

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* TÜRÜ  
BAKTERİLERİN MISIRDA (*Zea mays* L.) PROTEİN  
İFADE PROFİLİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan  
Dilek GÖKÇEK**

**Danışman  
Prof. Dr. Semih YILMAZ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kasım 2020  
KAYSERİ**



**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* TÜRÜ  
BAKTERİLERİN MISIRDA (*Zea mays* L.) PROTEİN  
İFADE PROFİLİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan  
Dilek GÖKÇEK**

**Danışman  
Prof. Dr. Semih YILMAZ**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
Tarafından FLY-2020-10030 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**KASIM 2020  
KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Dilek GÖKÇEK



**YÖNERGEYE UYGUNLUK**

**“*Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* TÜRÜ BAKTERİLERİN MISIRDA (*Zea mays* L.) PROTEİN İFADE PROFİLİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI”** adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Hazırlayan**

Dilek GÖKÇEK

İmza

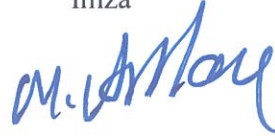
**Danışman**

Prof. Dr. Semih YILMAZ

**Tarımsal Biyoteknoloji ABD Başkanı**

Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

İmza



**Prof. Dr. Semih YILMAZ** danışmanlığında **Dilek GÖKÇEK** tarafından hazırlanan “*Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* Türü Bakterilerin Mısırdı (*Zea mays* L.) Protein İfade Profili Üzerine Etkisinin Araştırılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

... / ... / ...

### JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Semih YILMAZ .....

Üye : ..... ..

Üye : ..... ..

### ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve .....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.... /.../ .....

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tespitinde ve gerçekleştirilmesinde desteğini benden esirgemeyen, bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Semih YILMAZ'a ve tez çalışma sürecinde kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen Öğr. Gör. Güler TOPRAK'a teşekkür ederim.

Tezimin sera çalışma aşamaları ile yakından ilgilenen Öğr. Gör. Alim AYDIN'a ve ziraat mühendisi Emine ARIKAN'a çalışmamın her aşamasında yanımda bulunan ve desteğini benden esirgemeyen Gıda Yüksek Mühendisi Büşra ÇİĞDEM'e ve bu süreçte manevi destekçim olan Gülsüm COŞKUN'a teşekkür ederim.

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Biriminin FLY-2020-10030 nolu proje ile tezime verdiği destekten ötürü ve çalışmamı yürüttüğüm Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme ve beni sabırla destekleyen bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan annem Emine GÖKÇEK'e sonsuz teşekkür ederim.

Dilek GÖKÇEK

Kasım 2020 KAYSERİ

***Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* TÜRÜ BAKTERİLERİN MISIRDA  
(*Zea mays* L.) PROTEİN İFADE PROFİLİ ÜZERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dilek GÖKÇEK**

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2020  
Danışman: Prof. Dr. Semih YILMAZ**

**ÖZET**

Serbest yaşayan, bitki gelişimini teşvik eden ve biyolojik savaş ajanı olarak kullanılabilen PGPR'ler son 30 yıldan fazla süredir tarımda kullanılmaktadır. PGPR grubunda olan *Bacillus* türü bakterilerin bitkilere uygulanması hakkında yürütülen araştırmalarda bitkiler üzerinde önemli verim artışları olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasının amacı *Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* bakterilerinin önemli tahıl grubundan olan mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde verim, gelişim ve protein ifade profilinde oluşturduğu farklılıkların belirlenmesidir. Araştırmada ACC deaminaz, fosfataz ve siderofor taşıdığı bilinen yerel bakteriler mısır tohumlarına kaplama şeklinde uygulanmış ve bitki fiziksel gelişimi incelemeleri için verim parametreleri belirlenmiştir. Bitkilerin en üst kısımdaki taze yapraklarından protein ekstraksiyonu yapılmış SDS-PAGE ve 2D analizleri ile protein farklılıkları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda klorofil içeriği bakteri uygulanan mısır bitkilerinde kontrole göre önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ayrıca kök yaş ağırlıkları bakteri uygulanan mısır bitkilerinde kontrol bitkilerine göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Yine sürgün yaş ağırlıkları da bakteri uygulanan bitkilerde kontrol bitkilerine göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). SDS-PAGE ve 2D de *Bacillus* sp. KH16.2 (MH847787), *Bacillus thuringiensis* SY49.1 (MW197418) ve *Bacillus* sp. KH6.4 bakteri uygulamaları yapılan bitkilerde kontrole göre artış ve azalış yönünde ifade farklılıkları belirlenmiştir. Sonuç olarak mısır bitkisine uygulanan bakterilerin hem verim parametrelerinde hem de protein ifade profilinde farklılık oluşturduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Zea mays* L., SDS-PAGE, 2D

**INVESTIGATING THE EFFECT OF *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *B. thuringiensis* TYPE OF BACTERIA ON PROTEIN EXPRESSION PROFILE OF CORN (*Zea mays* L.)**

**Dilek GÖKÇEK**

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Master Thesis, November 2020  
Supervisor: Prof. Dr. Semih YILMAZ**

**ABSTRACT**

Plant growth promoting free living and biological warfare agents as PGPRs have been used in agriculture for more than 30 years. Studies conducted on the application of *Bacillus* type of bacteria as PGPRs on plants have reported significant yield increases. The aim of this study is to determine the effect of local *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *B. thuringiensis* species strains on the growth, yield and protein expression profile of maize (*Zea mays* L.), which is an important cereal crop. The local bacterial species known to carry ACC deaminase, phosphatase and siderophore were applied as seed coating and yield parameters were determined on plant physical developments. Protein extraction was performed using the upper fresh leaves of the plants and expressional differences were determined through SDS-PAGE and 2D gel electrophoresis. Results indicated that, chlorophyll content in corn plants treated with bacteria were significant when compared with control plants ( $p < 0.05$ ). Also, root dry weights of plants treated with bacteria were significantly higher compared with that of control plants ( $p < 0.05$ ). Shoot fresh weight in treated plants were significantly higher than that of control plants ( $p < 0.05$ ). In plants with *Bacillus* sp. KH16.2 (MH847787), *Bacillus thuringiensis* SY49.1 (MW197418) and *Bacillus* sp. KH6.4 species application SDS-PAGE and 2D analysis revealed considerable expressional differences both as up and down regulations compared with control groups. In conclusion, it was determined that the bacteria applied to the corn plants gave rise to differences in both yield parameters and protein expression profiles.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Zea mays* L., SDS-PAGE, 2D

## İÇİNDEKİLER

### *Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* TÜRÜ BAKTERİLERİN MISIRDA (*Zea mays* L.) PROTEİN İFADE PROFİLİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ..... | i    |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK.....       | ii   |
| KABUL ONAY .....              | iii  |
| TEŞEKKÜR.....                 | iv   |
| ÖZET.....                     | v    |
| ABSTRACT.....                 | vi   |
| İÇİNDEKİLER .....             | vii  |
| KISALTMALAR VE SİMGELER.....  | x    |
| TABLolar LİSTESİ.....         | xii  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....        | xiii |
| GİRİŞ .....                   | 1    |

## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

|                                                                              |   |
|------------------------------------------------------------------------------|---|
| 1.1. Genel Bilgiler .....                                                    | 4 |
| 1.1.1. Bitki BüyümeYi Destekleyen Rizobakteriler (PGPR) .....                | 4 |
| 1.1.2. Mısır Bitkisi ( <i>Zea mays</i> L.).....                              | 5 |
| 1.1.3. İki Boyutlu (2D) Jel Elektroforezi .....                              | 7 |
| 1.1.4. IEF (İzoelektrik Fokuslama) .....                                     | 7 |
| 1.1.5. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi)..... | 8 |
| 1.2. Literatür Çalışması.....                                                | 8 |

## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

|                    |    |
|--------------------|----|
| 2.1. Materyal..... | 13 |
| 2.2. Yöntem .....  | 14 |

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.2.1. Bakterilerin Çalışma için Hazırlanması.....</b>                           | <b>14</b> |
| 2.2.1.1. Bakterilerin Stok Kültürden Aktifleştirilmesi .....                        | 14        |
| 2.2.1.2. Bakterilerin İnokülasyon Çalışmaları için Çoğaltılması .....               | 14        |
| <b>2.2.2. Mısır Tohumunun Yüzey Sterilizasyonu .....</b>                            | <b>15</b> |
| <b>2.2.3. Bakteri Tohum İnokülasyonu .....</b>                                      | <b>15</b> |
| <b>2.2.4. Denemenin Kurulması .....</b>                                             | <b>15</b> |
| <b>2.2.5. Mısır Bitkisinin Fiziksel Analizleri .....</b>                            | <b>16</b> |
| <b>2.2.6. Protein Ekstraksiyonu .....</b>                                           | <b>18</b> |
| <b>2.2.7. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....</b>                          | <b>19</b> |
| <b>2.2.8. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi).....</b> | <b>20</b> |
| 2.2.8.1. Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması.....                               | 20        |
| 2.2.8.2. SDS-PAGE için Düzenegin Kurulması ve Jellerin Hazırlanması .....           | 22        |
| <b>2.2.9. Hızlı Gümüş Boyama .....</b>                                              | <b>24</b> |
| 2.2.9.1. Gümüş Boyama için Çözeltilerin Hazırlanması .....                          | 24        |
| 2.2.9.2. Jel Boyama İşleminin Yapılması .....                                       | 25        |
| <b>2.2.10. İki Boyutlu (2D) Jel Elektroforezi .....</b>                             | <b>25</b> |
| 2.2.10.1. Rehidratasyon Aşaması.....                                                | 25        |
| 2.2.10.1. IEF (izoelektrik odaklama) Aşaması .....                                  | 26        |
| <b>2.2.11. SDS-PAGE Aşaması.....</b>                                                | <b>30</b> |
| 2.2.11.1. Hızlı Gümüş Boyama.....                                                   | 32        |
| 2.2.11.1.1. Gümüş Boyama Çözeltilerinin Uygulanması .....                           | 32        |

### 3. BÖLÜM

#### BULGULAR

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| <b>3.1. SPAD Ölçümü .....</b>            | <b>37</b> |
| <b>3.2. Bitki Boy Ölçümü.....</b>        | <b>38</b> |
| <b>3.3. Sürgün Yaş Ağırlığı .....</b>    | <b>39</b> |
| <b>3.4. Yaprak Sayısı.....</b>           | <b>40</b> |
| <b>3.5. Bitki Kök Yaş Ağırlığı .....</b> | <b>40</b> |
| <b>3.6. Sürgün Kuru Ağırlığı.....</b>    | <b>41</b> |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7. Bitki Kök Kuru Ağırlığı .....                                          | 42 |
| 3.8. Bradford ile Protein Miktar Tayini.....                                | 42 |
| 3.9. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektrophorez) ..... | 43 |
| 3.10. İki Boyutlu (2D) Jel Elektrophorezi .....                             | 46 |

## 4. BÖLÜM

### TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1. Tartışma .....                                                                  | 57 |
| 4.1.1. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Klorofil İçeriğine Etkisi.....            | 58 |
| 4.1.2. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Kök Yaş ve Kuru Ağırlığına Etkisi .....   | 59 |
| 4.1.2. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Sürgün Uzunluğuna Etkisi .....            | 61 |
| 4.1.3. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Sürgün Yaş ve Kuru Ağırlığına Etkisi..... | 62 |
| 4.1.4. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Protein Profili Üzerine Etkisi .....      | 63 |
| 4.2. Sonuç ve Öneriler .....                                                         | 66 |
| KAYNAKÇA .....                                                                       | 68 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                        | 58 |

## KISALTMALAR VE SİMGELER

|                                                 |                                |
|-------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>°C</b>                                       | : Santi grad derece            |
| <b>µl</b>                                       | : Mikrolitre                   |
| <b>µM</b>                                       | : Mikromolar                   |
| <b>2D</b>                                       | : Two-dimensional              |
| <b>AgNO<sub>3</sub></b>                         | : Gümüş Nitrat                 |
| <b>APS</b>                                      | : Ammonium Persulfate          |
| <b>ark.</b>                                     | : Arkadaşları                  |
| <b>BSA</b>                                      | : Sığır serum albümin          |
| <b>cm</b>                                       | : Santimetre                   |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>                          | : Distile su                   |
| <b>DTT</b>                                      | : Dithiothreitol               |
| <b>g</b>                                        | : Gram                         |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                           | : Su molekülü                  |
| <b>HCl</b>                                      | : Hidroklorik asit             |
| <b>IAA</b>                                      | : İndol asetik asit            |
| <b>IEF</b>                                      | : İzoelektrik odaklama         |
| <b>IPG</b>                                      | : Immobilised pH gradient      |
| <b>kDa</b>                                      | : Kilo dalton                  |
| <b>kg</b>                                       | : Kilogram                     |
| <b>L, mL, µL</b>                                | : Litre, mililitre, mikrolitre |
| <b>M</b>                                        | : Molar                        |
| <b>mg</b>                                       | : Miligram                     |
| <b>NA</b>                                       | : Nutrient agar                |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>             | : Sodyum Karbonat              |
| <b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> | : Sodyum tiyosülfat            |
| <b>NB</b>                                       | : Nutrient Broth               |

|              |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| <b>nm</b>    | : Nanometre                       |
| <b>PAGE</b>  | : Poliakrilamid Jel Elektroforezi |
| <b>SDS</b>   | : Sodyum dodesil sülfat           |
| <b>sp.</b>   | : Tür                             |
| <b>spp.</b>  | : Türler                          |
| <b>TCA</b>   | : Trikloroasetik Asit             |
| <b>TEMED</b> | : tetrametiletilediamin           |
| <b>vd.</b>   | : ve diğerleri                    |



## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.1. Çalışma için kullanılan bakteriler .....                                                    | 13 |
| Tablo 2.2. 5x tris-glisin tampon çözeltisi .....                                                       | 20 |
| Tablo 2.3. SDS-PAGE için örnek tamponu.....                                                            | 21 |
| Tablo 2.4. %12'lik ayırma jelinin hazırlanması .....                                                   | 21 |
| Tablo 2.5. %4'lük yükleme jelinin hazırlanması.....                                                    | 21 |
| Tablo 2.6. IEF işlemi için kullanılan protokol.....                                                    | 28 |
| Tablo 3.1. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen SPAD değerleri .....                                  | 38 |
| Tablo 3.2. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen bitki boyuna ilişkin ortalama<br>değerler.....        | 38 |
| Tablo 3.3. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen gövde-yaprak yaş ağırlık<br>değerleri.....            | 39 |
| Tablo 3.4. Yaprak sayısına ilişkin değerler .....                                                      | 40 |
| Tablo 3.5. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen kök yaş ağırlık değerleri.....                        | 40 |
| Tablo 3.6. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen sürgün kuru ağırlık değerleri .....                   | 41 |
| Tablo 3.7. Bitki kök kuru ağırlığına ilişkin varyans analiz tablosu.....                               | 42 |
| Tablo 3.8. Bakteri uygulamalarının Bradford yöntemi ile elde edilen protein<br>konsantrasyonları ..... | 43 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|             |                                                                                               |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1.  | NA ve NB ortamlarına ekilmiş bakteriler .....                                                 | 14 |
| Şekil 2.2.  | Hasat öncesi mısır bitkileri.....                                                             | 16 |
| Şekil 2.3.  | Hasattan sonra mısır kök karşılaştırılması .....                                              | 17 |
| Şekil 2.4.  | Mısır yapraklarından elde edilen protein örnekleri .....                                      | 19 |
| Şekil 2.5.  | Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonunun belirlenmesi .....                             | 19 |
| Şekil 2.6.  | Jelin polimerizasyonu.....                                                                    | 22 |
| Şekil 2.7.  | SDS-PAGE için örneklerin hazırlık aşaması .....                                               | 23 |
| Şekil 2.8.  | Örneklerin jel kuyucuklarına yüklenmesi .....                                                 | 23 |
| Şekil 2.9.  | SDS-PAGE'in çalıştırılması.....                                                               | 24 |
| Şekil 2.10. | Proteinlerin IEF için pasif rehidratasyon aşaması.....                                        | 26 |
| Şekil 2.11. | Wik kâğıt yastıkların IEF tepsisine yerleştirilmesi .....                                     | 26 |
| Şekil 2.12. | IEF işlemi .....                                                                              | 27 |
| Şekil 2.13. | Dengeleme solüsyonları .....                                                                  | 28 |
| Şekil 2.14. | Dengeleme 1 tamponunun strip üzerine eklenmesi.....                                           | 29 |
| Şekil 2.15. | Dengeleme 2 tamponunun strip üzerine eklenmesi.....                                           | 29 |
| Şekil 2.16. | Dengeleme tamponunun strip üzerine eklendikten sonra çalkalanması<br>ve uzaklaştırılması..... | 30 |
| Şekil 2.17. | Jellerin polimerizasyonu .....                                                                | 30 |
| Şekil 2.18. | IPG striplerinin jel üzerine yerleştirilmesi .....                                            | 31 |
| Şekil 2.19. | Jel kasetin tanka yerleştirilmesi.....                                                        | 31 |
| Şekil 2.20. | SDS-PAGE düzeneği .....                                                                       | 32 |
| Şekil 2.21. | Jellerin boyama için cam tabakalardan çıkarılması.....                                        | 32 |
| Şekil 2.22. | Jellerin boyama çözeltilerine alınma aşaması .....                                            | 33 |
| Şekil 2.23. | Jellerin çalkalama aşaması .....                                                              | 33 |
| Şekil 3.1.  | Bakteri uygulanan bitkilerin ve kontrol bitkisinin SDS-PAGE jel<br>görüntüsü.....             | 44 |

|            |                                                                                                                     |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.2. | Bakteri uygulanan bitkilerin ve kontrol bitkisinin SDS-PAGE jel görüntüsü.....                                      | 45 |
| Şekil 3.3. | Kontrol ve S3 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 1. Bölüm (pH, 3-6.5) 2D jel görüntüsü .....      | 46 |
| Şekil 3.4. | Kontrol ve S3 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 2. bölüm (pH, 6.5-10) 2D jel görüntüsü .....     | 47 |
| Şekil 3.5. | Kontrol ve S4 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 1. bölüm (pH, 3-6.5) 2D jel görüntüsü .....      | 48 |
| Şekil 3.6. | Kontrol ve S4 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 2. bölüm (pH, 6.5-10) 2D jel görüntüsü .....     | 49 |
| Şekil 3.7. | Kontrol ve S7 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 1. Bölüm (pH, 3-6.5) 2D jel görüntüsü .....      | 50 |
| Şekil 3.8. | Kontrol ve S7 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 2. Bölüm (pH, 6.5-10) 2D jel görüntüsü .....     | 51 |
| Şekil 4.1. | Vaishnav A. ve ark. (2015)'nın soya fidelerinden elde ettiği SDS-PAGE görüntüsü .....                               | 64 |
| Şekil 4.2. | Kwon ve ark. (2016)'nın <i>A. thaliana</i> bitkisinin sürgün ve kök kısımlarından elde edilen 2D jel görüntüsü..... | 65 |

## GİRİŞ

21. Yüzyılın stratejik sektörleri arasında bilinen gıda sektörünün, dünya nüfusunun 2050 yılında 10 milyara ulaşması beklentisiyle birlikte büyük bir sorumluluk üstleneceği öngörülmektedir. BM'nin açıkladığı “Gıda Güvenliği ve Beslenme” başlıklı raporunda 10 yıldan uzun bir süredir düşüş gösteren açlığın 2016 yılından itibaren tekrar yükselişe geçtiği ve 815 milyon insanın açlık ile mücadele ettiği ortaya koyulmuştur. 2050 yılına kadar artması beklenen nüfus için tarım ve gıda üretiminin en az yüzde 50 arttırılması gerekmektedir. Dünya nüfusunda meydana gelecek bu değişikliğe karşılık mevcut tarım ve gıda üretim sistemlerimizin temel sorunları çözmekte başarısız olduğu görülmektedir (FAO, 2017).

Birleşmiş milletler tarım örgütü dünya genelinde kullanılan gıdanın %99,7'sinin karasal ortamdan elde edildiğini göstermektedir. Bu bilgilerle birlikte her yıl dünya nüfusuna 79 milyon insan eklendiği de göz önünde bulundurulduğunda, gıda talebinde sürekli bir artış ve arzda eş zamanlı bir azalma olduğu görülmektedir (Alexandratos ve Bruinsma, 2003).

Günümüzde artan nüfus ve buna bağlı olarak ortaya çıkan açlığa karşılık tarımsal verime olan talep de bir o kadar artmıştır. Bundan dolayı doğal kaynaklar ve gelecekte oluşabilecek daha büyük sorunlar önemsenmeden yüksek oranda kimyasal ilaç ve gübre kullanımı artmaktadır. Yetiştiriciler ekilen üründen daha fazla verim elde etmek adına tarım alanlarında kimyasal ilaçların ve gübrelerin kullanımını arttırarak toprağın kalitesinin bozulmasına ve verimliliğini kaybetmesine neden olmaktadır. Aşırı pestisit ve gübre kullanımı sonucunda toprak sağlığı bozulmakta, çevre kirliliği ve patojen popülasyon artmaktadır (Saber, 2001).

İhtiyaçlarımızı toprak sağlığını koruyarak doğal kaynaklardan sağlayabilmek için gıda ve tarım sistemlerinde değişiklik yapmanın zorunlu olduğu açıktır (FAO, 2017).

Tüm yorumcular, gıda üretiminin önümüzdeki yıllarda önemli ölçüde artırılması gerektiği konusunda hemfikir olmasına rağmen bunun en iyi şekilde nasıl başarılması gerektiği konusunda çok farklı görüşler vardır. Bazıları tarımın yeni topraklara yayılması gerekeceğini belirtiyor ancak böyle bir durum biyolojik çeşitliliğin daha fazla kaybı anlamına gelecektir. Diğerleri, gıda üretiminde artış için yüksek verimli çeşitlerin, gübre ve böcek ilacı gibi büyük miktarlarda satın alınan girdilerin kullanılması gerektiğini söylüyor. Başka bir grup ise, ekolojik olarak daha sağlam yöntemlerin kullanılması yoluyla tarımsal sürdürülebilirliğin çiftçilere arazi kullanımlarını yoğunlaştırma ve gıda üretimini artırma seçenekleri sunduğunu söylüyor.

Ancak kalıcı açlık sorununu çözmek, sadece yeni tarım teknolojileri ve uygulamaları geliştirme meselesi değildir. Çoğu fakir üretici pahalı teknolojileri karşılayamaz. Doğal, sosyal ve insan kaynaklarından en iyi şekilde yararlanmakla birlikte yerel olarak mevcut veya ucuz teknolojilere dayalı yeni çözüm türleri bulmaları gerekecektir. Sürdürülebilirlik, çevreye verilen zararı en aza indiren veya ortadan kaldıran mevcut en iyi teknolojilerin ve girdilerin kullanımıyla birleştirilen doğal, sosyal ve beşeri varlıkları kullanarak yoğunlaştırma olarak adlandırılabilir. Tarih boyunca çiftçiler, bugün sürdürülebilir olarak adlandırdığımız çok çeşitli teknolojileri ve uygulamaları kullanmış olsalar da sürdürülebilirlikle ilgili kavramlar ancak son yıllarda daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Jules Pretty, 2002, 2005, 2007).

Bu durum göz önüne alındığında ekonomik ve sosyal fırsatlar sağlayan ve gezegenimizin doğal kaynaklarını korumak ve gelecek nesillere çevreyi kirletmeden ve doğal dengesini bozmadan bırakmak için öncelikli hedefimiz sürdürülebilir tarıma geçişi hızlandırmak olmalıdır. Endüstriyel tarımın bazı savunucuları, ortaya çıkan olumsuz etkilerin “yeterli besin için” ödememiz gereken bedelinin olduğunu belirtmektedir. Aslında, giderek artan bilimsel kanıtlar bu iddiayı çürütmüş ve daha sürdürülebilir bir modelin aynı derecede karlı olabileceğini ve uzun vadede ihtiyaçlarımızı karşılayabileceğini göstermiştir (Anonim, 2017).

Bu durumlardan dolayı toprak sağlığını korumak fazla kullanılan kimyasal ilaç ve gübre sonucu ortaya çıkan sorunları gidermek amacıyla yapılan araştırmalar neticesinde, sürdürülebilir tarıma ilgi artmıştır. Bunun sonucu olarak da biyolojik gübre ile biyolojik savaş elemanı olarak kullanılabilen mikroorganizmalar öne çıkmıştır. Tarımda

kullanılan gündemdeki en önemli mikroorganizmalar ise bakterilerdir (Higa ve Paar, 1994; Bloenberg ve Luktenberg, 2001; Eşitken ve ark., 2003; Çakmakçı ve Erdoğan, 2008).

Toprak mikroflorası ekosistemde genellikle benzersiz bir rol oynar ve biyosferdeki en karmaşık, çeşitli ve önemli topluluklar arasındadır (Zhou ve ark., 2003). Örneğin bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü, bitki büyümesini teşvik etme veya aktif bileşiklerin izolasyonu bitkilerle ilişkili mikroorganizmaların incelenmesi, biyoteknolojik uygulamalar için büyük önem taşımaktadır (Emmert ve Handelsman, 1999; Bloenberg ve Lugtenberg, 2001).



# 1. BÖLÜM

## GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

### 1.1. Genel Bilgiler

#### 1.1.1. Bitki Büyümeyi Destekleyen Rizobakteriler (PGPR)

Mikroskobik hayvanların keşfine kadar bakterilerin var olduğu bilinmesede, bakterilerin antik çağdan beri bitki büyümesini teşvik etmek için kullanıldığı ortaya çıkmıştır. Antonie van Leeuwenhoek (1683), Hellriegel ve Wilfarth (1888), otlarda ve baklagillerde rizosfer kök kolonizasyonu konusundaki araştırmalarında toprak bakterilerinin atmosferik azotu bitkinin kullanabileceği forma dönüştürdüğünü ortaya koymuşlardır. Bu çalışmaların ışık tuttuğu diğer araştırmada Kloepper ve Schroth (1978, 1981) turpta köklere kolonize olarak büyümeyi teşvik eden ve böylece bitki hastalıklarının görülme sıklığını azaltan toprak bakteri topluluğunun olduğunu belirlediler ve bu bakteri topluluğunu büyümeyi teşvik edici "rizobakteriler" (PGPR) olarak adlandırdılar. Bu bakterilerin daha çok *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aereobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* ve *Xanthomonas* cinslerine ait olduğu belirtilmiştir (Burdman ve ark., 2000). PGPR'ler araştırmacılar tarafından çok çeşitli ortamlarda yüksek adaptasyon, daha hızlı büyüme oranları ve çok çeşitli doğal ve ksenobiyotik bileşikleri metabolize etmek için biyokimyasal değişkenliği nedeniyle toprak ekosistemine yerleşmede başarılı rizobakteriler olarak görülmektedir. Aynı zamanda PGPR'ı doğal genetik potansiyele sahip tarımsal uygulamalarda kullanılan önemli bir bileşen olarak kabul etmişlerdir (Cook, 2002).

PGPR'ler genellikle kök sisteminde kolonize olarak bitkinin gelişimini buradan destekler ve bitkiye zarar verebilecek mikroorganizmaların işlevine engel olurlar. PGPR'lerin tohumun çimlenmesi, kök gelişiminin desteklenmesi ve bitkinin su ve mineral alımının arttırmasına önemli katkı sağladığı bildirilmiştir. PGPR'ler büyüme hormonları üreterek doğrudan rizosferdeki mikrobiyal dengeyi değiştirerek ve dolaylı olarak da mineral madde oranını düzenleyerek bitki gelişimini olumlu yönde teşvik ederek etkilemektedir (Sıddiqui, 2006; Şevik, 2010).

Bu organizmalar ağır metalleri çözebilme yetenekleri, azot ve fosfor bağlayıcı özelliklerinin yanı sıra bakteriyel, fungal ve nematod hastalıklarını engeller ve viral hastalıklara karşı kalkan görevi görür (Djordjevic, 1987; Ferreira, 1987; Sıddiqui, 2006; Şevik, 2010).

Glick vd. (1999) PGPR'ların teşvik etme mekanizması içerisinde, nitrojen fiksasyonu, etilen seviyesinin düşürülmesi, sideroforlar ve fitohormonların üretilmesi, patojen direncinin artırılması, besinlerin çözündürülmesi, mikorizal işleyişin teşvik edilmesi, kirletici toksisitenin azaltılması gibi faaliyetlerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Ayrıca toprakta serbest formda bulunan PGPR'lara kıyasla aşılama yapılarak uygulanan PGPR'ların bitkinin daha fazla canlı kalmasını sağladığı ve bitki köklerinde daha iyi kolonize oldukları belirtilmiştir (Glick, 1995; Kaymak 2011).

Tüm bu nedenlerle çevre kirliliğinin önlenmesi ve tarımsal sürdürülebilirlik, kaynakların devamlılığının sağlanması ve tarımsal girdi maliyetin düşürülmesi, PGPR kullanımını zorunlu hale getirmektedir (Çakmakçı, 2005).

Bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin kullanılması, mahsul verimi ve bozulmuş ortamlarda bitki direncini arttırmak için biyolojik bir alternatif oluşturabilmektedir (Ana PGC Marques ve ark., 2010).

### **1.1.2. Mısır Bitkisi (*Zea mays* L.)**

Canlıların besin ihtiyacının karşılanmasında tahılların önemi oldukça fazladır. Bu nedenle artan dünya nüfusu besin ihtiyacı bakımından tahıllara bağımlıdır. İnsanlar günlük besinlerden aldıkları enerjinin yüzde ellisini tahıllardan sağlamaktadırlar (Gençtan ve ark., 1995; Kırtok, 1998).

Tarımı yapılan en önemli tahıl sıralamasında üçüncü olan mısır (*Zea mays*) aynı zamanda en fazla ekim alanına sahiptir. 185 milyon hektar üretim alanına sahip olan mısır toplam üretimde buğday ve çeltiği geride bırakarak birinci sırada yer almaktadır (FAO, 2013).

Bunun yanında sıcak iklim tahılları içerisinde yer alan mısır bitkisi üzerinde yapılan çalışmaların çokluğu ve dünya ekolojisine uygun çeşitlerinin bol olması ile de birinci sırada yer almaktadır (Kün 1997).

Uluslararası Hububat Konseyi'nin (UHK) açıklamış olduğu rapordaki bilgilere göre dünyada mısır ekim alanlarının 2018 ve 2019 yıllarında önceki yıllara göre yüzde %3 oranında arttığı rapor edilmiştir (UHK, 2019)

Dünya genelinde mısır üretimi göz önüne alındığında ilk üç sırada ABD, Çin ve Brezilya bulunmaktadır (UHK, 2019)

Mısır, uzun yıllardır tarımı yapılan birkaç ender bitkiden biri olmuştur. Anavatanı Amerika kıtası olup buradan Dünya'nın diğer yerlerine yayıldığı bilinmektedir

Yeni dünyanın keşfedildiği zamanlarda, Amerika kıtasının çoğu bölgesinde At dişi mısır, sert mısır, unlu mısır, şeker mısır ve cin mısır türlerinin tarımı yapılmaktaydı.

Portekizliler, 16. yüz yıl başlarında Afrika'nın batı kıyılarına, daha sonra da Hindistan ve Çin'e mısırı götürmüşlerdir. Tüm Asya'ya da bu şekilde yayıldığı düşünülmektedir.

Mısır, geniş adaptasyon yeteneği sayesinde tropik, subtropik ve ılıman iklim kuşaklarında yetişebildiği için Antartika dışında dünyanın her yerinde az veya çok tarımı yapılabilmektedir (Babaoğlu, 2003).

Az gelişmiş ülkelerde mısır insan beslenmesi için kullanılırken gelişmiş ülkelerde hayvan yemi ve endüstride doğrudan veya dolaylı yollardan birçok ürünün hammaddesi olarak kullanılmaktadır (Kırtok, 1998).

Mısır bitki aksamalarının tamamının silajda kullanılabilmesinden dolayı kolayca depolanan (silolanan) yem sınıfında ele alınmaktadır (Keleş, 2014).

Silaj yapımına uygunluğunun yanında, birim alanda daha fazla yeşil aksam üretmesi, besin değerinin yüksek olması ve yüksek oranlarda tüketilmesi gibi sebeplerden dolayı mısır bitkisi dünyanın birçok bölgesiyle birlikte Türkiye’de de önemli miktarda üretilmektedir. Mısır, yalnızca besin ve enerji değerine sahip olmayıp aynı zamanda bitki örtüsü hazırlama potansiyeline de sahip bir bitkidir (Kılıç, 1986; Denek ve Deniz, 2004).

### **1.1.3. İki Boyutlu (2D) Jel Elektroforezi**

İki boyutlu jel elektroforezi proteomik çalışmalar için önemli bir tekniktir ve ilk kez 1956 yılında Simithies ve Poulik (1956) tarafından kullanılmıştır. 2D-PAGE ile proteinlerin iki farklı özelliği kullanılarak yüksek ayırım sağlanabilmektedir. Birinci boyutta proteinler izoelektrik noktalarına göre, ikinci boyutta ise moleküler ağırlığına göre ayrılır. Yüksek çözünürlüklü 2D elektroforez, protein türleri ve izoform dağılım analizi, konak hücre protein analizi, hücre durumlarının niceliksel karşılaştırması gibi birçok noktada kullanılabilir (Nachimuthu ve Ponnusamy, 2014)

Tek bir jelde 10.000'e kadar proteini ayırabilen 2D-PAGE tekniğinin farklı aşamalarında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. 2D-PAGE jel görüntüsü ile belirli bir dokuda ifade edilen proteinlerin sayısı ve görüntü analizi ile önemli veriler elde edilebilmektedir. Yürütme işlemi sonrasında çeşitli yöntemlerle boyamanın ardından proteinler spotlar halinde görünmektedir (Thierry ve Cécile, 2011)

### **1.1.4. IEF (İzoelektrik Fokuslama)**

2D jel elektroforezi için IEF aşamasında, bir pH gradyanı (IPG) olarak ince bir poliakrilamid jel kullanılmaktadır. Jellerin içeriğinde düşük konsantrasyonda akrilamid (genellikle %4–5 oranında akrilamid) vardır. Proteinler bu IPG stripi üzerine tutturularak ardından elektrik akımı verilmektedir. Polipeptitler elektrik alanda gradyan üzerinde pH yüklerine göre anot ve katot a doğru hareket ederek her protein kendi izoelektrik noktasına geldiğinde yüksüzleşerek bulunduğu yerde konumlanmaktadır (Rabilloud, 2000).

Bir IEF çalışmasının sonunda, proteinler izoelektrik noktalarında yüksek oranda konsantre hale geldiği için tespiti yüksek hassasiyet ile sonuçlanmaktadır. Bundan

dolayı küçük yük farkları bile ayırt edilebilmektedir. Çözünürlük, daha uzun ayırma mesafeleri ve dar gradyan aralıkları kullanılarak artırılabilir (Hoving ve ark., 2000).

#### **1.1.5. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi)**

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), DNA, RNA ve proteinler dahil olmak üzere makro molekülleri ayırmak için en sık kullanılan tekniklerden birisi olmuştur. SDS-PAGE, protein boyutunun belirlenmesi, protein tanımlanması, numune saflık analizi vb. gibi protein analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Simon, 2001).

Elektroforez, genel olarak, yüklü molekülleri bir çözelti boyunca hareket ettirmek için bir elektrik alanı uygulama işlemidir. Bu teknikte, yüklü bir molekülün hareketliliği, net yükü ve içinden geçtiği çözeltinin direnci ile doğru orantılıdır.

Poliakrilamid jel, altta daha büyük olan "ayırma" jeli ve üstte dar bir "yükleme" jeli olmak üzere iki katmandan oluşmaktadır. Jelin üstündeki ve altındaki rezervuarlar, glisin ile yapılmış ve pH 8'e ayarlanmış bir tampon içermektedir.

Elektroforez sırasında, negatif yüklü moleküller tarafından taşınan akım, jelden bir rezervuardan diğerine doğru hareket etmektedir. SDS anyonik bir deterjan olup proteinlerle etkileşime girdiğinde polipeptitlerin ana iskeletini çevreleyerek negatif yüklü hale getirmektedir. Bundan dolayı polipeptitler elektrik akımıyla katottan anota doğru hareket ederek moleküler ağırlıklarına göre konumlanabilmektedir (Hames, 1996)

### **1.2. Literatür Çalışması**

**Akıncı (2011)** çalışmasında PGPR olarak adlandırılan mikroorganizmaların yalnızca bitkiye besin maddesi sağlamakla kalmayıp toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısını iyileştirerek bitkiler için sağlıklı bir ortam oluşturduğundan bahsetmiştir.

**Weissmann ve Gerhardson (2001)** yaptıkları bir araştırmada PGPR'ların biyolojik aktif metabolit, enzim, toksin ve bitki gelişiminde temel rol oynayan bitki gelişimini regüle eden maddeler salgılayarak etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

**Chung ve ark. (2005)** yapmış olduğu bir çalışmada az çözünür CaP'yi çözen mikroorganizmaların, mineral fosfat çözen (MPS) olarak adlandırıldığını bunula birlikte P çözen mikroorganizmaların (PSM) çözünmeyen fosfatları, asitleştirme, şelasyon, değişim reaksiyonları ve glukonik asit üretimi süreci yoluyla çözünür formlara dönüştürdüğü belirtilmiştir

**Jones ve Darrah (1994), Gadd (1999), Kumar ve Narula (1999), Nautiyal ve ark. (2000), Vassileva ve ark. (2000), Whitelaw (2000)** yapmış oldukları araştırmalarda mikroorganizmaların inorganik fosfat materyallerini çözebildiğini rapor etmişlerdir.

**Kloepper ve ark. (1989)** Bakteriler tarafından salgılanan bitkisel hormon, antibiyotik, siderofor ve diğer maddelerin bitkiler için P alımını sağladığını ve gelişmeyi teşvik ettiğini belirtmişlerdir.

**Chabot ve ark. (1996)** yapmış oldukları çalışmada mısır ve marulda mikroorganizmaların mineral P'ı çözerek bitki gelişimini teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Bakterilerin bitki gelişimi üzerine etkisi çok yönlü olarak gösterilmiş ve çoğu mikroorganizmanın P alımını artırdığı kanıtlanmışlardır.

**Kucey (1989), Biswas ve ark. (2000)** yapmış oldukları çalışma ile bitki rizosferinde bulunan birçok bakteri türünün organik ve inorganik maddeleri bitkiler için yararlı hale getirmekte olduğu, mikroorganizmaların fosfat çözebilme yeteneğine ek olarak bitki gelişmesini teşvik edici maddelerin üretimi yoluyla Fe, Zn gibi elementlerin de alınmasını arttırdığını rapor etmişlerdir.

**Çakmakçı ve ark. (1999 ve 2001), Öztürk ve ark. (2003) Eşitken ve ark. (2003 ve 2006), Orhan ve ark. (2006), Aslantaş ve ark. (2007)** yapmış oldukları çalışmalarında Bitki büyümesini teşvik edici etkileri olan ve tarımda mikrobiyal gübre olarak bilinen PGPR bakteri türleri genel olarak bitki büyümesi, besin elementi alımı, bitki bünyesinde IAA ve sitokininin üretimi, gibberellin üretiminin teşvik edilmesi gibi pek çok etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

**Burdman ve ark. (2000)** yapmış olduğu çalışmada *Artrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*,

*Pseudomonas*, *Serratia* ve *Rhizobia* cinslerine ait türler önemli kültür bitkilerinin gelişmesini ve verimini arttırdığını belirtilmiştir.

**Kaiser (1995), Srinivasan ve ark. (1996), Bashan ve Holguin (1997), Sudhakar ve ark. (2000), Çakmakçı (2002)** yapmış oldukları çalışmalarda bitki gelişmesini teşvik edici ve verim arttırıcı *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum* *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ve *Staphylococcus* cinsine ait türlerin bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* fungusları üzerinde biyolojik gübre olarak kullanımı hakkında olumlu sonuçlar da alındığını belirtmişlerdir.

**Verma, Yadav ve Tiwari (2012)** yapmış oldukları çalışmada PGPR'lerin konakçı direncinin uyarılması yoluyla bitkileri patojenlerden koruduğunu fosfat çözen bakteriler, indol-3-asetik asit (IAA) ve gibberellinler ile sitokininlerin yanında büyüme teşviki sağlayan diğer bazı materyallerin üretimi ile bitki büyümesini teşvik ettiğini belirtmişlerdir.

**Stein (2005)** yapmış olduğu bir araştırmada *Bacillus* sp. bakterilerin faydalı madde sentezi için olağanüstü yetenekleri olan güvenli mikroorganizmalar olduğunu belirtmiştir.

**Chung (2008) ve Gajbhiye (2010)** yapmış oldukları çalışmalarda diğer araştırmacılar gibi *Bacillus* türlerinin yaygın birçok fitopatojene karşı biyolojik kontrol faaliyetinin olduğunu ortaya koymuştur

**Marahiel ve ark. (1993) Chabot ve ark. (1996) Handlesman ve Staab (1996) Nautiyal (1997) Amer ve Utkheda (2000) Bapat ve Shah (2000) Eşitken ve ark. (2002)** yapmış oldukları çalışmalarda biyolojik gübre olarak kullanılan *Bacillus* türleri hormon senteziyle doğrudan gelişmeyi teşvik etmekte, patojenleri engellemekte, antibiyotik sentezlemekte ve fungus gelişimini önlemekte olduğunu bildirmişlerdir.

**Dobbelaere ve ark. (2002)** yapmış oldukları çalışmada bakteri aşılamanın bitki büyümesini, gelişimini, bitki kuru ağırlığını ve bitkilerin tane verimini pozitif yönde etkilediğini belirtmiştir.

**Abou-Aly (2009)** yapmış olduğu çalışmada hümik asit ve PGPR bakterilerinin buğdaydaki verim parametreleri araştırılmış ve başakcık sayısının ve dane veriminin önemli oranda arttığı belirtilmiştir.

**Zahir ve ark. (2007)** yapmış oldukları çalışmada *Azotobacter* ile aşıl原因an mısır bitkisinde bitki boyu, tane verimi ve toplam verimin önemli oranda arttığını belirtmişlerdir

**Tiwari ve ark. (1989), Belimov ve ark. (1995), Caceres ve ark. (1996), Sudha ve ark. (1999), Pal (1999), De Freitas (2000), Çakmakçı ve ark. (2001), Bent ve ark. (2002), Khan ve ark. (2003), Öztürk ve ark. (2003), Şahin ve ark. (2004),** yaptıkları araştırmada *Bacillus* türü bakterilerin, konifer türlerinin, çeltik, arpa, buğday ve mısır bitkilerinin veriminde önemli artış sağladığını rapor etmişlerdir.

**Toro ve ark. (1997), Sukhovitskaya (1998), Çakmakçı ve ark. (1999), Khan ve ark. (2003),** yapmış oldukları çalışmada *Bacillus subtilis* toplam bitki ağırlığı ile bitki dokularındaki N ve P konsantrasyonunu artırırken *Bacillus megaterium* toprağa iyi adaptasyon gösterip, bitki köklerine kolonize olarak şeker pancarı ve arpa verimini, pirinçte ise dane verimini artırdığı belirlenmiştir.

**De Freitas ve ark. (1997)** yapmış oldukları çalışmada *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus polymyxa* türlerinin, ortamda bulunan kaya fosfatının çözerek bitki boyu ve ağırlığında artış meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. polymyxa*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* ve *X. maltophilia* suşlarının çok iyi P çözebildiği de rapor edilmiştir.

**Pal (1998)** yapmış olduğu çalışmada darı, mısır, horozibiği, karabuğday ve Fransız fasulyesinde tohumların fosfat solubilize edici *Bacillus* sp. ile aşıl原因ması sayesinde vejetatif gelişmenin olumlu yönde etkilendiğini belirtmiştir.

**Yazdani ve ark. (2009)** yapmış oldukları çalışmada mısır bitkisi üzerinde PGPR bakteri uygulamasının mısır bitkisinin dane verimini ve hasat indeksini olumlu yönde etkilediğini rapor etmişlerdir.

**Kiewnik ve ark. (2001)** yaptığı başka bir çalışmada antagonistik *Bacillus* MSU-127 izolatının şeker pancarında önemli zarar yapan *Rhizoctonia solani* fungusunun neden olduğu kök çürüklüğü hastalığını önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir.



## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

Bu çalışma 2019-2020 Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarı ve Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. *Bacillus* cinsine ait bakteriler mısır bitkisi tohumlarına uygulanmış ve bitkiler sera koşullarında yetiştirilmiştir. İlk adım olarak bitkilerin fiziksel farklılıkları belirlenmiş, ikinci adım olarak ise bitkiden alınan örneklerden proteom çalışması yapılmıştır.

#### 2.1. Materyal

Bu çalışma kapsamında, tescilli atomic mısır (*Zea mays* L.) çeşidi ve bu mısır bitkisinin fiziksel özelliklerine, protein ifadesine olan etkisini belirlemek amacı ile *Bacillus* türleri bakteriler büyümeyi teşvik edici özelliklerinin incelenmesi amacıyla materyal olarak kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Çalışma için kullanılan bakteriler

| Adlandırma | Bakteri suşları                                                  |
|------------|------------------------------------------------------------------|
| S4+S8      | <i>Bacillus thuringiensis</i> SY49.1 + <i>Bacillus</i> sp. KH6.2 |
| S3         | <i>Bacillus</i> sp. KH16.2 (MH847787)                            |
| S4         | <i>Bacillus thuringiensis</i> SY49.1 (MW197418)                  |
| S5         | <i>Bacillus</i> sp. KH6.1                                        |
| S6         | <i>Bacillus subtilis</i> KH28.1 (MH846613)                       |
| S7         | <i>Bacillus</i> sp. KH6.4                                        |
| S8         | <i>Bacillus</i> sp. KH6.2                                        |
| S9         | <i>Bacillus</i> sp. KH18.2                                       |
| S10        | <i>Bacillus cereus</i> KH16.2 (MH847787)                         |

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Bakterilerin Çalışma için Hazırlanması

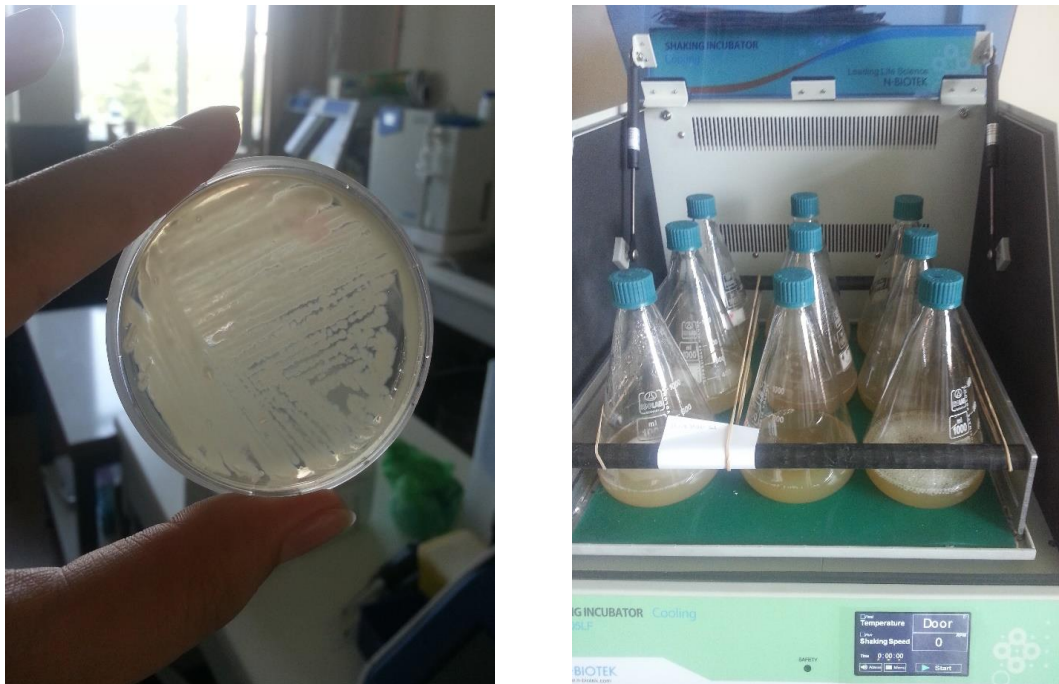
#### 2.2.1.1. Bakterilerin Stok Kültürden Aktifleştirilmesi

Daha önce tanımlamış olduğumuz ve stok kültürlerimizde  $-80^{\circ}\text{C}$  de muhafaza edilen *Bacillus* türü bakteriler aktifleştirilerek bu çalışmada kullanılmıştır. Bakterilerin aktivasyonu ve yetiştirilmesi için aşağıdaki ortamlar kullanılmıştır;

- **Nutrient Agar (NA) ortamı ( $\text{pH } 6,8 \pm 0,2$ ):** 20 g katı besiyerinin 1 litre distile su içinde süspanse edilmesi suretiyle hazırlanmıştır. Ortam, 15-20 dakika boyunca  $121^{\circ}\text{C}$ 'de otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında steril kabinde petri kaplarına dökülerek işlem yapılması için donmaya bırakılmıştır.
- **Nutrient Broth (NB) sıvı ortamı ( $\text{pH } 6,8 \pm 2$ ):** 8 g katı ortamın 1 litre distile su içinde çözündürülmesi ve  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15-20 dakika otoklav edilmesi suretiyle hazırlanmıştır.

#### 2.2.1.2. Bakterilerin İnokülasyon Çalışmaları için Çoğaltılması

Bakteriler NA ortamına öze yardımıyla ekilerek 24 saat  $35^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Ardından aktifleşen bakterilerden tek koloni alınarak NB ortamına ekilmiş ve bir gece çalkalamalı inkübatörde 180 rpm'de  $35^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. NA ve NB ortamlarına ekilmiş bakteriler

### 2.2.2. Mısır Tohumunun Yüzey Sterilizasyonu

Kullanılan mısır tohumları, %70'lik etil alkolde 1 dk bekletilmiştir. Sonrasında distile su ile yıkanmıştır. Devamında %1,5'lik sodyum hipoklorit ile 20-30 dk çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Sodyum hipoklorit uzaklaştırmak için 10 dk iki defa distile su ile yıkama yapılmıştır. Sonrasında ise steril kabinde kurumaya bırakılmıştır.

### 2.2.3. Bakteri Tohum İnokülasyonu

Bakteri denemeleri tohuma bulaştırma şeklinde **Sarma ve Saikia, (2014)**'nın metodunda değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir. %1.5'lik sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmiş tohumlar NB besiyerinde bir gece  $1 \times 10^8$  CFU/ml olacak şekilde yetiştirilen bakterilerin içerisinde (g tohum/ml bakteri) %0.01'lik süktroz ilavesinin ardından 45-60 dakika boyunca 150 rpm'de bekletilerek kaplanmış ve laminar flow içerisinde kurutularak ekim işlemine hazır hale getirilmiştir.

### 2.2.4. Denemenin Kurulması

Denemede tohum olarak tescilli Atomic mısır çeşidi kullanılmış ve mayıs ayının ilk haftası ekim yapılmıştır. Çalışma tohuma kaplanan her bir bakteri türü için üç tekerrür olacak şekilde sera koşullarında gerçekleştirilmiştir. Toprak örnekleri 121 °C'de 15-20 dk süreyle otoklavlanmış ve her bir saksıda 3 kg toprak olacak şekilde saksılara yerleştirilmiştir. Saksılar (30x32x18cm) %5'lik sodyum hipokloritte sterilize edilmiştir. Ekim derinliği 7-8 cm aralığında tutulmuştur. Saksılar aralarında belirli bir mesafe olacak şekilde Şekil 2.2.'de olduğu gibi seraya yerleştirilmiştir.



Şekil 2.2. Hasat öncesi mısır bitkileri

#### 2.2.5. Mısır Bitkisinin Fiziksel Analizleri

Ekim işleminden 36 gün sonra bitkiler hasat edilmiş ve her bir bakteri tekerrürü için aşağıda belirtilen ölçümler yapılmış ve ortalamaları alınmıştır.

##### I. SPAD Ölçümleri

Ölçümler için Konica-Minolta SPAD502 klorofilmetre cihazı kullanılmıştır. Klorofilmetre ile elde edilen değerler SPAD (Soil Plant Analysis Division) değeri olup, bu değer uygun eşitlik ile yaprak klorofil içeriğini tahmin edebilmektedir. Herbir örnek için iki yapraktan ve her yapraktan iki farklı noktadan olmak üzere toplam dört adet ölçüm yapılarak ortalama değer hesaplanmıştır (Markwell vd., 1995).

##### II. Bitki Boyu Ölçümü (cm)

Toprak seviyesinden en uzun yaprağa kadar olan yükseklik kaydedilmiştir. Her örnek için üç kez ölçüm alınarak ortalama değerler kaydedilmiştir (TOB, 2018).

### III. Bitki Yaş ve Kuru Ağırlığı (g)

Bitkiler hassas terazide tartılarak yaş ağırlıkları (g) belirlenmiştir. Daha sonra 70 °C de 48 saat etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlığı (g) ölçülerek kaydedilmiştir (TOB, 2018).

### IV. Bitki Kök Yaş ve Kuru Ağırlığı (g):

Kökler hassas bir şekilde topraktan temizlenerek yaş ağırlığı (g) ölçülmüştür (Şekil 2.3). Daha sonra 70 °C de etüvde 48 saat kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları ölçülmüştür (TOB, 2018).



Şekil 2.3. Hasattan sonra mısır kök karşılaştırılması

### V. Gövde yaş ağırlığı (g)

Bitkiler yapraklarından temizlenerek sadece gövde kısmı tartılmış ve kaydedilmiştir (TOB, 2018).

### VI. Yaprak sayısı (adet) ve ağırlığı (g)

Bitkinin üzerindeki bütün yapraklar sayılarak tartılmış ve kaydedilmiştir (TOB, 2018).

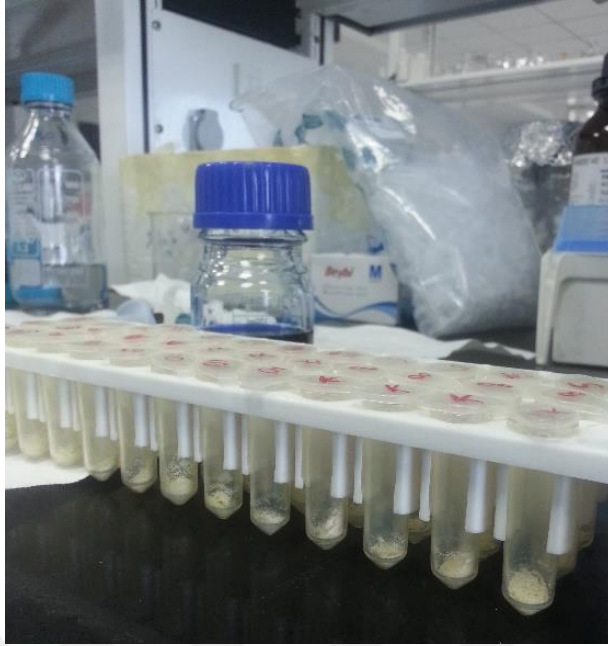
## VII. Bitki Dokularından Protein Ekstraksiyonu İçin Örnek Alınması

Tepe yaprakların çıktığı noktanın hemen altında yer alan en genç yaprağın tamamı alınmış ve ekstraksiyon için kullanılmak üzere -20 °C de saklanmıştır.

### 2.2.6. Protein Ekstraksiyonu

Hasat sırasında mısır bitkisinden alınan yaprak örnekleri TCA/aseton protein ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ekstrakt edilmiştir. Ekstraksiyon yöntemi için aşağıda verilen adımlar izlenmiştir;

1. Doku örnekleri (80g) sıvı azot ile toz haline getirilmiştir.
2. 1 g toz bitki örneği 4mL %10 TCA/aseton çözeltisinde homojenize edilmiştir.
3. Karışım 2mL ependorf tüplere alınmıştır.
4. Örnekler 12,000 g 4°C 5dk santrifüj edilmiştir.
5. Pellet hareket ettirilmeden süpernatant uzaklaştırılmıştır.
6. Pellet %10 TCA/aseton+5mM DTT solüsyonu ile süspanse edilmiştir.
7. Örnekler tekrar 12,000 g de 4°C de 5dk santrifüj edilmiştir.
8. Pellet hareket ettirilmeden süpernatant uzaklaştırılmıştır.
9. Pellet tekrar % 10TCA/aseton+5mM DTT solüsyonu ile süspanse edilmiştir.
10. Örnekler 12.000 g de 4°C de 5dk santrifüj edilmiştir.
11. Pellet hareket ettirilmeden süpernatant uzaklaştırılmıştır.
12. Pellet %80 aseton+5mM DTT solüsyonu ile süspanse edilmiş ve -20°C de 10 dk bekletilmiştir.
13. Örnekler 12.000 g de 4°C de 5dk santrifüj edilmiştir.
14. Pellet hareket ettirilmeden süpernatant uzaklaştırılmıştır.
15. Pellet %80 aseton+5mM DTT solüsyonu ile tekrar süspanse edilmiş ve 12.000xg de 4°C de 5dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
16. İşlem sonunda pellet 25°C de kurumaya bırakılmıştır (Şekil 2.4.)



Şekil 2.4. Mısır yapraklarından elde edilen protein örnekleri

#### 2.2.7. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein miktar tayini için "Bio-Rad Protein Assay" yöntemi kullanılmıştır. Standart eğri oluşturmak için bovin serum albümin (BSA) proteini standart olarak kullanılmıştır. Belirlenen BSA konsantrasyonlarının (0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1, 1,5 ve 2mg/ml) 660 nm'deki absorbans değerleri belirlenerek kaydedilmiştir (Bradford, 1976) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonunun belirlenmesi

### 2.2.8. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

Mısır bitkilerinin protein ifade profilindeki farklılıkları belirlemek için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. SDS-PAGE yöntemi için kullanılacak olan solüsyonlar 5x tris-glisin tampon çözeltisi tablo 2.1. de, örnek tamponu tablo 2.2. de, %12'lik ayırma jelinin hazırlanması tablo 2.3. de ve %4'lük yükleme jelinin hazırlanması tablo 2.4. de verilmiştir.

#### 2.2.8.1. Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması

- **1.5 M Tris (pH 8,8):** 181,5 g trizma bazı 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra pH değeri HCl ile ayarlanmış ve süzülerek otoklav edilmiştir.
- **1 M Tris (pH 6,8):** 121 g trizma bazı 1 L distile su içerisinde çözüldükten sonra pH değeri HCl ile ayarlanmış ve süzülerek otoklav edilmiştir.
- **Akrilamid çözeltisi:** 300 g akrilamid ve 8 g bis akrilamid 1 L distile su içerisinde homojenize edilip süzülerek hazırlanmıştır. Koyu renkli şişe içerisinde ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
- **SDS:** 10 g SDS tartılarak 100 mL distile su içerisinde homojenize edilmiş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
- **APS (amonyum persülfat):** 0,1 g APS tartılarak 1 mL distile su içerisinde homojenize edilmiştir. Kullanmadan hemen önce hazırlanmıştır.
- **Tris-Glisin SDS Koşturma Tamponu:**

Tablo 2.2. 5x tris-glisin tampon çözeltisi

| Kimyasallar       | Miktar (g)         |
|-------------------|--------------------|
| Tris Bazı         | 15.15              |
| Glisin            | 72.05              |
| SDS               | 5.00               |
| dH <sub>2</sub> O | 1 L' ye tamamlanır |

- **Örnek tamponu:**

Tablo 2.3. SDS-PAGE için örnek tamponu

| Kimyasallar              | Miktar     |
|--------------------------|------------|
| Gliserol                 | 0,80 mL    |
| SDS (%10)                | 1,6 mL     |
| $\beta$ -mercaptoethanol | 10 $\mu$ L |
| Bromophenol Blue (%0,5)  | 0,2 mL     |
| dH <sub>2</sub> O        | 4,0 mL     |

- **Ayırma jelinin hazırlanması:**

Tablo 2.4. %12'lik ayırma jelinin hazırlanması

| Kimyasallar            | Miktar      |
|------------------------|-------------|
| Tris HCl (1,5M/pH:8,8) | 20 mL       |
| SDS (%10)              | 800 $\mu$ L |
| Akrilamid (%30)        | 32 mL       |
| APS                    | 500 $\mu$ L |
| TEMED                  | 50 $\mu$ L  |
| dH <sub>2</sub> O      | 26,8 mL     |

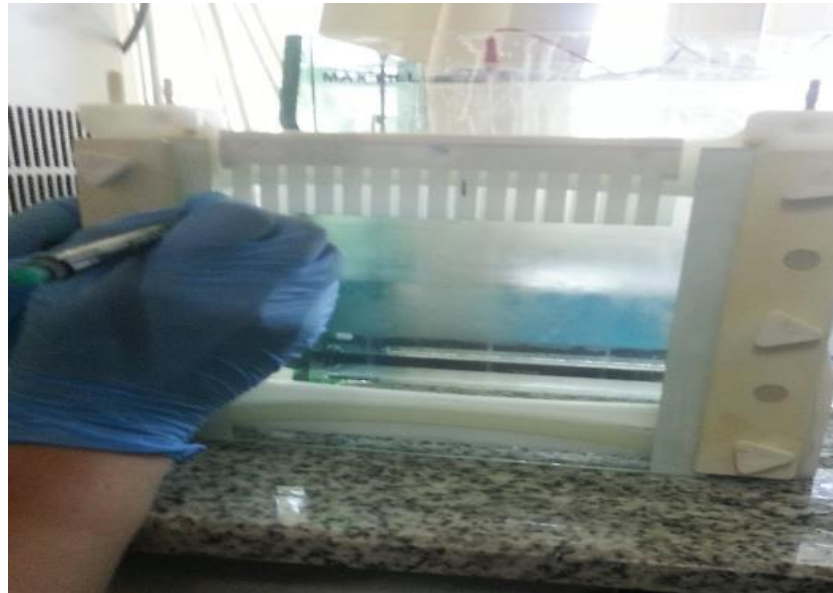
- **Yükleme jelinin hazırlanması:**

Tablo 2.5. %4'lük yükleme jelinin hazırlanması

| Kimyasallar            | Miktar       |
|------------------------|--------------|
| Tris HCl (0,5M/pH:6,8) | 3,75mL       |
| SDS (%10)              | 150 $\mu$ L  |
| Akrilamid (%30)        | 1,95 mL      |
| APS                    | 75 $\mu$ L   |
| TEMED                  | 15 $\mu$ L   |
| dH <sub>2</sub> O      | 9,15 $\mu$ L |

### 2.2.8.2. SDS-PAGE için Düzenegin Kurulması ve Jellerin Hazırlanması

1. Proteinlerin ayrılmaları için kullanılan standart bir jel genelde %7,5 poliakrilamid içerir. Poliakrilamid içeriği kullanılan polipeptidin büyüklüğüne göre değiştirilebilir.
2. Kullanılacak olan cam tabakalar %70'lik alkol ve saf su ile temizlemiş ve iki cam plaka arasına 1,5 mm kalınlığındaki spacer şeritler yerleştirilmiştir. Ardından plaka tutucu arasına camlar yerleştirilmiştir. Daha sonra camlar arasından hazırlanan jel solüsyonu yukarıdan 5 cm boşluk kalacak şekilde dökülerek polimerleşmesi için (yaklaşık 30 dk) bekletilmiştir.
3. Jelin üst kısmına havayla teması kesmek ve düz olmasını sağlamak amacıyla jel polimerize olmadan hemen önce izobütanol (200  $\mu$ L) ilave edilmiştir.
4. Jel polimerizasyonu bittikten sonra üzerindeki izobütanol saf su ile yıkanarak filtre kâğıdı ile kalan su dikkatlice alınmıştır. Bu aşamadan sonra ayırma jelinin hazırlanmasına geçilmiştir.
5. Bir tüpün içerisinde hazırlanan ayırma jel karışımı dökülmeden önce iki cam plaka arasına tarak yerleştirilmiştir. Hazırlanan karışım dökülerek polimerize olana kadar beklenmiştir.



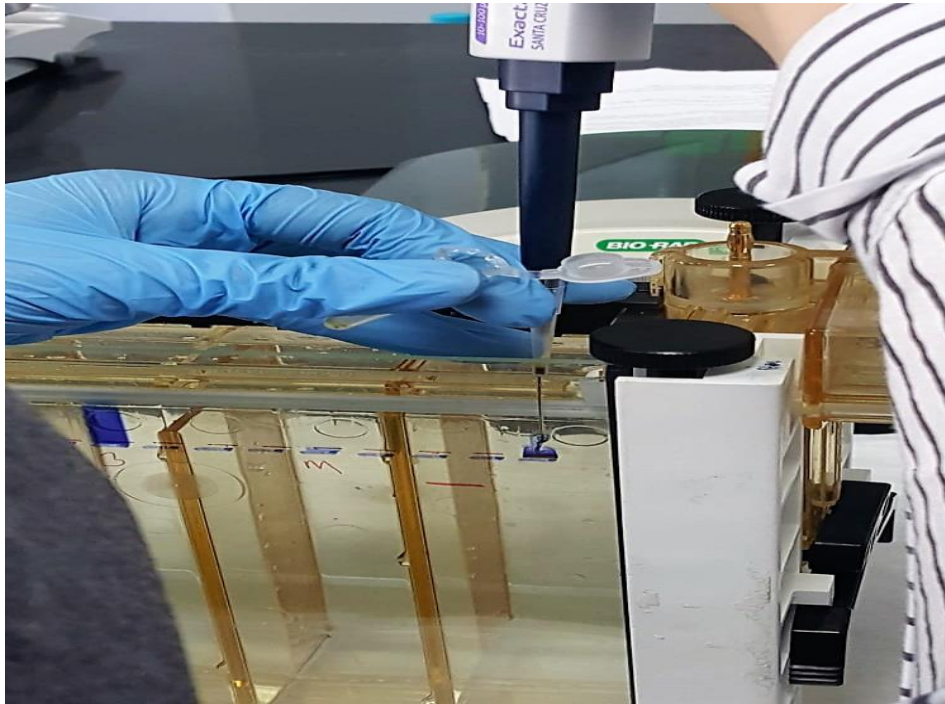
Şekil 2.6. Jelin polimerizasyonu

6. Protein örnekleri 4:1 (tampon:örnek) oranında örnek tamponu ile karıştırılarak 95 °C'de 5 dk Şekil 2.6. da olduğu gibi bekletilmiştir.



Şekil 2.7. SDS-PAGE için örneklerin hazırlık aşaması

7. Jel kaseti elektroforez tankı içerisine yerleştirilerek koşturma tamponu eklenmiştir.
8. Jel kasetinden tarak çıkarılarak kuyucuklar mikropipet yardımıyla koşturma tamponu ile temizlenmiştir.
9. Daha sonra protein örnekleri ( $1.5\mu\text{g}/30\mu\text{L}$ ) Şekil 2.8 de gösterildiği gibi kuyucuklara pipet yardımıyla yüklenmiştir.



Şekil 2.8. Örneklerin jel kuyucuklarına yüklenmesi

10. Örnekler ayırma jeline geçene kadar 30 mA, geçtikten sonra da 50 mA uygulanmıştır (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. SDS-PAGE'in çalıştırılması

11. Ayırma işleminin tamamlanmasının ardından jel camların arasından dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve gümüş boyama işlemine geçilmiştir.

## 2.2.9. Hızlı Gümüş Boyama

### 2.2.9.1. Gümüş Boyama için Çözeltilerin Hazırlanması

- **A Çözeltisi:** 400 mL metanol ve 0,5 mL %37'lik formaldehit 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır.
- **B Çözeltisi:** 0,2 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,314g/L) tartılarak 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır.
- **C Çözeltisi:** 1 g  $\text{AgNO}_3$  (%0,1) tartılarak 1L'ye distile su ile tamamlanmıştır.
- **D Çözeltisi:** 30g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 20 mL B çözeltisi 1L'ye distile su ile tamamlanmıştır. Kullanılacağı zaman 100mL için 50 $\mu\text{L}$  %37'lik formaldehit eklenmiştir.
- **E Çözeltisi:** 22,1 g Sitrik asit (2,3M) tartılarak 50mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

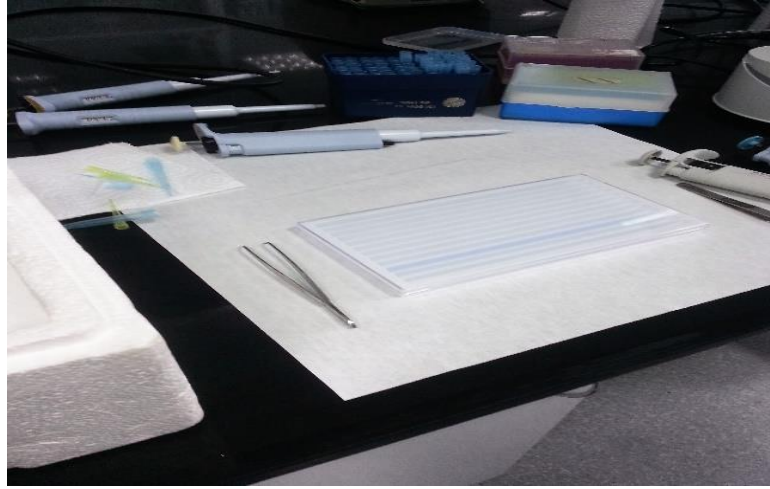
### 2.2.9.2. Jel Boyama İşleminin Yapılması

- SDS-PAGE işlemi bittikten sonra *Şekil 2.21.* de olduğu gibi jeller kasetlerden dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır
- Jel plastik bir kap içerisine *Şekil 2.22.* de olduğu gibi dikkatlice alınmış ve 200mL A çözeltisinde 20dk düşük hızda çalkalanmıştır.
- A çözeltisi uzaklaştırılarak iki defa 10dk saf su ile düşük hızda çalkalanmıştır.
- Saf su uzaklaştırılarak 200 mL B çözeltisi içerisinde 1-2 dk düşük hızda *Şekil 2.23* teki gibi çalkalanmıştır.
- B çözeltisi uzaklaştırılarak saf su ile yıkadıktan sonra 200 mL C çözeltisi eklenerek 20 dk düşük hızda çalkalanmıştır.
- Saf su ile yıkandıktan sonra 200 mL D çözeltisi eklenerek bant oluşumu gözlenmiştir.
- Bant oluşumu istenen görünüme gelince E çözeltisi (10mL) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur.
- Boyama işlemi bittikten sonra Biorad ChemiDoc MP cihazı kullanılarak görüntüleme işlemi yapılmıştır.

### 2.2.10. İki Boyutlu (2D) Jel Elektroforezi

#### 2.2.10.1. Rehidratasyon Aşaması

1. Uygun IPG stripler (17cm pH:3-10) uygulama yapacağımız protein miktarına göre ve pH aralığına göre seçilmiştir.
2. 4mL rehidratasyon tamponu (üre, thioüre, CHAPS, DTT, ampholyte, bromofenol blue) ile toz haline getirilen 1g bitki protein örneği karıştırılmıştır.
3. Protein oranı IEF kuyucuğunda 300µL olacak şekilde eklenmiştir.
4. Seçmiş olduğumuz nonlinear striplerin üzerindeki koruyucu bantlar forseps yardımıyla dikkatlice sıyrarak çıkarılmıştır.



Şekil 2.10. Proteinlerin IEF için pasif rehidratasyon aşaması

5. Strip'in jel yüzü aşağıya bakacak şekilde IEF tepsisindeki proteinin üzerine dikkatli bir şekilde bırakılmıştır.
6. 25°C'de 10-30 dk bekletilerek protein karışımının jele geçmesi sağlanmıştır.
7. Striplerin üzeri mineral yağ ile kaplanarak streç film ile sarılıp 11-16 saat pasif rehidrasyona bırakılmıştır.

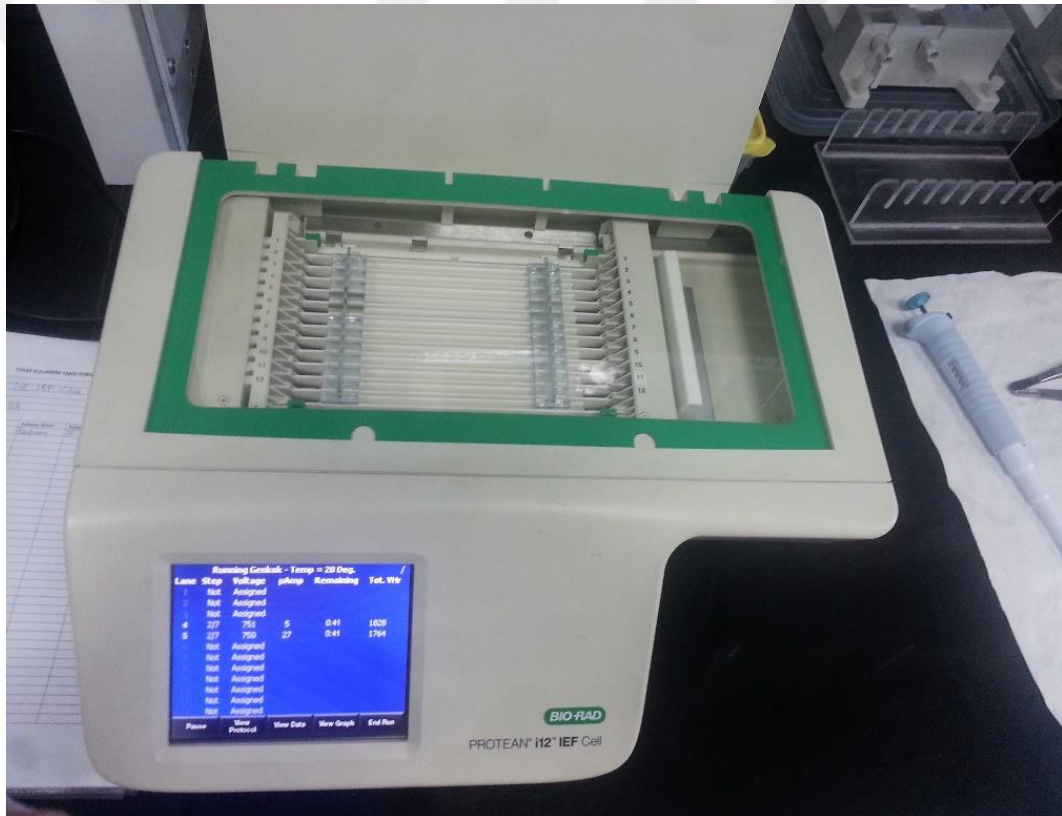
#### 2.2.10.1. IEF (izoelektrik odaklama) Aşaması

1. IEF tepsisine jel ve wik kâğıt yastıklar yerleştirilmeden önce 1mL mineral yağ eklenmiştir.



Şekil 2.11. wik kâğıt yastıkların IEF tepsisine yerleştirilmesi

2. Forseps yardımıyla IEF tepsisinin iki kenarında bulunan elektrotların üzerine yastıklama amacıyla elektrot kâğıtları (wik) *Şekil 2.11.* de olduğu gibi yerleştirilmiştir
3. Wik kâğıt yastıklar tepside jellerin uç kısımlarına gelecek şekilde ayarlanarak rehidrasyonu tamamlanan jel IEF tepsisine yerleştirilmiştir. Ardından jelin üzeri 1mL mineral yağ ile kaplanmıştır.
4. Kullanılan protokol tablo 2.5. de belirtildiği gibi ayarlanmıştır. *Şekil 2.12.* deki Bio-Rad Protean i12 IEF Cell cihazı kullanılarak jel üzerinde fokuslama işlemi yapılmıştır



*Şekil 2.12.* IEF işlemi

Tablo 2.6. IEF işlemi için kullanılan protokol

| Step | Voltage | Grad.  | $\mu$ Amp | Value | Units   |
|------|---------|--------|-----------|-------|---------|
| 1    | 500     | Rapid  | 50        | 2:00  | HH:MM   |
| 2    | 700     | Rapid  | 50        | 2:00  | HH:MM   |
| 3    | 1000    | Linear | 50        | 2:00  | HH:MM   |
| 4    | 4000    | Linear | 50        | 4:00  | HH:MM   |
| 5    | 8000    | Linear | 50        | 4:00  | HH:MM   |
| 6    | 8000    | Linear | 50        | 15000 | Volt Hr |
| 7    | 500     | Hold   | 50        |       |         |

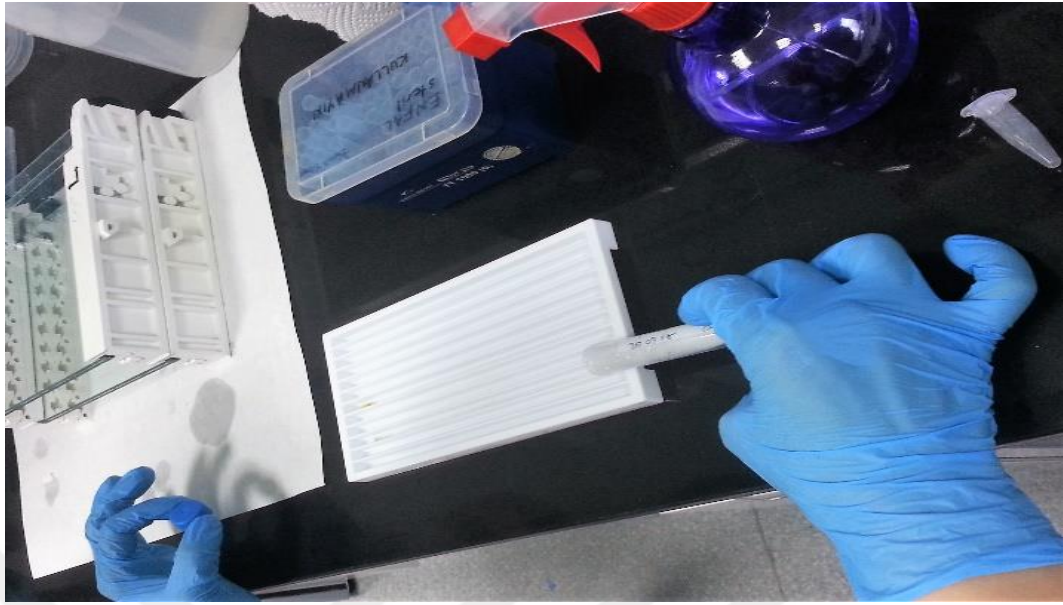
#### 2.2.10.2. Dengeleme 1 ve Dengeleme 2 Aşamaları (İkinci Boyuta Hazırlık)

- **Solüsyon 1:** %2 SDS, %30 Gliserol, 50 mM Tris, 27 mM DTT (şekil 2.13.)
- **Solüsyon 2:** %2 SDS, %30 Gliserol, 50 mM Tris, 125 mg IAA, 0.1g bromofenol blue (şekil 2.13.)



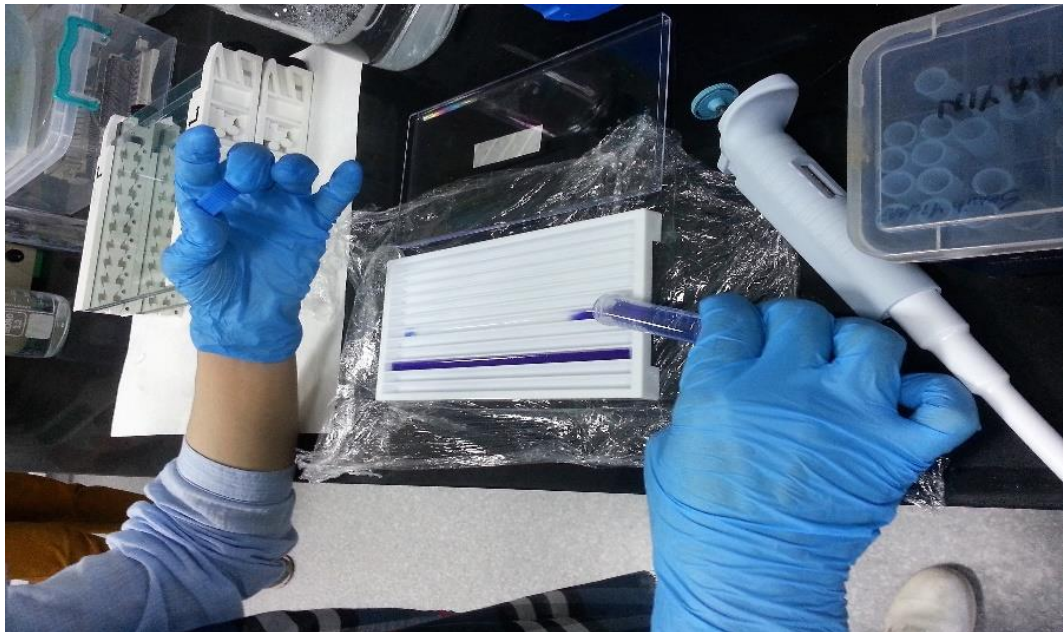
Şekil 2.13. Dengeleme solüsyonları

1. IEF işlemi sonrasında stripler jel tarafı yukarıya bakacak şekilde başka bir tepsiye alınmıştır.
2. 5mL dengeleme 1 tamponu Şekil 2.14 de olduğu gibi strip üzerine eklenerek 20dk çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.



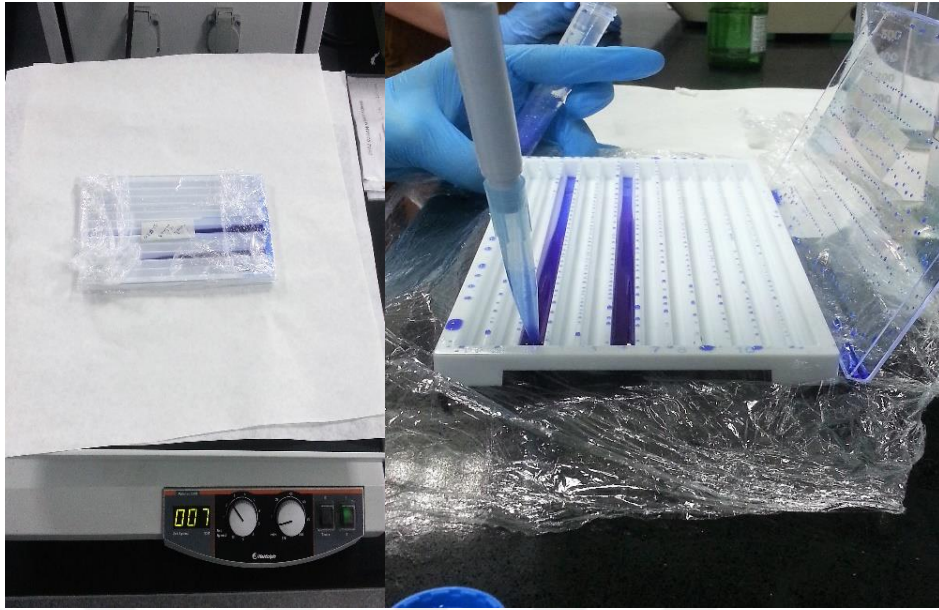
Şekil 2.14. Dengeleme 1 tamponunun strip üzerine eklenmesi

3. Inkübasyon bitince tampon tepsi kenarından sızdırılarak uzaklaştırılmıştır.
4. 5mL dengeleme 2 tamponu *şekil 2.15.* de olduğu gibi strip üzerine eklenerek 20dk çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.



Şekil 2.15. Dengeleme 2 tamponunun strip üzerine eklenmesi

5. Tekrar tepsi kenarından sızdırılarak veya *Şekil 2.16.* da olduğu gibi pipet yardımıyla tampon uzaklaştırılmıştır.



Şekil 2.16. Dengeleme tamponunun strip üzerine eklendikten sonra çalkalanması ve uzaklaştırılması

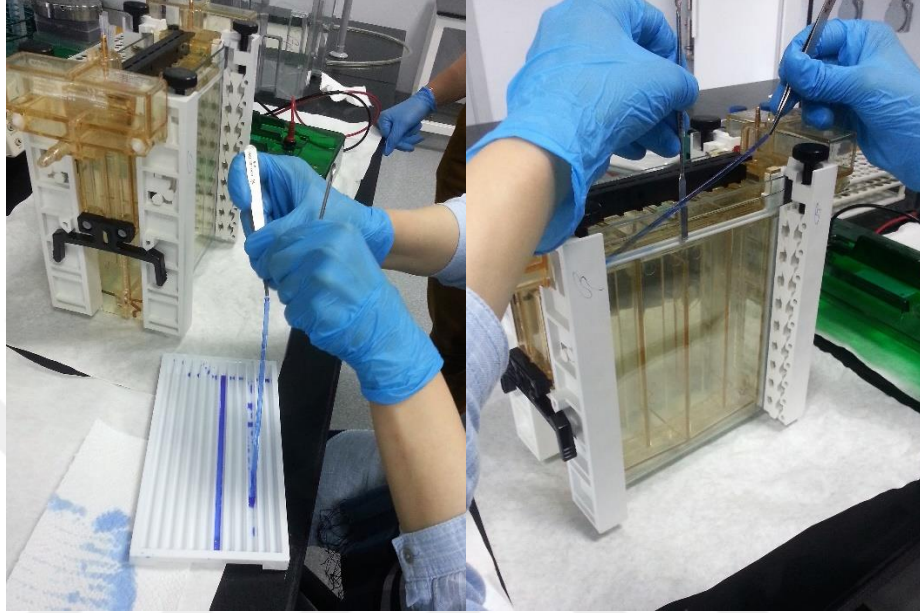
### 2.2.11. SDS-PAGE Aşaması

1. IPG striplerine uygun camlar, jel kasetleri ve spacerlar seçilerek düzenek kurulmuştur.
2. Hazırlanan %12'lik ayırma jeli cam tabakalar arasından bir pipet yardımıyla dökülmüş ve Şekil 2.17. de gösterildiği gibi polimerize olması beklenmiştir.



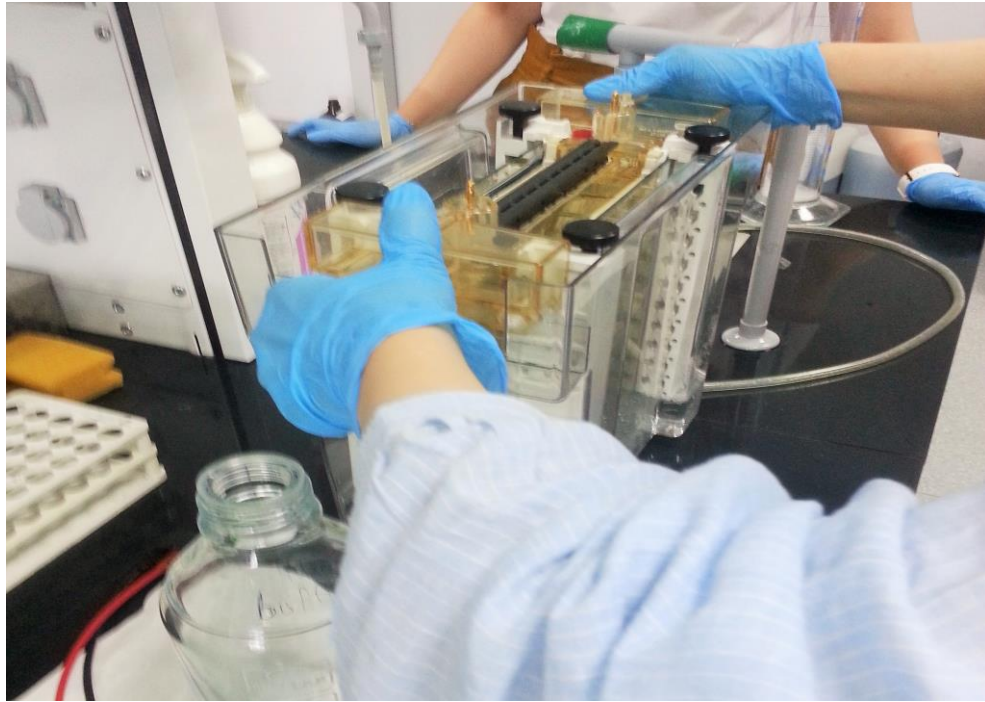
Şekil 2.17. Jellerin polimerizasyonu

3. Dengeleme aşamaları tamamlanan IPG stripler forseps yardımıyla Şekil 2.18. de olduğu gibi polimerize olmuş SDS-PAGE jel üzerine dikkatlice yerleştirilmiştir.



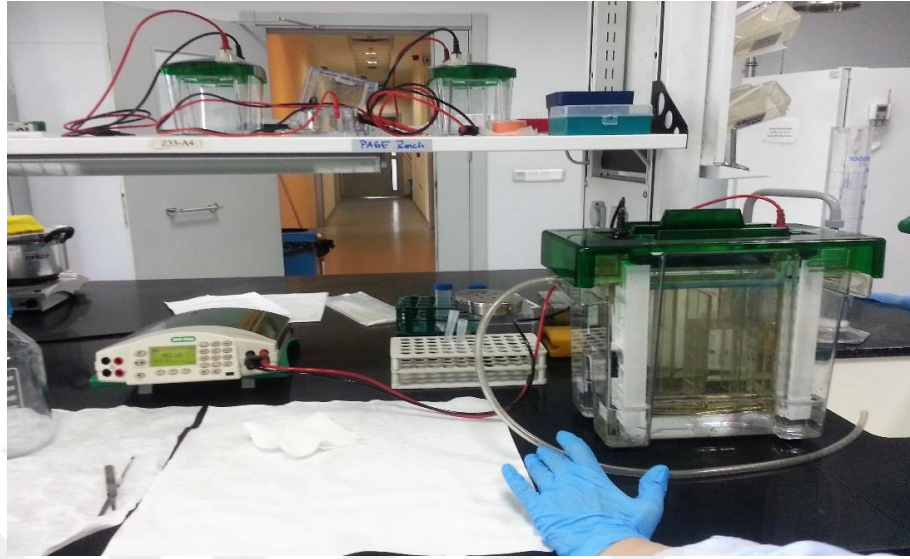
Şekil 2.18. IPG striplerinin jel üzerine yerleştirilmesi

4. Jel kaseti tanka yerleştirilerek koşturma tamponu ile doldurulmuştur (Şekil 2.19.).



Şekil 2.19. Jel kasetin tanka yerleştirilmesi

5. Güç kaynağı 30mA'e ayarlanarak 45dk yürütüldükten sonra 50mA'e çıkarılmıştır.



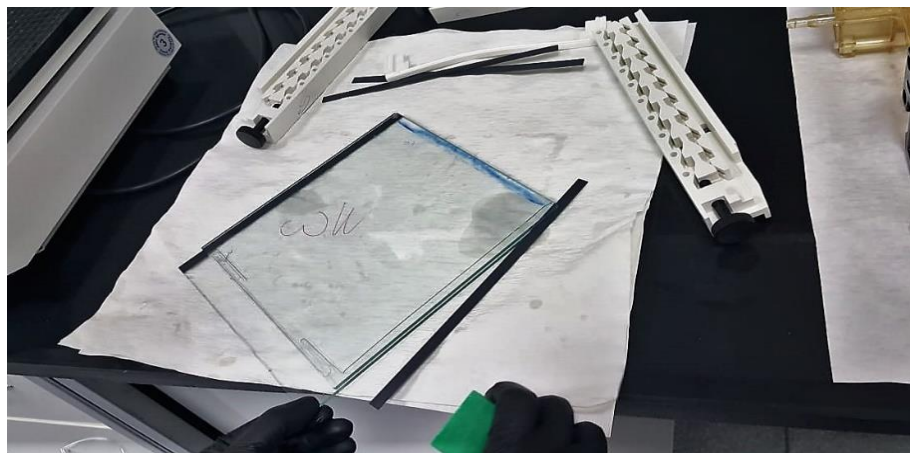
Şekil 2.20. SDS-PAGE düzeneği

6. Koşturma işlemi 4-5 saat boyunca proteinler jelin sonuna gelene kadar devam ettirilmiştir (Şekil 2.20.).
7. İşlem tamamlandıktan sonra hızlı gümüş boyama yöntemi ile boyama işlemi yapılmıştır.

#### 2.2.11.1. Hızlı Gümüş Boyama

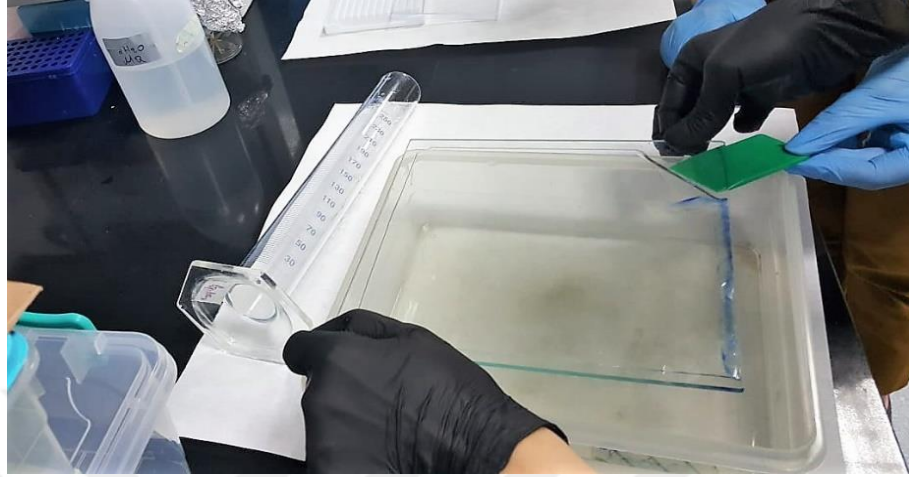
##### 2.2.11.1.1. Gümüş Boyama Çözeltilerinin Uygulanması

- SDS-PAGE bittikten sonra Şekil 2.21. de olduğu gibi jeller kasetlerden dikkatli bir şekilde çıkarılır.



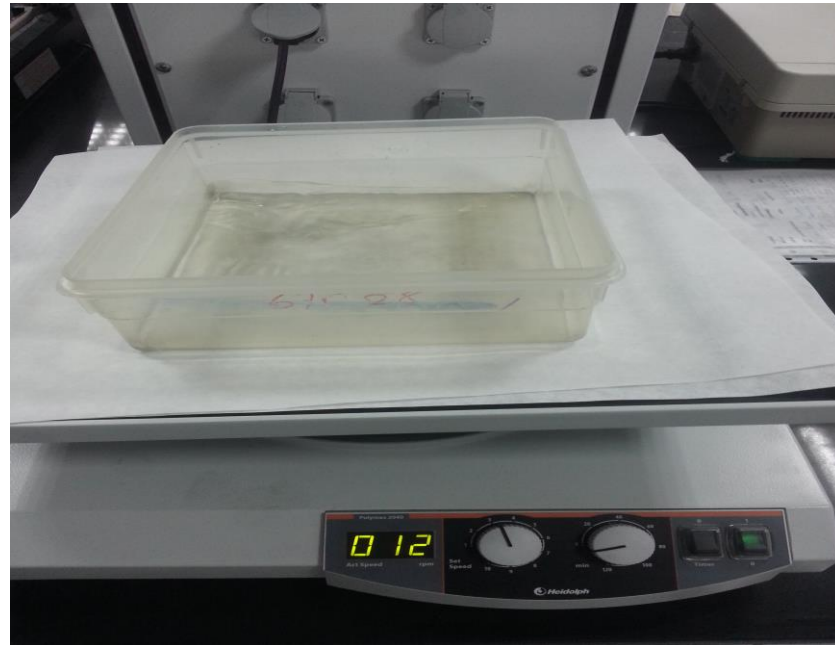
Şekil 2.21. Jellerin boyama için cam tabakalardan çıkarılması

- Jel plastik bir kap içersine *Şekil 2.22* de olduğu gibi kırılmadan dikkatlice alınmış ve 200mL A çözeltisinde 20dk düşük hızda çalkalanmıştır.



*Şekil 2.22. Jellerin boyama çözeltilerine alınma aşaması*

- A çözeltisi uzaklaştırılarak iki defa 10dk saf su ile düşük hızda çalkalanmıştır.
- Saf su uzaklaştırılarak 200 mL B çözeltisi içerisinde 1-2 dk düşük hızda çalkalanmıştır (*Şekil 2.23*).



*Şekil 2.23. Jellerin çalkalama aşaması*

- B çözeltisi uzaklaştırılarak saf su ile yıkadıktan sonra 200 mL C çözeltisi eklenerek 20 dk düşük hızda çalkalanmıştır.

- Saf su ile yıkandıktan sonra 200 mL D çözeltisi eklenerek bant oluşumu gözlenmiştir.
- Bant oluşumu istenen görünüme gelince E çözeltisi (10mL) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur.
- Boyama işlemi bittikten sonra Biorad ChemiDoc MP cihazı kullanılarak görüntüle işlemi yapılmıştır.



### **3. BÖLÜM**

#### **BULGULAR**

Bu çalışmada -80°C de stok kültürde muhafaza edilen bakteriler yeniden aktifleştirilerek kullanılmıştır (Yılmaz 2010; Mamoori 2017). Tohumlar yüzey sterilizasyonuna maruz bırakılıp kurutulduktan sonra bakterilerle muamele edilerek kaplanmıştır. Uygulama sonrası tohumlar sera koşullarında saksılara her bakteriden 3 tekerrür olmak koşuluyla ekilmiştir. Sulama işlemi rutin olarak yapılmıştır. Yapraklı döneme geçişte spad ölçümleri yapılmıştır. Morfolojik analizler yapıldıktan sonra tepe yaprakların çıktığı noktanın hemen altında gelişmiş en genç yaprağın tümü alınmış ve protein izolasyonu için kullanılmıştır. Bitkilerden izole edilen protein örnekleri SDS-PAGE ve 2D yöntemi ile analiz edilmiş ve kontrol ile kıyaslanarak aralarındaki ifade farklılıkları belirlenmiştir.

##### **3.1. SPAD Ölçümü**

Çalışmada Konica-Minolta SPAD 502 klorofil metre cihazı kullanılmıştır. Klorofil metre ile elde edilen değerler SPAD (Soil Plant Analysis Division) değeri olup, bu değer uygun eşitlik ile yaprak klorofil içeriğini tahmin edebilmektedir. Çalışmada seçilen örneklerin iki yaprağından ve iki farklı noktasından ölçüm yapılarak ortalama değer hesaplanmıştır.

Tablo 3.1. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen SPAD değerleri

| Uygulama | SPAD değeri          |
|----------|----------------------|
| S4+S8    | 41.00 <sup>abc</sup> |
| S3       | 36.40 <sup>d</sup>   |
| S4       | 43.56 <sup>a</sup>   |
| S5       | 40.56 <sup>abc</sup> |
| S6       | 40.80 <sup>abc</sup> |
| S7       | 42.93 <sup>ab</sup>  |
| S8       | 39.63 <sup>c</sup>   |
| S9       | 39.33 <sup>cd</sup>  |
| S10      | 40.30 <sup>bc</sup>  |
| Kontrol  | 32.96 <sup>e</sup>   |

Elde edilen SPAD değerleri karşılaştırıldığında ortalamalar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmuş ve en yüksek SPAD değeri 43.56 ile S4 bakterisi uygulanmış bitkilerden elde edilmiştir ( $p<0.05$ ). Bu SPAD değerini sırasıyla 42.93, 41.00, 40.80, 40.56 ve 40.30 SPAD değerleri ile S7, S4+S8, S6, S5 ve S10 bakterileri uygulanmış bitkiler takip etmiştir (Tablo 3.1). En düşük SPAD değeri ise 32.96 ile bakteri uygulanmamış kontrol bitkilerinden elde edilmiştir.

Bakteri uygulamasında elde edilen bütün SPAD değerleri kontrol bitkilerinden elde edilen değere göre önemli bulunmuştur.

### 3.2. Bitki Boy Ölçümü

Toprak seviyesinden en uzun yaprağa kadar olan yükseklik kaydedilmiştir. Her örnek için üç tekerrür halinde ölçüm alınarak ortalama değerler kaydedilmiştir.

Tablo 3.2. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen bitki boyuna ilişkin ortalama değerler

| Uygulama | Bitki Boyu (cm)     |
|----------|---------------------|
| S4+S8    | 63.67 <sup>ab</sup> |
| S3       | 62.33 <sup>b</sup>  |
| S4       | 65.00 <sup>ab</sup> |
| S5       | 66.00 <sup>ab</sup> |
| S6       | 66.33 <sup>ab</sup> |
| S7       | 74.00 <sup>a</sup>  |
| S8       | 70.00 <sup>ab</sup> |
| S9       | 67.00 <sup>ab</sup> |
| S10      | 70.33 <sup>ab</sup> |
| Kontrol  | 61.00 <sup>b</sup>  |

Bakteri uygulaması yapılan bitkilerin boy uzunluğu kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen tek anlamlı fark yalnızca S7 bakterisi uygulanan grupta görülmüştür (Tablo 3.2.). S7 bakterisi uygulanan bitkilerdeki ortalama boy uzunluğu 74 cm olarak elde edilmiştir ( $p \leq 0.05$ ). Diğer uygulamalardan elde edilen boy uzunluklarının 70.33 cm ile 62.33 cm arasında değiştiği görülmüştür. En düşük değer ise kontrol bitkisinde 61 cm olarak bulunmuştur.

### 3.3. Sürgün Yaş Ağırlığı

Hasat sonrası mısır bitkilerinin gövde ve yaprakları hassas terazide tartılarak ortalama değerler kaydedilmiştir.

Tablo 3.3. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen gövde-yaprak yaş ağırlık değerleri

| Uygulama | Sürgün Yaş Ağırlık (g) |
|----------|------------------------|
| S4+S8    | 96.00 <sup>ab</sup>    |
| S3       | 98.33 <sup>ab</sup>    |
| S4       | 100.00 <sup>a</sup>    |
| S5       | 98.00 <sup>ab</sup>    |
| S6       | 92.67 <sup>abc</sup>   |
| S7       | 90.33 <sup>abc</sup>   |
| S8       | 89.67 <sup>bc</sup>    |
| S9       | 93.33 <sup>abc</sup>   |
| S10      | 94.67 <sup>ab</sup>    |
| Kontrol  | 83.67 <sup>c</sup>     |

Varyans analiz sonuçlarına göre (Tablo 3.3.) en yüksek değer 100 g ile S4 bakterisi uygulanan bitkide elde edilmiştir ( $p \leq 0.05$ ). En düşük değer ise kontrol bitkisinde (83.67 g) elde edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında S4-8, S3, S4, S5 ve S10 bakteriyile yapılan uygulamalarda anlamlı derecede yüksek sonuç elde edilmiştir.

### 3.4. Yaprak Sayısı

Hasat sonrası mısır bitkilerinin yaprakları sayılarak değerlerin ortalaması kaydedilmiştir.

Tablo 3.4. Yaprak sayısına ilişkin değerler

| Uygulama | Yaprak Sayısı (adet) |
|----------|----------------------|
| S4+S8    | 7.33 <sup>a</sup>    |
| S3       | 7.33 <sup>a</sup>    |
| S4       | 6.66 <sup>a</sup>    |
| S5       | 7.33 <sup>a</sup>    |
| S6       | 7.00 <sup>a</sup>    |
| S7       | 7.00 <sup>a</sup>    |
| S8       | 6.66 <sup>a</sup>    |
| S9       | 7.33 <sup>a</sup>    |
| S10      | 7.00 <sup>a</sup>    |
| Kontrol  | 7.00 <sup>a</sup>    |

Yaprak sayısında uygulama yapılan ve yapılmayan gruplar arasında önemli bir fark görülmemiştir.

### 3.5. Bitki Kök Yaş Ağırlığı

Hasat sonrası gövde ve yapraklarından ayrılan kökler hassas terazide tartılarak değerlerin ortalaması kaydedilmiştir.

Tablo 3.5. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen kök yaş ağırlık değerleri

| Uygulama | Kök Yaş Ağırlığı (g)  |
|----------|-----------------------|
| S4+S8    | 74.66 <sup>a</sup>    |
| S3       | 62.66 <sup>abc</sup>  |
| S4       | 61.66 <sup>abcd</sup> |
| S5       | 70.33 <sup>ab</sup>   |
| S6       | 72.00 <sup>ab</sup>   |
| S7       | 70.33 <sup>ab</sup>   |
| S8       | 66.33 <sup>abc</sup>  |
| S9       | 60.33 <sup>bcd</sup>  |
| S10      | 55.66 <sup>cd</sup>   |
| Kontrol  | 49.33 <sup>d</sup>    |

Varyans analiz sonuçlarına göre (Tablo 3.5.) kök yaş ağırlıkları kıyaslandığında kontrol grubuna göre S4+S8, S3, S5, S6, S7 ve S8 bakterileriyle elde edilen sonuçlar anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). En yüksek değer 74.67 g ile S4 ve S8 bakterisinin karıştırılarak uygulandığı bitkilerde elde edilmiştir. En düşük değer ise 49.33 g ile kontrol grubunda elde edilmiştir.

Bitki kök yaş ağırlığı açısından veriler istatistiki açıdan önemli bulunmuştur.

### 3.6. Sürgün Kuru Ağırlığı

Hasattan sonra gövde ve yapraklar 70°C’de 48 saat kurutulduktan sonra hassas terazide tartılarak elde edilen değerlerin ortalaması kaydedilmiştir.

Tablo 3.6. Bakteri uygulaması sonucu elde edilen sürgün kuru ağırlık değerleri

| Uygulama | Sürgün kuru ağırlığı (g) |
|----------|--------------------------|
| S4+S8    | 9.33 <sup>cde</sup>      |
| S3       | 10.66 <sup>abc</sup>     |
| S4       | 10.66 <sup>abc</sup>     |
| S5       | 11.66 <sup>a</sup>       |
| S6       | 9.00 <sup>de</sup>       |
| S7       | 11.33 <sup>ab</sup>      |
| S8       | 10.00 <sup>bcd</sup>     |
| S9       | 10.66 <sup>abc</sup>     |
| S10      | 8.00 <sup>e</sup>        |
| Kontrol  | 6.00 <sup>f</sup>        |

Varyans analiz sonuçlarına göre (Tablo 3.6.) bakteri uygulaması yapılan tüm bitkilerde kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek değer elde edilmiştir. En yüksek değer 11.67g ile S5 bakterisinde, en düşük değer ise 6 g ile kontrol grubunda elde edilmiştir.

Bitki gövde ve yaprak ağırlığı açısından veriler istatistiki açıdan önemli bulunmuştur.

### 3.7. Bitki Kök Kuru Ağırlığı

Hasattan sonra mısır bitkisinin kökleri 70°C’de 48 saat kurutulduktan sonra hassas terazide tartılarak elde edilen değerlerin ortalaması kaydedilmiştir.

Tablo 3.7. Bitki kök kuru ağırlığına ilişkin varyans analiz tablosu

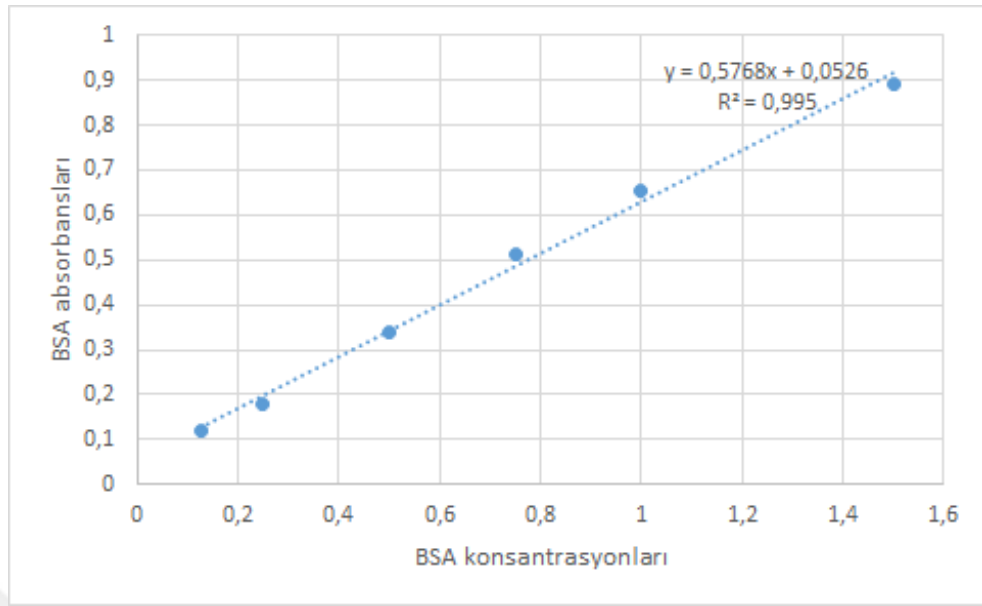
| Uygulama | Kök kuru ağırlığı (g) |
|----------|-----------------------|
| S4+S8    | 13.00 <sup>bc</sup>   |
| S3       | 16.00 <sup>abc</sup>  |
| S4       | 20.00 <sup>a</sup>    |
| S5       | 19.00 <sup>ab</sup>   |
| S6       | 15.33 <sup>abc</sup>  |
| S7       | 16.00 <sup>abc</sup>  |
| S8       | 19.33 <sup>a</sup>    |
| S9       | 20.00 <sup>a</sup>    |
| S10      | 19.33 <sup>a</sup>    |
| Kontrol  | 11.00 <sup>c</sup>    |

Varyans analiz sonuçlarına göre (Tablo 3.7.) kök kuru ağırlıkları kıyaslandığında S4, S5, S8, S9 ve S10 bakteri uygulaması yapılan bitkilerdeki değerler kontrole göre anlamlı derece de yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). En yüksek değer 20 g ile S4 ve S9 uygulamasından elde edilirken en düşük değer 11 g ile kontrol grubundan elde edilmiştir.

### 3.8. Bradford ile Protein Miktar Tayini

Bakteri uygulaması yapılan ve kontrol grubuna ait bitkilerin tepe yaprakların çıktığı noktanın hemen altında gelişmiş en genç yaprağı alınarak protein izolasyonu yapılmış ve protein miktarları belirlenmiştir.

Miktar tayini için "Bio-Rad Protein Assay" yöntemi kullanılmıştır. Hesaplamalarda Standart protein olarak Bovin Serum Albumin (BSA) kullanılmış ve grafik eğrisi oluşturulmuştur (Grafik 3.1.). BSA miktarı 0.125mg/ml, 0.25mg/ml, 0.50mg/ml, 0.75mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml konsantrasyonlarına ayarlanmış ve 660nm’deki absorbansları ile bitki proteinlerin absorbansları karşılaştırılarak regresyon eşitlik formülü ile proteinlerin miktarları belirlenmiş ve elde edilen değerler Tablo 3.8. de verilmiştir.



Grafik 3.1. Bio-Rad™ protein miktar tayini kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

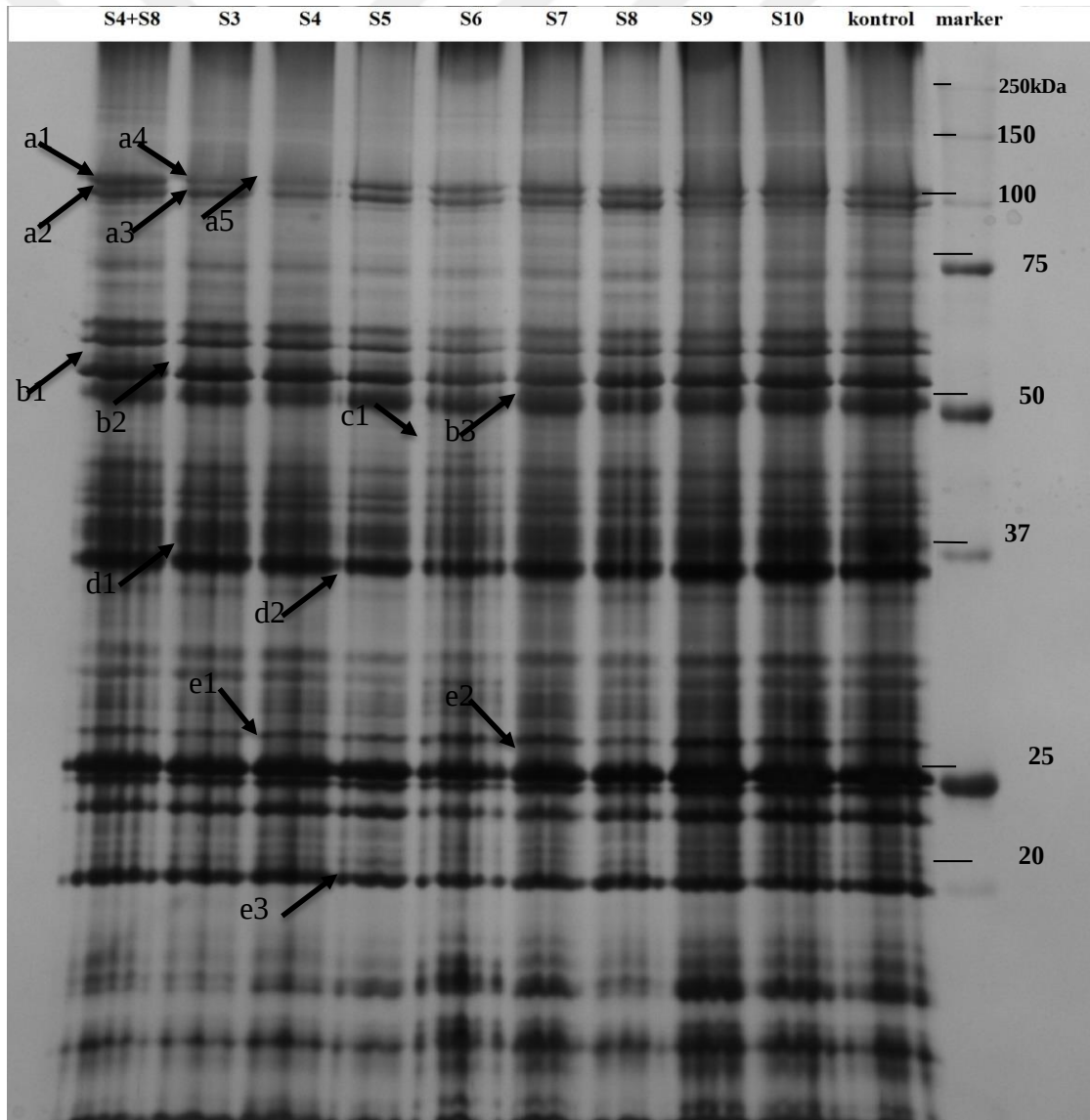
Tablo 3.8. Bakteri uygulamalarının Bradford yöntemi ile elde edilen protein konsantrasyonları

| Örnekler | Protein Konsantrasyonu (mg/mL) |
|----------|--------------------------------|
| S4+S8    | 0.0450                         |
| S3       | 0.2746                         |
| S4       | 0.2755                         |
| S5       | 0.3024                         |
| S6       | 0.4289                         |
| S7       | 0.5884                         |
| S8       | 0.1238                         |
| S9       | 0.1949                         |
| S10      | 0.5520                         |
| Kontrol  | 0.3881                         |

### 3.9. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroferez)

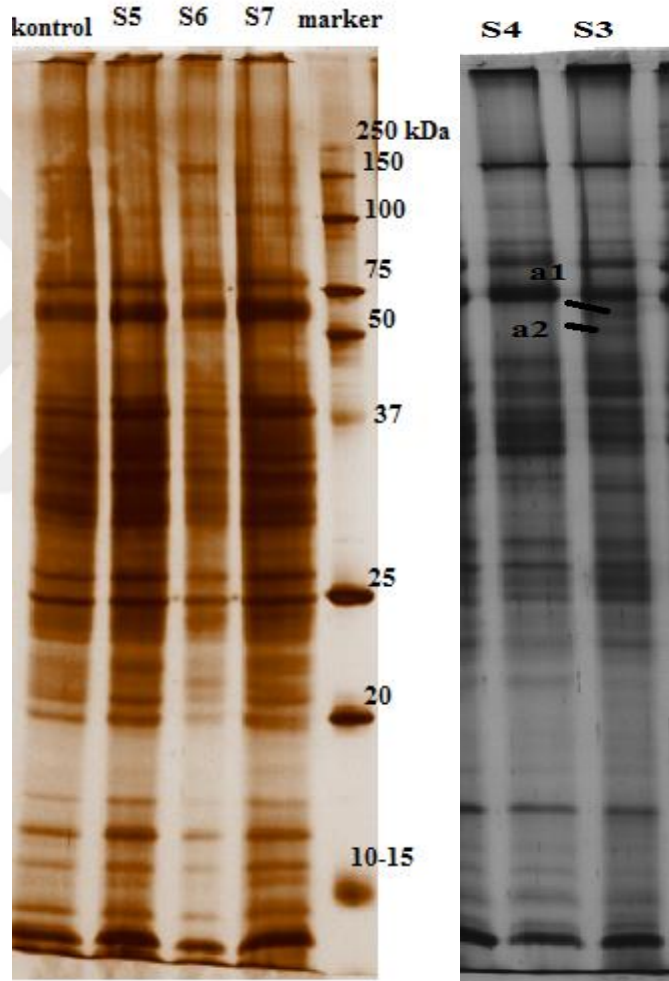
SDS-PAGE için kontrol ve uygulama gruplarına ait bitki proteinleri her örnek için içerisindeki miktar eşit olacak şekilde ayarlanmış (1.5 µg) ve önceden hazırlanmış jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Örnekler yükleme jelini geçene kadar 30 mA de akım

uygulanmış, ardından ayırma jeline geçtiğinde de 50 mA'ye yükseltilmiştir. Koşturma işlemi proteinlerin jelin sonuna gelmesine kadar devam ettirilmiştir. Ardından jeller camlar arasından dikkatli bir şekilde çıkarıldıktan sonra gümüş boyama işlemi yapılmış ve Bio-Rad Chemidoc Mp görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir (Şekil 3.1.). SDS-PAGE işlemi iki tekrar olarak yapılmıştır. Kaydedilen görüntülerde kontrol bitkisinin ve diğer bitkilerin örnekleri karşılaştırılarak bant farklılıkları belirlenmiştir. Örnekler içerisinde S3 (*Bacillus* sp. KH16.2), S4 (*Bacillus thuringiensis* SY49.1), S7 (*Bacillus* sp. KH6.4) bakteri uygulaması yapılan bitki proteinleri 2D jel elektroforezi için seçilmiştir.



Şekil 3.1. Bakteri uygulanan bitkilerin ve kontrol bitkisinin SDS-PAGE jel görüntüsü

Yapılan SDS-PAGE işlemleri sonucunda S3, S4, S7 uygulamalarında kontrol ile kıyaslandığında artış ve azalış yönündeki ifade farklılıkları belirgin şekilde görülmektedir. Örneğin 25 kDa boyutundaki e1 ve e2 protein bandı S7 ve S4 bakterisi uygulanan bitkide kontrole göre belirgin şekilde fazla ifade edilmiştir. Bakteri uygulaması yapılan S6 ve S7 örneğine ait 50-37 kDa civarında olan c1 ve b3 bandının kontrol örneğine göre daha belirgin olduğu Şekil 3.1. de görülmektedir.

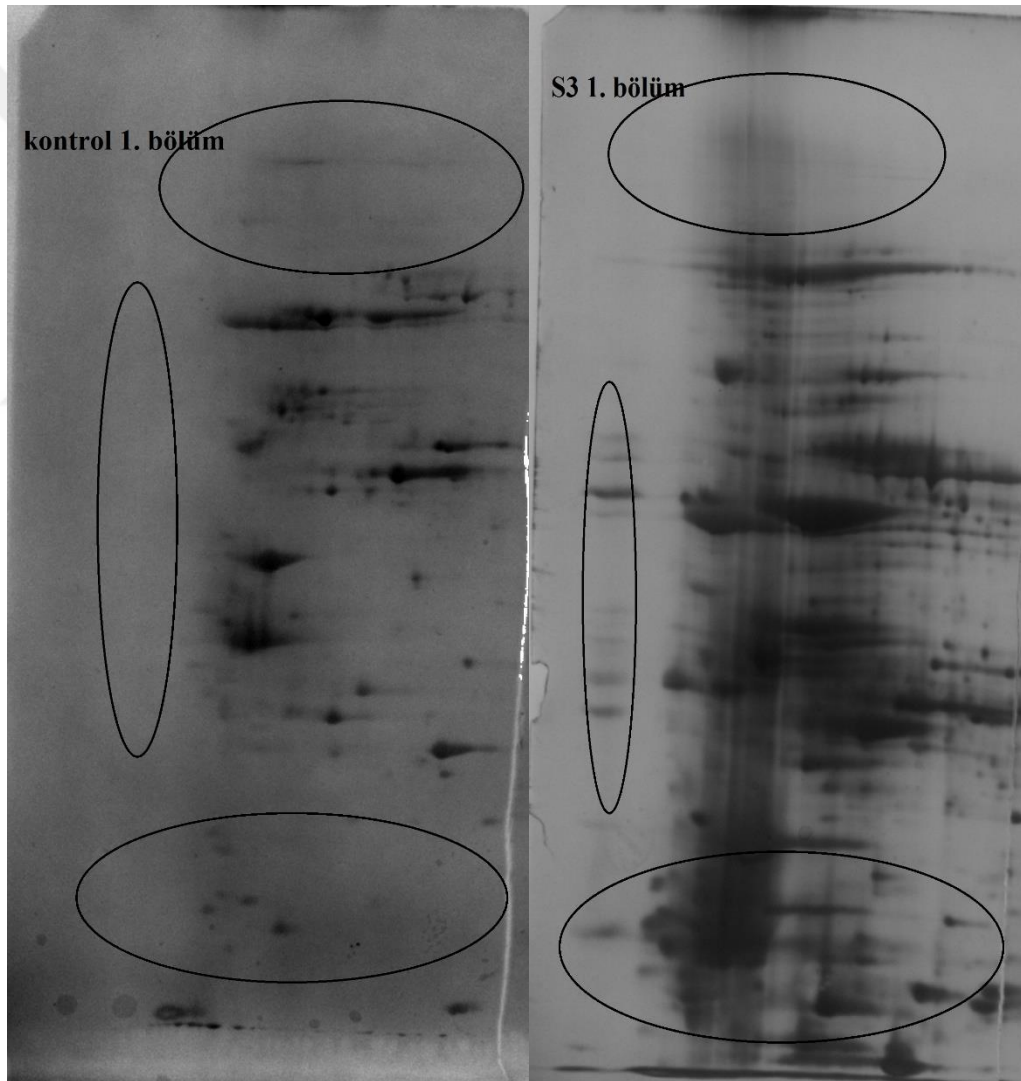


Şekil 3.2. Bakteri uygulanan bitkilerin ve kontrol bitkisinin SDS-PAGE jel görüntüsü

Bakteri uygulaması yapılan S3 de görünmekte olan 75-50 kDa civarı a1 ve a2 bandı kontrol bitkisinde görülmemektedir (Şekil 3.2.). Bu farklılıklar 2D jel elektroforezinde çok net bir şekilde görülebilmektedir.

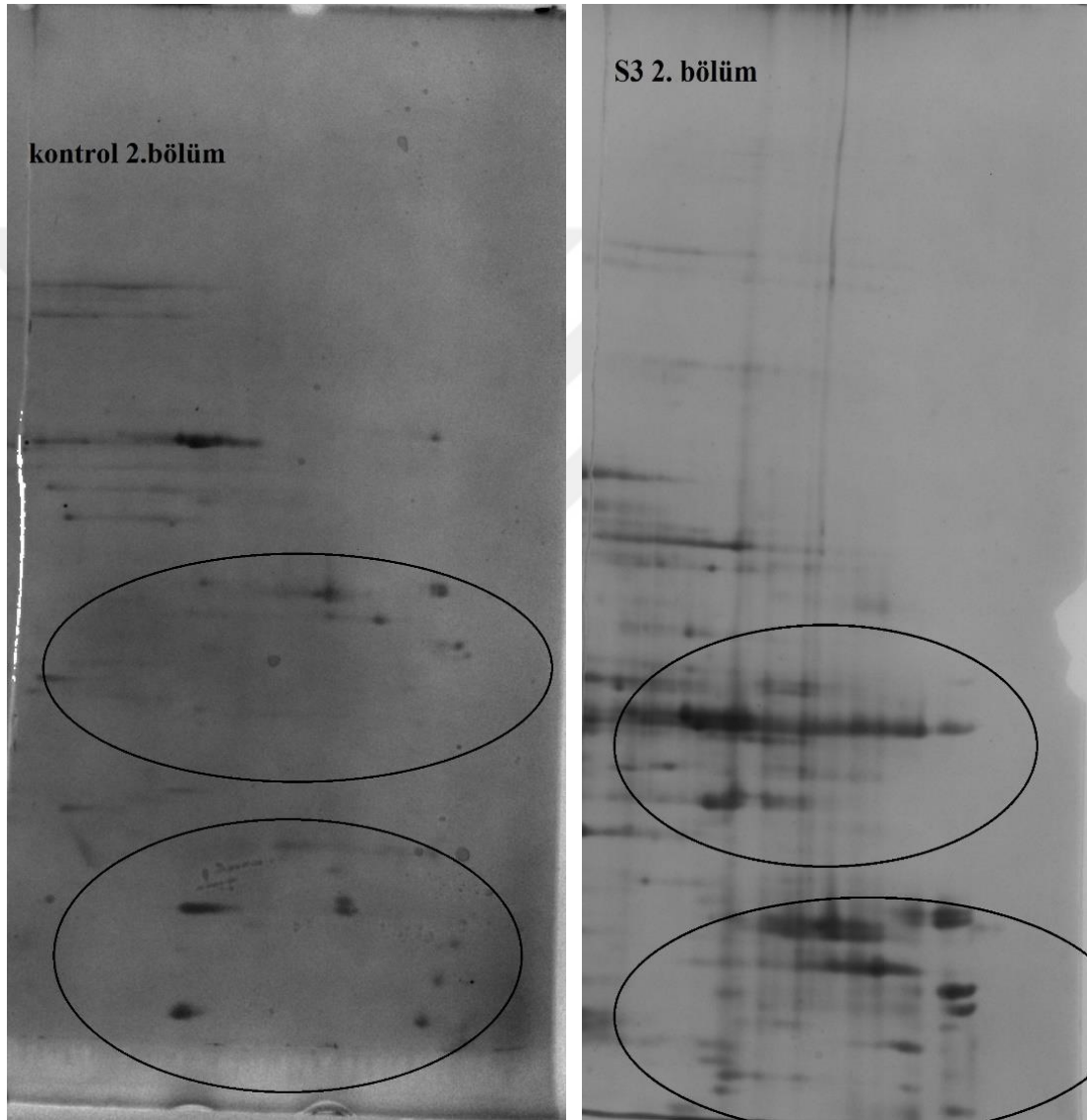
### 3.10. İki Boyutlu (2D) Jel Elektroforezi

S3(*Bacillus* sp. KH16.2), S4(*Bacillus thuringiensis* SY49.1), S7 (*Bacillus* sp. KH6.4) uygulanan ve kontrol bitkilerinin protein örnekleri 2D jel elektroforezi için striplere yüklenerek (300 µg) belirlenen protokolde yürütülmüştür. 2. aşamada SDS-PAGE de yürütülerek moleküler ağırlığına göre ayılmıştır. Proteinler jelin sonuna gelene kadar yürütülmüştür. Daha sonra gümüş boyama yapılarak Bio-Rad Chemidoc Mp cihazından jel görüntüleri kaydedilmiştir.



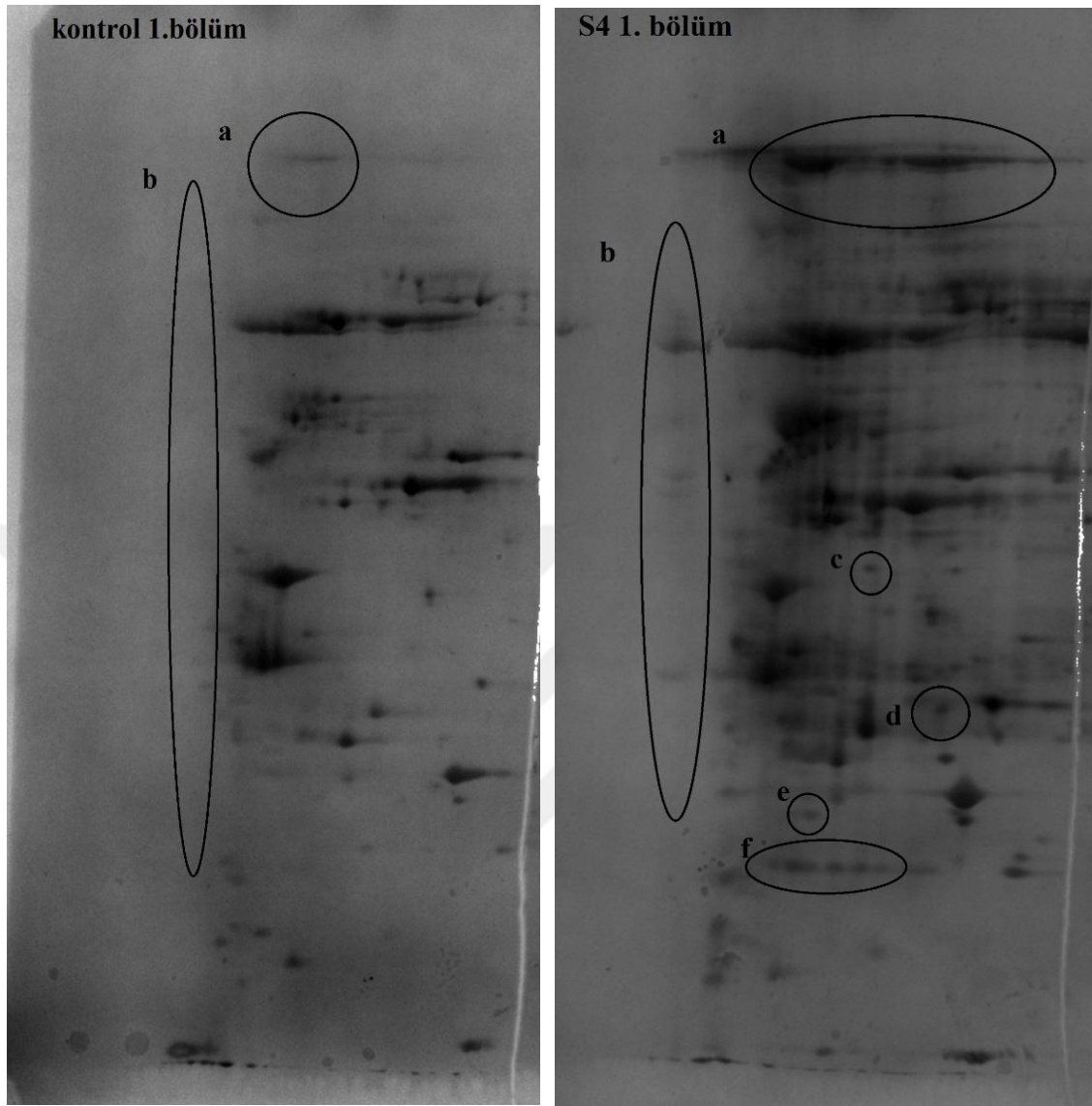
Şekil 3.3. Kontrol ve S3 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 1. Bölüm (pH, 3-6.5) 2D jel görüntüsü

Kontrol ve S3 (*Bacillus* sp. KH16.2) uygulaması yapılan bitkilerin 2D jel görüntülerinin karşılaştırılması yapıldığında belirgin ifade farklılıkları görülmektedir. Örneğin S3 uygulamasında 1. bölümde görünen spotlar kontrolde ifade edilmemiştir. 2D jel görüntüsünde ortaya çıkan protein ifade farklılıklarının bitkilerin büyüme farklılığındaki değişimlerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.



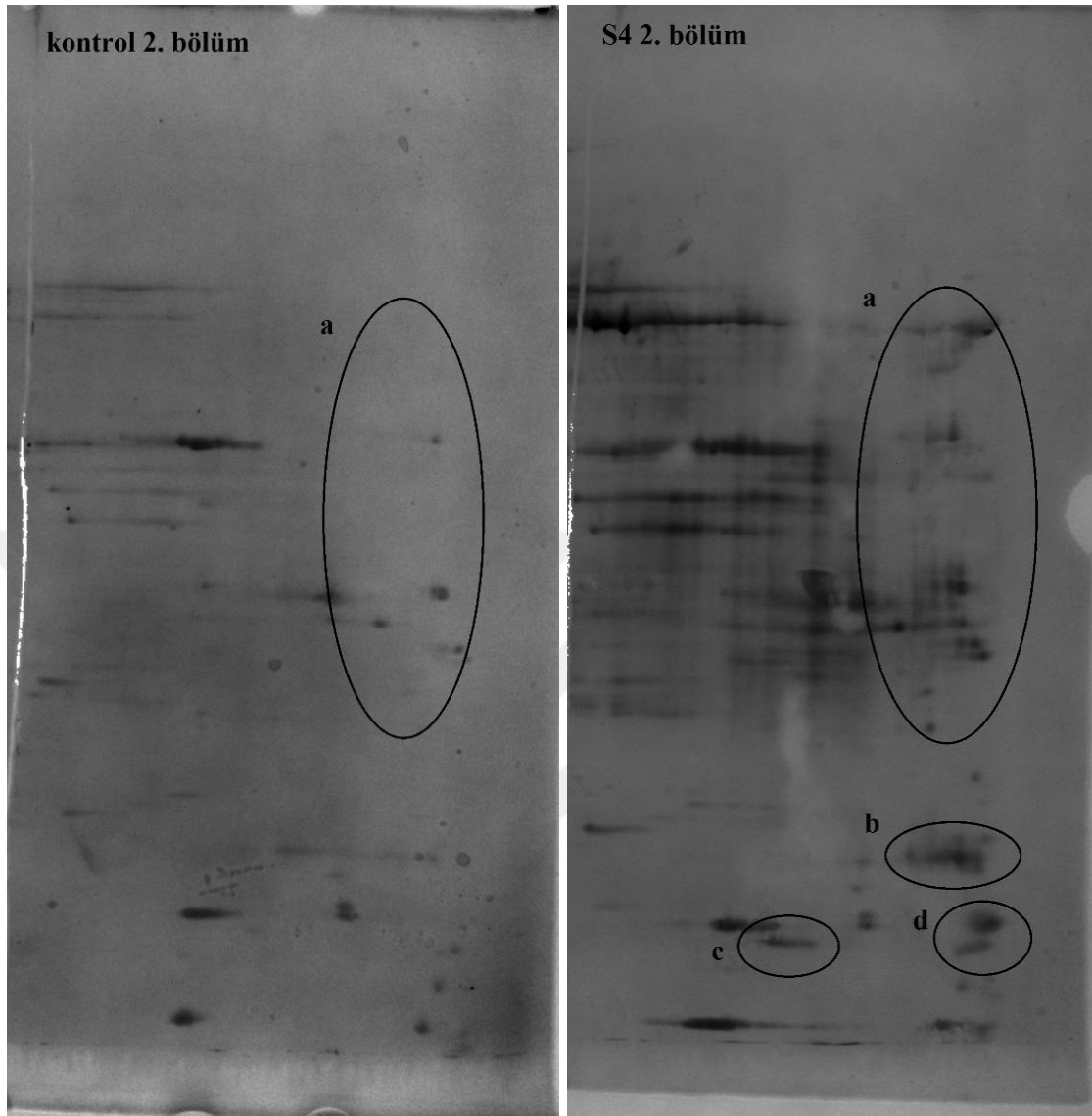
Şekil 3.4. Kontrol ve S3 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 2. bölüm (pH, 6.5-10) 2D jel görüntüsü

Şekil 3.4. de S3 bakteri uygulaması yapılan bitkinin 2D jel görüntüsünde işaretlenen yerdeki spotlar kontrol bitkisinde görülmemektedir.



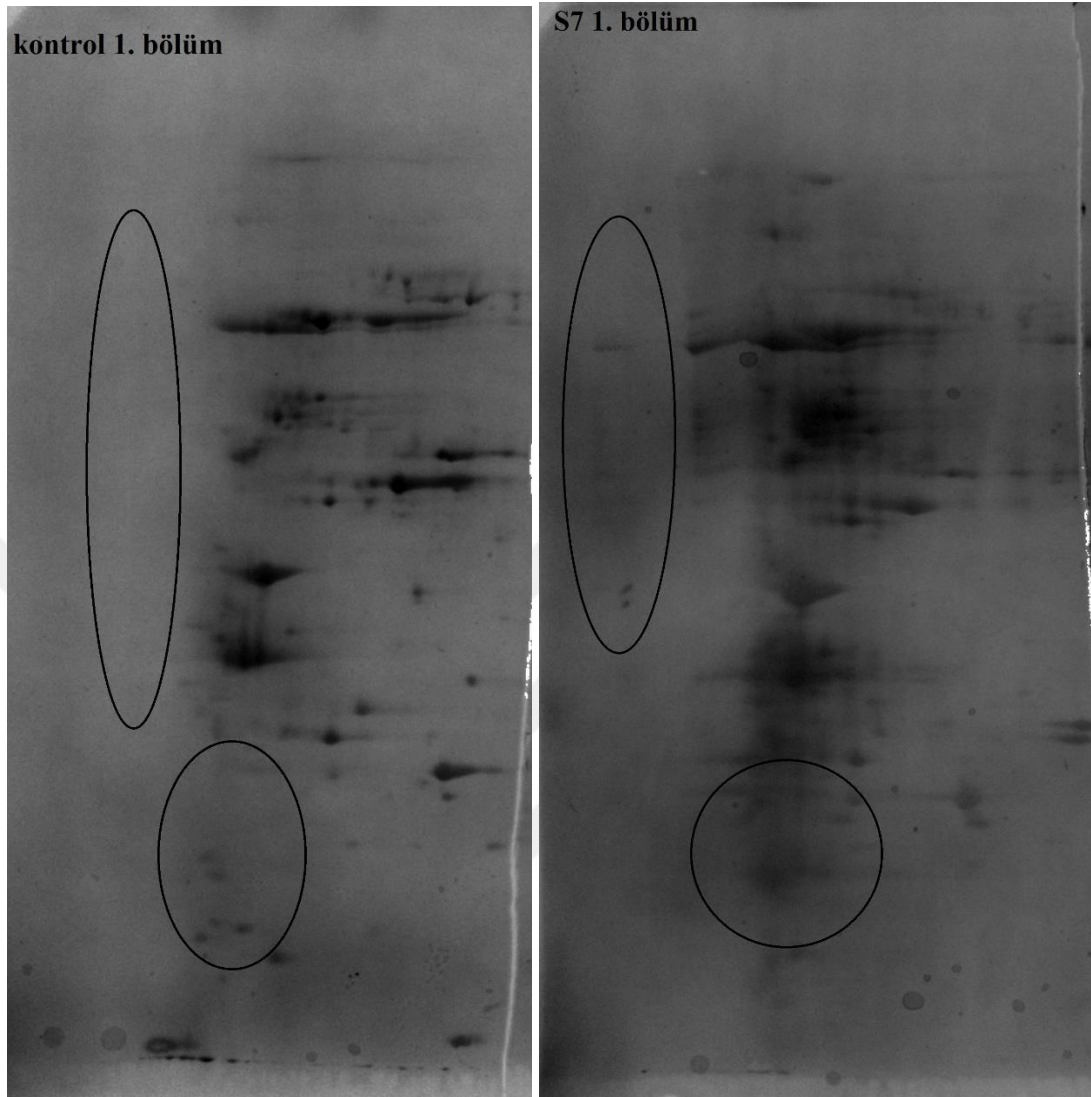
Şekil 3.5. Kontrol ve S4 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 1. bölüm (pH, 3-6.5) 2D jel görüntüsü

Şekil 3.5. de kontrol ve S4 (*Bacillus thuringiensis* SY49.1) bakteri uygulaması yapılan bitkinin 2D jel görüntüsü karşılaştırılmıştır. S4 jel görüntüsünde c, d, e, f olarak işaretlenen yerde görünen spotlar kontrolde görünmemektedir. S4 ve kontrolde a olarak işaretlenen bölümde regülasyon farklılığı olabileceği düşünülmektedir.



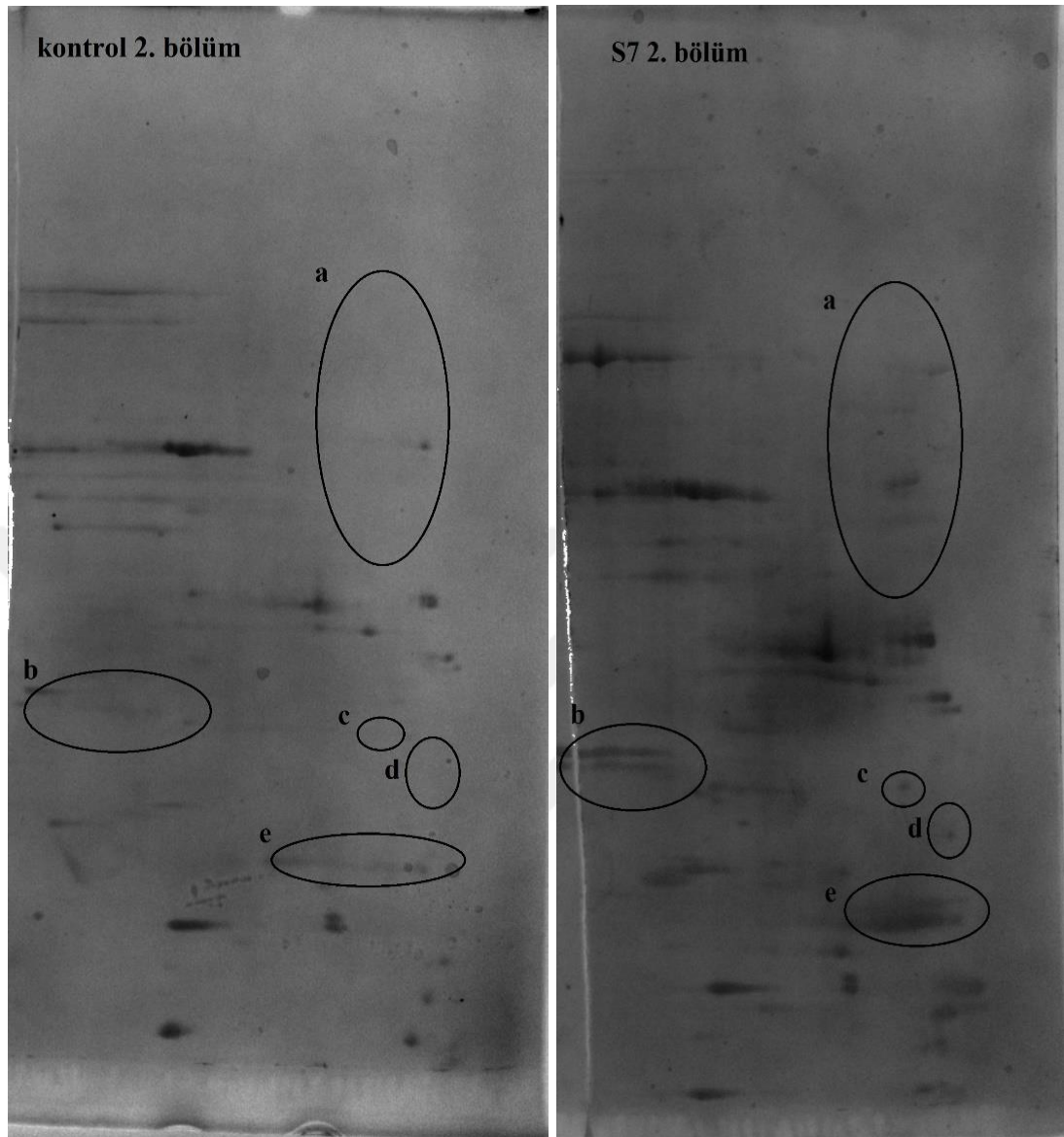
Şekil 3.6. Kontrol ve S4 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 2. bölüm (pH, 6.5-10) 2D jel görüntüsü

Şekil 3.6. da S4 uygulanmış bitkiden elde edilen proteinde a, b, c ve d olarak işaretlenen yerde görünen spotlar kontrolde ifade edilmemiştir.



Şekil 3.7. Kontrol ve S7 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 1. Bölüm (pH, 3-6.5) 2D jel görüntüsü

Şekil 3.7. de kontrol ve S7 (*Bacillus* sp. KH6.4) bakteri uygulaması yapılan bitkinin 2D jel görüntüsü karşılaştırılmıştır. 2D görüntülerinde işaretlenen kısımlardaki protein spotları incelendiğinde S7 ve kontrol arasındaki farklılıklar belirgin şekilde görülmektedir.



Şekil 3.8. Kontrol ve S7 bakteri uygulaması yapılan bitkilerin proteinlerinin 2. Bölüm (pH, 6.5-10) 2D jel görüntüsü

Şekil 3.8. de görüldüğü gibi S7 uygulamasından elde edilen örneklerde a, b, c, d ve e de görünen spotlar kontrol bitkisinde ifade edilmemiştir.

## 4. BÖLÜM

### TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

#### 4.1. Tartışma

PGPR, genellikle kaynak edinimini (N, P, Fe, Mg vb) kolaylaştırarak, bitki hormonu seviyelerini değiştirerek veya dolaylı olarak çeşitli patojenik ajanların bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki inhibitör etkilerini azaltarak bitki büyümesini teşvik etmektedir. Başka bir deyişle biyokontrol bakterileri gibi davranarak bitki büyümesini olumlu yönde etkilemektedir (Glick, 1995). İdeal iklim koşulları altında test edildiğinde bakterizasyonun verimi önemli düzeyde artırdığı bildirilmiştir (Lazarovits ve Norwak 1997).

Bununla birlikte, mısır dahil olmak üzere tahılların ve diğer gramajlı bitkilerin köklerini ve toprak üstü kısımlarını kolonize eden çeşitli büyüme geliştirici bakteriler bulunmuş olup sıklıkla *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* cinslerine ait türlerdir (Umali- Garcia ve ark. 1980, McInroy ve Kloepper 1995, Chelius ve Triplett 2000). Mısırın bu tür bakterilerle aşılmasının mahsul verimini artırdığı rapor edilmiştir (Jacoud ve ark. 1998; Riggs ve ark. 2001).

Mısır ikincil metabolizması üzerine yapılan araştırmalar sonucunda *Azospirillum* aşılmasını takiben büyük oranda kalitatif ve kantitatif değişikliklerin meydana geldiği ortaya koyulmuştur (Walker ve ark., 2011). Ayrıca bazı çalışmalarda *Bacillus* cinsine ait PGPR türlerinin sınırlı su koşullarında bitki büyümesini teşvik etmede diğer PGPR türlerine oranla daha fazla avantaj sağladığı belirtilmiştir (Chakraborty ve ark., 2013; Kasim ve ark., 2013; Radhakrishnan ve ark., 2017).

#### 4.1.1. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Klorofil İçeriğine Etkisi

Bu tez kapsamında yapılan morfolojik analizlerde elde edilen sonuçlarda klorofil içeriği parametresinde SPAD 502 cihazı kullanılarak mısır bitkilerinin klorofil içerikleri belirlenmiştir. Yapılan analizde en yüksek değer (43.56) S4 (*Bacillus thuringiensis* SY49.1) bakteri uygulaması yapılan bitkilerde en düşük değer (32.96) ise kontrol bitkilerinde elde edilmiştir. S4+S8(*Bacillus thuringiensis* SY49.1+bacillus sp. KH6.2), S3 (*Bacillus* sp. KH16.2), S5 (*Bacillus* sp. KH6.1), S6 (*Bacillus subtilis* KH28.1), S7 (*Bacillus* sp. KH6.4) ve S9 (*Bacillus* sp. KH18.2) bakteri uygulaması yapılan bitkilerinin klorofil değerleri sırasıyla 41.00, 36.40, 40.56, 40.80, 42.93, 39.63, 39.33 ve 40.30 SPAD olarak kontrol örneklerinin klorofil değerinden yüksek bulunmuştur.

Wang ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmada *Bacillus cereus* AR156, *Bacillus subtilis* SM21 ve *Serratia* dan oluşan bir karışımın salatalık yapraklarındaki rbcS ve rbcL (RuBisCo küçük ve büyük alt birimler) genlerinin transkripsiyonel seviyelerini, şiddetli kuraklık stresi altındaki kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında koruyarak klorofil içeriğini artırdığını rapor etmişlerdir.

Yıldırım ve ark. (2008) tuz stresi koşullarında PGPR (*Staphylococcus kloosii*, *Kocuria erythromyxa*) ile aşılınmış turp bitkilerinde PGPR aşılması yapılmamış bitkilere kıyasla klorofil içeriği üzerine önemli artışlar elde edildiğini belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada kontrol örneklerinin SPAD değeri 32.1 iken PGPR uygulanmış bitki örneklerinde 40.1 SPAD bulunmuştur.

Yıldırım ve ark. (2011) *Bacillus cereus*, *Brevibacillus reuszeri* ve *Rhizobium rubi* uygulanmış brokoli bitkilerinin uygulama yapılmamış bitkilere göre SPAD klorofil okuma değerlerinin artmış olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada *Bacillus cereus*, *Brevibacillus reuszeri*, *Rhizobium rubi* uygulanan bitkiler ve uygulama yapılmayan kontrol bitkileri karşılaştırıldığında sırasıyla %14, %14 ve %13 oranında klorofil içeriğinin arttığını bildirmişlerdir.

Güllüce ve ark. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada çeşitli dozlarda turp bitkilerine humik asit ve PGPR uygulaması yapmışlar ve bitkide klorofil içeriğinin önemli düzeyde değiştiğini bildirmişlerdir. Klorofil içeriğinde en yüksek değer PGPR uygulaması

yapılan turp bitkisinde 41.1 SPAD iken kontrol bitkisinde 32.1 SPAD olarak elde edildiği rapor edilmiştir.

Porcel Ruiz-Lozano (2004) yaptığı bir araştırmada *Bacillus subtilis* (GB03 suşu) ile muamele edilmiş soya fidelerinin, işlem görmemiş fidelere göre daha yüksek prolin ve klorofil içeriğine sahip olduğunu ve bunun yanında bitkilerin ozmotik dengesini koruduğunu ve tuz stresi altında fotosentez aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada elde edilen değerlerde bu çalışmalarla aynı yöndedir.

#### 4.1.2. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Kök Yaş ve Kuru Ağırlığına Etkisi

Yapılan bu çalışmada kontrol bitkisine kıyasla bakteri uygulanmış bitkilerin kök gelişiminin arttığı belirlenmiştir. S4+S8 (*Bacillus thuringiensis* SY49.1 +*bacillus* sp. KH6.2) bakteri karışımı (1:1) uygulanan mısır bitkileri kök yaş ağırlığı yönünden kontrol grubu ve tek bakteri uygulaması (S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9) yapılan bitkilere göre daha yüksek veri (74.66 g) ortaya koymuştur. Kök yaş ağırlık parametresinde en düşük değer 49.33 g ile kontrol bitkilerinde elde edilmiştir. Yine kök kuru ağırlığı yönünden en düşük değer kontrol bitkisinde 11.00 g ile, en yüksek değer ise S4 uygulanmış grupta 20.00 g olarak elde edilmiştir.

Latake ve ark. (2009) yapmış oldukları araştırmada farklı biyoinokülanların ve bunların kombinasyonlarının inci darı mahsulünün büyümesi ve verimi üzerindeki etkisini incelemek için bir saha denemesi yapmışlardır. *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Acetobacter* sp. ve fosfat çözücü *Bacillus megaterium* inci darı tohumlarına tek başına ve kombinasyon halinde uygulanmıştır. Mahsulün çeşitli büyüme ve verim parametreleri üzerine kaydedilen gözlemler, bu mikroorganizmaların birleşik aşılmasının, tek kültür aşılmasına kıyasla sinerjik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Kombine aşılama işlemi, incelenen tüm büyüme parametrelerinde ve ayrıca verimde önemli artışlar göstermiştir. Böylece bu biyoinokülanların inci darının büyümesini ve verimini arttırmadaki etkinliğinin kanıtlandığını rapor etmişlerdir.

Turan ve arkadaşları (2012), PGPR'nin bitki verimi üzerine etkisini araştırdığı çalışmalarında *Bacillus subtilis* OSU-142, *Bacillus megaterium* M3 ve *Azospirillum brasilense* Sp245 ile aşılanmış buğday bitkisinin verimi sırasıyla %24, %19, %19

oranında artırdığını çoklu ortak inokülasyonda ise bitki veriminin %33 yükseldiğini tespit etmişlerdir.

Telek ve ark. (2019) da yapmış oldukları bir araştırmada *Bacillus subtilis* uygulaması yapılmış kırmızı biber bitkilerinde kök yaş ve kuru ağırlık parametresinde en yüksek değerin bakteri uygulaması yapılan grupta 13.34 g ve 3.85 g olarak elde edilirken kontrol grubunda 7.06 g ve 2.58 g olarak elde etmişlerdir.

Walia ve ark. (2013) yapmış oldukları bir araştırmada *Bacillus subtilis* uygulanmış domates bitkilerinde kök kuru ağırlığının bakteri uygulaması yapılmamış kontrol bitkisine göre %54.08 oranında arttığını bildirmişlerdir.

Naveed ve ark. (2014) Mısır bitkisinde yaptıkları bir çalışmada *Burkholderia phytofirmans* PsJN suşu ile aşıl原因an mısır bitkilerinin aşıl原因mamış kontrole kıyasla daha yüksek kök biyokütlesine (%70'e kadar) sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Myresiotis ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada mısır bitkilerine *B. subtilis* FZB24, *B. subtilis* GB03 ve *B. subtilis* FZB24+*B. Subtilis* GB03 uygulaması yapmış ve 36. günde hasat etmişlerdir. Bakteri uygulaması yapılan mısır bitkilerinde kök kuru ağırlığının kontrole göre sırasıyla %38-65, %43-61 ve %39-65 arasında attığını tespit etmişlerdir.

Thakur ve ark. (2017), yaptıkları araştırmada mısır bitkisinin tohumlarını *Bacillus arenosi* bakterisi ile inoküle ederek gelişimi gözlemlemiş ve sonucunda bitki gelişiminin arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmayı yürüten araştırmacılar kontrol grubuna göre bakteri uygulanmış mısır bitkisinin kök kuru ağırlığının %93 oranında arttığını bildirmişlerdir.

Hussein ve arkadaşları (2013) yapmış oldukları bir çalışmada mısır bitkisine *Burkholderai* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. bakterilerini uygulamış ve verim özelliklerini araştırmışlardır. Kök kuru ağırlık özelliğinde bakteri uygulaması yapılan bitkilerden uygulama yapılmayan kontrol bitkisine göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. En yüksek değer *Burkholderai* sp. uygulaması yapılan bitkide 77 g olarak, en düşük değer ise kontrol bitkisinde 60 g olarak elde edilmiştir.

Menéndez E. ve ark. (2020) yaptığı araştırmada *Esorhizobium ciceri* CCANP14 suşu ve *Mesorhizobium tamadayense* CCANP122 suşlarını domates bitkilerine uygulanmış ve

vejetatif parametreleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Fide kök yaş ve kuru ağırlık parametresinde en yüksek değer *Esorhizobium ciceri* CCANP14 suşu uygulanmış fidede sırasıyla 3.15 g ve 0.38 g olarak elde edilirken en düşük değer kontrol fidesinde sırasıyla 0.43 g ve 0.05 g olarak elde edildiği rapor edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar literatür ile aynı yöndedir.

#### 4.1.2. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Sürgün Uzunluğuna Etkisi

Yapılan çalışma kapsamında bakteri uygulanan bitkiler uygulama yapılmayan kontrol bitkisine göre daha yüksek değerler ortaya koymuştur. Bitki boy ölçümünde en yüksek değer S7 (*Bacillus* sp. KH6.4) bakterisi uygulanan bitkide 74 cm olarak elde edilmiştir. En düşük değer ise kontrol bitkisinde 61 cm olarak bulunmuştur.

Yao ve ark. (2010) yaptıkları bir araştırmada pamuk bitkisine *Pseudomonas putida* Rs-198 suşunu uygulamışlar ve tuz stresi koşulunda verim özelliklerini incelemişlerdir. Bitki uzunluğu parametresinde bakteri uygulaması yapılan bitkinin uygulama yapılmayan kontrol bitkilerine göre %12.8 oranında artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hussein ve ark. (2013) yapmış oldukları bir çalışmada mısır bitkisine *Burkholderai* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. bakterilerini uygulamış ve verim özelliklerini araştırmışlardır. Bitki boyu özelliğinde bakteri uygulaması yapılan bitkilerden uygulama yapılmayan kontrol bitkisine göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. En yüksek değer *Burkholderai* sp. uygulaması yapılan bitkide 152.4 cm olarak, en düşük değer ise kontrol bitkisinde 131.0 cm olarak bildirilmiştir.

Thakur ve ark. (2017), yaptıkları araştırmada mısır bitkisinin tohumlarını *Bacillus arenosi* bakterisi ile inoküle ederek gelişimi gözlemlemiş ve sonucunda bitki gelişiminin arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmayı yürüten araştırmacılar kontrol grubuna göre bakteri uygulanmış mısır bitkisinin uzunluğunun %9 oranında arttığını bildirmişlerdir.

Menéndez E. ve ark. (2020) yaptığı araştırmada *Esorhizobium ciceri* CCANP14 suşu ve *Mesorhizobium tamadayense* CCANP122 suşlarını domates bitkilerine uygulanmış ve vejetatif parametreleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Fide uzunluğu parametresinde en yüksek değer *Mesorhizobium tamadayense* CCANP122 suşu uygulanmış fidede 23.25

cm olarak elde edilirken en düşük değer kontrol fidesinde 12.71 cm olarak elde edildiğini bildirilmişlerdir.

Sandhya V. ve ark. (2010) *Bacillus spp.* ile aşılanmış mısır bitkilerini kuraklık stresi altında ve normal iklim koşullarında yetiştirerek verim özelliklerine etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak hem stresli hem de stres olmayan koşullarda bitki boyu parametresinde bakteri aşılması yapılan bitkiler kontrol bitkilerine kıyasla daha yüksek değer ortaya koymuştur

Telek ve ark. (2019) da yapmış oldukları bir araştırmada *Bacillus subtilis* uygulaması yapılmış kırmızı biber bitkilerinde bitki uzunluk parametresinde en yüksek değeri bakteri uygulaması yapılan bitkide 52.74 cm olarak elde ederken kontrol bitkisinde 35.27 cm olarak elde etmişlerdir.

#### **4.1.3. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Sürgün Yaş ve Kuru Ağırlığına Etkisi**

Yapılan çalışma kapsamında bakteri uygulaması yapılmış mısır bitkilerinin kontrol grubu ile sürgün yaş ve kuru ağırlık parametresi açısından değerlendirilmiştir. Sonuç olarak bakteri uygulaması yapılmış mısır bitkileri kontrole göre daha yüksek değerler ortaya koymuştur. Sürgün yaş ağırlığında en yüksek değer S4 (*Bacillus thuringiensis* SY49.1) bakterisi uygulanmış grupta 100.0 g olarak elde edilirken en düşük değer kontrol bitkisinde 83.67 g olarak elde edilmiştir. Sürgün kuru ağırlığında en yüksek değer S5 (*Bacillus sp.* KH6.1) grubunda 11.66 g olarak elde edilirken en düşük değer kontrol grubunda 6 g olarak elde edilmiştir.

Menéndez E. ve ark. (2020) yaptığı araştırmada *Esorhizobium ciceri* CCANP14 suşu ve *Mesorhizobium tamadayense* CCANP122 suşunu domates bitkilerine uygulanmış ve vejetatif parametreleri üzerine etkisi araştırmışlardır. Fide yaş ve kuru ağırlık parametresinde en yüksek değer *Esorhizobium ciceri* CCANP14 suşu uygulanmış fidede sırasıyla 15.95 g ve 1.52 g olarak elde edilirken en düşük değer kontrol fidesinde sırasıyla 4.18 g ve 0.27 g olarak elde edilmiştir.

Hussein ve ark. (2013) mısır bitkisine *Burkholderai sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.* bakterilerini uygulamış ve verim özelliklerini araştırmışlardır. Bitki yeşil aksam kuru ağırlık yönünden bakteri uygulaması yapılan bitkilerin uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre daha yüksek değer ortaya koyduğu rapor edilmiştir.

En yüksek değer, *Pseudomonas* sp. uygulaması yapılan bitkide 83.2 g en düşük değer ise kontrol bitkisinde 58.4 g olarak bildirilmiştir.

Thakur ve ark. (2017), yaptıkları araştırmada mısır bitkisinin tohumlarını *Bacillus arenosi* bakterisi ile inoküle ederek gelişimi gözlemlemiş ve sonucunda bitki gelişiminin arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmayı yürüten araştırmacılar kontrol grubuna göre bakteri uygulanmış mısır bitkisinin kuru ağırlığının %49 oranında arttığını bildirmişlerdir.

Sandhya V. ve ark. (2010) yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus spp.* ile aşılanmış mısır bitkilerini kuraklık stresi altında ve normal iklim koşullarında yetiştirerek verim özelliklerine etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak hem stresli hem de stres olmayan koşullarda bitki sürgün kuru ağırlığında bakteri aşılması yapılan bitkiler kontrol bitkilerine kıyasla daha yüksek verim ortaya koymuştur.

Telek ve ark. (2019) da yapmış oldukları bir araştırmada *Bacillus subtilis* uygulaması yapılmış kırmızı biber bitkilerinde sürgün yaş ve kuru ağırlık parametrelerini değerlendirmişlerdir. Sürgün yaş ağırlık özelliğinde en yüksek değer bakteri uygulaması yapılan bitkide 24.36 g olarak elde edilirken en düşük değer kontrol bitkisinde 14.72 g olarak bulmuşlardır. Sürgün kuru ağırlık özelliğinde en yüksek değer bakteri uygulaması yapılan bitkide 12.05 g olarak elde edilirken en düşük değer kontrol bitkisinde 6.43 g olarak rapor edilmiştir.

#### 4.1.4. PGPR Uygulamasının Mısır Bitkisinin Protein Profili Üzerine Etkisi

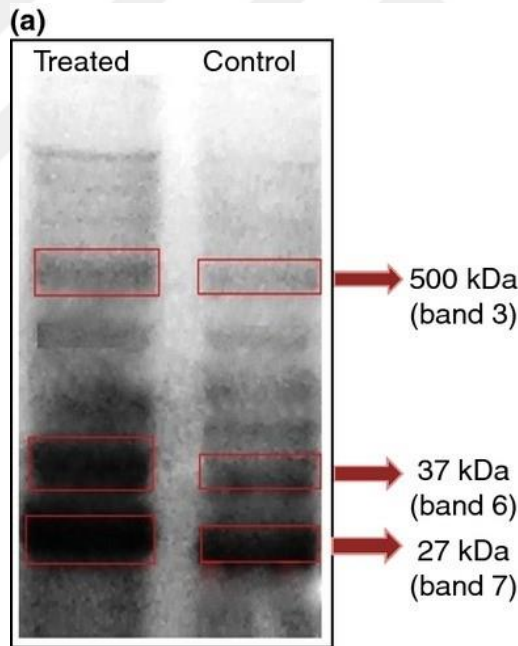
Bitki büyümesi teşvikine doğrudan dahil edilen mekanizmalar kapsamlı bir şekilde incelenmişse de bu çalışmaların çoğu PGPR'nin bitki morfolojik özellikleri üzerindeki etkisini değerlendirilmiştir. Moleküler ve Proteomik düzeyde indüklenen değişiklikler hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır (Bashan ve de-Bashan, 2010; Galland ve ark., 2012; van de Mortel ve ark., 2012; Wisniewski-Dyé ve ark., 2013).

*Pseudomonas fluorescens* ile muamele edilen pirinç bitkisinde RuBisCo büyük zincir prekürsörünün yaprak kılıfında ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiş olup büyüme teşviğinde birincil rolünü göstermektedir (Kandasamy ve ark., 2009).

*P. polymyxa* ile muamele edilmiş *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin MALDI - TOF / TOF ve 2DE analizinde farklı şekilde ifade edilen toplam 41 (kökte 17 nokta, sürgünde 24

nokta) spot görüldüğü belirtilmiştir (Kwon YS, 2016). Bitki sitozolik ve zar fraksiyonlarından elde edilen çeşitli proteinlerin, bazılarının bitki savunmasında işlev gördüğü bilinen bakteriyel aşılama yanıt olarak farklı şekilde ifade edildiği belirtilmiştir (Kwon YS, 2016).

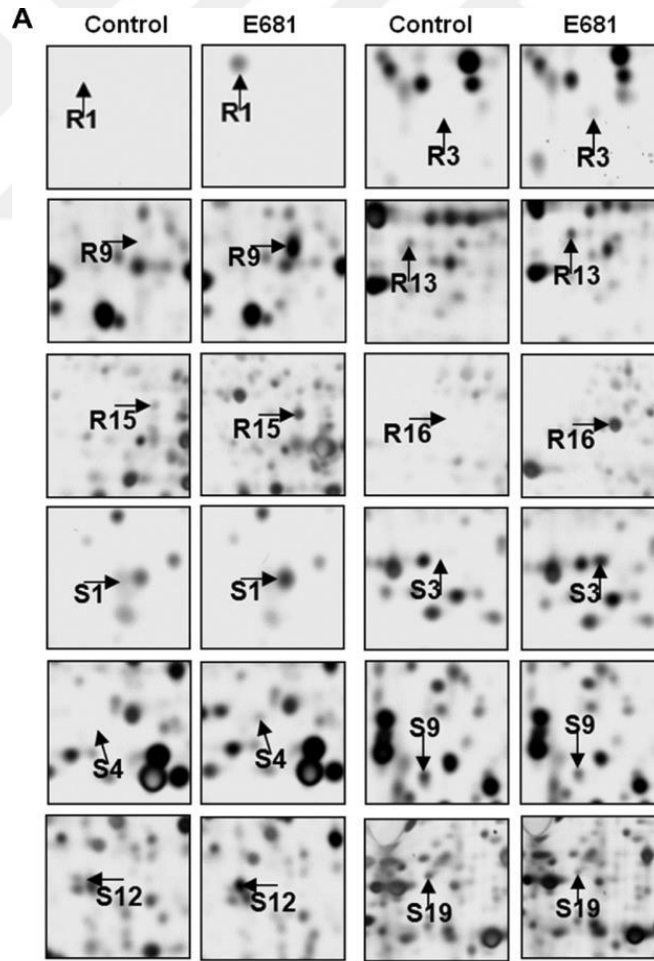
Sravani ve ark. (2018) yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus sonorensis* RS4 hücre çeperinde ve yer fıstığı kökü proteomunda birkaç proteinin farklı şekilde ifade edildiği belirtilmiştir. Ayrıca, yer fıstığı ve *B. sonorensis* RS4'te, bitki-PGPR yararlı etkileşimi ile tetiklenen birkaç spesifik protein değişikliği belirlenmiştir. Toplam 22 kök proteini, ekimden 12 ve 24 gün sonra RS4 ile muamele edilmiş yer fıstığı bitkisinin köklerinde farklı şekilde eksprese edilmiştir. Farklı şekilde eksprese edilen proteinlerin çoğunun bitki büyümesi ve yer fıstığı bitkisinin savunması ve *B. sonorensis* RS4'ün canlılığının devam etmesi ile işlevsel olarak ilgili olduğu ifade edilmiştir.



Şekil 4.1. Vaishnav A. ve ark. (2015)'nın soya fidelerinden elde ettiği SDS-PAGE görüntüsü

Vaishnav A. ve ark. (2015) yapmış oldukları bir araştırmada tuz stresi koşulunda soya fidelerine *Pseudomonas simiae* AU suşu uygulamışlar ve büyüme aşamasında yapraklarından protein profilini belirlemek için örnekler almışlardır. SDS-PAGE analizi sonrasında kontrol ve bakteri uygulamasında 3. 6. ve 7. numaralı noktalarda (Şekil 4.3.) göreceli bant yoğunluğu olduğunu tespit etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada mısır bitkisinde proteomik düzeyde farklılıkların belirlenmesi amacıyla bakteri uygulanmış ve uygulanmamış kontrol bitkilerinde SDS-PAGE analizi sonrasında bitkilerin protein profilleri karşılaştırılmıştır. Kontrole kıyasla 25 kDa'da S4 (*Bacillus thuringiensis* SY49.1) ve S7 (*Bacillus* sp. KH6.4) uygulanan bitkilerin protein profillerinde görülen bantların (e1 ve e2 bantları) kontrol bitkisinin protein profilindeki 25 kDa da olan bantlara göre daha belirgin olduğu görülmüştür. S6 (*Bacillus subtilis* KH28.1) ve S7 (*Bacillus* sp. KH6.4) uygulaması yapılan bitkilerin protein profiline ait 50-37 kDa civarında olan (c1 ve b2 bantları) protein bantları kontrol bitkisinin protein profilindeki 50-37 kDa da olan bantlara kıyasla daha yoğun olduğu bulgular bölümünde Şekil 3.1. de görülmektedir. S3 (*Bacillus* sp. KH16.2) uygulaması yapılan bitkilerin protein profilinde görülmekte olan 75-50 kDa arası (a1 ve a2) bantlarının kontrolde ifade edilmemiş olduğu bulgular bölümünde Şekil 3.2. de görülmektedir.



Şekil 4.2. Kwon ve ark. (2016)'nın *A. thaliana* bitkisinin sürgün ve kök kısımlarından elde edilen 2D jel görüntüsü

Kwon ve ark. (2016) yapmış oldukları bir araştırmada *A. thaliana* bitkisine *P. polymixa* bakterisinin E681 suşunu uygulamışlardır. Çalışmada *P. polymixa* bakterisinin *A. thaliana* bitkisinin sürgün ve kök proteom ve transkript seviyeleri üzerine etkisini araştırmışlardır. *Şekil 4.4.* de sürgün ve kök proteinlerinin jel görüntüsü kontrol bitkilerinin jel görüntüsü ile karşılaştırılmış ve spot farklılıkları adlandırılarak işaretlenmiştir. Çalışmanın devamında 2DE analizi sonucunda yaklaşık 800 protein spotu tespit edilmiştir. 800 spot arasında *A. thaliana* kökü ve sürgününde 41 farklı protein spotu olduğu belirtilmiştir.

SDS-PAGE analizi sonucu bant farklılıkları göz önünde bulundurularak S3 (*Bacillus* sp. KH16.2), S4 (*Bacillus thuringiensis* SY49.1) ve S7 (*Bacillus* sp. KH6.4) uygulanmış mısır bitkilerinden ekstrakt edilen proteinler 2D jel elektroforezi için seçilmiştir. 2D sonuçlarına göre S3, S4 ve S7 bakteri uygulaması yapılan mısır bitkilerinin protein spotları ile kontrol mısır bitkilerinin protein spotları arasında oldukça fazla spot ve yoğunluk farkı ortaya çıkmıştır. Spot farklılıkları ve yoğunlukları net bir şekilde görülmesi ve yorumlanması için jeller iki bölüme ayrılarak bulgular bölümünde (*Şekil 3.3.*, *Şekil 3.4.*, *Şekil 3.5.*, *Şekil 3.6.*, *Şekil 3.7.*, *Şekil 3.8.*) değerlendirilmiştir.

#### 4.2. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma kapsamında bakteri uygulaması yapılan mısır bitki örnekleri ile uygulama yapılmayan örnekler arasında morfolojik ve proteomik düzeydeki farklılıkları incelenmiştir.

Kurmuş olduğumuz denemede mısır bitkisi için klorofil içeriği, bitki boy uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlık, yaprak sayısı ve kök yaş ve kuru ağırlık parametrelerine bakılmıştır. *Bacillus* türü bakterilerin uygulamasının mısır bitkisinde klorofil içeriğini, bitki boy uzunluğunu, sürgün yaş ve kuru ağırlığını, kök yaş ve kuru ağırlığını arttırarak mısır gelişimini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.

Bu araştırmada ortaya çıkan veriler göz önünde bulundurularak mısır bitkisine uygulanan bakterinin bitki üzerinde hem morfolojik hem de proteomik düzeyde farklılıklar oluşturduğu ve büyüme teşviği ve verim yönünden olumlu yönde etki oluşturduğu belirlenmiştir.

PGPR olarak bitkiler üzerinde verim özelliklerinin belirlenmesi açısından çok fazla çalışma yapılmıştır. Ancak PGPR'nin bitkilerde protein profili üzerine göstermiş olduğu etkiler hakkında yapılan fazla araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu tez kapsamında yapılabilecek öneriler aşağıda verilmiştir:

- Bu sonuçlar, bitki büyümesini teşvik edici bakterilere karşı bitkilerde görülen moleküler yanıtın daha geniş bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunmuş olup farklılık göstren proteinlerin tanımlanması yapılabilir.
- Benzer sonuçların diğer farklı bitki türleri üzerinde de denenmesi bulguların teyit edilmesi bakımından faydalı olabilir.
- Farklı görülen protein spotlarının detaylı analizi yapılarak etki mekanizmaları hakkında bilgi elde edilebilir.
- Farklı uygulama yöntemleri denenerek benzer etkinliklerin olup olmayacağı araştırılabilir.
- Bu çalışmada protein izolasyonu için mısır bitkisinin yaprakları kullanılmış olup, bitkinin kök ve gövde kısmından örnekler alınarak protein profili çıkarılabilir ve aradaki farklar gözlemlenebilir.
- Kimyasal gübre ve pestisit kullanımı azaltılması sağlanabilir.

## KAYNAKÇA

- Abou-Aly, H. E. 2009. Impact of inoculation with effective strains of plant growth promoting rhizobacteria on fusarium wilt of pepper. **Anna. Agric. Sc., Moshtohor**, **47** (1): 13-22.
- Akıncı, Ş. 2011. Hüyük asitler, bitki büyümesi ve besleyici alımı. **Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, **23** (1): 46-56.
- Alexandratos, N., Bruinsma, J., 2012. World Agriculture Towards 2030/2050: The 2012 Revision. Esa Working Paper No. 12-03. Rome, Fao.
- Amer, G. A., Utkheda, R S., 2000. Development of formulation of biological agents for management of root rots of lettuce and cucumber. **Can J Microbiol**, **46**: 809-816.
- Ankati, S, Rani, T. S., Podile, A. R., 2018. Partner-triggered proteome changes in the cell wall of *Bacillus sonorensis* and roots of groundnut benefit each other. **Microbiol Res.**, **217**: 91-100.
- Anonim, 2017. <https://www.ucsusa.org/resources/what-sustainable-agriculture>. (Erişim tarihi: Eylül 2020)
- Aslantaş, R., Çakmakı, R., Şahin, F., 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. **Sci. Hort.**, **111**: 371-377.
- Babaoğlu, M., 2003. Farklı kökenli mısır (*Zea mays* L.) genotiplerinin çeşitli agronomik ve kalite karakterleri bakımından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Edirne, 123s.
- Bapat, S., And Shah, A. K. 2000. Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*. **Can J Microbiol**, **46**: 125-132.
- Bashan, Y, Holguin, G., 1997. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can.J. Microbiol**, **43**: 103-121.

- Bashan, Y., De-Bashan, L. E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth a critical assessment. **Adv. Agron., 108**: 77–136.
- Belimov, A. A., Safronova, V. I., Sergeyeva, T. A., Egorova, T. N., Matveyeva, V. A., Tsyganov, V. E., Borisov, A. Y., Tikhonovich, I. A., Kluge, C., Preisfeld, A., Dietz, K. J., Stepanok, V. V., 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Can J. Microbiol, 47**: 793-800.
- Bent, E., Breuil, C., Enebak, S., Chanway, C. P., 2002. Surface colonization of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* [dougl.engelm]) roots by *pseudomonas fluorescens* and *paenibacillus polymyxa* under gnotobiotic conditions. **Plant Soil, 241**:187-196.
- Biswas, J. C., Ladha, J. K., Dazzo, F. B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. **Soil Sci Soc Am J., 64**: 1644-1650
- Bloemberg, G. V., Lugtenberg, B. J. J., 2001. Molecular Basis Of Plant Growth Promotion And Biocontrol By Rhizobacteria. **Current Opinion In Plant Biology, 4** (4): 343–350
- Blom, D., Fabbri, C., Connor, E. C., Schiestl, F. P., Klauser, D. R., Boller, T., Eberl, L., Weisskopf, L., 2011. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. **Environ Microbiol 13**: 3047–3058.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem 72**: 248– 254.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Okon, Y., 2000. Recent advances the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. **Inmicrobiol Interactions in Agricultureand Forestry, 10**: 29-250.

- Caceres, E. A. R., Anta, G. G., Lopez, J. R., Diciocco, C. A., Basurco, J. P., Parade, J. L., 1996. Response of field-grown wheat to inoculation with *azospirillum brasilense* and *bacillus polymyxa* in the semiarid region of Argentina. **Arid Soil Res Rehabil**, **10**: 13-20.
- Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M. P., 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. **Plant And Soil**, **184**: 311-321.
- Chelius, M. K., Triplett, E. W., 2000. Diazotrophic endophytes associated with maize. in: Triplett, E. W. (ed.), prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. **Horizon Scientific Press**, 779-792.
- Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho H, Sa T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil Biol Biochem** **37** (10):1970–1974
- Chung, S., Kong, H., Buyer, J. S., Lakshman, D. K., Lydon J., Kim S. D., Roberts D. P. 2008. Isolation and partial characterization of *bacillus subtilis* me488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **80**, 115-123
- Cook, R. J. 2002. Advances in plant health management in the twentieth century. **Annu Rev Phytopathol** **38**, 95–116.
- Çakmakçı, R., Kantar, F., Algur, Ö. F., 1999. Sugar beet and barley yields in relation to *bacillus polymyxa* and *bacillus megaterium* var. phosphaticum inoculation. **J. Plant Nutr. Soil Sci**, **162**, 437-442
- Çakmakçı, R., 2002. Azot Fiksasyonu ve Fosfat Çözücü Bakteri Aşılamalarının Şeker Pancar verim ve kalitesine Etkisi. II. Şeker Pancarı üret. Semp., Verim, Kalit. Yük., 257-270.
- Çakmakçı, R. 2005. Bitki gelişimini teşvik eden rizobakterilerin tarımda kullanımı / Use of plant growth promoting rhizobacteria in agriculture, **Journal Of The Faculty Of Agriculture**, **36**.

- Çakmakçı, R., Erdoğan, Ü., 2008. Organik Tarım. İkinci Baskı, Erzurum: Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No: 236.
- Çakmakçı, R., Kantar F., Şahin, F., 2001. Effect of N<sub>2</sub>-fixing bacterial inoculations on yield of sugar beet and barley. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, **164**: 527-531
- De Freitas, J. R., Banerjee, M. R., Germidam, J. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth ve yield but not phosphorus uptake of canola (brassica napus l). **Biol Fertil Soils**, **24**: 358-364.
- De Freitas, J. R., 2000. Yield and N assimilation of winterwhea (triticum aestivuml., var norstar) inoculated with rhizobacteria. **Pedobiologia** **44**: 97-104.
- Denek, N., Deniz, S. 2004. Erken süt olum döneminde biçilen bazı mısır hasıllarına üre ve melas ılatesinin silaj kalitesi ve sindrilebilir kuru madde verimine etkisi. **Turkish Journal Of Veterinary & Animal Sciences**, **28** (1):123-130.
- Djordjevic, S. P., Chen, H., M Batley, J W Redmond, B. G., 1987. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of Rhizobium sp. strain NGR 234 and Rhizobium trifolii is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. **Rolfe Journal Of Bacteriology**, **169** (1): 53-60.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., & Vanderleyden, J. 2002. Effect of inoculation with wild type azospirillum brasilense and a. irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology And Fertility Of Soils**, **36** (4): 284-297.
- Emmert, E. A. B., Handelsman, J. O., 1999. Biocontrol of plant disease: a (gram+) positive perspective. **Fems Microbiology Letters**, **171** (1): 1-9.
- Eşitken, A., Karadağ, S., Ercişli, M., Turan, F., Şahin, M., 2003. The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot. **Australian Journal Of Agricultural Research**, **54**: 377-380.

- Eşitken, A. 2003. Effects of magnetic fields on yield and growth in strawberry 'camarosa', **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, **78** (2): 145-147.
- Eşitken, A., Pırlak, M., Turan, F., Sahin, M., 2006. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. **Scientia Horticulturae**, **110**: 324-327.
- Fao 2013. İstatistikler. Web: [[Http://Www.Fao.Org/](http://www.fao.org/)], (Erişim tarihi: eylül 2020)
- Fao 2017. Web: ([www.fao.org/state-of-food-security-nutrition](http://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition)), (Erişim tarihi: eylül 2020).
- Farinati, S., Dalcorso, G., Panigati, M., Antonella, F., 2011. Interaction between selected bacterial strains and arabidopsis halleri modulates shoot proteome and cadmium and zinc accumulation. **Journal of Experimental Botany**, **62**: 3433-47.
- Ferreira, M.C.B., Fernandes, M.S. & Döbereiner, J., 1987. Role of azospirillum brasilense nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biol Fert Soils** **4**: 47-53.
- Gadd, G., 1999. Fungal production of citric and oxalic acid: importance of metal specification, physiology and biogeochemical processes. **Adv Microb Physiol** **41**: 47-92
- Gajbhiye, A., Rai, A. R., Meshram, S. U., Dongre, A. B., 2010. Isolation, evaluation and characterization of *bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against fusarium oxysporum. **World Journal of Microbiology And Biotechnology**, **26** (7): 1187-1194.
- Galland, M., Gamet, L., Varoquaux, F., Touraine, B., Desbrosses, G., 2012. The ethylene pathway contributes to root hair elongation induced by the beneficial bacteria phyllobacterium brassicacearum stm196. **Plant Sci**. **190**: 74-81.
- Gençtan, T., Emekliler, Y., Çölkesen, M., Başer, İ., 1995. Serin İklim Tahılları Tüketim Projeksiyonları Ve Üretim Hedefleri.Tmmob Ziraat

- Mühendisliği Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, s. 255-259, Ankara.
- George, L., Jerzy, N., 1997. Rhizobacteria For Improvement Of Plant Growth And Establishment. Hortscience. 32: 188-192.
- Glick, B. R., Patten C. L., Holguin, G. M., 1999. Penrosebiochemical And Genetic Mechanisms Used By Plant Growth Promoting Bacteria Imperial College Press, London
- Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Of Microbiology**; **41** (2):109–117
- Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S., Weisskopf, L., 2013. Production Of Bioactive Volatiles By Different Burkholderia Ambifaria Strains. **J Chem Ecol** **39**: 892–906
- Hames, B. D., Rickwood, D., 1996. Gel electrophoresis of proteins a practical approach second edition. Irl Oxford University Press Usa., 149-164.
- Handlesman, J., Staab, E., 1996. Biocontrol Of Soilborne Plant Pathogens. **Plant Cell**. **8**: 1855-1869.
- Higa, T., Parr, J. F., 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Center, Atami, Japan. s.16.
- Hoving, S., Voshol, H., Van Oostrum, J., 2000. Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels. **Electrophoresis: An International Journal**, **21** (13): 2617-2621.
- Jacoud, C., Faure, D., Wadoux, P., Bally, R., 1998. Development of a strain-specific probe to follow inoculated azospirillum lipoferum crt1 under field conditionsand enhancement of maize root development. **By İnoculation. Fems Microbiol. Ecol**. **27**: 43-51.
- Jones, D. L., Darrah, P. R., 1994. Rol of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. **Plant Soil** **166**: 247–257.

- Kaiser, P., 1995. Diazotrophic mixed cultures of *azospirillum brasilense* and *enterobacter cloacea*. **Nato Ası Ser. Ser. G**, **37**: 207-212.
- Kandasamy, S., Loganathan, K., Muthuraj, R., Duraisamy, S., 2009. Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. **Proteome Sci**, **7**: 47.
- Kaymak, H. C., 2011. Potential of pgpr in agricultural innovations. In: maheshwari dk (ed) plant growth and health promoting bacteria. Microbiol monographs. **Springer, Berlin** **18**: 45–79
- Keleş, G., Cıbık, M., 2014. Mısır silajının besin ve besleme değerini etkileyen faktörler. **Hayvansal Üretim**, **55** (2): 27-37.
- Khan, M. R., Talukdar, N. C., Thakuria, D., 2003. Detection of *azospirillum* and *psb* in rice rhizosphere soil by protein and antibiotic resistance profile and their effect on grain yield of rice. **Indian J. Biotechnol** **2**: 246-250.
- Kılıç, A., 1986. Silo yemi (öğretim, öğrenim ve uygulama önerileri). Bilgehan Basımevi, İzmir, 327.
- Kırtok, Y., 1998. Mısır üretimi ve kullanımı. Kocaoluk basım ve yayın evi, İstanbul, 125-129.
- Kiewnik, S., Jacobsen, B. J., Braun-Kiewnik, A., Eckhoff, J. L. A., Bergman, J. W., 2001. Integrated control of rhizoctonia crown and root rot of sugarbeet with fungicides and antagonistic bacteria. **Pant Dis**. **85**: 718-722.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R. M., 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends Biotechnol**. **7**: 39-44.
- Kloepper, J. W. Schroth M. N., 1981. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, **71**: 1020-1024
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of The 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Vol. 2. Station De Pathologie Végétale Et De Phytobactériologie, Inra, Angers, France, 879–882.

- Kucey, R. M. N., Janzen, H. H., Legett, M. E., 1989. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. **Adv Agron** **42**: 199-228.
- Kumar, V., Narula, N., 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by azotobacter chroococcum. **Biol Fert Soils**, **28**: 301-305.
- Kün, E., 1997, Tahıllar 1ı (Sıcak İklim Tahılları), Ank. Üniv. Ziraat Fak. Yay. No: 1452, Ankara, 432 s.
- Kwon, Y.S., Lee, D. Y., Rakwal, R., Baek, S. B., Lee, J. H., Kwak, Y. S., Seo, J. S., Chung, W. S., Bae, D. W., Kim, S. G., 2016. Proteomic analyses of the interaction between the plant-growth promoting rhizobacterium *paenibacillus polymyxa* e681 and arabidopsis thaliana. **Proteomics**, **16**: 122-135.
- Kwon, Y. S., Ryu, C. M., Lee, S., Park, H. B., Han, K. S., Lee, J. H., Lee, K., Chung, W. S., 2010. Proteome analysis of arabidopsis seedlings exposed to bacterial volatiles. **Planta** **232**: 1355–1370
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, **227**: 680-685
- Latake, S. Shinde, D. B., Bhosale, D. M., 2009. Effect of inoculation of beneficial microorganisms on growth and yield of pearl millet. **Indian Journal Of Agricultural Research** **43**: 61-64.
- Lee, B., Farag, M. A., Park, H. B., Kloepper, J. W., Lee, S. H., Ryu, C. M., 2012. Induced Resistance By A Long-Chain Bacterial Volatile: Elicitation Of Plant Systemic Defense By A C13 Volatile Produced By *Paenibacillus Polymyxa*. **Plos One**, **7**: 1–11
- Mamoori, K., 2017. Plant Growth Properties Of *Bacillus* Species From Soil Samples. MSc thesis, Kayseri, 76 s.
- Marahiel, M. A., Nakano, M. M. Zabar, P., 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *bacillus*. **Mol Microbiol**, **7**: 631-636.

- Marques, A.P., Pires, C., Moreira, H., Rangel, A.O., Castro, P.M., 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *zea mays* as indicator plant. *Soil biology & biochemistry*. **Soil Biol Biochem.** **42** (8): 1229-1235
- McInroy, J.A., Kloepper, J.W., 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant Soil** **173**: 337-342
- Menéndez, E.; Pérez-Yépez, J.; Hernández, M.; Rodríguez-Pérez, A.; Velázquez, E.; León-Barrios, M., 2020. Plant Growth Promotion Abilities Of Phylogenetically Diverse *Mesorhizobium* Strains: Effect In The Root Colonization And Development Of Tomato Seedlings. **Microorganisms** **8**: 412.
- Myresiotis, C. K., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2015. Effect of specific plant-growth-promoting rhizobacteria (pgpr) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*zea mays* l.) Seedlings. **Pest. Manag. Sci.**, **71**: 1258-1266.
- Nachimuthu, S., Ponnusamy R., 2011. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. Concepts and techniques in genomics and proteomics. Wood yayıncılık, 268s.
- Nautiyal, C. S., 1997. Method For Selection And Characterization Of Rhizospherecompetent Bacteria Of Chickpea. **Curr Microbiol**, **34**: 12–17
- Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D., 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **Fems Microb Lett**, **182**: 291-296.
- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T. G., Wieczorek, K., Sessitsch, A., 2014. Increased Drought Stress Resilience Of Maize Through Endophytic Colonization By *Burkholderia Phytofirmans* Psjn And *Enterobacter* Sp. *Fd17*. **Environ. Exp. Bot.**, **97**: 30–39.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Şahin, F. 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. **Scientia Horticulturae**, **111** (1): 38-43.

- Öztürk, A., Caglar, Ö., Şahin, F., 2003. Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, **166**: 262-266.
- Pal, K. K., Dey, R., Bhatt, D. M., Chauhan, S. M., 2000. Plant Growth Promoting Fluorescent Pseudomonads Enhanced Peanut Growth, Yield And Nutrient Uptake. Fifth International PGPR Workshop, 29 October- 3 November, 2000, Cordoba Argentina.
- Porcel, R., Ruiz-Lozano, J. M., 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. **J Exp Bot** **55**: 1743– 1750.
- Pretty, J. N., Ball, A. S., Lang, T., 2005. Morrison farm Costs And Food Miles: An Assessment Of The Full Cost Of The Uk Weekly Food Basket. **Food Policy**, **30** (1): 1-19
- Pretty, J., 2007. Sage Handbook Of Environment And Society. Sage Publications Ltd., London, 457-470
- Rabilloud, T., 1999. Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. (Eds: T. Rabilloud) Springer Science & Business Media, 248s.
- Riggs, P. J., Chelius, M. K., Iniguez, A. L., Kaeppler, S.M., Triplett, E. W., 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **J. Plant Physiol.** **28**: 829-836.
- Saber, M. S. M., 2001. Clean biotechnology for sustainable farming. Eng. **Life Sci.**, **1**: 217-223.
- Sandhya, V., Shaik, Z. A., Minakshi, G., Gopal, R., Venkateswarlu B., 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus spp.*: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. **Journal Of Plant Interactions**, **6** (1): 1-14.
- Siddiqui, Z. A., 2006. Prospective biocontrol agents of plant pathogens. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. (Eds: Zaki, A. Siddiqui) The Netherlands: Springer, 111-142.

- Simon, R., 2001. Protein Purification Techniques II. Edition. Oxford University Press., 38s.
- Smithies, O., Poulik, M. D., 1956. Two Dimensional Electrophoresis Of Serum Proteins. **Nature**, **177**; 1033.
- Srinivasan, M., Petersen, D. J., Holl, F. B., 1996. Influence of indoleacetic-acidproducing *bacillus* isolates on the nodulation of phaseolus vulgarisby rhizobium etliundergnotobiotic conditions can. **J. Microbiol.****42**: 1006-1014.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, **56** (4): 845-857.
- Sudha, S.N., Jayakumar, R., Sekar, V., 1999. Introduction and expression of the cry1acgene of *bacillus thuringiensisin* a cereal associated bacterium, *bacillus polymyxa*. **Curr. Microbiol.** **38**: 163-167.
- Sudhakar, P., Chattopadhyay, G. N., Gangwar, S. K., Ghosh, J. K., 2000. Effect of foliarapplication of *azotobacter*, *azospirillum* and *beijerinckia* on leaf yield and qualityof mulberry (*morus alba*). **J. Agric.Sci., Camb.**,**134**: 227-234.
- Şahin, F., Çakmakçı, R., Kantar, F. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with n<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant And Soil**, **265**: 123-129
- Şevik, M. A., 2010. Bitki virüs hastalıklarına karşı kullanılan bitki gelişimini tesvik eden rhizobakteriler (PGPR). **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi**, **12** (2): 1-19
- Thakur, R., Sharma, K.C., Gulati, A., Sud, R. K., Gulati, A., 2017. Stress-tolerant *viridibacillus arenosi* strain iħb b 7171 from tea rhizosphere as a potential broad-spectrum microbial inoculant. **Indian J. Microbiol.**, **57** (2): 195–200
- Thierry, R., Cécile, L., 2011. Two-Dimensional gel electrophoresis in proteomics. **A Tutorial Journal Of Proteomics Elsevier**, **74** (10): 1829-1841

- Tiwari, V. N., Lehri, L. K., Pathak, A. N., 1989. Effect of inoculating crops with phosphomicrobes. **Exp Agric**, **25**: 47-50.
- Turan, M., Gulluce, M., Von Wirén, N. And Sahin, F. 2012. Yield Promotion And Phosphorus Solubilization By Plant Growth–Promoting Rhizobacteria İn Extensive Wheat Production İn Turkey. **Z. Pflanzenernähr.Bodenk.**, **175**: 818-826.
- Uluslararası Hububat Konseyi, 2019. 2018-2019 Mısır Raporu. Web: <http://Www.Uhk.Org.Tr/?Cat=169> (Erişim tarihi: Eylül 2020)
- Umali-Garcia, M, Hubbell, D. H., Gaskins, M. H., Dazzo F. B., 1980. Association of azospirillum with grass roots. **Appl Environ Microbial** **39**: 219-226
- Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A., Choudhary, D., 2015. Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*glycine max* l. Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. **J Appl Microbiol**, **119**: 539-551.
- Van De Mortel, J. E., De, Vos, R. C. H., Dekkers, E., Pineda, A., Guillod, L., Bouwmeester, K., 2012. Metabolic and transcriptomic changes induced in arabidopsis by the rhizobacterium pseudomonas fluorescens ss101. **Plant Physiol.** **160**: 2173–2188
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M., Vassilev, N., 2000. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of yarowia lipolytica. **Proc Bioch**, **35**: 693-697.
- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., 2012. Enhancement of nodulation and yield of chickpea by co-inoculation of indigenous mesorhizobium spp. And plant growth–promoting rhizobacteria in eastern uttar pradesh. **Communications İn Soil Science And Plant Analysis**, **43** (3): 605-621.
- Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Moënné-Loccoz, Y., Bally, R., And Comte, G., 2011. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *azospirillum*. **New Phytol.** **189**: 494–506.

- Weissmann, R., Gerhardson, B., 2001. Selective plant growth suppression by shoot application of soil bacteria. **Plant Soil**, **234**: 159-170.
- Whitelaw, M. A., 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Adv Agron** **69**: 99-151
- Wisniewski-Dyé, F., Drogue, B., Borland, S., Prigent-Combaret, C., 2013. In Beneficial Plant-Microbial Interactions: Ecology And Applications, (Eds: M. B. R. González, J. Gonzalez-López), Boca Raton, Fl: Crc Press, 468s.
- Yazdani, M., Bahmanyar, M. A., Pirdashti, H., & Esmaili, M. A., 2009. Effect of phosphate solubilization microorganisms (psm) and plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.). **World Academy Of Science, Engineering And Technology**, **49**: 90-92.
- Yıldırım, E., Turan, Metin; D., 2008. Mesude figen. Mitigation of salt stress in radish (*raphanus sativus* l.) By plant growth promoting rhizobacteria. **Roumanian biotechnol lett**, **13**: 3933-3943.
- Yılmaz, S. 2010. Çeşitli habitatlardan izole edilen *bacillus thuringiensis* suşlarının moleküler karakterizasyonu ve zararlı böceklerle karşı mücadelede kullanımı. Doktora Tezi, 161s.
- Zahir, Z. A., Asghar, H. N., Asif, M., Akhtar, M. J., 2007. Growth and yield of wheat as affected by compost enriched with chemical fertilizer, l-tryptophan and rhizobacteria. **Pak. J. Agri. Sci**, **44** (1):136-140.
- Zhou, J., Xia, B., Huang, H., 2003. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. **Soil Biology And Biochemistry**, **35** (7): 915–924.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Dilek GÖKÇEK  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 13.07.1995-Gaziantep  
**Medeni Durum** : Bekar  
**e-mail** : dilekniyan27@gmail.com

### EĞİTİM

| Derece        | Kurum                                                        | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|--------------------------------------------------------------|------------------|
| Yüksek Lisans | Erciyes üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, KAYSERİ | 2020             |
| Lisans        | Erciyes üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, KAYSERİ | 2018             |
| Lise          | Akşemseddin Anadolu Lisesi<br>Şahinbey/GAZİANTEP             | 2013             |

### İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl        | Kurum                               | Görev |
|------------|-------------------------------------|-------|
| 2019-Halen | Erciyes Üniversitesi Teknopark A.Ş: |       |

### YABANCI DİL

İngilizce