.N., Sprent, J.I., Bontemps, C., Young, J.P.W., Vandamme, P., 2008. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2174-2179.
- Cousin, R., 1997. Peas (*Pisum sativum* L.). Field Crops Research, 53, 111-130.
- Çiftçi, C.Y., 2006a. *Yemeklik Tane Baklagiller. Doçentlik, Doktora, Yüksek Lisans Tez Çalışmaları ve Özetleri (1938-2005)*. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı, 165 s, Ankara.
- Çiftçi, C.Y., 2006b. *Yemeklik Dane Baklagiller. Araştırma Makaleleri ve Özetleri (1939-2005)*. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı, 248 s, Ankara.
- Darlu, P., Lecointre, G., 2002. When Does the Incongruence Length Difference Test Fail? Molecular Biology and Evolution, 19 (4), 432-437.
- Davies, D.R., Berry, G.J., Heath, M.C., Dawkins, T.C.K., 1985. Pea (*Pisum sativum* L.). In *Grain Legume Crops*. (Editörler: R.J. Summerfield, E.H. Roberts), s: 147-199, William Collins Sons Co. Ltd, Londra.
- Davis, E.O., Evans, I.J., Johnston, A.W.B., 1988. Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. Molecular and General Genetics, 212 (3), 531-535.
- De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M.D., Dreyfus, B., Kersters, K., 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, 44, 715-733.
- De Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck, U., Coopman, R., Collins, M.D., Kersters, K., Dreyfus, B., Gillis, M., 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. International Journal of Systematic Bacteriology, 42, 93-96.

- De Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M.R., Lindström, K., Dreyfus, B., Gillis, M., 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 369-382.
- Debelle, F., Plazanet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Prome, J.C. ve Denarie, J., 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. Molecular Microbiology, 22 (2), 303-314.
- Debelle, F., Moulin, L., Mangin, B., Denarie, J. ve Boivin, C., 2001. Nod Genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. Acta Biochimica Polonica, 48 (2), 359-365.
- Diouf, A., de Lajudie, P., Neyra, M., Kersters, K., Gillis, M., Martinez-Romero, E., Gueye, M., 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 159-170.
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A. and Kim, C, 1987. The *nifA* Gene of *Rhizobium meliloti* Is Oxygen Regulated. Journal of Bacteriology 169 (7), 3217-3223
- Dixon, R. and Kahn, D, 2004. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. Nature Reviews Microbiology, 2, 621-631.
- Dobert, R.C., Breil, B.T., Triplett, E.W., 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. Molecular Plant Microbe Interaction, 7, 564-572.
- Downie, J.A. ve Johnston, A.W.B, 1988. Nodulation of legumes by *Rhizobium*. Plant Cell and Environment, 11, 403-412.
- Doyle, J.J., 1994. Phylogeny of the legume family: An approach to Understanding the Origins of Nodulation. Annual Review of Ecology and Systematics, 25, 325-349.
- Dreyfus, B., Garcia, J.I., Gillis, M., 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. International Journal of Systematic Bacteriology, 38, 89-98.

- Durmaz, R., 2001. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri, 242 s, İstanbul.
- Eardly, B.D., Young, J.P.W., Salender, R.K., 1992. Phylogenetic Position of *Rhizobium* sp. Strain Or 191, a Symbiont of Both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, Based on Partial Sequences of the 16S rRNA and *nifH* Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (6), 1809-1815.
- Eardly, B.D., Wang, F.S., Van Berkum, P., 1996. Corresponding 16S rRNA gene segments on *Rhizobiaceae* and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. *Plant Soil*, 186, 69-74.
- Eardly, B.D., Nour, S.M., Van Berkum, P., Selander, R.K., 2005. Rhizobial 16S rDNA and *dnaK* Genes: Mosaicism and the Uncertain Phylogenetic Placement of *Rhizobium galegae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (3), 1328-1335.
- Eisen, J.A., 1995. The RecA Protein as a Model Molecule for Molecular Systematic Studies of Bacteria: Comparison of Trees of RecAs and 16S rRNAs from the Same Species. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 1105-1123.
- Elkan, G., 1987. *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*. Marcel Dekker, 440 s, New York, ABD.
- Elliott, G.N., Chou, J.H., Chen, W.M., Bloemberg, G.V., Bontemps, C., Martinez-Romero, E., Velazquez, E., Young, J.P., Sprent, J.I., James, E.K., 2009. Burkholderia spp. are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. *Environmental Microbiology*, 11 (4), 762-778.
- Evans, J., Gregory, A., Dobrowolski, N., Morris, S.G., O'Connor, G.E., Walleace, C., 1996. Nodulation of Field-Grown *Pisum sativum* and *Vicia faba*: Competitiveness of inoculant Strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Determined by an indirect Competitive ELISA Method. *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (2), 247-255.
- Fani, R., Gallo, R., Lio, P., 2000. Molecular Evolution of Nitrogen Fixation: The Evolutionary History of the *nifD*, *nifK*, *nifE* and *nifN* Genes. *Journal of Molecular Evolution*, 51, 1-11.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10, 315-319.

- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics*, 5 (2), 163-166.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E., Downie, J.A., 1993. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by nodX, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Molecular Microbiology*, 10 (2), 351-360.
- Fischer, H.M., 1994. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. *Microbiological Reviews*, 58 (3), 352-386.
- 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., Chen, W.X., 2004. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2003-2012.
- Garcia-Fraile, P., Rivas, R., Willems, A., Peix, A., Martens, M., Martinez-Molina, E., Mateos, P.F., Velazquez, E., 2007. *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 844-848.
- Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigotier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A. and Young, J.P.W., 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of Rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2037-2048.
- Gepts, P., Osborn, T.C., Rashka, K., Bliss, F.A., 1990. Phaseolin-protein Variability in Wild Forms and Landraces of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for Multiple Centers of Domestication. *Economic Botany*, 40 (4), 451-468.
- Germano, M. G., Menna, P., Mostasso, F. L. and Hungria, M., 2006. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of Bradyrhizobial strains from 33 legume species. *Internasyonel Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 217-229.

- Geurts, R., Heidstra, R., Hadri, A., Downie, J.A., Franssen, H., Kamen, A., Bisseling, T., 1997. Sym2 of Pea Is Involved in a Nodulation Factor-Perception Mechanism That Controls the Infection Process in the Epidermis. *Plant Physiology*, 115, 351-359.
- Geurts, R., Bisseling, T., 2002. *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell*, 239-249.
- Ghosh, W., Roy, P., 2006. *Mesorhizobium thiogangeticum* sp. nov., a novel sulfuroxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 91-97.
- Gonzalez, V., Bustos, P., Ramirez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernandez-Gonzalez, I., Hernandez-Celis, J.C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodriguez, O., Flores, M., Cevallos, M.A., Collado-Vides, J., Romero, D., Davila, G., (2003). The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biology*, 4 (6), 1-13.
- Grange, L., Hungria, M., 2004. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1389-1398.
- Gu, C.T., Wang, E.T., Tian, C.F., Han, T.X., Chen, W.F., Sui X.H., Chen, W.X., 2008. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1364-1368.
- Guan, S.H., Chen, W.F., Wang, E.T., Lu, Y.L., Yan, X.R., Zhang, X.X., Chen, W.X., 2008. *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana spp.* in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2646-2653.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Serie*, 41, 95-98.

- Hall, B.G., 2004. *Phylogenetic Trees Made Easy A How to Manual*. Sinauer Associates, Inc., 221 s, Sunderland, Massachusetts, ABD.
- Han, T.X., Han, L.L., Wu, L.J., Chen, W.F., Sui, X.H., Gu, J.G., Wang, E.T., Chen, W.X., 2008a. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2610-2618.
- Han, T.X., Wang, E.T., Wu, L.J., Wen, F.C., Gu, J.G., Gu, C.T., Tian, C.F., Chen, W.X., 2008b. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1693-1699.
- Han T.X., Wang E.T., Han, L.L., Chen, W.F., Sui, X.H., Chen, W.X., 2008c. Molecular Diversity and Phylogeny of Rhizobia Associated with Wild Legumes Native to Xinjiang, China. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 287-301.
- Haukka, K., Lindstrom, K. and Young, J. P. W., 1998. Three Phylogenetic Groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2), 419-426.
- Hennecke, H., Kaluza, K., Thöny, B., Fuhrmann, M., Ludwig, W., Stackebrandt, 1985. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Archives of Microbiology*, 142, 342-348.
- Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.V., Requena, N., Amarger, N., Martinez-Romero, E., Olivares, J., Sanjuan, J., 1999. At least five Rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 87-97.
- Hirsch, P. ve Müller, M., 1985. *Blastobacter aggregatus* sp. nov., *Blastobacter capsulatus* sp. nov., and *Blastobacter denitrificans* sp. nov., new budding bacteria from fresh water habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, 281-286.
- Hirsch, A.M., 1999. Role of Lectins (and Rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 320-326.
- Hirsch, A.M., Lum, M.R. ve Downie, J.A., 2001. What makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiology*, 127, 1484-1492.

- Hou, B.C., Wang, E.T., Li, Y., Jia, R.Z., Chen, W.F., Gao, Y., Dong, R.J., Chen, W.X., 2009a. *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Medicago archiducis-nicolai* Vassilcz grown in Tibet, China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 3051-3057.
- Hou, B.C., Wang, E.T., Li, Y., Jia, R.Z., Chen, W.F., Man, C.X., Sui, X.H., Chen, W.X., 2009b. Rhizobial Resource Associated with Epidemic Legumes in Tibet. Microbial Ecology, 57, 69-81.
- Hunter, W.J., Kuykendall, L.D., Manter, D.K., 2007. *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite-reducing alpha-Proteobacteria isolated from a bioreactor. Current Microbiology, 55, 455-460.
- Hynes, M.F., O'Connell, M.P., 1990. Host Plant Effect on Competition Among Strains of *Rhizobium leguminosarum*. Canadian Journal of Microbiology, 36, 864-869.
- Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J.J., 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology, 32, 378-380.
- Jarvis, B.D.W., Downer, H.L., Young, J.P.W., 1992. Phylogeny of Fast-Growing Soybean-Nodulating Rhizobia Supports Synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and Assignment to *Rhizobium fredii*. International Journal of Systematic Bacteriology, 42 (1), 93-96.
- Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., 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, 895-898.
- 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. International Journal of Systematic Microbiology, 32, 136-139.
- Jordan, D.C., 1984. Family III. Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I.* (Editörler: N.R. Krieg, J.G. Holt), s: 234-242, Williams & Wilkins, Baltimore, ABD.

- Jourand, P., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, N., Dreyfus, B., de Lajudie, P., 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume rootnodule- forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2269-2273.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Shusei Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S., (2002). Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, 9, 189-197.
- Kaplan, L., Lynch, T.F., 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in Archaeology: AMS Radiocarbon Dates and Their Significance for Pre-Colombian Agriculture. *Economic Botany*, 53 (3), 261-272.
- Krishnan, H.B., Bennett, J.O., 2006. Rhizobium-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation. *In Plant-Associated Bacteria*. (Editör: Gnanamanickam, S.S.), s: 57-105, Springer, Hollanda.
- Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E., Udell, S.E., 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 501-505.
- Kuykendall, L.D., Young, J.M., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H., 2005. Genus I. Rhizobium. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. (Editör: G.M. Garrity). s: 325-340, Springer, ABD.
- Küçük, Ç., Kivanç, M., Kınacı, E., 2006. Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from Bean. *Turkish Journal of Biology*, 30, 127-132.
- Kwon ,S.W., Park, J.Y., Kim, J.S., Kang, J.W., Cho, Y.H., Lim, C.K., Parker, M.A., Lee, G.M., 2005. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 263-270.

- Lafay, B., Bullier, E., Burdon, J.J., 2006. Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Parasponia* (Ulmaceae) do not constitute a separate coherent lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1013-1018.
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S.I., Casartelli, R.R., Amarger, N., 1992. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 412-419.
- Laguerre, G., Fernandez, M.P., Edel, V., Normand, P., Amarger, N., 1993. Genomic Heterogeneity among French *Rhizobium* Strains Isolates from *Phaseolus vulgaris* L. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43 (4), 761-767.
- Laguerre, G., Allard, M., Revoy, F. and Amarger, N., 1994. Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (1), 56-63.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. and Amarger, N., 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Microbiology*, 147, 981-993.
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M.R., Amarger, N., 2003. Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* for Nodulation of Host Legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 2276-2283.
- Laranjo, M., Branco, C., Soares, R., Alho, L., Carvalho, M.D.E., Oliveira, S., 2002. Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 1043-1050.
- Laranjo, M., Alexandre, A., Rivas, R., Velazquez, E., Young, J.P.W., Oliveira, S., 2008. Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 391-400.
- Lechevalier, M.P., 1994. Taxonomy of the Genus *Frankia* (*Actinomycetales*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(1), 1-8.

- Lin, D.X., Chen, W.F., Wang, F.Q., Hu, D., Wang, E.T., Sui, X.H., Chen, W.X., 2009. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1919-1923.
- Lindström K., 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 365-367.
- Lindström, K., Kokko-Gonzales, P., Terefework, Z., Rasanen, L.A., 2006. Differentiation of Nitrogen-fixing Legume Root Nodule Bacteria (Rhizobia). *In Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis*. (Editör: Cooper, J.E.), s: 236-258, CABI Publishing, İngiltere.
- Lodwig, E.M., Hosie A.H.F, Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J.A., Poole, P.S., 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*, 422, 722-726.
- Lu, Y.L., Chen, W.F., Han, L.L., Wang, E.T., Chen, W.X., 2009. *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 3006-3011
- Lu, Y.L., Chen, W.F., Han, L.L., Zhang, X.X., Chen, W.X., Han, S.Z., 2009. *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* spp. growing in Yunnan Province of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, DOI: 10.1099/ijs.0.007393-0, Baskıda.
- Luyten, E. ve Vanderleyden, J., 2000. Survey of genes identified in *Sinorhizobium meliloti* spp., necessary for the development of an efficient symbiosis. *European Journal of Soil Biology*, 36, 1-26.
- Malek, W., Sajnaga, E., 1999. Current Taxonomy of the Rhizobia. *Acta Microbiologica Polonica*, 48 (2), 109-122.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, 1019 s, ABD.
- Madigan, M.T. ve Martinko, J.M., 2010. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*. Palme Yayıncılık, 992 s, Ankara.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, N.Y.

- Martinez, E., Pardo, M.A., Palacios, R., Cevallos, M.A., 1985. Reiteration Of Nitrogen Fixation Gene Sequences and Specificity of *Rhizobium* in Nodulation and Nitrogen Fixation in *Phaseolus uulgaris*. Journal of General Microbiology, 131, 1779-1786
- 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, E., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Davila, G., Palacios, R., 1988. *Rhizobium phaseoli*: A molecular genetics view. Plant and Soil, 108, 179-184.
- Martinez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P., Pardo, M.A., 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 417-426.
- Martinez-Romero, E. ve Caballero-Mellado, J., 1996. *Rhizobium* Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. Critical Reviews in Plant Sciences, 15(2), 113-140.
- Martinez-Romero, E., 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. Plant and Soil, 252, 11-23.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes. Trends in Microbiology, 17 (10), 458-466.
- McInroy, S. G., Campbell, C. D., Haukka, K. E., Odee, D. W., Sprent, J. I., Wang, W. J., Young, J. P. W., Sutherland, J. M., 1999. Characterisation of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using BiologTM and partial 16S rDNA sequencing. FEMS Microbiology Letters, 170, 111-117.
- Mhamdi, R., Jebara, M., Aouani, M.E., Ghrir, R., Mars, M., 1999. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. Biology and Fertility of Soils, 28, 313-320.
- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M., Amarger, N., 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. FEMS Microbiology Ecology, 41, 77-84.

- Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Elarbi, M., Mhamdi, R., 2007. Salt-tolerant rhizobia isolates from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. *mediterranense*) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, 187, 79-85.
- Mnasri, B., Badri, Y., Saidi, S., de Lajudie, P., Mhamdi, R., 2009. Symbiotic diversity of Ensifer meliloti strains recovered from various legume species in Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, 32 (8), 583-592.
- Moreira, F.M.S., Haukka, K., Young J.P.W., 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, 7, 889-895.
- Moreira, F.M.S., Cruz, L., de Faria, S.M., 2006. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 197-206.
- Moschetti, G., Peluso, A.L., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe, O., Defez, R., 2005. Use of nodulation patterns, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 619-631.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C., 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*. 2000, 411, 948-50. Erratum in: *Nature*, 412:926.
- Moulin, L., Bena, G., Boivin-Masson, C., Stepkowski, 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 720-732.
- Muehlbauer, F.J., Cubero, J.I., Summerfield, R.J., 1985. Lentil (*Lens culinaris* Medic.). *In Grain Legume Crops*. (Editors: R.J. Summerfield, E.H. Roberts), s: 147-199, William Collins Sons Co. Ltd, Londra.
- Mutch, L.A., Tamimi, S.M., Young, J.P.W., 2003. Genotypic characterisation of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: a comparison with UK isolates. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 709-714.
- Mutch, L.A., Young, J.P.W., 2004. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. *Molecular Ecology*, 13, 2435-2444.

- Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A., Howieson, J.G., 2009. *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 2140-2147.
- Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Junzo-Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi, S., Abe, M., 2004. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. Journal of General and Applied Microbiology, 50, 17-27.
- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B.D., Suomalainen, S., Paulin, L., Xiaoping Zhang, X., Gillis, M., Lindström, K., 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 49, 1359-1368.
- Nour, S.M., Fernandez, M.P., Normand, P., Cleyet-Marel, J.C., 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Systematic Bacteriology, 44, 511-522.
- Nour, S.M., Cleyet-Marel, J.C., Normand, P., 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, 640-648.
- Oldroyd, G.E.D ve Downie, J.A., 2004. Calcium, Kinases And Nodulation Signalling In Legumes. Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 5, 567-576.
- Oldroyd, G.E.D. ve Downie, J.A., 2008. Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. Annual Review of Plant Biology, 59, 519-546.
- Ophel, K. ve Kerr, A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. For Strains of *Agrobacterium* biovar 3 from Grapevines. International Journal of Systematic Bacteriology, 40 (3), 236-241.
- Öğütcü, H., Adıgüzel, A., Güllüce, M., Karadayı, M., Şahin, F., 2009. Molecular Characterization of *Rhizobium* strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from Hidg Altitudes in Erzurum-Turkey. Romanian Biotechnological Letters, 14 (2), 4294-4300.

- Özkoç, İ. ve Çakmakçı, L., 1992. Bazı Baklagil Tohumlarının *Rhizobium* Bakterileri İle Ön İnokülasyon Olanakları. Doğa-Turkish Journal of Biology, 16, 85-97.
- Özkoç, İ. ve Deliveli, M.H., 2001. In Vitro Inhibition of the Mycelial Growth of Some Root Rot Fungi by *Rhizobium leguminosarum* Biovar *phaseoli* Isolates. Turkish Journal of Biology, 25, 435-445.
- Peng, G., Yuan, Q., Li, H., Zhang, W., Tan, Z., 2008. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2158-2163.
- Perez-Ramirez, N.O., Rogel, M.A., Wang, E., Castellanos, J.Z., Martinez-Romero, E., 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. FEMS Microbiology Ecology, 26, 289-296.
- Pollack, R.A., Findlay, L., Mondschein, W. and Modesto, R. R., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. John Wiley & Sons Inc, 232 s, New York
- Posada, D., 2008. jModel test: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution, 25, 1253-1256.
- Quan, Z.X., Bae, H.S., Baek, J.H., Chen, W.F., Im, W.T., Lee, S.T., 2005. *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 2543-2549.
- Ramirez-Bahena, M.H., Garcia-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E., 2008. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58, 2484-2490.
- Ramirez-Bahena, M.H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodriguez-Navarro, D.N., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Willems, A., Velazquez, E., 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 1929-1934.

- Rasolomampianina, R., Bailly, X., Fetiaron, R., Rabevohitra, R., Béna, G., Ramarason, I., Raherimandimby, M., Moulin, L., de lajudie, P., Dreyfus, B., Avare, J.C., 2005. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to α - and β -Proteobacteria. *Molecular Ecology*, 14, 4135-4146
- Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N.S., Mateos, P.F., Dazzo, F.B., Kroppenstedt, R.M., Martínez-Molina, E., Gillis, M., 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, 47-53.
- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J.L., 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov. isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1271-1275.
- Romdhane, S. B., Nasr, H., Samba-Mbaye, R., Neyra, M., Ghorbal, M.H., de Lajudie, P., 2006. Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 436-445.
- Rome, S., Fernandez, M.P., Brunel, B., Normand, P., Cleyet-Marel, J.C., 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 972-980.
- Sahgal, M., Johri, B.N., 2003. The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*, 84 (1), 43-48.
- Sahgal, M., Johri, B.N., 2006. Taxonomy of rhizobia: Current status. *Current Science*, 90 (4), 486-487.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A new Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4), 406-425.
- Samba, R.T., de Lajudie, P., Gillis, M., Neyra, M., Barreto, M.M.S., Dreyfus, B., 1999. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal. *Symbiosis*, 27, 259-268.
- Sambrook, J ve Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Santillana, N., Ramirez-Bahena, M.H., Garcia-Fraile, P., Velazquez, E., Zuniga, D., 2008. Phylogenetic diversity based on *rrn*, *atpD*, *recA* genes and 16S-23S intergenic sequence analyses of Rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Archives of Microbiology*, 189, 239-247.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D., Young, J.M., 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology*, 49, 155-179.
- Scholla, M.H., Elkan, G.H., 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a Fast-Growing Species That Effectively Nodulates Soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 484-486.
- Schultze, M., Kondorosi, A., 1998. Regulation of Symbiotic Root Nodule Development. *Annual Review of Genetics*, 32, 33-57.
- Scott, D.B., Young, C.A., Collins-Emerson, J.M., Terzaghi, E.A., Rockman, E.S., Lewis, P.E., Pankhurst, C.E., 1996. Novel and Complex Chromosomal Arrangement of *Rhizobium loti* Nodulation Genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9 (3), 187-197.
- Scott, K.F., Rolfe, B.G., J., Shine, J., (1983). Biological nitrogen fixation: primary structure of the *Rhizobium trifolii* iron protein gene. *DNA*, 2 (2), 149-155.
- Segovia, L., Young, J.P.W., Martinez-Romero, E., 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* Bivar Phaseoli Type I Strains as *R. etli* sp. nov. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43 (2), 374-377.
- Sessitsch, A., Hardarson, G., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., 1997. Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. *Molecular Ecology*, 6, 601-608.
- Shamseldin, A., Werner, D., 2007. Presence of *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* and *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* in Egyptian soils. *World Journal of Microbiol Biotechnol*, 23, 285-289.
- Shamseldin, A., Muhammad, E.S., Sadowsky, M.J., An, C.S., 2009. Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) by analysis of *nodC*, ARDRA and rDNA sequence analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 45-53.

- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L.E., Martinez-Romero, E., 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2), 884–893.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L.E., Souza, V., Martinez-Romero, E., 2005. Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Molecular Ecology*, 14 (13), 4033–4050.
- Singh, K.B., 1997. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research*, 53, 161–170.
- Singh, R.K., Mishra, R.P., Jaiswal, H.K., Kumar, V., Pandey, S.P., Rao, S.B., Annapurna, K., 2006. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. *Current Microbiology*, 52 (2), 117–122.
- Society for General Microbiology. *Rhizobium*, Root nodules and Nitrogen fixation <http://www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium.pdf> (18.12.2009)
- Somasegaran, P., Hoben, H. J., 1985. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. 367 s, USAID, ABD.
- Spaink, H.P., 2000. Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 257–288.
- Squartini, A., Struffi, P., Döring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velazquez, E., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Dazzo, F.B., Casella, S., Nuti, M.P., 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1267–1276.
- Sullivan, J.T., Eardy, B.D., Van Berkum, P., Ronson, C.W., 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2818–2825.
- Sullivan, J.T. ve Ronson, C.W., 1998. Evolution of Rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 5145–5149.

- Suominen, L., Roos, C., Lortet, G., Paulin, L., Lindström, K., 2001. Identification and Structure of the *Rhizobium galegae* Common Nodulation Genes: Evidence for Horizontal Gene Transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (6), 907-916.
- Swofford, D.L., 2003. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4 beta 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Şehirali, S., 1988. *Yemeklik Dane Baklagiller*. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, 435 s, Ankara.
- Tamimi, S.M., Young, J.P.W., 2004. *Rhizobium etli* is the dominant common bean nodulating rhizobia in cultivated soils from different locations in Jordan. *Applied Soil Ecology*, 26, 193-200.
- Tan, Z.Y., Kan, F.L., Peng, G.X., Wang, E.T., Reinhold-Hurek, B., Chen, W.X., 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 909-914.
- Tan, Z., Hurek, T., Vinuesa, P., Müller, P., Ladha, J.K., Reinhold-Hurek, B., 2001. Specific Detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* Strains Colonizing Rice (*Oryza sativa*) Roots by 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer-Targeted PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (8), 3655-3664.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevleri, 345 s, İstanbul.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Researches*, 25, 4876-4882.
- Tian, C.F., Wang, E.T., Han, T.X., Sui, X.H., Chen, W.X., 2007. Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. *Archives of Microbiology*, 188, 273-282.
- Tian, C.F., Wang, E.T., Wu, L.J., Han, T.X., Chen, W.F., Gu, C.T., Gu, J.G., Chen, W.X., 2008. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2871-2875.

- Tian, C.F., Young, J.P.W., Wang, E.T., Tamimi, S.M., Chen, W.X., 2010. Populationmixing of *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae nodulating Vicia faba: the role of recombinationand lateral gene transfer. FEMS Microbiology Ecology, 1-14.
- Tindall, B.J., Rossello-Mora, R., Buse, H.J., Ludwig, W., Kampfer, P., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 249–266.
- Toledo, I., Lloret, L., Martínez-Romero, E., 2003. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new sinorhizobium species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. Systematic and Applied Microbiology, 26, 54-64.
- Trevaskis, B., Colebatch, G., Desbrosses, G., Wandrey, M., Wienkoop, S., Saalbach, G. and Udvardi, M., 2002. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. Comperative and Functional Genomics, 3, 151-157.
- Trujillo, M.E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A.M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E., 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Applied and Environmental Microbiology, 71, 1318-1327.
- Turner, S.L., Young, J.P.W., 2000. The Glutamine Synthetases of Rhizobia: Phylogenetics and Evolutionary Implications. Molecular Biology and Evolution, 17 (2), 309-319.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N. ve Matsuguchi, T., 1995. Phylogeny of Sym Plasmids of Rhizobia by PCR-Based Sequencing of a *nodC* Segment. Journal of Bacteriology, 177 (2), 468-472.
- Valverde, A., Velazquez, E., Fernandez-Santos F, Vizcaino, N., Rivas, R., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Igual, J.M., Willems, A., 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 1985-1989.
- Valverde, A., Igual, J.M., Peix, A., Cervantes, E., Velazquez, E., 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 2631-2637.
- Van Berkum, P., Beyene, D., Vera, F. T. and Keyser, H. H., 1995. Variability among *Rhizobium* Strains Originating from Nodules of *Vicia faba*. Applied and Environmental Microbiology, 61 (7), 2649-2653.

- Van Berkum, P., Beyene, D., Eardly, B.D., 1996. Phylogenetic Relationship among *Rhizobium* Species Nodulating the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). International Journal of Systematic Bacteriology, 46 (1), 240-244.
- Van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T.A., Eardly, B.D., 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 13-22.
- Van Berkum, P., Eardly, B.D., 2002. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. Applied Environmental Microbiology, 68, 1132-1136.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.M., de Vos, P., Willems, A., 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Systematic Applied Microbiology, 25, 507-512.
- Vazquez, M., Davalos, A., De Las Penas, A., Sanchez, F., Quinto, C., 1991. Novel Organization of the Common Nodulation Genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli Strains. Journal of Bacteriology, 173 (3), 1250-1258.
- Velazquez, E., Igual, J.M., Willems A., Fernandez, M.P., Munoz, E., Mateos, P.F., Abril, A., Toro, N., Normand, P., Cervantes, E., Gillis, M., Martinez-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, 1011-1021.
- Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G., Brunel, B., Cleyet-Marel, J.C., 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 850-855.
- Vincent, J.M., 1970. *A manuel for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publications, 164 s, Oxford ve Edinburgh.
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M.J., Izaguirre-Mayoral, M.L., Bedmar, E.J., Martinez-Romero, E., 2005. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. Systematic and Applied Microbiology, 28 (8), 702-716.

- Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., 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, 569-75.
- Wang, E.T., van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X.H., Dorado, O., Chen, W.X., 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, 687-699.
- Wang, E.T., Rogel, M.A., Santos, G.L., Martínez-Romero, J., Cevallos, M.A., Martínez-Romero, E., 1999. *Rhizobium etli* bv. *mimosaei* a novel biovar isolates from *Mimosa affinis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1479-1491.
- Wang, E.T., van Berkum, P., Sui, X.H., Beyene, D., Chen, W.X., 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, 51-65.
- Wang, E.T., Tan, Z.Y., Willems, A., Fernández-López, M., Reinhold-Hurek, B., 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, 1683-1687.
- Wang, F.Q., Wang, E.T., Liu, J., Liu, J., Chen, Q., Sui, X.H., Chen, W.F., Chen, W.X., 2007. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1192-1199.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, P., Krichevsky, M. I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Trüper, 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 463-464.

- Wei, G.H., Wang, E.T., Tan, Z.Y., Zhu, M.E., Chen, W.X., 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 2231-2239.
- Wei, G.H., Tan, Z.Y., Zhu, M.E., Wang, E.T., Han, S.Z., Chen, W.X., 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1575-1583.
- Weisburg, W.G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J., 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173, 697-703.
- Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Munoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martinez-Romero, E., Toro, N. ve Gillis, M., 2003. Description of new *Ensifer* strain from nodules and proposal to transfer *Ensifer adherens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adherens* comb. Nov. Request for Opinion. International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1207-1217.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution. Microbiological Reviews, 51 (2), 221-271.
- Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan, H., 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. International journal of Systematic Microbiology., 45, 706-711.
- Yang, C.Y., Yang, J.K., Li, Y.G., Zhou, J.C., 2008. Genetic diversity of root-nodulating bacteria isolated from pea (*Pisum sativum*) in subtropical regions of China. Science in China Series C: Life Sciences, 51 (9), 854-862.
- Yao, Z.Y., Kan, F.L., Wang, E.T., Wei, G.H., 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, 2219-30.
- Yoon, J.H., Kang, S.J., Yi, H.S., Oh, T.K., Ryu, C.M., 2009. *Rhizobium soli* sp. nov., isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 1387-1393.

- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., 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, 89-103.
- 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, 2107-2110.
- Young, J.M., Kerr, A., Sawada, H., 2005. Genus II. *Agrobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. (Editor: G.M. Garrity). s: 325-340, Springer, ABD.
- Young, J.P.W., Johnston, A.W.B., Brewin, N.J., 1982. A Search for Peas (*Pisum stivum* L.) Showing Strain Specificity for Symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Heredity, 48 (2), 197-201.
- Young, J.P.W., 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In *Biological nitrogen fixation*. (Editorler: G. Stacey, R.H. Burris, and H.J. Evans), s: 43-86, Chapman and Hall, New York.
- Young, J.P.W., Haukka, K.E., 1996. Diversity and Phylogeny of rhizobia. New Phytologist, 133, 87-94.
- Young, J.P.W., Lisa C Crossman, L.S., Johnston, A.W.B, Nicholas R Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H., Wexler, M., Curson, A.R.J., Todd, J.D., Poole, P.S., Mauchline, T.H., East, A.K., Quail, M.A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabbinoiwitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S., Parkhill, J., (2006). The Genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biology, 7 (4), 1-20.
- Zakhia, F., De Lajudie, P., 2001. Taxonomy of Rhizobia. Agronomie, 21, 569-576.

- Zelwer, M., Daubin, V., 2004. Detecting phylogenetic incongruence using BIONJ: an improvement of the ILD test. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 687-693.
- Zhang, X.X., Guo, X.W., Terefework, Z., Paulin, L., Cao, Y.Z., Hu, F.R., Lindstrom, K. and Li, F.D., 1999. Genetic diversity among rhizobial isolates from field-grown *Astragalus sinicus* of Southern China. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 312-320.
- Zhang, X.X., Turner, S.L., Guo, X.W., Yang, H.J., Debelle, F., Yang, G.P., De Narie, J., Young, J.P.W., Li, F.D., 2000. The Common Nodulation Genes of *Astragalus sinicus* Rhizobia are Conserved despite Chromosomal Diversity. *Applied And Environmental Microbiology*, 66 (7), 2988-2995.
- Zurdo-Pineiro, J.L., Rivas, R., Trujillo, M.E., Vizcaino, N., Carrasco, J.A., Chamber, M., Palomares, A., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E., 2007. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 784-788.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Cem Tolga GÜRKANLI

Doğum Yeri: Erzurum

Doğum Tarihi: 19.04.1978

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Samsun Anadolu Lisesi- 1996

Lisans: O.M.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü- 2002

Yüksek Lisans: O.M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı- 2005

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: O.M.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2002-)

İletişim Bilgileri:

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Fen-Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü Kurupelit/Samsun

Tel.: 0533-5516378

E-mail: tolgag@omu.edu.tr