

**ACC DEAMİNAZ AKTİVİTESİNE SAHİP VE SOĞUĞA
DİRENÇLİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU**

Gamze BALTACI KADIOĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR
2013
Her Hakkı Saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ACC DEAMİNAZ AKTİVİTESİNE SAHİP VE SOĞUĞA DİRENÇLİ
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Gamze BALTACI KADIOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2013**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

ACC DEAMİNAZ AKTİVİTESİNE SAHİP VE SOĞUĞA DİRENÇLİ
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR danışmanlığında, Gamze BALTACI KADIOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 15.../02.../2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/ oy çokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

İmza : 

Üye Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU

İmza : 

Üye Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum



Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ACC DEAMİNAZ AKTİVİTESİNE SAHİP VE SOĞUĞA DİRENÇLİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Gamze BALTACI KADIOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

Bitki büyümesini teşvik eden bazı rizobakteriler (PGPR) ACC deaminaz enzimi üretirler ve bu enzim bitkilerdeki stres etileninin miktarını azaltarak onların biyotik ve abiyotik stres koşullarında büyümesini sağlar. Diğer taraftan, soğuk iklimin hakim olduğu kısa sezonlu bölgelerde, toprak sıcaklığı PGPR bakterilerinin optimal üreme sıcaklığından düşüktür ve bu nedenle soğuğa dirençli ve ACC deaminaz üreten yeni PGPR bakterilerinin izolasyonu önem kazanmaktadır. Bu bilgiler ışığında, Erzurum civarındaki dağların yüksek rakımlı bölgelerinden (1760-2724 m) toplanan 20 yabani bitkiye ait rizosfer toprağından toplam 32 bakteri izole edilmiştir. Bu izolatların ACC deaminaz enzimi üretim potansiyelleri dikkate alınarak 8 tanesi seçilmiştir. Kültürel, sitolojik, biyokimyasal testler ve 16s rDNA analizi yöntemleri ile bu sekiz izolat *Pseudomonas migulae* (GBK 1), *Leucobacter iarius* (GBK 2), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 3), *Stenotrophomonas maltophilia* (GBK 4), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 5), *Enterobacter cloacae* (GBK 6), *Pseudomonas carica papayae* (GBK 7) ve *Pseudomonas migulae* (GBK 8) olarak tanılanmıştır. Bu türlerin optimal sıcaklık değerlerinin altında üreyebildiği ve ACC deaminaz üretebildiği belirlenmiştir. ACC'den α -ketobütirat üretme potansiyeli bakımından en etkili 4 türün sırasıyla *Stenotrophomonas maltophilia* (GBK 4) ($1,207\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$), *Leucobacter iarius* (GBK 2) ($0,993\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 3) ($0,962\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$) ve *Pseudomonas migulae* (GBK 1) ($0,951\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$) oldukları tesbit edilmiştir.

2013, 101 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bitki Büyümesini Teşvik Edici Bakteriler, ACC, ACC deaminaz, biyogübre, etilen

ABSTRACT

MS Thesis

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF COLD TOLERANT AND ACC DEAMINASE CONTAINING BACTERIA

Gamze BALTACI KADIOĞLU

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

It is well known that certain Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPB) having ACC deaminase enzyme activity that reduce the level of stress ethylene and stimulating growth of plants under various biotic and abiotic stresses. On the other hand, cold environments are characterized by short growing seasons and temperatures below the optimal values for growth of PGPR. So, isolation of novel cold tolerant and ACC deaminase containing bacteria is very important. Keeping all this in view, 32 bacteria were isolated from the 20 rhizospheric soils of wild plants collected from high altitudes (1760-2724 m) in mountains in Erzurum, Eastern Anatolia, Turkey. They were screened in their ACC deaminase producing potentials and 8 of them were selected. After some cultural, cytological and biochemical tests and 16s rDNA analysis they were identified as *Pseudomonas migulae* (GBK 1), *Leucobacter iarius* (GBK 2), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 3), *Stenotrophomonas maltophilia* (GBK 4), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 5), *Enterobacter cloacae* (GBK 6), *Pseudomonas carica papayae* (GBK 7) ve *Pseudomonas migulae* (GBK 8). It was found that these eight bacteria may grow and produce ACC deaminase at sub-optimal temperatures (5, 15 and 20 °C). The most effective four species in α -ketobutyrate producing potential from ACC were *Stenotrophomonas maltophilia* (GBK 4) ($1,207\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$), *Leucobacter iarius* (GBK 2) ($0,993\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 3) ($0,962\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$) and *Pseudomonas migulae* (GBK 1) ($0,951\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$), respectively.

2013, 101 pages

Keywords: Plant Growth Promoting Bacteria, ACC, ACC deaminase, biofertilizer, ethylene

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ilgi ve yardımını hiçbir zaman eksik etmeyen kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, Sayın Yrd. Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU'na ayrıca Biyoloji Bölümünün tüm öğretim elemanları ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren, karşılaştığım problemlerin çözümünde her zaman maddi, manevi destek olan çok değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ' ye, Sayın Uzm. Murat ÖZDAL'a ve Sayın Arş. Gör. Özden CANLI'ya ayrıca yanımda olan değerli arkadaşlarım Özlem GÜR'e, Alev SEZEN'e, Neslihan YÜCE'ye, Nurbetül KARTAL'a, Elif Burcu TÜZEMEN'e, Nisa METİN'e ve burada isimlerini saymadığım büyüklerime, hocalarıma, sevdiklerime çok teşekkür ederim. Sabırla ve büyük bir fedakârlıkla bana her zaman yardım eden ve yanımda olan kadim dostum Şeymanur AYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Maddi manevi desteklerini hayatımın her aşamasında hissettiğim, varlıkları ile moral ve güç bulduğum, bana güvenen, çalışmalarında teşvik ve tavsiyelerini esirgemeyen, bugünlere gelmemde haklarını ödeyemeyeceğim kadar büyük payı olan annem Sevilay BALTACI ve babam Feridun BALTACI'ya, çok sevdiğim abim Fatih BALTACI ve kardeşim Ömer Faruk BALTACI'ya, her zaman yanımda olan sevgili eşim Murat KADIOĞLU'na sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Gamze BALTACI KADIOĞLU

Şubat 2013

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ..... | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | ix |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Bitki Büyüme ve Gelişimini Artırıcı Mikroorganizmalar..... | 1 |
| 1.2. Bitki Gelişimini Artırıcı Bakterilerin Etki Mekanizmaları..... | 4 |
| 1.2.1. Fosforlu bileşikleri çözebilme kabiliyeti olan PGPR üyeleri..... | 6 |
| 1.2.2. Azot bağlayıcı PGPR üyeleri..... | 8 |
| 1.2.3. Patojenlerle mücadele edebilme kabiliyeti olan PGPR üyeleri..... | 10 |
| 1.2.4. Fitohormon sentezleyebilme kabiliyeti olan PGPR üyeleri..... | 11 |
| 1.3. Etilen Hormonu..... | 13 |
| 1.3.1. Etilen hormonunun bitkiler üzerindeki etkisi..... | 13 |
| 1.3.2. Etilen hormonu ve ACC deaminaz enzimi..... | 14 |
| 1.3.3. Bitkideki etilen seviyesini etkileyen faktörler..... | 15 |
| 1.4. ACC Deaminaz Enzimi..... | 16 |
| 1.4.1. Bakteriyel ACC deaminaz enzimi ve etki mekanizması..... | 16 |
| 1.4.2. ACC Deaminaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar..... | 18 |
| 1.4.3. Stres hasarlarının azaltılmasında ACC deaminaz enzimine sahip mikroorganizmaların etkisi..... | 19 |
| 1.4.3.a. Tuzluluk stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi..... | 22 |
| 1.4.3.b. Kuraklık stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi..... | 23 |
| 1.4.3.c. Aşırı su /sel stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi..... | 24 |
| 1.4.3.d. Sıcaklık stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi..... | 24 |
| 1.4.3.e. Bitkilerin soğuğa direnç kazanmasında ACC deaminaz enziminin etkisi..... | 25 |
| 1.4.3.f. Patojen stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi..... | 28 |
| 1.4.3.g. Ağır metal stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4.3.h. Organik kirletici stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi | 31 |
| 1.4.3.ı. Hava kirliliği stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi | 31 |
| 1.4.3.i. Ornamental bitkilerde çiçeklerin solmasına karşı ACC deaminaz enziminin etkisi | 32 |
| 1.4.3.j. Rizobiyal enfeksiyona karşı ACC deaminaz enziminin etkisi | 33 |
| 1.5. Araştırmanın Amacı | 35 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 36 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEMLER..... | 44 |
| 3.1. Materyal..... | 44 |
| 3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar | 44 |
| 3.1.2. Kimyasal maddeler | 44 |
| 3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı | 45 |
| 3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı | 46 |
| 3.1.5. Kullanılan bitki materyali..... | 47 |
| 3.2. Yöntem | 47 |
| 3.2.1. Arazi çalışmaları..... | 47 |
| 3.2.2. Bitki örneklerinin teşhisi | 47 |
| 3.2.3. Bakterilerin izolasyonu ve saflaştırılması | 48 |
| 3.2.4. İzolatların kültürel, biyokimyasal ve sitolojik karakterizasyonu | 50 |
| 3.2.5. ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesi | 51 |
| 3.2.6. ACC deaminaz aktivite tayini için standart grafiğin hazırlanması..... | 57 |
| 3.2.7. 16S rDNA gen analizi | 58 |
| 3.2.8. İstatistiksel analiz | 58 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI | 60 |
| 4.1. Bitki Toplanan Yerlerin Özellikleri | 60 |
| 4.2. Toplanan Bitki Örneklerinin Teşhisi | 63 |
| 4.3. Rizosfer Topraklarından Elde Edilen İzolatların Bazı Özellikleri | 69 |
| 4.4. ACC Deaminaz Enzimi Bakımından Aktif İzolatların Seçimi | 71 |
| 4.5. Seçilen İzolatların ACC Deaminaz Aktivite Değerleri | 72 |
| 4.6. ACC Deaminaz Aktivitesi Yüksek Bulunan Bakterilerin Genetik Karakterizasyonu..... | 74 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ..... | 76 |

| | |
|-----------------|-----|
| KAYNAKLAR | 84 |
| ÖZGEÇMİŞ | 102 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|----|---------------------|
| % | Yüzde konsantrasyon |
| °C | Santigrat derece |
| cm | Santimetre |
| dk | Dakika |
| g | Gram |
| l | Litre |
| μ | Mikron |
| μl | Mikrolitre |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanometre |
| sn | Saniye |

Kısaltmalar

| | |
|------|---|
| ACC | 1-aminosiklopropan-1 karboksilat |
| BNF | Biyolojik Nitrojen Fiksasyonu |
| İAA | İndol Asetik Asit |
| PGPR | Bitki Gelişimini Teşvik Edici Kök Bakterileri |
| PSB | Fosfor Çözücü Bakteriler |
| rpm | Dakikadaki Devir Sayısı |
| YIB | Verim Artırıcı Bakteriler |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 3.1. İlk inkübasyondan sonra PAF sıvı besiyerinde mikroorganizmaların üreme durumları | 49 |
| Şekil 3.2. ACC'li ortamda ve 5°C, 15°C ve 20°C'de üreyen mikroorganizmaların saf kültürlerinin elde edilmesi..... | 49 |
| Şekil 3.3. Mikroorganizmaların yatık agarlarda stoklarının oluşturulması | 50 |
| Şekil 3.4. ACC deaminaz aktivitesinin tayininde kullanılan yöntemin akım şeması | 53 |
| Şekil 3.5. Besiyerinden arındırılan ve santrifüjlenen biyomaslar | 56 |
| Şekil 3.6. Bakteri hücrelerinin toluenle parçalanması | 56 |
| Şekil 3.7. Elde edilen süpernatanta 2M 2ml NaOH eklendikten sonra gözlemlenen renk değişimleri..... | 57 |
| Şekil 3.8. Standart eğri grafiği | 58 |
| Şekil 4.1. Palandöken Dağlarının uydu görüntüsü..... | 60 |
| Şekil 4.2. Hasanbaba Dağlarının uydu görüntüsü..... | 61 |
| Şekil 4.3. Kargapazarı Dağlarının uydu görüntüsü..... | 61 |
| Şekil 4.4. Toplanan bitki örnekleri | 69 |
| Şekil 4.5. GBK 1, GBK 2, GBK 3, GBK 4, GBK 5, GBK 6, GBK 7 ve GBK 8 izolatlarının yakınlığını gösteren dendogram..... | 75 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 1.1. Bazı PGPR'nin çeşitli bitkilerin gelişimi üzerindeki etkileri | 3 |
| Çizelge 1.2. Bazı önemli bakteriyel faktörlerin bitki büyümesine etkisi..... | 6 |
| Çizelge 1.3. Bazı patojenlerle mücadelede ve bitki gelişimini artırmada etkili çeşitli PGPR üyeleri | 11 |
| Çizelge 1.4. PGPR tarafından üretilen bazı fitohormonlar | 12 |
| Çizelge 1.5. ACC deaminaz aktivitesine sahip PGPR'nin bazı bitkilere etkisi..... | 18 |
| Çizelge 1.6. Bitkilerdeki ağır metal stresinin ACC deaminaz içeren PGPR ile azaltılması..... | 30 |
| Çizelge 4.1. Bitkilerin toplandığı yerlerin konum ve yükseklikleri | 62 |
| Çizelge 4.2. Toplanan bazı bitkilerin isimleri..... | 63 |
| Çizelge 4.3. İzolatların bazı kültürel ve sitolojik özellikleri..... | 70 |
| Çizelge 4.4. İzolatların ACC içeren ve DF besiyeriyle hazırlanan petrielerde 2-6 gün içindeki üreme durumları | 71 |
| Çizelge 4.5. Elde edilen izolatların ACC deaminaz aktivite değerleri | 73 |
| Çizelge 4.6. ACC deaminaz aktivite değerleri en yüksek bulunan 8 izolata ait veriler . | 74 |
| Çizelge 5.1. Belirtilen izolatlara ait α -ketobütirat değerleri | 82 |

1. GİRİŞ

Uzun yıllar, tarımsal verimi artırmak amacıyla çeşitli kimyasal maddeler kullanılmıştır. Bu kimyasalların bir kısmı pestisit olarak adlandırılan ve tarım faaliyetlerinde olması istenmeyen canlıları öldürmede kullanılan maddelerdir. İkinci grup kimyasal maddeler ise ‘kimyasal gübre’ olarak tanımlanan maddelerdir. Bu kimyasalların yoğun bir şekilde kullanımı, verimde kısmi artışlar sağlamış ve kullanımları giderek artmıştır. Ancak, uzun yıllar boyunca kimyasalların kullanımı, yeraltı ve yerüstü sularında ve toprakta birikimlerine yol açmış, bu da sadece faydalı organizmalar ve insanı tehdit eder boyutlarda kalmamış, aynı zamanda tarımsal verimin de giderek azalmasına yol açmıştır. Bu nedenlerle, tarımsal verimi artırıcı alternatif ve doğal ürünlerin üretimi çalışmaları hız kazanmıştır (Penrose and Glick 2003; Çakmakçı 2005; Fürnkranz *et al.* 2009).

1.1. Bitki Büyüme ve Gelişimini Artırıcı Mikroorganizmalar

‘‘Bitki Gelişimini Teşvik Edici Kök Bakterileri’’ olarak bilinen bu mikroorganizmalar literatürde ‘‘Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)’’ olarak tanımlanmıştır. PGPR teriminden ilk olarak 1978 yılında bahsedilmiştir (Klepper and Schroth 1978). Bu bakteriler için ‘‘Yield Increasing Bacteria (YIB)’’, ‘‘Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB)’’ terimleri de kullanılmaktadır (Chen *et al.* 1996; Bashan *et al.* 2000).

Bitkiye fayda sağlayan bakteriler toprakta serbest yaşayanlar ve bitkilerle simbiyotik yaşayanlar olarak iki gruba ayrılabilir. PGPR; bitki rizosferinde kolonize olan, bitki kökleriyle yakın ilişki içerisinde bulunan ve serbest yaşayan saprofit bakteriler grubunda yer alır. PGPR’nin bitki gelişimini artırmada inokülant olarak kullanımı kolay, ucuz aynı zamanda olumsuz etkileri olmayan bir yoldur. Ancak; gelişimi artırmada PGPR’nin etkisi; inokülant ırkları, kültürel koşullar veya türlere göre değişiklik arzedebilir (Klepper *et al.* 1988; van Peer and Schipper 1989; Frommel *et*

al. 1991; Kloepper and Beauchamp 1992; Liu *et al.* 1995; Glick *et al.* 1998; Chen *et al.* 2000; Tahir *et al.* 2006; Kausar *et al.* 2006; Arshad *et al.* 2007).

PGPR kullanımını sayesinde çimlenme oranı, kök gelişmesi, verim, yaprak alanı, klorofil oranı, azot oranı, protein oranı, hidrolik aktivite, susuzluğa tolerans, kök ve gövde ağırlığı artmakta, yaprakların yaşlanması gecikmekte ve bazı hastalıklara karşı direnç sağlanmaktadır. PGPR uygulamaları laboratuvar, sera ve tarla koşullarında yürütülmekte, ancak tarla denemelerinde beklenmeyen koşullardan dolayı kimi zaman uygun sonuçların alınması zorlaşmaktadır. Topraktaki pH değişimleri, yüksek sıcaklık, düşük yağış, nem ve besin noksanlığı gibi olumsuz koşulların ortaya çıkması mikroorganizma kolonizasyonunu azaltmaktadır (Dobbelaere *et al.* 2001; Şahin vd 2004). Kültür ortamındaki bitkiler üzerinde faydalı etkiler oluşturma yeteneği ile bilinen PGPR, tarım alanlarında kullanmak için de bir potansiyel oluşturur. PGPR, sürdürülebilir tarımda, mahsüllerde çok çeşitli ürün artışı sağlamada yol gösterici ve önemli bir etkiye sahiptir (Kloepper *et al.* 1989; Kloepper 1994).

Bitki gelişimini teşvik eden başlıca bakterilerin; *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Aereobacter*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Chromatium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Rhodosprillum*, *Serratia* ve *Xanthomonas* cinslerine ait türler olduğu belirlenmiştir (Çakmakçı 2005 a, b; Çakmakçı ve Erdoğan 2008). Ülkemizde en çok çalışılan türler; patojenleri baskılayıcı özellikleriyle bilinen *Bacillus*, *Pseudomonas* ve azot bağlayıcı özellikleriyle bilinen *Rhizobium*, *Azotobacter* ve *Azosprillum* cinslerine ait türlerdir (Çakmakçı vd 2006 a, b; 2007 a, b; 2008 a, b). PGPR'nin kullanımı hakkında yapılan bazı araştırmalar Çizelge 1.1.' de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Bazı PGPR'nin çeşitli bitkilerin gelişimi üzerindeki etkileri (Çakmakçı 2005'ten değiştirilerek)

| Bakteri | Bitki | Sonuçlar/ artış | Kaynak |
|--|---|--|---------------------------------|
| <i>Azospirillum brasilense</i> | Sorgum | Kuru madde, yaprak alanı, kök sayı ve uzunluk %33-40, hidrolik geçirgenlik %25-40 artış | Sarig <i>et al.</i> 1992,1998 |
| <i>A. brasilense</i> Cd | Nohut, bakla | Kök, gövde, verim artışı, | Hamaoui <i>et al.</i> 2001 |
| <i>A. brasilense</i> NO40 | Pirinç | %15-20 verim artışı | Omar <i>et al.</i> 1989 |
| <i>A. lipoferum</i> <i>X. maltophla</i> | Ayçiçeği Ayçiçeği | Gelişme ve çimlenme teşviki çimlenme oranı artışı | Fages and Arsac, 1991 |
| <i>A. lipoferum</i> CRTI | Mısır | N oranı artış, geniş kök sistemi | Jacoud <i>et al.</i> 1998 |
| <i>Azospirillum</i> spp. | Buğday | %- 15.8-31 verim değişimi | Baldani <i>et al.</i> 1987 |
| <i>Azospirillum</i> spp. | Darı Hardal Çeltik | %-12.1-31.7 verim değişim, % 16-128 verim artışı %4.9-15.5 verim artışı | Kloepper <i>et al.</i> 1989 |
| <i>Azospirillum</i> spp. | Mısır | %11-14 verim artışı | Fallik and Okon, 1996 |
| <i>Azospirillum</i> spp. | Mısır | Kuru madde ve Mg artış | Hernandez <i>et al.</i> 1997 |
| <i>Azospirillum</i> spp. | Mısır | Glutamat sentez ve dehidrojenaz aktivite, kök ve yaprak N artış | Ribauda <i>et al.</i> 2001 |
| <i>Beijerinckia mobilis</i> <i>Clostridium</i> spp. | Pancar, Arpa, Buğday, turp | Çimlenme, uzunluk ve ağırlık artışı | Polyanskaya <i>et al.</i> 2000 |
| <i>Burkholderia vietnamiensis</i> | Çeltik | % 33 gövde uzunluğu, % 53 kök ag., % 13-22 dane verimi artışı | Tran Van <i>et al.</i> 2000 |
| <i>Bacillus</i> spp. | Şekerpancarı, arpa | İkili aşılama pancar % 11.9-12.4, arpa % 7.4-9.3 verim artışı | Şahin vd 2004 |
| <i>Enterobacter cloacea</i> CAL3 | Domates, biber, | Fide gelişimini teşvik | Mayak <i>et al.</i> 2001 |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> R85, <i>P. fluorescens</i> R104 <i>P. putida</i> R111 | Kışık buğday | % 46-75 dane verim artışı | De Freitas and Germida 1992 a,b |
| <i>P. corrugata</i> <i>A. chroococcum</i> | Horozibiği, ragi | Gelişme ve N artışı, doğal bakteri gelişiminin teşviki | Pandey <i>et al.</i> 1999 |
| <i>P. fluorescens</i> | Domates | %5.6-9.4 verim artışı | Gagne <i>et al.</i> 1993 |
| <i>P. fluorescens</i> <i>P. corrugate</i> <i>Serratia plymthica</i> | Hıyar | %12 meyve sayısı,%18 meyve ağırtışı, <i>Pythium</i> enfekte edilen toprakta % 18 verim artışı | Mc Cullaugh <i>et al.</i> 1996 |
| <i>P. putida</i> GR12-2 | Kanola, marul, domates, arpa, buğday, yulaf | Dikotiledon bitki kök gelişimi artışı | Hall <i>et al.</i> 1996 |

Çizelge 1.1 (devam)

| | | | |
|--|---------------------|---|---------------------------------------|
| <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Variovovax</i> spp. <i>Phyllobacterium</i> spp. | Kanola | % 11-52 kök kuru ağı. A artışı, | Bertrand <i>et al.</i> 2001 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | Patates | Serada bitki ağı., tarlada yumru verimi artışı | Frommel <i>et al.</i> 1993 |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | Şeker pancarı | Sera fide ağırlığı, tarla verim artışı, hastalıklara antagonizm | Suslow and Schroth, 1982 |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | Patates, Pirinç | % 14 ile 33 verim değişimi, % 3-160 verim artışı | Klopper <i>et al.</i> 1989 |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | Mısır, arpa, buğday | % 15-25 verim artışı | Iswandi <i>et al.</i> 1987 |
| <i>P. syringae</i> pv. | Fasulye | Protein artışı, patojen kontrolü | Alstrom 1995 |
| <i>Pseudomonas</i> W34 <i>B. cereus</i> S18 | Marul, domates | Fide biyomas artışı, % 9 verim artışı | Hoffmann-Hergarten <i>et al.</i> 1998 |
| <i>S. liquifaciens</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp. | Mısır | % 8-14 verim artışı, | Lalande <i>et al.</i> 1989 |

1.2. Bitki Gelişimini Artırıcı Bakterilerin Etki Mekanizmaları

PGPR, sahip olduğu bazı mekanizmalar vasıtasıyla bitki gelişimini doğrudan ya da dolaylı bir şekilde etkiler. Dolaylı etki, PGPR'nin bitki gelişimini sınırlayıcı koşulları önlemesiyle gerçekleşirken; doğrudan etki, bitkiye bakteri tarafından sentezlenen bir bileşiği sağlaması veya çevreden gerekli olan bazı besinlerin hazır alınımını kolaylaştırmasıyla gerçekleşir.

PGPR, ürettiği sideroforlarla demiri ayırmasıyla, fosfat minerallerini ve diğer besin maddelerini çözebilme kabiliyetiyle ve havadaki serbest azotun fiksasyonu ile bitkiye besin sağlayarak; indol asetik asit (İAA), indol-3-asetik asit, gibberellin, oksin, sitokinin gibi bitki hormonlarını sentezleyerek; bitki hormonlarının seviyelerini etkileyerek gelişim ve büyümeyi ayarlayan bazı enzimler üreterek (Örneğin; ACC deaminaz aktivitesiyle bitki etilen hormonu seviyesini enzimatik olarak düşürme) bitkiye doğrudan hizmet eder. Ayrıca; antibiyotik sentezleyerek, mantar patojenlerinin ihtiyaç

duyduğu demiri bağlayıcı özellikteki sideroforları salgılayarak, antifungal aktiviteye sahip hidrojen siyanit gibi ağır metabolitler üreterek, bazı mantar hücrelerini lize edebilen kitinaz, β -1,3- glukanaz, proteaz veya lipaz gibi enzimler sentezleyerek, kök yüzeyindeki bitki patojenlerini besin ve uygun yer konusunda rekabet dışı bırakarak biyokontrol sağlanmasıyla ve bulundurduğu ACC deaminaz enzimi ile aşırı miktarda sentezlendiğinde bitkiyi olumsuz yönde etkileyen etilenin seviyesini azaltarak bitkinin çevresel streslere karşı daha dirençli olmasını sağlanmasıyla da bitkiye dolaylı olarak hizmet ederler (Scher and Baker 1982; Dart 1986; Barnes *et al.* 1991; Arshad and Frankenberger 1991; Mordukhova *et al.* 1991; Renwick *et al.* 1991; Shanahan *et al.* 1992; O`Sullivan and O`Gara 1992; Glick 1995; Flaishman *et al.* 1996; Kennedy *et al.* 1997; De Freitas *et al.* 1997; Glick *et al.* 1999; Bloemberg and Lugtenberg 2001; Gull *et al.* 2004; Glick *et al.* 2005; Nadeem *et al.* 2006; Van Loon 2007; Raaijmakers *et al.* 2008).

PGPR olarak tanımlanan bakteriler bu mekanizmalardan herhangi birini ya da birkaçını kullanarak bitki büyüme ve gelişmesini etkiler. Üstelik bu bakteriler bitkinin yaşamı süresince farklı dönemlerde farklı özelliklerden yararlanabilir. Örneğin; tohum çimlenmesini takiben bir PGPR bitkinin etilen konsantrasyonunu düşürmekle, fide kök uzunluğuna etilenin inhibe edici etkisini azaltmış olur. Fide tohumun içerdiği besin kaynaklarını tükettiği zaman ise aynı PGPR topraktaki fosfor ve demiri bitkiye sağlayarak bitki gelişimine katkıda bulunur.

Toprak bileşiminin içeriği; bitkiye azot, fosfor ve demir gibi bir bileşiği veya besini sağlayan bakteri mekanizmasını oldukça fazla etkiler. PGPR`nin etkisi optimum koşullar altında ve besin bakımından zengin topraklarda yaşayan bitkiler için yok denecek kadar azdır (Glick *et al.* 1998; Penrose and Glick 2003). PGPR`nin bazı etki mekanizmaları Çizelge 1.2`de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Bazı önemli bakteriyel faktörlerin bitki büyümesine etkisi (Ping and Boland 2004'ten değiştirilerek)

| MİKROORGANİZMA | BAKTERİYEL SALGI | BİTKİ | BİTKİDEKİ ETKİSİ |
|---|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| | Bitkisel Hormonlar | | |
| <i>Pseudomonas</i> | Oksinler | <i>Arabidopsis</i> | Morfogenesis, Gelişmeyi Düzenleme |
| <i>Rhizobium</i> | Giberellinler | Pirinç | Gelişmeyi Teşvik etme |
| <i>Rhizobium</i> | Sitokininler | Kanola | Gelişmeyi Teşvik etme |
| <i>Pseudomonas</i> | Etilen | <i>Pueraria lobata</i> | Gelişmeyi Düzenleme |
| <i>Serratia</i> | Salisilik asit | Tütün | Sistemik Kazanılmış Dayanım |
| | Hücre dışı Enzimler | | |
| <i>Enterobacter</i> | ACC deaminaz | Kanola | Etilen Üretimini Azaltma |
| <i>Rhizobium</i> | Fosfataz | Mısır | İnorganik Fosfatları Mineralize etme |
| | Organik Asitler | | |
| <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> ve <i>Bacillus</i> | Glukonik asit, 2-ketoglukonik asit | Genel | Organik Fosfatları Çözme |

Bitki büyümesini teşvik edici bakterilerin hepsi aynı yoğunlukta kullanılmamakta, bazı PGPR üyeleri, biyogübre üretimi için daha yoğun çalışılan ve kullanılan organizma grubunu temsil etmektedir. Aşağıda bu organizmaların bazıları hakkında bilgi verilmiştir.

1.2.1. Fosforlu bileşikleri çözebilme kabiliyeti olan PGPR üyeleri

Bitkiler için en önemli besin kaynaklarından biri de fosfordur. Fosfor (P), bitki gelişimini etkileyen elementlerdendir. Genel olarak topraktaki toplam fosforun %30-50'sini organik P oluşturmaktadır. Organik P toprakta çoğunlukla inositol fosfat, fosfomonoester veya fosfolipit, nükleik asit ve fosfotriester şeklinde bulunmaktadır. Organik P ancak inorganik fosfora hidrolize olması durumunda bitkiler tarafından alınabilir. Toprakta bulunan bazı bakteriler, bitkiler tarafından kullanılmayacak durumdaki fosforu çözerek kullanılabilir forma dönüştürür (Goldstein 1986, 1995).

Topraktaki P yeterli düzeyde olsa ya da düzenli olarak gübreleme yapılsa bile bitkilerin bu fosforu alma etkinliği düşük olmaktadır. Bitki tarafından alınabilen P yüksek verim için genellikle yetersizdir çünkü uygulanan inorganik fosfor gübrelemeden hemen sonra fikse edilmektedir (Gyaneshwar *et al.* 2002).

Tohumların fosfor çözücü bakterilerle (PSB) aşılması toprakta fikse edilmiş durumdaki gübre fosforunun alınabilirliğini artırarak bitki gelişmesini teşvik etmektedir. Fosfat bakterilerinin biyolojik gübre olarak kullanımı ile tarımsal üretim %10-15 oranında artmıştır (Jones and Darrah 1994; Yadav and Dadarwal 1997).

Bitkiler fosforu HPO_4^{-2} veya H_2PO_4^- formunda alabilirler. Topraktaki fosforun bu formlara dönüşmesi için mikroorganizmalar tarafından çözülmesi gerekmektedir. (Çakmakçı 2005). Bitki rizosferinde önemli sayıda aerobik ve anaerobik P çözücü bakteri bulunmaktadır. Besin ve enerji kaynağı olarak topraktaki organik maddelerin parçalanması sonucu toprak solüsyonundaki P düzeyinde değişiklik meydana gelmektedir. Fosfat çözünürlüğü bazı elementler tarafından da etkilenmektedir. Mesela kritik bir potasyum konsantrasyonunun optimum P çözünürlüğü için gerekli olduğu saptanmıştır (Illmer and Schinner 1992). Mikroorganizmalar fosfat çözebilmeye kabiliyetine ilaveten bitki gelişimini teşvik edici maddeleri üreterek demir, çinko gibi elementlerin de alınmasını artırmaktadır (Kucey *et al.* 1989). Ayrıca N_2 fiksasyonunun alınabilir P tarafından sınırlandırıldığı da yapılan çalışmalarda görülmüştür (Mac Dermott 1999). Fosfat çözücü *Bacillus* spp. sayesinde bitkiye P sağlanarak bitki gelişmesinin teşvik edildiği bunun yanında N, P, K ve Fe alımının arttığı da ortaya çıkmıştır (Whitelaw *et al.* 1997; Biswas *et al.* 2000a). Ayrıca fosfatın çözülme miktarının karbon kaynağı olan glikoz konsantrasyonunun fazlaşmasına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir (Nautiyal 1999).

Mikroorganizmaların, salgıladıkları organik asitler sayesinde toprak pH'sını düşürmek suretiyle inorganik fosfat materyalini çözebildiği ve buna bağlı olarak bitki veriminde artışlar meydana geldiği yönünde bulgular tespit edilmiştir (Kucey *et al.* 1989; Jones and Darrah 1994; Gadd 1999; Kumar and Narula 1999; Vassileva *et al.* 2000; Whitelaw

2000; Nautiyal *et al.* 2000; Seshadri *et al.* 2000; Antoun 2003). Bazı araştırma sonuçlarında ise fosfat çözünürlüğü ile pH arasında doğrusal bir ilişkinin olmadığı ortaya konulmuştur (Thomas 1985; Ehrlich 1990; Çakmakçı vd 2004).

Organik P'nin çözülmesinde asit fosfataz üretimi önemli rol oynamaktadır (Rodríguez and Fraga 1999). Ayrıca glikolik, okzalik, malonik, süksinik (Banik and Dey 1982; Illmer and Schinner 1992) asetat, laktat, oksalat, tartarat, süksinat, sitrat, glukonat, ketoglukonat ve glikolat (Banik and Day 1982; Goldstein 1986; Cunningham and Kuiack 1992; Gyaneshwar *et al.* 1998; Kim *et al.* 1998, 1999) gibi organik asitlerin fosfat çözücü bakteriler tarafından sentezlendiği bulunmuştur. Sıvı kültür ortamlarında fosfat çözücülerin sitrik, glutamik, süksinik, laktik, okzalik, maleik, fumerik, tartarik ve ketobütirik gibi organik asitleri üretme yeteneği fark edilmiştir (Sundara *et al.* 2002).

Rhizobium spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. önemli düzeyde asit fosfataz aktivitesi göstermektedir (Abd-Alla 1994; Thaller *et al.* 1995; Glick *et al.* 1997; Skrary and Cameron 1998). Bunun yanında *Paenibacillus*, *Vibrio*, *Xanthobacter*, *Kluyvera*, *Erwinia* ve *Chryseomonas* cinslerine ait bakterilerin P çözebildiği sonucuna varılmıştır (Liu *et al.* 1992; Vazquez *et al.* 2000). *Rhizobium leguminosarum* (Hadler *et al.* 1990), *R. meliloti* (Hadler and Chakrabarty 1993), *B. firmus* (Banik and Dey 1982) gibi türlerin ise 2-ketoglükonik asit salgılayarak fosfatı çözdüğü gözlemlenmiştir. *B. liqueniformis* ve *B. amyloliquefaciens* türlerinin laktik, izovalerik, izobütirik ve asetik asit karışımlarını üretebildiği bilinmektedir.

1.2.2. Azot bağlayıcı PGPR üyeleri

Atmosfer, onun en önemli bileşeni olan moleküler azot için sınırsız bir kaynaktır. Azot elementi, nükleik asit ve protein gibi bileşiklerin temel yapı taşı olması itibariyle tüm hayatsal faaliyetler için önemli bir nitelik taşıır. Ne yazık ki; yüksek bitkiler azottan doğrudan istifade edemez. Bitkilerin azottan yararlanabilmesi için atmosferde N₂ formunda olan azotun ilk önce yükseltgenerek nitrata (NO₃) veya indirgenerek

amonyağa (NH₃) dönüştürülmesi gerekir. Toprakta serbest ve simbiyotik yaşayan bakterilerin sahip oldukları nitrogenaz enzimi yardımıyla atmosferdeki N₂ gazının NH₃'e indirgenmesi biyolojik azot fiksasyonu olarak tanımlanmaktadır (Taiz and Zeiger 1991; Salisbury and Ross 1992; Algur ve Öğütçü 2000).

Azot fiksasyonu serbest ve simbiyotik olarak iki şekilde gerçekleşmektedir. Simbiyotik azot fiksasyonunun en bilinen örneğini baklagiller ile onların köklerinde nodül oluşturan Rhizobium bakterileri oluşturur. Serbest azot fiksasyonu ise bitki rizosferinde yaşayan bazı bakteriler vasıtasıyla meydana gelir. Çok sayıda bakterinin azot fikse ettiği tespit edilmiş, ancak bunlardan sadece *Azotobacter*, *Bacillus* ve *Azosprillum* cinslerine ait bazı türlerden tarımda biyogübre olarak faydalanılmıştır (Alcama 1996; Kantar 1997; Kantar vd 1999; Algur ve Öğütçü 2000). Yapılan çalışmalarda *Azotobacter diazotrophicus* ve *Herbaspirillum* spp.'nin şeker kamışında endofit olarak bulunduğu ve azotu fikse ettiği ortaya konulmuştur (Döbereiner *et al.* 1993 b). Azot fiksasyonunun ilk safhası olan N₂'nin amonyuma dönüşümü Rhizobium bakterilerinin yerleştiği nodülde oluşur. Bakterinin ürettiği nitrogenaz enzimi ile katalizlenen bu süreçte havanın azotuna hidrojen eklenir (Salisbury and Ross 1992; Kadioğlu 1998).

Azotun kimyasal olarak indirgenmesi, yüksek oranda enerji gerektirdiği için biyolojik nitrojen fiksasyonu (BNF) büyük bir önem taşımaktadır. Bazı mikroorganizmalar BNF kabiliyetleriyle bitkiler tarafından alınamayan atmosfer azotunu (N₂), nitrogenaz enzimi sentezleyerek bitkinin kullanabileceği şekle (NH₄) dönüştürmektedir. BNF'nin maaliyeti kimyasal gübrelere göre daha düşüktür ve enerji tasarrufu sağlamaktadır (Glick 1995; Lucy *et al.* 2004). BNF miktarı nem, oksijen ve organik kaynaklara bağlı olarak farklılık gösterir. BNF; sürdürülebilir tarımın gelişmesi için alternatif gübre kaynağı olarak kullanılmasıyla, sürekli artan gereksinimleri karşılamasıyla, çevre kalitesini artırmasıyla, doğal kaynakları korumasıyla ve toprak erozyonunu azaltmasıyla gündemde önemli bir yer edinmiştir (Çakmakçı 2005).

1.2.3. Patojenlerle mücadele edebilme kabiliyeti olan PGPR üyeleri

Bakteriler; antifungal madde, siderofor ve antibiyotik sentezinin yanında patojenlere karşı koymada başka mekanizmalara da sahiptir. *Pseudomonas* benzeri bazı bakterilerin hidrojen siyanit sentezleyerek mantar gelişimini engellemesi, *P. cepacia* gibi türlerin *Fusarium* enfeksiyonunda bitkiye zarar veren fusarik asit bileşiklerini parçalayarak mantar patojenlerinin oluşturduğu bitki hastalıklarını önlemesi, bazı bakterilerin fungus gelişimini önleyici enzim salgılaması, *P. cepacia* gibi bazı bakterilerin mantar misellerine zarar vererek *Rhizoctonia*, *Sclerotium* ve *Pythium* cinslerine ait patojenlerin zararını önlemesi, kök yüzeyinde besin için rekabete girerek bitkileri patojenlerden koruması, PGPR ile aşılana bitki ve tohumların uzun dönemde hastalıklara neden olan funguslara karşı bitkide sistemik dayanıklılık sağlaması, *Pseudomonas* benzeri bakterilerle inokülasyonla doğal mikroflora arasında antibiyosis ve rekabete dayalı antagonistik etki oluşturması bu mekanizmalar arasında sayılabilir (Çakmakçı 2005).

Mycorrhizae, *Streptomyces*, *Enerobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* ve *Bacillus* cinslerine ait çeşitli türler toprak patojenlerinin kontrolünde etkilidir. En bilinen bakteriyel biyoinsektisit *B. thuringiensis*'tir. Bu bakterinin üretmiş olduğu *Bt* toksini, çok seçici bir özellik göstererek sadece belli zararlı böceklere karşı etkide bulunur ve dolayısıyla insan, kuş, balık ve faydalı böceklere zarar vermez. Yapılan bir çalışmada *B. thuringiensis*, sebzelerde biyokontrol amaçlı olarak kullanılmış ve bu bakterinin kimyasal ilaçlamalar kadar etkili olduğu belirlenmiştir (Saber 2001). Bitki gelişimini artırmada bazı patojenlere karşı kullanılan çeşitli PGPR üyeleri Çizelge 1.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 1.3. Bazı patojenlerle mücadelede ve bitki gelişimini artırmada etkili çeşitli PGPR üyeleri (Küçük ve Güler 2009'dan değiştirilerek)

| Antagonist | Patojen | Konukçu bitki |
|--------------------------------|---|---------------|
| <i>Rhizobium</i> spp. | <i>Meloidogyne javanica</i> | Mercimek |
| <i>R. leguminosarum</i> | <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>pisi</i> | Bezelye |
| <i>R. phaseoli</i> | <i>Fusarium solani</i> | Fasulye |
| <i>Rhizobium</i> spp. | <i>Ascochyta rabiei</i> | Nohut |
| <i>R. trifolii</i> | <i>Phytophthora</i> sp. | Yonca |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> | Turp |
| <i>P. fluorescens</i> Q8r1-96 | <i>Gaumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> | Buğday |
| <i>P. chlororaphis</i> MA342 | <i>Drechslera graminea</i> | Arpa |
| <i>P. fluorescens</i> VO61 | <i>D. avenae</i> | Yulaf |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Phythium</i> sp. | Domates |
| <i>Trichoderma hamatum</i> TR1 | <i>Rhizoctonia solani</i> | Patlıcan |
| <i>T. harzianum</i> T1 | <i>P. ultimum</i> | Fasulye |
| <i>T. virens</i> GL-21 | <i>Fusarium</i> sp. | Hıyar |

1.2.4. Fitohormon sentezleyebilme kabiliyeti olan PGPR üyeleri

Rizosferden elde edilen kök bakterilerinin %80'inde bitki gelişimini düzenleyen İAA üretiminin gerçekleştiği düşünülmektedir (Patten and Glick 2002).

Yapılan çalışmalar; İAA'nın bitkilerde floem ve ksilemin farklılaşmasını sağladığını, yaprak yaşlanmasını geciktirdiğini ve çiçek gelişimini artırdığını ortaya çıkarmıştır (Anonymous 2003a). İAA; kök oluşumu, hücre bölünmesi ve genişlemesini, gibberellinler ise bitki morfolojisini değiştirebilmektedir (Salisbury 1992). İAA üreten PGPR kök gelişmesi ve kök uzunluğunu artırdığı için bitkiler daha geniş bir kök yüzey alanı sayesinde topraktan besin elementlerini bünyesine kolaylıkla alabilmektedir (Data et al. 1982). PGPR tarafından üretilen, hücre çoğalması, hücre genişlemesi ve belli

bitkilerde doku genişlemesinde etkisi bulunan bir başka fitohormonun ise sitokinin olduğu anlaşılmıştır (Mayak *et al.* 1999; Holguin and Glick 2001).

Mikroorganizmalar fitohormon üreterek bitki gelişimini teşvik etmekte ve PGPR doğrudan kök solunumunu etkileyerek kök gelişimini artırabilmektedir. Nitekim farklı bitkilerin *Azospirillum* ile aşılınması sonucu kök solunumu artış göstermiştir (Vedder-Weiss *et al.* 1999). PGPR'nin doğal bitki hormonlarını sentezlemesi ile bitki gelişimini uyardığı (Amer and Utkheda 2000), besinlerin alımını kolaylaştırdığı (Bashan *et al.* 1990), bitki hastalıklarının kontrolünü sağladığı (Kiewnik *et al.* 2001; Georgakopoulos *et al.* 2002; Estevez de Jensen *et al.* 2002) ve fide gelişimini teşvik ettiği (Biswas *et al.* 2000b; Peng *et al.* 2002) tespit edilmiştir. Örneğin; *Azospirillum* cinsine ait bakteriler N₂ fikse etme yeteneğine ek olarak, oksin ve sitokinin hormonlarını üretmesiyle de erken fide gelişmesi üzerinde olumlu etki göstermektedirler (Shanthaam and Mattoo 1997). PGPR tarafından üretilen bazı fitohormonlar ve uygulandığı bitkiler Çizelge 1.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. PGPR tarafından üretilen bazı fitohormonlar (Vessey 2003' den değiştirilerek)

| Üretilen madde | PGPR | Bitki | Kaynak |
|----------------|--------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| İAA | <i>Aeromonas veronii</i> | Pirinç | Mehnaz <i>et al.</i> 2001 |
| | <i>Agrobacterium</i> sp. | Marul | Barazani and Friedman 1999 |
| | <i>Alcaligenes piechaudii</i> | Marul | Barazani and Friedman 1999 |
| | <i>Azospirillum brasilense</i> | Buğday | Kaushik <i>et al.</i> 2000 |
| | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | Turp | Antoun <i>et al.</i> 1998 |
| | <i>Comamonas acidovorans</i> | Marul | Barazani and Friedman 1999 |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | Pirinç | Mehnaz <i>et al.</i> 2001 |
| | <i>Enterobacter</i> sp. | Şeker kamışı | Mirza <i>et al.</i> 2001 |
| | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | Turp | Antoun <i>et al.</i> 1998 |
| Sitokinin | <i>Paenibacillus polymyxa</i> | Buğday | Timmusk <i>et al.</i> 1999 |
| | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Soya fasulyesi | De Salamone <i>et al.</i> 2001 |
| | | Çam | Bent <i>et al.</i> 2001 |
| | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | Kolza- Marrul | Noel <i>et al.</i> 1996 |
| Giberellin | <i>Bacillus</i> sp. | Kızılağaç | Gutierrez-Manero <i>et al.</i> 2001 |

1.3. Etilen Hormonu

Gaz tabiatında bir bitki hormonu olan etilenin, bitkilerin yaşamları boyunca gerçekleşen birçok gelişimsel işlemin düzenlenmesinde kullanıldığı bilinmektedir (Abeles *et al.* 1992; Reid 1995). Etilen birçok mekanizma ile bitki gelişim ve fonksiyonlarını düzenler ve olgunlaştırma hormonu olarak tanımlanır. Farklı gelişimsel aşamalardaki fizyolojik rolünden başka; mekanik yaralanma, kimyasallar ve metaller, kuraklık, ekstrem sıcaklıklar ve patojen enfeksiyonu gibi birtakım streslere maruz kalan bitkilerde tepkiler uyandırmasıyla bağlantısından dolayı etilen, stres hormonu olarak da bilinir (Wang *et al.* 1990; Kende 1993; Abeles 1993; Morgan and Drew 1997; Johnson and Ecker 1998).

1.3.1. Etilen hormonunun bitkiler üzerindeki etkisi

Etilen; dormansinin kırılması, kök oluşumu ve köklerin uzaması, kök ve gövde farklılaşması, adventif kök formasyonu, yaprak ve meyve dökülmesi, çiçeklenmenin sona ermesi, dioik bitkilerde döllenmenin artması, çiçek ve yaprak yaşlanması ve nodül oluşumu gibi birçok olayda görev almasıyla bitkisel gelişimin fizyolojik bir göstergesi konumundadır (Abeles *et al.* 1992; Johnson and Ecker 1998; Arshad and Frankenberger 2002). Ayrıca çimlenme, çiçek gelişimi, meyve olgunlaşması ve birçok çevresel faktöre tepki gibi bitkide meydana gelen çok çeşitli olaylarda işlevi bulunan önemli bir sinyal molekülüdür (Stearns and Glick 2003; Yıldırım and Taylor 2005).

Etilen bazı bitkilerde çiçeklerin solmasında, bazı bitkilerde ise çiçeklenmede rol oynar. Düşük düzeyde etilenin kök gelişimini teşvik etmesine rağmen, hızlı bir şekilde gelişen köklerin yüksek miktarda etilen sentezine sebep olması kök uzamasını engellemektedir (Mattoo and Suttle 1991; Ma *et al.* 1998). Etilenin bitki gelişiminde büyük öneminin olmasıyla birlikte, stres durumlarında üretilen aşırı etilen bitki gelişimini engellemektedir. Köklerdeki etilen artışı biyotik ve abiyotik stres koşullarına bitkinin verdiği bir tepkidir (Abeles *et al.* 1992; Arshad and Frankenberger 1995, 1998, 2002). Yüksek miktarda etilen kök gelişimini olumsuz olarak etkiler ve anormal gelişmeye neden olur. Bu bakımdan normal bitki büyüme ve gelişimini sağlamak için etilen

üretimini düzenlenmesi gereklidir. Strese bağı olarak üretilen etilen; kök uzamasını, yumrucuk oluşumunu ve oksin taşınmasını engelleyerek bitki yaşlanması ile yaprak dökülme ve yaşlanmasını hızlandırmaktır. Bitkiler çeşitli stres durumlarında genellikle “stres etileni” üreterek strese yanıt verir. Farklı bitkiler strese farklı şekillerde tepki gösterir ancak birçok bitki etilen hassasiyetine sahiptir. Yani farklı stres çeşitlerine maruz kalan bitkilerin zarar görmesinin bir sonucu olarak bitki etilen düzeyinin artışı değişmeyen bir tepki şeklidir (Hyodo 1991).

Karanlıkta çimlenen (etiyolet) dikotil fidelerinin etilen varlığında gösterdiği ‘klasik üçlü tepki’ (classical triple response) bitki gelişimi üzerinde etilenin en bilinen etkisidir. Bu etki, fidelerde morfolojik olarak 3 değişikliğe sebep olur. Bunlar; gövde uzamasının inhibisyonu, gövde çapında artış, yatay (horizontal) büyüme şeklindedir (Akhtar *et al.* 2005; Khalid *et al.* 2006).

1.3.2. Etilen hormonu ve ACC deaminaz enzimi

Bitkilerdeki etilen üretiminin belirgin şekilde artışı bitki dokusundaki ACC konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir (Machackov *et al.* 1997). Etilen; doku tahribi, biyotik ve abiyotik stres koşulları boyunca bitki dokularında öncü maddesi olan ACC’den sentezlenir. Etilenin aşırı miktarda sentezlenmesi ise kök uzamasını ve fidelenmeyi engeller ayrıca bitkilerdeki yaprakların gelişimini durdurur (Sheehy *et al.* 1991; Foolad and Lin 1997; Glick and Pasternak 2003; Ma *et al.* 2003). Bunun yanında etilen adeta nodulasyonun bir inhibitörü olarak davranış gösterip, nodül formasyonunu olumsuz etkiler (Ligero *et al.* 1991; Hirsch and Fang 1994).

Stres koşullarında bitkilerde bir yanda “stres etileni” miktarında artış gözlenirken, diğer yanda etilen sentezini engelleyen ve düzenleyen maddelerde azalma görülür. Bundan dolayı ACC deaminaz üreten bakteriler bitkilerdeki etilen düzeyini azaltabilirse, stresin bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerindeki zararlı etkilerine karşı koruma sağlanabilir (Çakmakçı 2009).

Etilen seviyesini düşürmek için rizobitoksin, L- riobitoksinin sentetik analogu olan L- α -aminoetoksivinil glisin (AVG), aminooksiasetik asit (AOA) ve etilen inhibitörü metilsiklopropan (MCP) ve analogları gibi kimyasallar kullanılır (Sisler and Serek 1997; Yuhashi *et al.* 2000). Özellikle hasat sonrası meyve bozulmaları ve çiçeklerin solmasını azaltmada ticari olarak onaylanmış MCP kullanılmaktadır. Fakat genellikle bu kimyasallar pahalı, uygulama alanı dar ve çevre için zararlı etkileri mevcut olan maddelerdir (Saleem *et al.* 2007). Rizosferde doğal olarak bulunan birçok PGPR, ACC deaminaz aktivitesi bulundurması ve geniş alanlarda uygulanabilmesi yönüyle kimyasallara göre daha avantajlı olmaktadır. Üstelik oksin, gibberellin, sitokin ve poliamin sentezi gibi birçok mekanizma bulundurdıklarından bitki gelişimini doğrudan artırıcı özelliktedirler (Tabor 1985; Frankenberger and Arshad 1995; Patten and Glick 2002; Zahir *et al.* 2004; Çakmakçı vd 2007a). Bu özelliklerinden ötürü ACC deaminaz üreten PGPR'yi tercih etmek diğer alternatiflere göre daha güvenilirdir. Şu da ifade edilmelidir ki; ACC deaminaz aktivitesine sahip bitki gelişimini artırıcı bakteriler haricinde biyotik ve abiyotik stres şartlarına karşı tarla koşullarında herhangi bir kimyasal etilen inhibitörü uygulanmamaktadır (Glick *et al.* 2007).

1.3.3. Bitkideki etilen seviyesini etkileyen faktörler

Normal büyüme ve gelişme sürecinde, hücre içindeki etilen seviyesi bitki tarafından bazı mekanizmalar kullanılarak ayarlanır. Yüksek bitkilerde S-adenozilmetionin (SAM), ACC sentaz enzimi yardımıyla ACC' ye dönüştürülür. Etilen üretiminin son aşamasında ise ACC, ACC oksidaz enzimi vasıtasıyla; etilen, karbondioksit (CO₂) ve siyanite (HCN) okside olur (Hontzeas *et al.* 2004). Bu da bitkilerdeki etilen üretiminin, doğrudan bitki dokularındaki ACC konsantrasyonuna bağlı olduğu anlamına gelmektedir (Lürssen *et al.* 1979; McKeon *et al.* 1982; Machackov *et al.* 1997).

ACC seviyesinin azalması, stresin neden olduğu yüksek etilen değerlerinin inhibe edici etki potansiyelini azaltan hücre içindeki daha düşük etilen seviyesiyle sonuçlanır. Yapılan çalışmalarda bazı PGPR'lerin ACC deaminaz enzimleri vasıtasıyla ACC'yi

parçalayıp köklerdeki hücre içi etilen seviyesini düşürerek bitki gelişimini teşvik ettiği görülmüştür (Glick *et al.* 1998; Yuhashi *et al.* 2000).

ACC deaminaz enzimi ACC tarafından indükleninceye kadar bakteri stoplazmasında düşük bir miktarda bulunur ve enzimin indüklenmesi yavaş gelişen bir süreçtir (Jacobson *et al.* 1994). Bakteri bitki dokuları ile temasa geçtiğinde, bakteri hücrelerinde inaktif ve düşük miktarda bulunan bu enzim bitki tarafından sentezlenen ACC maddesi ile indüklenerek artmakta ve aktif hale gelmektedir (Glick *et al.* 1998).

1.4. ACC Deaminaz Enzimi

ACC deaminaz, piridoksal 5-fosfat kofaktörü ile enzimatik aktivite gösteren bir enzim grubunun üyesidir (Walsh *et al.* 1981). Bu enzimler üç boyutlu yapılarına göre dört grupta incelenir. Bunlar; triptofan sentez, aspartat aminotransferaz, D-aminoasit aminotransferaz ve alanin rasemazdır (Jansonius 1998). ACC deaminaz, triptofan sentez grubuna dâhildir. ACC deaminaz enzimi ilk olarak Honma ve Shimomura (1978) tarafından keşfedilmiştir.

1.4.1. Bakteriyel ACC deaminaz enzimi ve etki mekanizması

Mikroorganizmaların içerdiği ACC deaminaz enzimi, bitkilerde etilenin yakın öncü maddesi olan ACC' nin etilene dönüşmesi yerine amonyak ve α -ketobütirata parçalanmasını sağlar (Honma and Shimomura 1978; Glick *et al.* 1994 a, b, 1998, 2001; Mayak *et al.* 1999; Penrose and Glick 2003; Shaharoon *et al.* 2006a; Khosravi *et al.* 2008).

Bakteriyel ACC enziminin aksiyon şekli Glick *et al.* (1998) tarafından bulunmuştur. Bitki gelişimini teşvik edici bakteriler tarafından üretilen indol asetik asit, tohum ve kök sızıntılarında bulunan triptofan ve diğer küçük moleküller yardımıyla bitki kök yüzeyleri veya tohumlar tarafından adsorbe edilir (Whipp 1990; Hong *et al.* 1991; Fallik *et al.* 1994). Bakteri tarafından sentezlenen İAA bitki tarafından alınır ve içsel İAA ile

birleşerek hücre çoğalma ve büyümesini indükler. İAA aynı zamanda ACC sentez enziminin aktivitesini teşvik ederek SAM'ın ACC'ye dönüşmesini sağlar (Kende 1993). ACC deaminaz enzim aktivitesi olan bakteriyle muamele edilen bitkide bakteriyel indolasetik asit nedeniyle ACC sentez enzimi aktivitesi artarken, ACC miktarı bakteriyel ACC deaminaz enziminden dolayı azalır (Glick *et al.* 1998; Madhaiyan *et al.* 2006; Saleem *et al.* 2007). Tohum ve köklerden büyük oranda sızan ACC, toprak bakterileri tarafından alınır ve mikrobiyal ACC deaminaz enzimi tarafından amonyum ve α -ketobütrata hidrolize edilir, böylece bitkideki harici ACC miktarı azalmış olur (Glick *et al.* 1998).

ACC deaminaz aktivitesi gösteren toprak mikroorganizmaları, bitki köklerinden sızan, bitkinin ürettiği ve ihtiyacı olan ACC miktarından daha fazla ACC sentezlenmesine neden olur, fakat daha fazla ACC rizosfere aktığından içsel ve dışsal ACC miktarı dengelenir. ACC, ACC deaminaz üreten mikroorganizmalara azot kaynağı olduğu için, bu bakteriler diğer toprak mikroorganizmalarına oranla bitki kök bölgesiyle daha sıkı bir ilişkiye girer ve daha hızlı gelişir. Bu yolla etilenin öncü maddesi olan ACC düzeyi dolayısı ile de stres hormonu olan etilenin biyosentezi engellenmiş olur (Glick *et al.* 1998; Saleem *et al.* 2007). Bu modele göre, bitki ACC deaminaz aktivitesine sahip bakteriyle inoküle edildiği zaman daha fazla kök gelişimi göstermektedir. Yürütülen araştırmalarda ACC deaminaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalarla inokülasyon durumunda içsel etilen düzeyinde kesinlikle bir farklılaşma olduğu ve bunun sonucunda bitki gelişmesinde değişimler meydana geldiği ortaya konulmuştur. Sonuçta, ACC deaminaz aktivitesi gösteren bakteriyle aşılanan bitkilerde, köklerdeki ACC miktarı ve buna bağlı olarak etilen üretimi azaltılabilmektedir (Burd *et al.* 1998; Penrose *et al.* 2001; Belimov *et al.* 2002; Mayak *et al.* 2004 b). Çizelge 1.5'de bazı bitkilerin ACC deaminaz aktivitesine sahip PGPR ile aşılınmasıyla bitkilerde ortaya çıkan değişiklikler özetlenmiştir.

Çizelge 1.5. ACC deaminaz aktivitesine sahip PGPR'nin bazı bitkilere etkisi (Çakmakçı 2009'dan değiştirilerek).

| Bitki türü | PGPR | Etkiler | Kaynak |
|---|---|---|-----------------------------------|
| <i>Brassica campestris</i> | <i>Bacillus circulans</i> <i>B. firmus</i> <i>B. globisporus</i> | Aşılama kök ve gövde gelişimini artırmış | Ghosh <i>et al.</i> 2003 |
| <i>B. napus</i> | <i>Alcaligenes</i> spp. <i>Bacillus pumilus</i> <i>Variovorax paradoxus</i> | Aşılana bitki daha kuvvetli gelişmiş | Belimov <i>et al.</i> 2001 |
| <i>B. napus</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> | Kök uzunluğu ve gövde yüksekliğinde artış | Saleh and Glick, 2001 |
| <i>Chamaecytisus proliferus</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Kök uzaması ve nodül sayısında artış | Donate-Correa <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Dianthus caryophyllus</i> | <i>Azospirillum brasilense</i> | Kök uzamasında artış | Li <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | <i>P. putida</i> | Kök, kök-gövde ağırlığı ve meyvede artış | Gravel <i>et al.</i> 2007 |
| <i>Pisum sativum</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | Nodül gelişimi teşviki | Ma <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Zea mays</i> <i>Vigna radiata</i> | <i>Pseudomonas</i> spp. spp. | Kök uzamasında ve nodülasyonda artış | Shaharoon <i>et al.</i> 2006 a, b |
| <i>V. radiata</i> | <i>P. putida</i> | Etilen üretimi azalışı | Mayak <i>et al.</i> 1999 |
| <i>Z. mays</i> | <i>E. sakazakii</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Klebsiella oxytoca</i> | Agronomik parametrelerde artış | Babalola <i>et al.</i> 2003 |

1.4.2. ACC deaminaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar

ACC deaminaz aktivitesinin *Enterobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* spp., *Variovorax* spp., *Alcaligenes* spp. ve *Bacillus* spp.'de yaygın olarak görülmesinin yanında; yapılan çalışmalarda, gram negatif bakteriler (Wang *et al.* 2000; Babalola *et al.* 2003), gram pozitif bakteriler (Belimov *et al.* 2001; Ghosh *et al.* 2003), endofitik bakteriler (Pandey *et al.* 2005; Sessitsch *et al.* 2005) ve mantarlar (Minami *et al.* 1998; Jia *et al.* 1999) gibi birçok mikroorganizmada da ACC deaminaz aktivitesinin olduğu belirlenmiştir. Toprak bakterilerinin taşıdığı bu enzim, mikroorganizma-bitki birlikteliğinde bir anahtar niteliği taşır.

Farklı bir araştırmada ise *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Ralstonia* cinslerine ait birçok türün suşlarının da ACC deaminaz aktivite genlerine

sahip olduğu bulunmuştur (Blaha *et al.* 2006). Wang *et al.* (2001) tarafından dünyanın farklı bölgelerinden izole edilen ve biyokontrolde kullanılan *Pseudomonas* türlerinin çoğunda ACC deaminaz enziminin bulunduğu belirlenmiştir.

ACC deaminaz üreten bakteriler, farklı bitkisel süreçleri engelleyen etilen miktarını azaltarak ve buna bağılı olarak ACC sentaz enziminin olumsuz etkilerini ortadan kaldırıp kök ve gövde uzamasını sağlayarak, hücre çoğalmasına katkıda bulunarak bitki büyüme ve gelişimini olumlu yönde etkiler. Ne var ki, ACC deaminaz aktivitesi gösteren her bakterinin bitki gelişmesini artırmadığı, bitki gelişimini teşvik edici bakterilerde ACC deaminaz aktivitesinin bitki büyüme ve gelişmesinde tek başına yeterli olmadığı yönünde araştırma bulguları da vardır (Dey *et al.* 2004).

ACC deaminaz aktivitesi gösteren bakterilerle birlikte yetişen bitkilerde, bakteri bitki tarafından sentezlenen ACC için alıcı işlevi görür ve bitkide etilen düzeyini azaltır (Glick *et al.* 1998). Yaygın bir şekilde ACC deaminaz enzimine sahip olan toprak mikroorganizmaları, ACC'yi azot ve karbon kaynağı olarak kullanabildiği için kök rizosferine kolonize olma bakımından diğer bakterilere oranla daha yüksek rekabet şansı kazanırlar. Örneğin yürütölen bir çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen 233 *Rhizobium* suşundan 27 adedi hariç diğerlerinin ACC deaminaz enzim aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (Duan *et al.* 2006).

1.4.3. Stres hasarlarının azaltılmasında ACC deaminaz enzimine sahip mikroorganizmaların etkisi

Yapılan birçok çalışmada ekstrem sıcaklıklar, yüksek ışık, sel, kuraklık, toksik metaller, radyasyon, yaralanmalar, predatör böcekler, çeşitli patojenlerin (virüs, bakteri, mantar vb.) varlığı, yüksek tuz miktarı, çevresel organik kirleticiler gibi çok sayıda abiyotik ve biyotik stres koşullarının bitki gelişimini inhibe ettiği vurgulanmıştır. Ortamdaki stres faktörleri giderilinceye ya da bitki metabolizması stresin üstesinden gelmeyi başarıncaya kadar bitki, yaşamı boyunca bu gibi streslere maruz kalır. Dolayısı ile bitki

gelişim süreci genelde, maksimum gelişim periyotları arasına gelişim inhibisyon periyotlarının girmesi şeklinde ilerler (Abeles *et al.* 1992; Glick *et al.* 2007).

PGPR, özellikle bitkinin çevresel streslere hassas olduğu genç fide dönemi olan bitki gelişmesinin ilk üç veya dört haftası boyunca etkili bir şekilde gelişmeyi teşvik eder ve bitkinin korunmasını sağlar. Böylelikle bitki yüksek gelişme gösterir ve stres şartlarını sağlıklı bir şekilde atlatır (Shantharam and Mattoo 1997).

Öldürücü olmayan stres dönemlerinde bitki gelişimi yavaşlar veya durur bu yüzden gelişme sürecindeki bitkinin gerçek verimi stres faktörlerinin yoğunluğu ve sayısına bağlı olarak değişir (Glick 1995; Glick *et al.* 1999).

Bitkilerin savunma proteinleri sentezlemesini de kapsayan fizyoloji ve metabolizmasını değiştirebilme yeteneğine ilaveten toprak rizosferindeki PGPR'nin de çeşitli çevresel stres koşulları ile başa çıkması için bitkiye yardım edebileceği düşünülmüştür. PGPR ile muamele edilen bitkilerde bu bakterilerin içerdiği ACC deaminaz enzimi sayesinde stres koşullarının bir sonucu olarak sentezlenen stres etileninin miktarı azaltılarak bitkideki bu aşırı etilenin yol açabileceği yıkıcı etkilere karşı bitkinin daha dirençli olması sağlanmıştır (Burd *et al.* 1998; Grichko *et al.* 2000; Wang *et al.* 2000; Grichko and Glick 2001; Mayak *et al.* 2004a,b; Kausar and Shahzad 2006; Zahir *et al.* 2007; Nadeem *et al.* 2007; Arshad *et al.* 2008).

Bitkinin strese tepkisinin ilk aşamalarında ACC birikmesine bağlı olarak etilen üretiminde hızlı bir patlama yaşanır (Morgan and Drew 1997). Birçok bitki için etilen patlaması tohumun uyku halinin kırılmasını sağlar fakat çimlenmeyi takiben devam eden yüksek etilen seviyesi kök uzamasını engeller (Esashi 1991; Jackson 1991).

PGPR; ACC deaminaz aktivitesi sayesinde etileni azaltma ve dolayısıyla daha uzun köklerin formasyonunu kolaylaştırma yoluyla, özellikle tohumlar ekildikten sonraki ilk birkaç gün boyunca çeşitli stresler altındaki bazı fidelerin hayatta kalma şansını artırır (Glick *et al.* 1998; Wang *et al.* 2000; Grichko and Glick 2001; Penrose and Glick 2003).

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine tepki olarak bitkinin etilen üretimindeki artış, kök gelişmesini ve dolayısıyla tüm bitki gelişimini engelleyici niteliktedir. Bitkisel gelişmeyi engelleyen etilen üretimi birçok çevresel stres faktörü tarafından teşvik edilir (Abeles *et al.* 1992). Bu konuyla ilgili bitki gelişimini teşvik edici bakterilerin bitkideki etilen seviyesini azaltabildiği ve böylece bitki gelişimine yardımcı olabildiği görüşü öne sürülmüştür (Glick *et al.* 1998). Bu durumda bitki gelişimini teşvik edici bakteriler genellikle tohum ve köklere yapışır, triptofan veya bitkinin salgıladığı bazı küçük moleküllere yanıt olarak İAA sentezleyip salgılar ve bu İAA'nın bir kısmı bitki tarafından alınır. Alınan İAA ile bitkide bulunan içsel İAA birleşerek; hücre çoğalmasını, bitki hücrelerinin uzamasını veya ACC'nin oluşumunu katalizleyen ACC sentaz enziminin transkripsiyonunu sağlar. Tohum, kök ve yapraklardan sızan ACC bakterilerce alınır veya bir miktar ACC daha sonra bakteri tarafından ACC deaminaz yardımıyla amonyum ve α -ketobütirata dönüştürülür (Penrose *et al.* 2001; Grichko and Glick 2001a). Savunulan bu modelde ACC deaminaz enzim aktivitesi gösteren PGPR, bitkide bulunan ACC için alıcı rol üstlenerek bitkideki etilen miktarının azalmasına sebep olur. Bu şekilde bitki etilen düzeyini doğrudan azalttığı gibi özellikle stres koşullarında bitki gelişimini engelleyen etilen miktarını da azaltarak bitkiye dayanıklılık sağlar. Böylelikle bu bakteri-bitki birlikteliğinde, bitki kök ve gövde gelişmesi kolaylaştırılmış olur (Çakmakçı 2009).

Nitekim; ACC deaminaz aktivitesine sahip gen aktarılmış transgenik bitkilerin, laboratuvar koşullarında aşırı su (Grichko and Glick 2001a), bitki patojenleri (Robison *et al.* 2001 b), tuzluluk (Sergeeva *et al.* 2006) ve metal kirliliği (Grichko *et al.* 2000; Nie *et al.* 2002; Stearns *et al.* 2005) gibi bazı stres koşullarına karşı dayanıklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu bitkilerde ACC deaminaz enzimi, ACC'yi α -ketobütrat ve amonyuma parçalayarak etilene okside olabilen ACC miktarını düşürmektedir. Mesela transgenik domatestede ACC deaminaz aktivitesinin, transformasyon yapılmamış olanlara göre aşırı su stresini azalttığı ortaya konulmuştur (Grichko and Glick 2001a).

1.4.3.a. Tuzluluk stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Toprakta tuz miktarının fazla olması, tarım üretimini güçleştiren başlıca engelleyici unsurlardan birisidir (Kausar 2006). Kurak ve yarı kurak bölgelerde tuzluluk stresi, ürün verimi üzerinde büyük ölçüde negatif etki potansiyeline sahiptir. Tuzluluk stresine bağlı olarak, bitkide etilen için bir öncü olan ACC miktarı artar (Jalili *et al.* 2009). Ayrıca kıyı bölgesi yakınlarındaki tarım alanları için toprak tuzluluğu büyük bir problemdir (Mayak *et al.* 2004b).

Tuzlu topraklarda bitkilerin daha fazla sulanmaya ihtiyacı vardır. Özellikle sıcak ve kurak bölgelerde tuzluluk tarımsal üretimi önemli ölçüde sınırlayıcı bir faktördür. Dünyada sulanan tarım alanlarının %20'si yetersiz sulamanın bir sonucu olarak ortaya çıkan ikinci bir tuzlulaşmayla karşı karşıyadır (Mayak *et al.* 2004a). Tuz stresi bitkinin hücre içi etilen üretimini teşvik etmektedir (Cuartero and Fernandez-Munoz 1999; Blumwald 2000). Araştırmalar ACC deaminaz aktivitesine sahip PGPR ile muamele edilen bitkilerin tuz stresine maruz olduğu durumlarda da normal gelişim deseni gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Örneğin İsrail'de bitki kök rizosferinden izole edilen ve ACC deaminaz enzimi taşıyan *Achromobacter piechaudii* bakterisi kullanılarak tuzlu topraklarda yetiştirilen bitkilerdeki gelişim olumsuzluklarını giderme yoluna gidilmiştir (Mayak *et al.* 2004a). Araştırma sonuçları 172 mM üzerinde NaCl varlığında bu bakterinin domates fidelerinde yaş ve kuru ağırlık artışına sebep olduğu yönündedir. Bu araştırmalarda bitkideki sodyum miktarının değişmediği, fosfor ve potasyum alımının arttığı ve bu durum sonucunda tuzluluk stresinin bitkiye olumsuz etkilerinin azaldığı saptanmıştır. *A. piechaudii* bakteri ırkının fazla miktarda tuz bulunan ortamdaki domateste etilen düzeyini önemli derecede düşürerek tuz stresine karşı bitki gelişimini kolaylaştırdığı görülmüştür. Mısır bitkisinin farklı tuz konsantrasyonlarına sahip ortamlarda ACC deaminaz enzimi bulunduran *Pseudomonas syringae*, *Enterobacter aerogenes* ve *Pseudomonas fluorescens* gibi bakterilerle yetiştirilmesi sonucu tuza karşı bitki

depresyonunda azalma ve gelişme parametrelerinde artış izlenmiştir (Nadeem *et al.* 2007).

1.4.3.b. Kuraklık stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Kuraklık dünyanın yarısına yakın bir kısmını olumsuz yönde etkileyen global bir problemdir. Aynı zamanda bitki büyüme ve gelişimini sınırlayan en önemli çevresel streslerden birisidir. Bitkiler kuraklığa diğer birçok olumsuz çevre faktörlerinde olduğu gibi dokularındaki etilen üretimini artırarak hücrel ve moleküler seviyede tepki verir. Bu da bitki gelişiminde anormallikler görülmesi sonucunu doğurur (Mattoo and Suttle 1991; Ingram and Bartels 1996; Bray 1997; Mayak *et al.* 2004b).

Mayak *et al.* (2004b) tarafından yürütülen araştırmalarda, ACC deaminaz içeren *Achromobacter piechaudii* ARV8 suşunun etilen miktarını azaltarak, kuraklık stresinin sebep olduğu bitkisel gelişim yetersizliğini ortadan kaldırdığı, domates ve biber fidelerinde yaş ve kuru ağırlık artışı sağladığı bulunmuştur. Bu bakteri suşunun, suyun yetersiz olduğu şartlarda bitki su içeriğini değiştirmezken, yeniden su uygulandığında bitki su alımını artırdığı tespit edilmiştir. Bununla beraber, su stresi altında da bitki gelişiminin devamını sağlaması ilginç bulunmuştur.

Dodd *et al.* (2005) tarafından uygulanan çalışmada sulama ve kuraklık koşullarında ACC deaminaz aktivitesine sahip *Variovorax paradoxus* 5C-2 suşu ile inoküle edilen bezelyede (*Pisum sativum* L.) bakteriyel etkinin su stresi koşullarında daha belirgin olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada, kısa süreli denemelerde ACC deaminaz içeren bakterinin kök ve gövde biyoması, yaprak alanı ve transpirasyon üzerinde olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir. Uzun süreli denemelerde ise ACC deaminaz aktivitesi gösteren bakteri inokülasyonunun uygulama yapılmayanlara oranla bitkideki tohum verimini, tohum sayısını ve tohum azot birikimini artırdığı gözlenmiştir. Üstelik bakteri aşılması, kuraklık stresine maruz kalan bezelyede nodülasyonu, yeteri kadar sulanan fakat inoküle edilmemiş bitkilerde oluşan nodülasyon seviyesine çıkarmıştır. Benzer şekilde uygulanan saksı ve tarla denemelerinde kuraklık stresinin olumsuz etkilerini engellemek

amacıyla ACC deaminaz aktivitesine sahip bakteri aşılama ları sayesinde bezelyede gelişme, verim ve olgunlaşma üzerinde olumlu sonuçlar alınmıştır (Saleem *et al.* 2007).

1.4.3.c. Aşırı su /sel stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Su basması bitkinin yetiştirme süreci boyunca belli dönemlerde karşılaşılabilecek bir sorundur. Aşırı su bulunan toprakta bitki çevresinde anaerobik ortam oluşmasına bağlı olarak bitki kök dokularında ACC birikimi dolayısı ile de bitki kök ve gövdesinde etilen üretimi artar (Else and Jackson 1998). Sentezlenen etilenden ötürü epinasti, yapraklarda klorosis ve nekrozlar oluşarak verim düşer. Sel durumunda köklerde sentezlenen ACC gövdeye taşınarak ACC oksidaz enziminin etki etmesiyle etilene dönüşür (Else *et al.* 1995). Sele yakalanan domates bitkilerinde görülen anormal gelişimin en büyük nedeninin domates gövdelerindeki etilen üretiminin artışı olduğu ortaya çıkmıştır (Jackson 1997). Yapılan deneylerde görüldüğü kadarıyla sele uğrayan bitkilere ACC deaminaz aktivitesi olan bakteri aşılama yapıldığı veya genetik olarak bu enzim özelliği bitkilere aktarıldığı takdirde köklerdeki ACC birikimi azalmıştır. Sonuçta sentezlenen etilen miktarı düştüğünden bitkinin daha az zarar gördüğü sonucuna varılmıştır (Grichko and Glick 2001a,b). Yabani domates bitkilerine *Pseudomonas putida* UW4, *Enterobacter cloacae* CAL2 ve *P. putida* (ATCC17399/pRKACC) bakteri ırklarından ACC deaminaz geni aktarılmış veya *P. putida* (ATCC17399/pRK415) ırkı ile aşılama yapılmış ve stres sonucu oluşan etilen miktarının bakteriyel ACC deaminaz tarafından azaltılarak su basmasına karşı bitkisel toleransın arttığı gözlemlenmiştir (Grichko and Glick 2001).

1.4.3.d. Sıcaklık stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Bitkiler de çoğu canlıda olduğu gibi sıcaklık değişimlerine karşı hassasiyet gösterir. Küresel ısınmadan doğan sıcaklık stresi dünya tarım alanları için ciddi bir tehlike arz eder (Mendelsohn and Rosenberg 1994; Robertson *et al.* 2000). Sürekli yükselip alçalan sıcaklık bitkide hormonal dengesizliğe yol açarak bitki gelişimini ciddi bir şekilde etkiler (Cheikh and Jones 1994). Diğer biyotik ve abiyotik stres faktörlerinde olduğu

gibi yüksek ve düşük sıcaklıklar da bitki dokularında etilen üretiminin artmasını tetikler (Strzelczyk *et al.* 1994). Yine diğer çevre streslerine karşı işleyen mekanizma kullanılarak PGPR bakterileri aracılığıyla üretilen ACC deaminaz yardımıyla bitkiler etilen düzeyini azaltarak kendisi için uygun olmayan sıcaklıklarda yaşamaya dayanmaya çalışırlar.

Nitekim yüksek sıcaklık koşullarındaki patates bitkisinin bir PGPR özelliği taşıyan *Burkholderia phytofirmans* PsJN ile aşılması durumunda patateste normal bitki gelişiminin devam ettiği sonucuna varılmıştır (Bensalim *et al.* 1998). Barka *et al.* (2006), invitro koşullarda asmanın (*Vitis vinifera* L.) *Burkholderia phytofirmans* PsJN suşu ile aşılması sonucu normal çevre sıcaklığında (26°C) ve düşük sıcaklıkta (4°C) asma gelişiminde ve fizyolojik aktivitesinde artış gözlemişlerdir. Yapılan inokülasyonla kök gelişmesi ve bitki biyoması artmıştır.

Araştırmalarda PGPR ile muamelenin muamele görmeyenlere göre, bitkide düşük sıcaklığa toleransı teşvik ettiği yönünde bulgular ortaya konulmuştur. Cheng *et al.* (2007), ACC deaminaz aktivitesi gösteren *P. putida* UW4 suşu ile aşılana kanolada düşük sıcaklığa karşı tolerans ve gelişim üzerinde olumlu etki belirlemişlerdir. Az sayıda da olsa yapılan çalışmalar ACC deaminaz enzimine sahip bakterilerin sıcaklık stresi tarafından tetiklenen etilen üretimini azaltıcı etkide bulunduğunu ortaya çıkarmıştır.

1.4.3.e. Bitkilerin soğuğa direnç kazanmasında ACC deaminaz enziminin etkisi

Genel itibariyle dünya soğuk bir gezegendir ve biyosferin %80-85'i yıl boyunca sürekli olarak 5°C'nin altındaki sıcaklıklara maruz kalmaktadır (Herbraoud and Potier 1999; Bakermans 2007).

Soğuk habitatlar; arktik ve antarktik bölgeler, yüksek dağlar, derin okyanuslar, soğuk topraklar, çöller, göller ve mağaralar gibi diğer soğuk çevreler ile ifade edilir. (Bakermans 2007). Soğuk çevrelerde, çok çeşitli sayıda bakteriler, arkealar, mayalar,

ipliksi mantarlar ve algler gibi mikroorganizmalar kolonize olmuştur (Gerday and Glansdorff 2007; Margesin *et al.* 2008). Mikroorganizmalar tüm ekosistemlerin ayrılmaz bir parçası olduğu için ve bulundurdukları bazı özellikler sayesinde soğuk ekosistemlerde besin döngüsünde önemli bir rol oynarlar (Hägglom and Margesin 2005).

Sıcaklık neredeyse tüm yaşayan türlerin gelişimi ve hayatta kalması için önemli bir unsur olduğundan, optimum değerlerden uzaklaşan sıcaklık değişimleri ani ve şiddetli olarak ekosistemin verimini etkiler (Kumar *et al.* 2005).

Alpin toprak çevreleri gibi yüksek ve soğuk bölgeler, fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinde belirgin olarak mevsimsel değişiklik göstermeleriyle karakterize edilir (Greenland and Losleben 2001).

Mikrobiyal kommünite kompozisyonlarındaki ve mikrobiyal yeteneklerdeki değişiklikler, periyodik olarak gerçekleşen belirli çevresel değişikliklerle bağlantılıdır. Aminoasitler, toprak proteinleri, suda çözünebilir organik bileşikler ve selüloz gibi birçok organik bileşik mevsimsel değişimlere bağlı olarak farklılaşan mikrobiyal kommünite için önemlidir. Örneğin toprakların yaşlıktan kuruluğa doğru değişimi gelişim için gerekli olan karbon kaynaklarının dağılımını daha heterojen bir hale getirir. Bu yüzden mevsimsel değişiklik gösteren çevrelerde bakteriler sert ve değişken koşullara eğilimli olmaya mecbur kalır (Lipson *et al.* 1999,2000; Schadt *et al.* 2003; Meyer *et al.* 2004).

Bitki gelişimi ve verimliliği soğuk şartlarda gerilediğinden dolayı donla birleşen düşük sıcaklıklar temel zorlayıcı unsurlardan biridir (Kumar *et al.* 2005).

Mikroplar düşük sıcaklıkları tercihlerine göre; psikrofiller (soğuğu sevenler) ve psikrotolerantlar (soğuğa toleranslılar) olarak gruplandırılır. Psikrofiller sürekli olarak kutuplar, yüksek bölgeler, derin denizler gibi soğuk habitatlarda yaşarlar ve 15°C ile 0°C'nin altında değişen sıcaklıklarda yetişirler. Psikrotolerantlar ise yüksek yaz ve

düşük kış sıcaklıklı kıtasal iklimli bölgeler gibi periyodik olarak günlük ya da mevsimlik sıcaklık değişimi gösteren çevrelerde ve genellikle 20°C' nin altındaki sıcaklıklarda optimum olmakla birlikte 4-42°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişirler. Soğuk koşulların genellikle geçişli olduğu yüksek bölgelerdeki ekosistemlerde daha sıcak koşullarda optimum olarak geliştikleri halde daha düşük sıcaklık koşullarında da fonksiyonlarını korudukları için psikrotolerant mikroorganizmalar büyük bir önem arz eder (Morita 1975; Mıshra *et al.* 2009).

Tarımsal verim, özellikle kış ayları boyunca düşük atmosfer ve toprak sıcaklığına bağlı olarak azaldığından dolayı; düşük sıcaklıkların negatif etkisini dengeleyen, soğuğa adapte olmuş, bitki büyüme ve gelişimini olumlu olarak etkileyen rizobakteri ırklarını inokülant olarak kullanmak son derece önemlidir (Kottmeier and Sullivan 1990; Mıshra *et al.* 2009).

Soğuğa dirençli bu mikroorganizmalar düşük sıcaklıktaki çevrelerde başarıyla gelişebilmek için, bir dizi fonksiyonel ve güçlü etkili adaptasyon geliştirmişlerdir. Bu adaptasyonlar; düşük sıcaklıklarda yüksek katalitik etkili, soğukta aktif kalabilen enzim üretimi, hücre membranlarına membran akışkanlığını korumak için doymamış yağ asitlerinin katılması ve düşük sıcaklıklarda soğuk şok proteininin sentezi olarak bilinir (Gerday and Glansdorff 2007; Margesin *et al.* 2008).

Soğuğa bir tepki olarak meydana gelen protein sentezi, *Csps* (Soğuk şoku proteinleri = Cold shock proteins) veya *Caps* (Soğuk şoku alıştırtma proteinleri = Cold shock acclimation proteins) olarak gruplandırılmaktadır (Russell *et al.* 1995).

Sıcaklık azaldığında bütün hücrelerde çift katmanlı fosfolipid membranların akışkanlığı da azalmaktadır. Optimum akışkanlığı sağlamak için hücreler, membranlarındaki doymamış yağ asiti miktarını artırır veya membran yağ asitlerinin uzunluklarını azaltarak akışkanlığı arttırabilirler (Phadtare *et al.* 1999).

1.4.3.f. Patojen stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Bitki patojeni olan mikroorganizmalar çeşitli ekosistemlerde ve gıda üretim alanlarında en büyük tehlikelerden biri olduğu için son yıllarda virüs, bakteri ve fungal patojenlere dayanıklılığı sağlama adına yapılan çalışmalar bitki mühendisliğinde popülerlik kazanmıştır. Ne yazık ki çevre koşullarının değişkenlik göstermesi bütün patojenlerle veya diğer stres faktörleriyle başa çıkmada büyük bir engel teşkil etmektedir. Bu yüzden pratik bir yol olarak farklı patojenlere karşı bitkileri koruyacak biyolojik kontrol ajanlar olan bakteriler seçilir ve geliştirilir. Toprak ve bitkiye yarar sağlayan ve bitki gelişimini teşvik edici ajan olarak kullanılan bakterilerle ilgili birçok çalışma yürütülmüştür (Eşitken *et al.* 2002; Dobbelaere *et al.* 2003; Altındağ *et al.* 2006; Domenech *et al.* 2006; Ji *et al.* 2006). PGPR, ekolojik ortam ve besin maddeleri için rekabet ederek ve patojenlere karşı allelokimyasal madde üreterek bitkiye sistemik dayanıklılık kazandırmasıyla bitkilerin biyolojik olarak kontrolünü sağlar (Bloemberg *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001; Compant *et al.* 2005). Patojenle enfekte olan bitkide genellikle etilen seviyesi artar. Bu sebeple bazı etilen engelleyicilerin varlığı bitkilerdeki patojen enfeksiyonunu büyük ölçüde indirgeyebilir (Bashan 1994).

ACC deaminaz aktivitesiyle bilinen PGPR, mikrobiyal patojenlere karşı antagonistik etkide bulunduğundan bu bakterilerle bitki tohum ve köklerinin muamele edilmesi yaygın bir stratejidir. Örneğin, ACC deaminaz üretme yeteneği olan biyokontrol ajanları sayesinde salatalıkta *Pythium ultimum* ve patatestede *Erwinia carotovora* patojenlerinin yıkıcı etkileri engellenmiştir (Wang *et al.* 2000).

ACC deaminaz içeren bakteriler patojenlere karşı doğrudan antagonistik etki etmenin yanında bitkiye dayanıklılık sağlayarak da patojen saldırısına karşı bitkinin korunmasını temin eder.

Bazı patojenik bakterilerin de ACC deaminaz enzimine sahip olduğu yönünde bulgular vardır (Joardar *et al.* 2005; Blaha *et al.* 2006). Fakat ACC deaminaz varlığının bu

bakterilerin patojenik etkilerine perde olduğu ya da bitki gelişimine olumlu yönde etki ettiğine dair bir sonuç bulunmamıştır.

Bitkide azalan etilen miktarıyla birlikte birçok fungal enfeksiyonun etkisinin de büyük ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Hyodo 1991; Bashan 1994). Mesela ACC deaminaz özelliği aktarılmış transgenik domates bitkileri bünyelerindeki stres etilenini azaltarak farklı patojenlere karşı koruma sağlamıştır (Lund *et al.* 1998; Robison *et al.* 2001b).

Bakteriyel ACC deaminaz enziminin kullanımı bitki hastalıklarına toleransta yol gösterici olmakla beraber mekanizmanın açıklığa kavuşması için ileri seviyede araştırmalara ihtiyaç vardır.

1.4.3.g. Ağır metal stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Bazı ağır metaller bitki büyüme ve gelişmesi için gerekli olan iz elementlerdir fakat aşırı miktarları bitkide toksik etki oluşturur ve bitki gelişmesini baskılar (Ernst 1998). Toprakta bulunan yüksek konsantrasyondaki metaller etilen üretiminde artışa sebep olur (Rodecap *et al.* 1981; Safronova *et al.* 2006), CO₂ fiksasyonunu azaltır ve şekerlerin taşınmasını sınırlar böylece kök ve gövde gelişmesini engeller (Prasad and Strazalka 2000). Bitkinin yetiştiği ortamda fazlaca ağır metal bulunduğu takdirde bitki tarafından gelişimi engelleyici nitelikteki 'stres etileni' sentezlenir ve bu da demir eksikliğine neden olur. Laboratuvar koşullarında ACC deaminaz ve siderofor üretici PGPR kullanımı ile ağır metallerin oluşturduğu zararlı etkiye karşı bitkileri koruma temin edilmiştir (Burd *et al.* 1998, 2000; Reed and Glick 2005). Bakteriyel ACC deaminaz geni aktarılmış transgenik bitkiler, gen aktarımı yapılmamış bitkilere nispeten toksik metal etkilerine karşı daha dayanıklı bulunmuştur (Grichko *et al.* 2000; Nie *et al.* 2002; Stearns *et al.* 2005). *P. putida* ile muamele gören ayçiçeğinde kadmiyum toksik etkisinin azaldığı ve kökler tarafından metal alımının %40 oranında arttığı belirlenmiştir (Wu *et al.* 2006).

Tarla koşullarının laboratuvar ortamlarına göre daha kompleks olmasına rağmen yapılan tarla çalışmalarında bitkilerin ACC deaminaz üretici PGPR ile işlem görmesi ve bitkiye ACC deaminaz aktivitesini sağlayan gen aktarımı, bakteri uygulanmamış ve genetik transformasyon yapılmamış bitkilere oranla metal kirliliğine karşı bitki gelişiminde olumlu sonuçlar sağlamıştır (Farwell *et al.* 2006).

Metal kirliliği olan topraklarda bitki gelişiminde kazanımlar elde etmekle beraber metal kirlilik seviyesinin azaltılabilmesi için, ağır metal alımı yüksek bitkilerin kök ve tohumlarına ACC deaminaz aktivitesi gösteren PGPR aşlanarak, bu bakterilerin sayılarını artırma yoluna gidilmelidir. Buna ek olarak; yüksek düzeyde metal akümüle eden bitkilere ACC deaminaz gen aktarımı yapılmalıdır. Ağır metal stresi altındaki bitkilere ACC deaminaz bulunduran bazı PGPR'nin etkisi Çizelge 1.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 1.6. Bitkilerdeki ağır metal stresinin ACC deaminaz içeren PGPR ile azaltılması (Çakmakçı 2009'dan kısaltılarak).

| Bitki türü | ACC deaminaz içeren PGPR | Kirletici | Kaynak |
|--|---|--|----------------------------------|
| <i>Brassica napus</i> <i>B.juncea</i> <i>Lycopersicum</i> <i>esculentum</i> | <i>Kluyvera ascorbata</i> | Yüksek Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , ve CrO ₄ ²⁻ toksiditesi yok ve normal bitki gelişimi | Burd <i>et al.</i> 1998, 2000 |
| <i>B. juncea</i> <i>Pisum sativum</i> | <i>Bacillus pumilus</i> <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> <i>P. brassicacearum</i> <i>P. marginalis</i> <i>P. putida</i> <i>P. oryzihabitans</i> | Bakteri Cd ²⁺ toksiditesine karşı toleranslı ve 300 µM CdCl ₂ solüsyonunda kolza kök uzamasını teşvik etmiş | Belimov <i>et al.</i> 2001 |
| <i>Phragmites australis</i> | <i>P. asplenii</i> | Yüksek Cu ²⁺ ve kreozot ortamında normal gelişim | Reed <i>et al.</i> 2005 |
| <i>P. sativum</i> | <i>P. brassicacearum</i> <i>P. marginalis</i> | Aşılama Cd ²⁺ neden olduğu köklerin besin alımının engellemesini önlemiş | Safronova <i>et al.</i> 2006 |
| <i>B. napus</i> | <i>P. fluorescens</i> | Cd ²⁺ toksik etkisine karşı koruma ve gelişme teşviki | Dell'Amico <i>et al.</i> 2008 |
| <i>B. napus</i> | <i>P. putida</i> | Aşırı su ve Ni ²⁺ , ortamında biomas artışı | Farwell <i>et al.</i> 2007 |
| <i>Helianthus annuus</i> | <i>P. putida</i> | Cd ²⁺ toksitesi azalmış kök metal alımı % 40 artırmış | Wu <i>et al.</i> 2006 |

1.4.3.h. Organik kirletici stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Topraktaki organik kirleticilerin anormal boyutta olması bitki gelişimini olumsuz olarak etkiler. Bu konuda çok az araştırma mevcut olmakla birlikte kirli ortamlarda yetiştirilen bitkilerde görülen kök sistemindeki gelişme bozukluklarının da yine etilen üretimindeki artıştan ileri geldiği düşünülmüştür (Jackson 1997; de Prado *et al.* 1999). ACC deaminaz aktivitesi gösteren PGPR ile kanola tohumlarına yapılan aşılama ile bakır ve krezot içeren topraktaki doğal bakterilere kıyasla bu bakterilerin bitki gelişimi üzerinde daha etkili oldukları görülmüştür (Reed and Glick 2005).

Yağ artıkları, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve polisiklik bifenil gibi organik çevre kirleticilerini bitkisel olarak temizleme yolları ve bununla ilgili birçok ticari ürün geliştirilmiştir. Ancak çoğu bitki ve ağaç türü bazı organik bileşikleri ayrıştırırken yüksek moleküller ve su eksikliğinden ötürü degradasyon zorlaştığından bu maddelerin bitki kökleri tarafından ayrıştırılmasını kolaylaştırıcı degradatif bakterilere son derece ihtiyaç vardır. Normal topraklarda bulunan bakteri popülasyonu kompleks organik moleküllerin parçalanmasında bir etkiye sahip olmazken, rizosferdeki ayrıştırıcı bakteriler normal popülasyonlarının 100-1000 katı daha fazla bir popülasyonla bu işi yapabilmektedir. Ancak bu bakterilerle aynı rizosferde bulunan bitkiler bu sonuçtan olumsuz etkilenebilir. Bu durum bitkiler tarafından bir stres faktörü olarak algılanır ve bitkide stres etileni sentezi artar.

Bitkisel gelişmenin engellendiği bu durumlarda, bitki tohum ve köklerinin ACC deaminaz üretici PGPR ile aşılması, bitkisel gelişmenin normal düzeyine ulaşmasını sağlar ve kirleticilerin parçalanması diğer durumlara göre daha hızlı gerçekleşir (Huang *et al.* 2004, 2005; Reed and Glick 2005; Greenberg *et al.* 2006).

1.4.3.i. Hava kirliliği stresine karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Hava kirliliğine sebep olan CO₂, CO, SO₂, NO_x, CH₄ ve O₃ gibi bileşikler tarım ve süs bitkileri için de onların metabolik aktivitelerini ve enzim sistemlerini engellemeleri

nedeniyle tehlike arz eder (McCune 1975). Hava kirliliği koşullarında bitkinin savunma mekanizması olarak etilen hormonu üretimini artırdığı araştırma sonuçlarında mevcuttur (Tuomainen *et al.* 1997; Moeder *et al.* 2002; Wang *et al.* 2002; Vahala *et al.* 2003).

Kimyasal bir kirletici olan ozon, bitki yaprak yüzeylerinde nekrotik lezyonların ortaya çıkmasına sebep olur. Bitkide ozonun zararlı etkilerini önlemek amacıyla ACC oksidaz ve ACC sentaz enzimlerine bağlı olarak değişen etilen miktarının dengelenmesiyle ilgili çalışmalar yürütülmüştür.

ACC sentaz geni antisens aktarımı yapılmış tütün ve patates bitkilerinde ozonun sebep olduğu aşırı etilen miktarı sırasıyla %82 ve %66 oranında düşürülmüştür (Nakajima *et al.* 2002; Sinn *et al.* 2004). Araştırmalarda etilenin inhibe edilmesi ile O₃ tarafından meydana gelen yaprak bozukluklarında azalma gözlenmiştir (Moeder *et al.* 2002). Ancak kirlilik stresine karşı ACC deaminaz enziminin kullanımıyla ilgili çok sayıda çalışmaya gereksinim vardır.

1.4.3.i. Ornamental (Süs) bitkilerde çiçeklerin solmasına karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Tarla, bahçe ve gıda endüstrisini yakından ilgilendiren çiçeklerin yaşlanması, meyve olgunlaşması ve bozulması gibi konularda etilenin önemli bir rolü vardır. Koruyucu enzim etkilerinin ortadan kalkması, oksijen türlerinin aktivasyonu ve membran geçirgenliğinin artmasıyla hücrelerin ölmesi sonucu çiçeklerde solma olayı görülür (Rubinstein 2000). Süs bitkileri ve ağaç türlerinde etilen üretimine bağlı olarak çiçeklerin solması ve raf ömrünün hızla kısılması çiçekçilikte önemli bir problemdir. Çiçekli türlerde yaşlanma ve çiçeklerin solmasında etilen ve onun öncüsü ACC'nin etkisi göz ardı edilemez (Woltering and van Doorn 1988; Reid and Wu 1992). ACC deaminaz içeren PGPR süspansiyonlarıyla bitkinin muamele edilmesi sonucu çeşitli çiçeklerde raf ömrünün uzatılabileceği (Nayani *et al.* 1998) ve bu yöntemin ticari olarak süs bitkisi yetiştiriciliğinde kullanışlı bir biyoteknolojik çalışma olabileceği düşünülmektedir (Çakmakçı 2009).

1.4.3.j. Rizobiyal enfeksiyona karşı ACC deaminaz enziminin etkisi

Nodülasyon sürecinde *Rhizobium* bakterilerinin kökleri enfekte etmesi bitkide biyotik strese neden olur ve köklerde üretilen ACC dolayısıyla da etilen seviyesi artış gösterir. Bu durumda etilen ve onun öncüsü olan ACC, baklagil bitkilerinde nodülasyonu olumsuz yönde etkiler (Lee and La Rue 1992; Nukui 2000; Oldroyd *et al.* 2001). Yani sonuçta rizobiyal enfeksiyon adeta kendi kendini engelleyici bir süreç olarak işler (Guinel and Geil 2002; Ma *et al.* 2003 a).

Yapılan son çalışmalar ışığında bitkilere ACC deaminaz aktivitesi gösteren PGPR'nin uygulanmasıyla etilen biyosentezinin engellenmesi sonucu baklagillerde nodülasyonun kolaylaşması sağlanarak simbiyotik ilişki ve azot fiksasyonunda artış elde edilmiştir (Okazaki *et al.* 2004).

Örneğin; Dey *et al.* (2004) tarafından yerfıstığına ACC deaminaz enzimine sahip *Pseudomonas fluorescens* inokülasyonu yapılarak bitki ağırlığı ve nodül sayısında artış sağlanmıştır. ACC deaminaz üretici PGPR'nin soyada erken gelişme ve nodülasyonu artırdığı görülmüştür (Cattelana *et al.* 1999).

Bir başka çalışmada bezelyenin ACC deaminaz aktivitesi gösteren *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K bakterisi ile muamele görmesi sonucu erken nodülasyon döneminde köklerdeki etilen etkisinin azalmasına bağlı olarak nodül oluşumunda artış belirlenmiştir (Ma *et al.* 2003).

Şunu da vurgulamak gerekir ki; PGPR'nin *Rhizobium* bakterileriyle birlikte aşılması, baklagillerin nodülasyon veriminde çok daha olumlu sonuçların ortaya çıkmasını sağlamıştır (Remans *et al.* 2007).

Mesela; *Pseudomonas* bakterisinin *Bradyrhizobium* ile birlikte aşılması sonucu ACC deaminaz aktivitesi sayesinde bitkisel ACC'nin, etilen yerine amonyum ve α -ketobütrata parçalandığı ve birlikte aşılamanın tek başına *Rhizobium* aşılmasına

nispeten nodülasyonda daha olumlu etki sağladığı tespit edilmiştir (Shaharoon et al. 2006 b).

Fosfor eksikliği PGPR'nin nodülasyon ve bitki gelişimindeki performansını etkileyen bir faktördür. Fosforun yetersiz olduğu durumlarda bakterilerdeki hormon dengesi değişir. Bunun için ACC deaminaz aktivitesi olan bakteriler *Rhizobium* bakterileriyle birlikte uygulandığı zaman baklagillerde nodül oluşumu ve bitki gelişiminin artacağı ön görülmüştür. Özellikle fosfor içeriğinin az olduğu topraklarda etkili PGPR-*Rhizobium* kombinasyonu uygulamak olumlu sonuçlar doğuracaktır (Çakmakçı 2009).

Birçok *Rhizobium* türünün ACC sentaz enziminin inhibitörü olan rizobitoksin veya etilen seviyesini düşürücü ACC deaminaz ürettiği ve bu sayede nodülasyonu %25-40 civarında artırdığı gözlenmiştir (Nukui et al. 2000; Ma et al. 2003 b, 2004).

Fakat ACC deaminaz aktivitesi bulunan ticari birçok *Rhizobium* türü olmasına rağmen tarla koşullarında bu bakterilerin çok az bir kısmının etkin olduğu görülmüştür. Bu yüzden doğal koşullarda da doğrudan ACC deaminaz aktivitesi gösteren *Rhizobium* türlerinin seçimi ticari inokulant geliştirme açısından önemlidir.

ACC deaminaz enzim aktivitesi aktarılan *Rhizobium* türleri serbest yaşayan PGPR'ye nispeten daha az enzim aktivitesi sergiler. Bu durum sonucunda iki çeşit ACC deaminaz üretici bakteri olduğu düşünülebilir. Bunlardan biri; toprakta serbest yaşayan, bitki dokularına yerleşmeyen ve yüksek düzeyde ACC deaminaz aktivitesi ile bitkideki etilen seviyesini azaltarak farklı stres koşullarının olumsuz etkilerine karşı bitkiyi koruyan ve bitkiye dayanıklılık sağlayan bakteri grubudur. Diğeri ise; bitki ile simbiyotik bir ilişki içinde olan, sadece belli bitki köklerine ait, ACC deaminaz enzim aktivitesi düşük olmakla beraber yalnızca bitkinin belli bir bölgesinde etilen düzeyini azaltarak nodülasyonu teşvik eden *Rhizobium* bakterileridir (Çakmakçı 2009).

1.5. Araştırmanın Amacı

Bu araştırmanın amacı, soğuk ve yüksek rakımlı bölgelerden toplanan bitki rizosfer topraklarından ACC deaminaz aktivitesine sahip bakterileri izole etmek ve karakterizasyonlarını yapmaktır. Bu türlerin, soğuk iklim Şartlarına sahip ve rakımı yüksek olan Erzurum ili ve çevresindeki tarımsal faaliyetlerde PGPR olarak kullanılmaları hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda PGPR içerisinde ACC deaminaz aktivitesine sahip mikroorganizmaların izolasyonu ve kullanımı üzerindeki araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Bu araştırmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Zafar-ul-Hye *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada; ACC deaminaz içeren 27 rizobakteri izolatu mercimek rizosferinden dilüsyon yayma tekniği kullanılarak elde edilmiştir. Steril koşullar altındaki tüm rizobakteriyel izolatların mercimek fidelerinin gelişimini etkileme potansiyeli olduğu görölmüştür. Seçilen izolatlarla inoküasyon sonucunda mercimek fidelerinin kök uzunluğu, filiz uzunluğu, yaş kök ağırlığı, yaş filiz ağırlığı, kuru kök ağırlığı, kuru filiz ağırlığında sırasıyla; 2,4, 2,3, 2,6, 2,7, 2,6, 2,2 kat kadar artış gözlemlenmiştir.

Khosravi *et al.* (2008) tarafından yapılan bir çalışmada; *Sinorhizobium meliloti* türünün ACC deaminaz içeren KYA40 ve KYA71 suşları ile negatif kontrol olarak ACC deaminaz taşımayan KYA95 suşunun 7 ve 10 dS.m⁻¹ tuzluluktaki buğday gelişimi ve hazır besinlerin alımına etkileri araştırılmıştır. KYA40 ile inoküasyonun buğdayda sürgün uzunluğunu, sürgün ağırlığını, kök uzunluğunu ve Fe, Mn ve Cu elementlerinin alımını belirgin bir şekilde artırdığı sonucuna varılmıştır. Bu suşun; 10 dS.m⁻¹'de inoküle edilmeyenlere göre kuru sürgün ağırlığını %9; Fe, Cu ve Mn alımını ise %37 ile 47,45 oranında artırdığı hesaplanmıştır.

Jalili *et al.* (2009) tarafından ACC deaminaz enzimine sahip *P. fluorescens* türlerini izole ve karakterize etmek, onların gelişimini artırıcı faktörleri ve kanola tohumlarının çimlenmesi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla bir çalışma yürütölmüştür. İzolatların %14'ünde tuzluluk stresi altında ACC deaminaz aktivitesi yani ACC'yi azot kaynağı olarak kullanma yeteneği belirlenmiştir. Tuz stresi altında ACC deaminaz içeren *P. fluorescens* ve *P. putida* türleriyle inoküle edilen tohumların çimlenme oranı bariz bir şekilde daha yüksek çıkmıştır. Sonuç olarak kanola tohumlarının bu türlerle

inokülasyonunun kanolada tohum çimlenmesi ve gelişimi üzerindeki tuzluluk stresinin olumsuz etkilerini hafifletebileceği ön görülmüştür.

Penrose and Glick (2003); genellikle ACC deaminaz içeren bakterilerce zengin olan bitki köklerine yakın topraklardan numuneler almış, çeşitli işlemlerle elde ettiği bakteri izolatlarının ACC deaminaz aktivitelerini tayin etmiş ve onların kanola fidelerinin kök uzunluğuna etkisini araştırmıştır. Bu bakterilerle muamele gören kanola fidelerinin kök uzunluklarının işlem görmeyenlere göre %40-60, bazen de %90-120 oranında daha fazla olduğu sonucuna varmıştır.

Saravanakumar and Samiyappan (2006); *Pseudomonas* türlerinin tuz stresi altındaki yerfıstığı bitkisinin gelişimini artırmadaki kabiliyetini test etmeye yönelik ACC deaminaz aktivitelerini belirleme ve ACC deaminaz enziminin *in vitro* ve tarla koşullarında stres altındaki yerfıstığına etkisi üzerine çalışma yapmıştır. *In vitro* koşullarda yapılan çalışmada tuz stresine maruz kalan yerfıstığı bitkileri üzerindeki etkinliklerini değerlendirmek amacıyla dört PGPR ırkı kullanılmıştır. PCR analizleri bu dört suşun floresan *Pseudomonas* grubuna ait olduğunu göstermiştir. Bunların içinde *P. fluorescens* TDK1 suşunun yerfıstığı fidelerinin büyüme parametrelerinde artış noktasında yüksek performans gösterdiği saptanmıştır. Biyokimyasal ve moleküler (PCR) analizlere göre dört suş arasında *P. fluorescens* TDK1 suşu daha yüksek ACC deaminaz aktivitesi ve PCR analizine pozitif reaksiyon göstermiştir *P. fluorescens* TDK1 ırkından izole edilen ACC deaminaz geni tuzdan etkilenen yerfıstığı bitkilerine klonlanarak test edilmiştir. Sonuç olarak bu ırkın yüksek ACC deaminaz enzim aktivitesi sayesinde tuzluluğa rağmen yerfıstığı ürün veriminde yüksek performans izlenmiştir.

Meyer *et al.* (2004) tarafından Alpin bölgelerdeki *Pseudomonas* komünitesini karakterize etmek ve bu komünitedeki değişken koşulların etkisini araştırmak için, çeşitli karbon kaynaklarında yetişen *Pseudomonas* izolatlarının soğuğa karşı toleransı ölçülmüş ve 16S ribozomal DNA dizi analizi sonuçlarına dayanarak aralarındaki filogenetik ilişki incelenmiştir. Alınan toprak örneklerinde yaygın olarak *Pseudomonas*

cinsinin varlığı ve izolatların geniş metabolik çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca metabolik özelliklerle 16S filogenisindeki uyumsuzluktan dolayı bu mikroorganizmaların metabolik çeşitliliği filogeni tarafından belirlenememiştir.

Mishra *et al.* (2009); 4°C’de gelişen ve bitki büyümesini artırıcı nitelikteki bakteri izolatını kuzeybatı Hindistan Himalaya Dağları’nda yetişen *Amaranth* bitkisinin rizosfer toprağından izole edilmiştir. Gram negatif özellikteki izolatın optimum 28°C olmakla beraber 4-30°C’de yetişebildiği, optimum pH’ sının 8.0 ve pH tolerans aralığının 5-10, tuz konsantrasyonuna toleransının %6 (w/v)’ya kadar olduğu sonuçlarına varılmıştır. Rifampisin, gentamisin, streptomisine duyarlı olmasına rağmen; ampisilin, penisilin, polimiksin, B sülfat ve kloramfenikole direnç gösterdiği tespit edilmiştir. 16S rRNA dizi analizine göre bu bakterinin *Pseudomonas lurida* olduğu saptanmıştır. Bu bakterinin İAA ürettiği ve 4, 15 ve 28°C’de fosfatı çözebildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca 15°C’de siderofor sentezlediği bulgusuna varılmıştır. Tohumlarının bu bakteriyle inokülasyonu sonucunda 30 günlük buğday fidelerinde inokülasyon yapılmayanlara göre çimlenmenin, sürgün ve kök uzunluklarının sırasıyla %19,2, 30,0 ve 22,9 oranlarında arttığı saptanmıştır.

ACC deaminaz aktivitesi, bitkideki etilen seviyesini düşürerek bitki gelişimini artıran bakteriler için önemli bir belirleyicidir. Li *et al.* (2011) tarafından ACC deaminaz içeren bakterilerin hızlı bir şekilde taranabilmesi için ACC’nin kolorimetrik ninhidrin analizine dayanan bir metot geliştirmiştir. Bu metotla 311 bakteri izolatından tek azot kaynağı olarak ACC’nin kullanıldığı minimal besiyerinde gelişebilen 44 bakteri izolatı hızlı bir şekilde seçilmiştir. ACC’yi kullanabilen bu 44 bakteri izolatının *Burkholderia*, *Pseudomonas* ve *Herbaspirillum* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir.

Selvakumar *et al.* (2008); Hindistan’ın kuzeybatı Himalaya bölgesindeki subalpin topraklarından izole edilen soğuğa dayanıklı *Pantoea dispersa* ırkının izolasyonu, karakterizasyonu, filogenetik analizi ve bitki gelişimini artırma potansiyeli ile ilgili bir araştırma yapmıştır. Sarı pigmentli, çubuk şeklinde ve gram negatif özelliğinde olan *Pantoea dispersa* 1A suşu nutrient agar besiyerinde izole edilerek 4°C’de inkübasyona

bırakılmıştır. Bu bakteri suşu, 16 S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre tanımlanmıştır. Maksimum gelişmesi 30°C’de olmakla beraber, 4 ila 42°C’de yetişebildiği görülmüştür. 4°-15°C’de farklı miktarlarda fosfat çözme ve İAA, siderofor ve HCN üretme yeteneği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bakteri izolatının sera koşullarında buğdayın besin alımı parametrelerine ve gelişiminin artmasına olumlu yönde etkide bulunduğu ortaya konulmuştur. Dolayısıyla soğuk ortamlarda yetişen buğdayın *Pantoea dispersa* 1A (MTCC 8706) suşu ile aşılama yoluyla büyüme ve gelişme seviyesinde istenen değerlerin elde edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Bitkilerdeki ürün verimini artırmak için bitki gelişimini teşvik edici özelliklere sahip olan kök bakterilerinin seçilmesi gerekli ve önemli bir stratejidir. Stres koşulları altındaki rizosferde fazla miktarda etilen üretimine bağlı olarak nohut bitkisindeki nodülasyon inhibe edilir. ACC deaminaz özelliğine sahip kök bakterileri bu zararlı etkinin üstesinden gelerek bitki büyümesini kolaylaştırabilir. Bu verilere dayanarak Shahzad *et al.* (2010) tarafından kontrollü koşullar altında nohut fidelerinin gelişimini artırmak için ACC deaminaz enzimini taşıyan rizobakteriler, Punjab’ın farklı bölgelerinde yetişen nohut bitkilerinin rizosferinden izole edilerek taranmıştır. Çok az bir kısmı hariç tüm rizobakteri izolatlarının aksenik koşullar altında nohut fidelerinin gelişiminde olumlu bir şekilde değişikliğe sebep olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarında; seçilen izolatlarla aşılama yoluyla nohut fidelerinin kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, kuru kök ağırlığı, kuru sürgün ağırlığı, yan kök sayısı, lateral kök uzunluğu ve lateral kök kuru ağırlığında inokülasyon yapılmayan kontrol grubuna göre sırasıyla %107,5, 57,4, 86,7, 83,5, 266,7, 286,6 ve 121’e kadar artış olduğu gözlenmiştir. Bu veriler ışığında; doğal koşullardaki etkisi test edilmeden önce kontrollü koşullar altında nohut fidelerinin büyümesini teşvik etmede etkili kök bakterilerinin taranması için ACC deaminaz enzim aktivitesinin varlığının belirlenmesinin kullanışlı bir yol olabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Sadrnia *et al.* (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada; rizosferde bulunan, plazmid taşıyan gen kodlaması ACC deaminaz içeren *Pseudomonas mendocina* bakterisinin, domates bitkisinin tuzluluğa karşı direnci üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma

saksı ve sera koşullarında gerçekleştirilmiştir. Saksı denemelerinde ACC deaminaz geni aktarılmış *P. mendocina* ile muamele edilen domates bitkileriyle plazmid geni taşımayan *P. mendocina* ile muamele gören domates bitkileri ve kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Tuzluluk; sulama suyuna 172 ve 207 mM NaCl eklenerek sağlanmıştır. Sera deneyleri ise benzer bakteri gruplarıyla 207 mM NaCl ile yapılmıştır. Saksı denemelerinden elde edilen sonuçlarda 172 mM NaCl' de klonlanmış *P. mendocina* ile muamele edilen bitkilerde, plazmidsiz *P. mendocina* ve kontrol grubuyla muamele edilenlere göre sürgün gelişiminde %11-%18,4, köklerde %3,7- %16,6 ve beş hafta sonra ıslak ağırlıkta %9,6- %27,5 oranında artış gözlenmiştir. 207 mM NaCl'deki sonuçlarda ise sürgün için %9,7-%14,9, kökler için %15,7- %94,3 ve ıslak ağırlık için %50,6- %96,4 artış hesaplanmıştır. 207 mM NaCl'deki sera denemesi sonuçlarında; sürgünde 7 kat, köklerde 14 kat, ıslak ağırlıkta 154 kat artış belirlenmiştir.

ACC deaminaz üreten rekombinant *P. mendocina* ile yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan domates bitkisinin uygulanması durumunda bu bakterinin bitkideki etilen içeriğini azaltarak tuzluluk stresine karşı bitkinin direncini artırabileceği sonucuna varılmıştır.

Etilen, çeşitli stresler tarafından indüklendiği için stres hormonu olarak bilinmektedir. Yüksek bitkilerde ACC etilenin öncü maddesidir ve bazı kök bakterileri sahip oldukları ACC deaminaz enzimleri vasıtasıyla bu maddeyi amonyak ve α -ketobutirata dönüştürebilmektedir. Shaharoon et al. (2006) tarafından ACC deaminaz enzimi bulduran rizobakterilerin karanlıkta çimlenen bezelye fidelerinde ACC tarafından indüklenen klasik üçlü tepkiye etkisi üzerine bir araştırma düzenlenmiştir.

Etiyole bezelye fideleri farklı ACC konsantrasyonları (0,2 - 10 mmol L⁻¹) ile muamele edilmiş ve 7 gün karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Başka bir çalışmada ise farklı ACC deaminaz aktivitesi olan 5 rizobakteri irki ile bezelye fideleri inoküle edilmiştir. İnoküle edilen bu bezelye fideleri 10 mmol L⁻¹ ACC ile muamele edilmiş ve 25±3°C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlarda ACC' nin hücre dışı uygulamasının etiyole bezelye fidelerindeki "klasik üçlü tepki" konsantrasyonu üzerinde etkisi olduğu

bulunmuştur. Rizobakterilerle inokülasyonun, etiyole bezelye fidelerindeki ACC'ye dayalı klasik üçlü tepkiyi azalttığı, fide ve kök uzunluğunda inokülasyon yapılmayanlara göre belirgin bir artışa sebep olduğu ortaya çıkmıştır. İnokülasyona bağlı olarak, inokülasyon yapılmayan fidelere göre kök çapında önemli bir miktarda azalma (%31'e kadar) görülmüştür. ACC deaminaz aktivitesi ile fide uzunluğu arasında anlamlı ($P < 0.05$) pozitif bir korelasyon ($R^2 = 0.91$) belirlenmiştir. Bu veriler ışığında; rizobakterilerin ACC deaminaz aktivitesinin etiyole bezelye fidelerindeki klasik üçlü tepkide azalmayı sağladığı sonucuna varılmıştır. Çalışma sonuçları ACC deaminaz içeren rizobakterilerle inokülasyonun bitkilerde biyotik ve abiyotik streslere bağlı olarak üretilen ACC miktarını azaltabileceğini ortaya koymuştur.

Nadeem *et al.* (2006) tarafından yürütülen bir araştırmada tuzluluk stresi altındaki mısır bitkisinin gelişimini artırmak için ACC deaminaz aktivitesine sahip mikrobiyal ırkların potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 20 rizobakteri ırkı tuz stresinden etkilenmiş bölgelerin toprak örneklerinden izole edilmiş ve 6 dS m^{-1} 'de akselik koşullar altında ACC deaminaz aktivitesi ve bitki gelişimini artırma bakımından taranmıştır. 3 ırkın (S5, S15 ve S20) önemli düzeyde gelişimi artırdığı görülmüş ve $0, 5, 10 \text{ dS m}^{-1}$ 'de saksı denemeleri için kullanılmıştır. Saksı denemelerinde tuzluluk seviyesinin artmasının mısır fidelerinde gelişimin azalmasına yol açtığı bununla birlikte mısır tohumlarının bu 3 bakteri ırkıyla inokülasyonunun tüm tuzluluk seviyelerinde iyi bir performans sağladığı gözlenmiştir. Özellikle S20 suşu ile 5 dS.m^{-1} 'de inokülasyon neticesinde, inokülasyon yapılmayan kontrol grubuna göre kök/sürgün uzunluğunda, kök kuru / yaş ağırlığında ve sürgün yaş/ kuru ağırlığında sırasıyla %56/62, %51/71, %52/61 oranlarında artış hesaplanmıştır. 10 dS.m^{-1} 'deki artış ise sırasıyla; %120/63, %52/71, %59/118 olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde S20 suşuyla taze yapraklardaki klorofil a, b ve karotenoid içeriğindeki artış kontrol grubuna kıyasla 5 dS.m^{-1} 'de %86'ya 10 dS m^{-1} 'de ise %84'e kadar ulaşmıştır. Araştırma sonucunda rizobakteriyel ırkların hücre içi ACC'nin deaminasyonunu sağladığı ve ACC deaminaz içeren bu bakterilerle inokülasyonun stresin indüklediği etilenin negatif etkilerini önleyebileceği görüşüne varılmıştır.

Kausar *et al.* (2006) tarafından tuz stresi altındaki mısırın gelişimini artırmada ACC deaminaz enzimi taşıyan rizobakterilerin etkisini incelemek için kontrollü koşullarda bir çalışma düzenlenmiştir. Tek azot kaynağı olarak ACC' nin kullanıldığı minimal salt medium' da bakteriler geliştirilmiştir. Sterilize edilen mısır tohumları petri plaklarda çimlenmeye bırakılmıştır. Düzgün bir şekilde çimlenen tohumlar seçilerek belirlenen suşlar ile inoküle edildikten sonra iki filtre kağıdı arasına yerleştirilmiştir. Tohumları içeren filtre kağıtları kavanozlara yerleştirilerek gelişme odasında $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Mısır için farklı tuz seviyeleri NaCl kullanılarak oluşturulmuştur. Gelişen fidelere besin sağlamak için Hoagland çözeltilisi kullanılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla; EC 9 dS.m^{-1} 'de *P. fluorescens* A (N₃) suşu ile inokülasyon sonucu kök uzunluğunda 3,3 kat, 12 dS.m^{-1} 'de *P. putida* A (Q7) suşu ile aşılama yoluyla sürgün uzunluğunda 2,3 kat, 6 dS.m^{-1} 'de N₃ ile inokülasyonla ise yaş ağırlıkta 1,13 kat artış hesaplanmıştır.

PGPR; tarımda kullanılan kimyasal gübreler ve böcek ilacı uygulamalarına ekonomik ve çevre dostu bir alternatif olmuştur. Fürnkranz *et al.* (2009) tarafından bitkilerle birlikte yaşayan ve Bolivya tarımı için PGPB olarak hizmet edebilecek yeni bakteri türlerini izole ve karakterize etmek amacıyla bir çalışma yürütülmüştür. Bolivya tarımında bitki gelişimini artırıcı olarak kullanılacak yeni bakteriler elde etmek için sonjna (*Moringa oleifera*), sorgum (*Sorghum vulgare*), ayçiçeği (*Helianthus annuus*) ve aspir (*Carthamus tinctorius*) bitkileriyle ilişki içinde olan bakteriler doğrudan veya dolaylı PGPB özelliklerini belirlemek için *in vitro* koşullarda taranmıştır. Daha sonra gelecek vaat eden suşlar çalışmalar için seçilmiştir. Yapılan *in vitro* deneylerde, 59 test izolatından %19'u diazotrof, %41' i fosfor çözebilme, %10'u ACC miktarını azaltma ve %17'si fitohormon (IAA) sentezleme özelliği sergilemiştir. *In vitro* taramalara dayanarak *Pectobacterium cypripedii* M56, *Pantoea agglomerans* M72 ve *P. agglomerans* M81 rizosfer bakteri suşları çalışmalar için seçilmiştir. Çalışma sonucunda bitki gelişimini artırıcı özelliklerine dayanılarak bitkiyle ilişkili bakterilerin seçiminin tarımsal amaçlar için yeni mikrobiyal inokülantların geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Karagöz (2012) tarafından; ACC deaminaz bulunduran, azot fikseri ve fosfat çözücü bitki gelişimini teşvik edici bakterilerin şeker pancarı verim ve kalitesiyle, pentoz fosfat yolu ve antioksidan enzimleri üzerine aşırı su ve su eksikliği koşullarında etkisinin test edilmesi amacıyla bir araştırma yürütülmüştür. Sonuç olarak; erken gelişme dönemlerinde geçici bir su stresi ortaya çıktığında şekerpancarı depo-kök ve şeker veriminde önemli bir oranda azalma gözlenmiştir. Su eksikliğinde klorofil içeriği ve fotosentez oranının azaldığı aynı zamanda aşırı suyun da şeker pancarı üzerine zararlı etkilerinin bulunduğu ortaya konulmuştur. Sulama düzeylerine bağlı olarak değişmekle beraber genel olarak optimum, aşırı su ve kısıtlı su koşullarında özellikle azot fikseri, fosfat çözücü ve ACC deaminaz aktivitesine sahip *P. putida* B3/10, *B. subtilis* BS 6/3, *B. subtilis* R3/3, *P. fluorescens* T26, *V. paradoxus* R2/1 ve *B. megaterium* A21/3 izolatlarıyla aşılamaya bağlı olarak şeker pancarında enzim aktivitesi, yan kök, depo kök ve yaprak veriminde gelişme gözlenmiştir.

ACC deaminaz içeren bakteri ile aşılama neticesinde su stresinin şeker pancarının gelişme, verim ve kalitesi üzerindeki olumsuz etkilerinin kısmen ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Ayrıca PGPR aşılması ile şeker pancarı yapraklarının makro ve mikro element içeriğinde artış ve enzim aktivitesinde değişme fark edilmiştir. Araştırma sonuçları; test edilen etkin bakterilerin bitki gelişimi için kimyasal gübre ihtiyacını ve su stresinin olumsuz etkisini azaltabildiğini ve sürdürülebilir organik şeker pancarı üretiminde biyolojik gübre olarak kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Karagöz 2012).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Saf su üretme cihazı: Nüve NS 112

Buzdolabı: Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF

Çalkalamalı inkübatör: Zhicheng, CHINA, ZHWY-200B

Vorteks karıştırıcı : IKA, U. S. A., MS2

Hassas terazi: Denver, GERMANY, TP- 214

Otoklav: Hirayama, JAPAN, HVE 50

İnkübatör: Memmert, GERMANY, INBE 410 1583

Manyetik karıştırıcı: Nüve, TÜRKİYE, MK-418

Spektrofotometre: Shimadzu, JAPAN, RC 232C

pH metre: Hanna, PORTUGAL, HI 9321

Işık mikroskobu: Boeco BM-180, Germany

Etüv: Philip-Harris, England

3.1.2. Kimyasal maddeler

Bakterilerin izolasyonu, saflaştırılması ve inokülasyonu gibi işlemlerde kullanılan nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), tryptic soy agar (TSA), tryptic soy broth (TSB) gibi genel besiyerleri; OXOID, FLUKA, MERCK ve SIGMA firmalarından temin edilmiştir.

ACC (1-aminosiklopropan-1 karboksilat) A3903; SIGMA firmasından alınmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

1. Kristal violet çözeltisi: 20 ml %95'lik etanolde 2 g kristal viyolel çözülmüştür. 80 ml distile edilmiş suda 0,8 g amonyum oksalat çözülmüş ve bu iki çözelti karıştırılarak kullanılmıştır.

2. Safranin çözeltisi: 0,25 g safranin 10 ml etanolde çözülmüş ve üzerine 100 ml distile edilmiş su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Filtre kâğıdından süzülerek kullanılmıştır.

3. Gram iyodu: 1 g iyot ve 2 g KI havanda iyice karıştırılarak toz hale getirilmiş ve üzerine yavaş yavaş 300 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır.

4. Malaşit yeşili: 5 g malaşit yeşili 100 ml distile suda çözümlenerek hazırlanmıştır.

5. %5'lik safranin: 0,5 g safranin 200 ml distile suda çözümlenerek hazırlanmıştır.

6. 0,5 M ACC çözeltisi: 10 ml steril saf suda 0,5055 g ACC çözümlenerek elde edilmiştir. Bu sıvı filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

7. %1 seyreltilmiş 0,5 M ACC çözeltisi: 0,1 ml 0,5 M ACC, 9,9 ml steril saf suya eklenerek hazırlanmıştır.

8. 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6): 1,21 g trizma base 80 ml steril saf suda çözülmüş, 0,1 M HCl ile pH 7,6'ya ayarlanmıştır. Çözeltinin üzeri 100 ml'ye tamamlanmıştır.

9. 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5): 1,21 g trizma base 80 ml steril saf suda çözülmüş, 0,1 M HCl ile pH 8,5'e ayarlanmıştır. Çözeltinin üzeri 100 ml'ye tamamlanmıştır.

10. 0,56 M HCl: 1,7 ml %37'lik HCl steril saf suya katılmış ve üzeri 100 ml'ye tamamlanmıştır.

11. Dinitrofenil hidrazin ayıracı (2 M HCl' de %0,2): 6,13 ml HCl steril saf suya eklenmiş ve üzeri 100 ml' ye tamamlanmıştır. 0,2 g dinitrofenil boyası katılıp yarım saat karıştırılarak çözülmüştür. Daha sonra süzme işlemi yapılarak çözelti hazırlanmıştır.

12. 2 N NaOH: 8 g NaOH 100 ml sterilize edilmiş saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı

1.PAF medium:

20 g bactopecton, 1,5 g MgSO₄, 1,5 g K₂HPO₄, 10 ml gliserol; 1 l saf suda sırayla çözülerek hazırlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edilmiştir.

2. DF (Dworkin and Foster 1958) minimal salt medium:

a) Eser elementler: 10 mg H₃BO₃, 11,19 mg MnSO₄. H₂O, 124,6 mg ZnSO₄. 7H₂O, 78,22 mg CuSO₄. 5H₂O, 10 mg MoO₃; 100 ml saf suda sırasıyla çözülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edilmiştir.

b) Demir çözeltisi: 100 mg FeSO₄. 7H₂O; 10 ml saf suda sırayla çözülerek hazırlanıp otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edilmiştir.

c) Diğerleri: 4 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄. 7H₂O, 2 g glikoz, 2 g glikonik asit, 2 g sitrik asit, 2 g (NH₄)₂SO₄ (azot kaynağı olarak ACC' nin katılmadığı durumlarda); 1 l saf suda sırayla çözülerek hazırlanmıştır. Ardından otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edilmiştir.

FeSO₄. 7H₂O çözeltisinin ve eser elementlerle hazırlanan çözeltinin her birinden 0,1 ml alınarak diğer elementlerle hazırlanan 1 l' lik çözeltiliye aktarılmıştır.

3.1.5. Kullanılan bitki materyali

Çalışmada; Erzurum ilindeki Palandöken, Kargapazarı ve Hasanbaba Dağlarının bulunduğu bölgelerden rizosfer toprağıyla birlikte toplanan bitkiler kullanılmıştır. Bitkiler, vakit geçirilmeden laboratuvar ortamına getirilmiş ve izolasyon işlemlerine geçilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi çalışmaları

Çalışmada kullanılmak üzere 2011 ve 2012 yıllarının Ekim-Kasım aylarında arazi çalışması düzenlenen Erzurum ilinin Palandöken, Kargapazarı ve Hasanbaba Dağları civarından bitki örnekleri rizosfer toprağıyla birlikte toplanmış ve steril polietilen torbalara konularak laboratuvar ortamına getirilmiş ve aynı gün izolasyon çalışmaları için kullanılmıştır. Çizelge 4.1.'de örneklerin toplandığı yerlerin yükselti ve konumları verilmiştir.

3.2.2. Bitki örneklerinin teşhisi

Toplanan bitki örneklerinin teşhisi; herbaryum koleksiyonu ve teşhis anahtarı yardımıyla bitkilerin morfolojik özellikleri belirlenerek Yrd. Doç. Dr. Meryem Şengül Köseoğlu tarafından yapılmıştır.

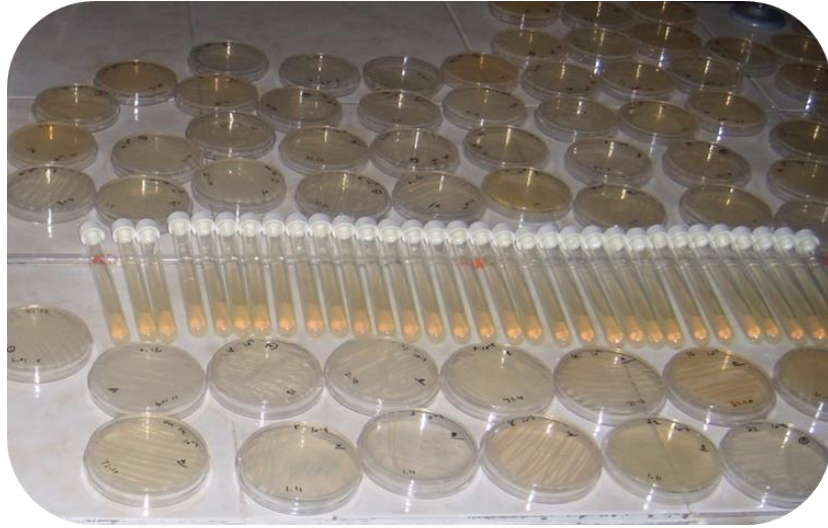
3.2.3. Bakterilerin izolasyonu ve saflaştırılması

İlk olarak Erzurum'da bulunan Palandöken, Kargapazarı ve Hasanbaba Dağları civarından toplanan 20 çeşit bitki, rizosfer toprağıyla birlikte dikkatlice steril polietilen torbalara yerleştirilip numaralandırılmış ve bitki toplanan bölgelerin konum ve yükseklikleri GPS (Magellan 600) cihazıyla belirlenmiştir.

Toplanan her bir bitkinin rizosfer toprağından 1'er g alınarak içerisinde steril olarak 50 ml PAF sıvı besiyeri bulunan 250 ml'lik erlenmayerlere aktarılmıştır. 15°C'de 24 sa. inkübasyonun ardından her bir kültürden 1 ml alınıp, otoklavlanarak yeniden hazırlanan ve içerisinde 50 ml PAF sıvı besiyeri bulunan 250 ml'lik erlenmayerlere transfer edilmiştir. Tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra içerisinde 50 ml DF sıvı besiyeri bulunan ve amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) içeren 250 ml'lik erlenmayerlere bir önceki kültürden 1 ml'lik ekim yapılarak 24 sa. inkübe edilmiştir. Ertesi gün; yeni hazırlanmış olan ve içerisinde steril 50 ml DF sıvı besiyeri bulunan (300 µl ACC katılmış) 250 ml'lik erlenmayerlere yine bir önceki kültürden 1 ml'lik aktarım yapılarak mikroorganizmalar 7 gün boyunca 15°C'de çalkalayıcı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 10⁻¹-10⁻⁴'lük seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. 10⁻⁴' lük dilüsyonlar azotsuz DF katı besiyeriyle hazırlanan (her birine 120 µl 0,5 M %1 seyreltilmiş ACC katılan) petrilere yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Bu işlem her bir toprak örneğinin 10⁻⁴'lük dilüsyonunun 5°C, 15°C ve 20°C' de inoküle edilmek üzere hazırlanan ACC'li DF katı besiyeri bulunan petrilere ekimiyle gerçekleştirilmiştir. 2-6 günlük inkübasyon sonunda 3 farklı sıcaklıkta (5°C, 15°C ve 20°C) gelişen mikroorganizma kolonilerinden farklı olanlar arka arkaya yapılan pasajlar sonucunda izole edilerek saf kültürler elde edilmiş ve yatık agarlarda stokları oluşturulmuştur. Mikroorganizmaların üretimi ve saflaştırılması ile ilgili işlemler Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.1. İlk inkübasyondan sonra PAF sıvı besiyerinde mikroorganizmaların üreme durumları



Şekil 3.2. ACC'li ortamda ve 5°C, 15°C ve 20°C'de üreyen mikroorganizmaların saf kültürlerinin elde edilmesi



Şekil 3.3. Mikroorganizmaların yatık agarlarda stoklarının oluşturulması

3.2.4. İzolatların kültürel, biyokimyasal ve sitolojik karakterizasyonu

Koloni morfolojisi: Saflaştırılan bakteri kültürlerinin her birinden alınan örnekler, çizgi ekim yöntemiyle tek koloni düşecek şekilde NA besiyerine aktarılmış ve 25°C’de 24-48 saatlik inkübasyon sonunda gelişen koloniler şekil ve renk bakımından incelenmiştir.

Hücre morfolojisi: Stoklanan saf bakteri izolatlarının 24 saatlik genç kültürleri oluşturulmuş ve bu kültürlerden preparatlar hazırlanmıştır. Gram ve basit boyama yöntemi ile boyanan preparatlar mikroskopun immersiyon objektifinde incelenmiş ve bakterilerin gram özelliği, hücre şekilleri ve hücre büyüklükleri tespit edilmiştir.

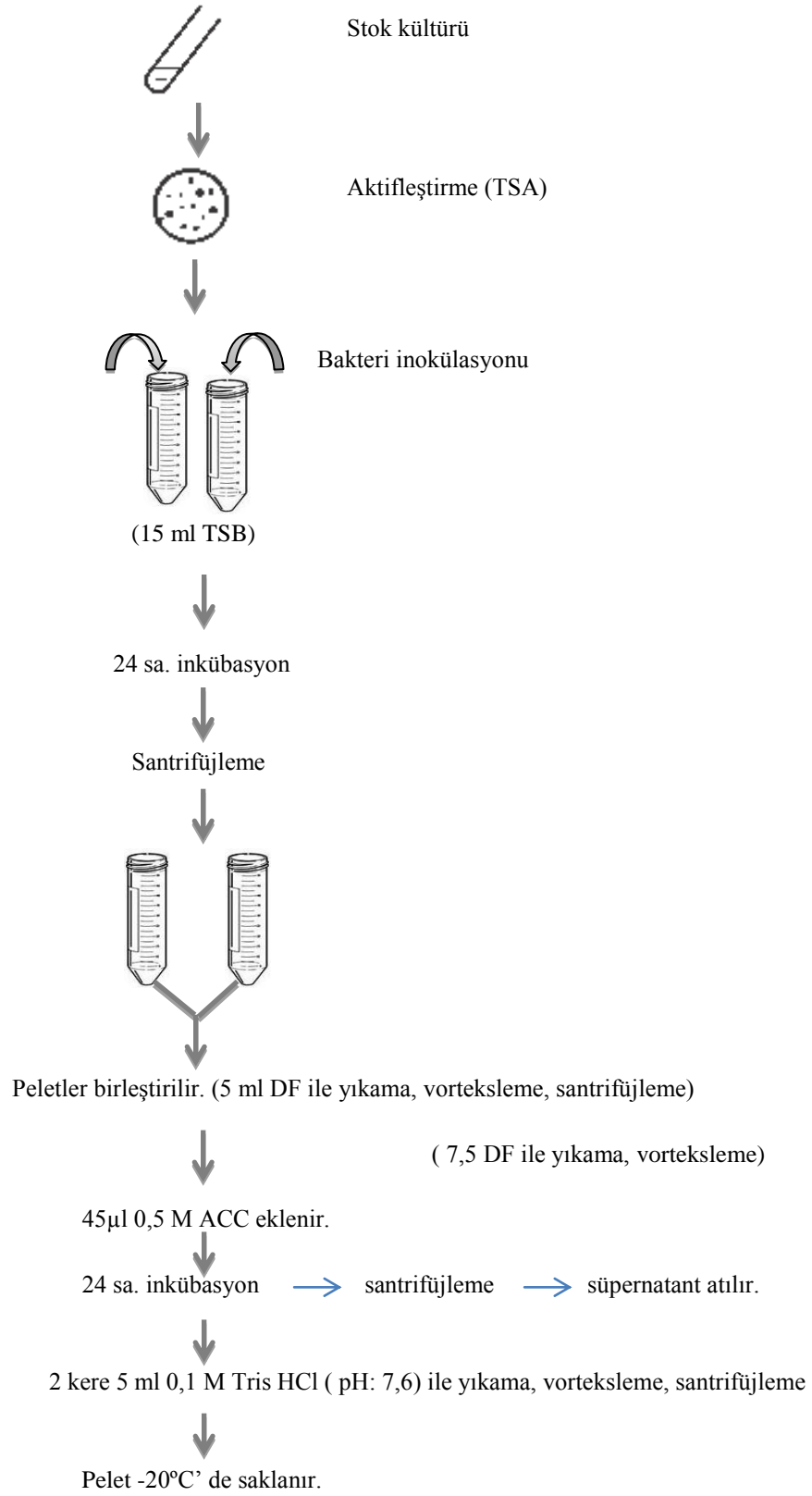
Endospor testi: Stoklanan saf bakteri izolatları, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde NA besiyerinde geliştirildikten sonra 50-60°C’de 20 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerden preparat hazırlanmıştır. Bu preparatlar 3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiş ve filtrelenen malaşit yeşiliyle boyanmıştır. Daha sonra alevde 5 dk. etkiye bırakılmıştır. Buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Saf suyla yıkandıktan sonra safranin ile 30 sn. muamele edilmiştir. Tekrar saf suyla boyanın fazlası akıtılarak preparat kurutulmuş ve yağ immersiyon objektifiyle

incelenmiştir. İşlem sonunda sporlar yeşil renkte, vejetatif hücreler pembe renkte görülmüştür (Tamer vd 1989).

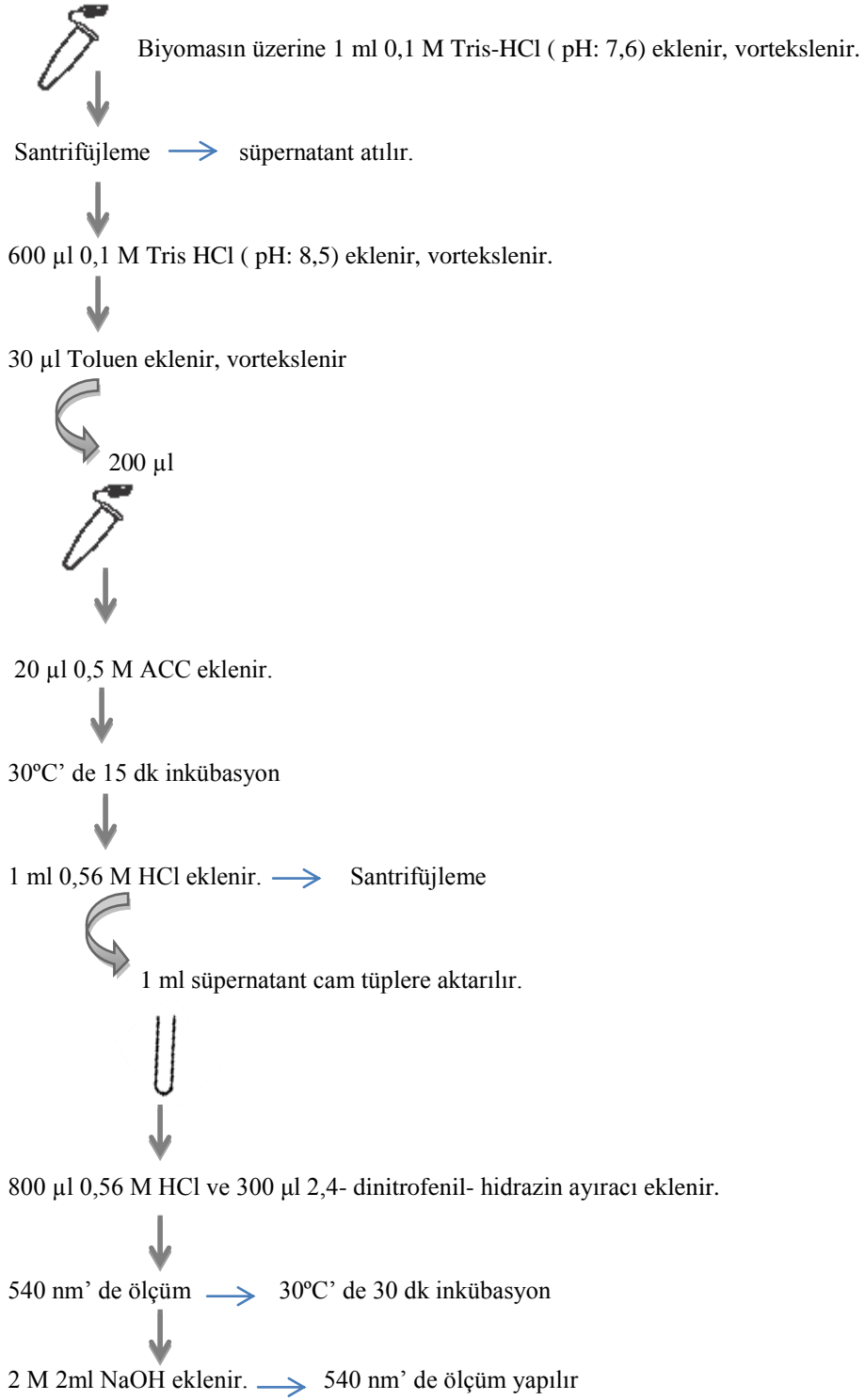
Katalaz testi: 24–48 saat gelişmeye bırakılan genç bakteri kültürlerinin her birinden bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerlerine bir damla H₂O₂ damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu bakterinin katalaz pozitif, oluşmaması ise bakterinin katalaz negatif olduğu sonucunu göstermiştir (Klement *et al.* 1990).

3.2.5. ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesi

ACC’li DF salt medium katı besiyerinde iyi gelişen mikroorganizmalar seçilerek ACC deaminaz aktivite tayinleri yapılmıştır. ACC deaminaz aktivitesinin tayini için kullanılan yöntemin akım şeması Şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.4 (devam)



Şekil 3.4. ACC deaminaz aktivitesinin tayininde kullanılan yöntemin akım şeması

Bu maksatla; stoklanan izolatların TSA'ya ekimi yapılarak mikroorganizmalar aktifleştirilmiştir. Her bir bakteri türü için aşağıdaki adımlar uygulanmıştır.

Bakteri hücrelerinin besiyerinden arındırılması ve ACC deaminaz aktivitesinin tetiklenmesi işlemlerinde kullanılan deney protokolü:

1) İçerisinde 15 ml TSB bulunan 2 adet tüpe bakteri inoküle edilmiştir. 1 gece 200 rpm ve 25°C'de inkübe edilmiştir.

2) Biyomas santrifüj edilmiştir (5.000 rpm, 20 dk, 4°C). Her iki tüpe bulunan peletler birleştirilerek hücreler 5 ml DF minimal mediumla yıkanmış ve vortekslenmiştir.

3) Tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve hücreler 7,5 ml DF salt medium bulunan yeni tüpe aktarılıp vortekslenerek yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

4) İnkübasyondan önce 0,5 M ACC 'den 45 µl eklenerek son konsantrasyonun 3 mM olması sağlanmıştır. ACC deaminaz aktivitesini tetiklemek için, 200 rpm'de 24 sa. inkübe edilmiştir.

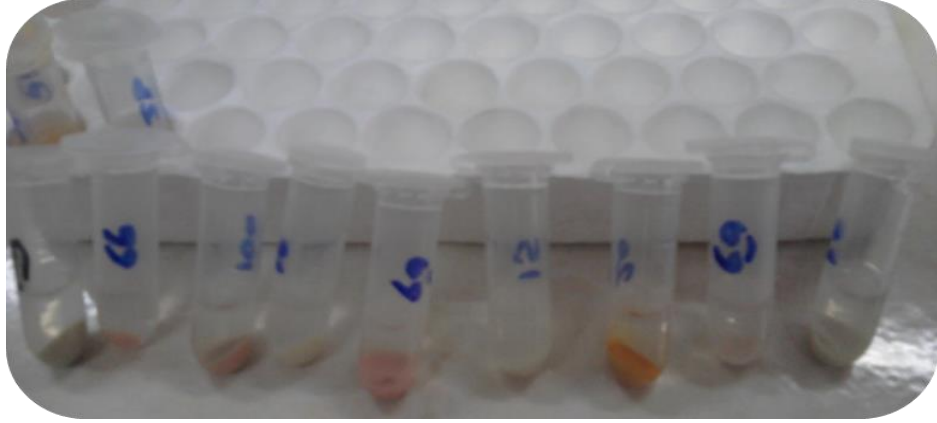
5) 5.000 rpm, 4°C'de 20 dk. santrifüj işleminden sonra üst kısım (süpernatant) atılmıştır. Hücreler üst üste 2 kere 5 ml 0.1 M Tris-HCl (pH:7.6) tamponunda yıkanmış, vortekslenmiş, santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelet - 20°C de saklanmıştır.

Bakteri hücrelerinin parçalanması ve ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan deney protokolü:

1) 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alınan biyomasın üzerine 0,1 M 1 ml Tris-HCl (pH:7,6) tamponu eklenmiş ve vortekslenmiştir.

- 2) 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 600 µl 0,1 M Tris-HCl (pH:8,5) eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 3) Hücreleri parçalamak için; üzerine 30 µl toluen eklenerek 30 sn yüksek devirde vortekslenmiştir. Toluenli hücrelerden 200 µl alınarak 1.5 ml' lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 20 µl 0,5 M ACC eklenerek vortekslenmiştir.
- 4) 30°C'de 15 dk inkübe edildikten sonra 0.56 M HCl'den 1 ml eklenerek vortekslenmiştir.
- 5) 13.000 rpm'de 25°C'de 5 dk santrifüjlenmiş ve süpernatanttan temiz cam tüpe 1ml alınmıştır.
- 6) Üzerine 800 µl 0,56 M HCl eklenip vorteksleme işlemi yapılmıştır. Daha sonra 300 µl 2,4- dinitrofenil- hidrazin ayıracı eklenmiş, vortekslenmiş ve ilk spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.
- 7) 30°C'de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, üzerine 2M 2 ml NaOH eklenerek spektrofotometrede 540 nm'de ölçüm yapılmış ve izolatların ACC deaminaz aktiviteleri belirlenmiştir.

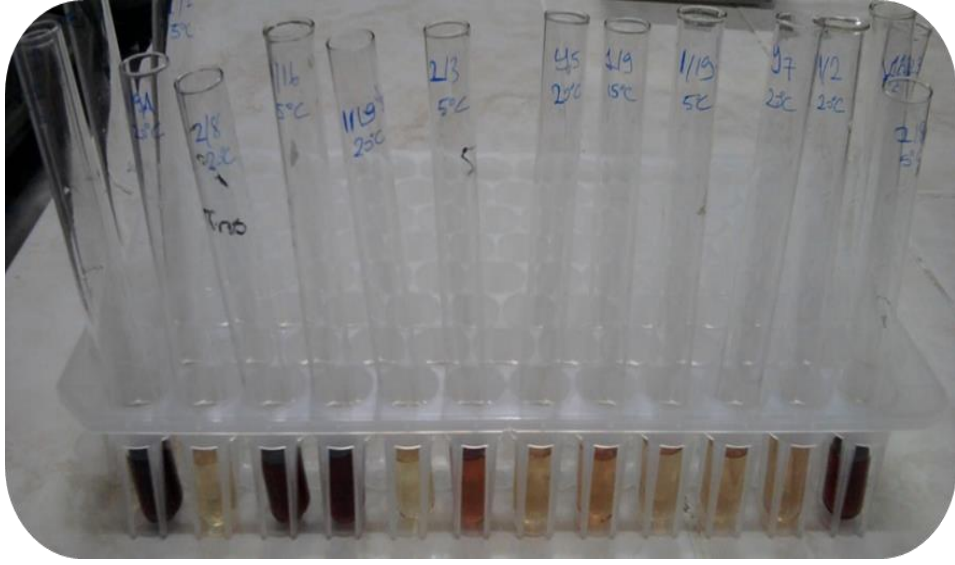
ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili işlemler Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Besiyerinden arındırılan ve santrifüjlenen biyomaslar



Şekil 3.6. Bakteri hücrelerinin toluenle parçalanması



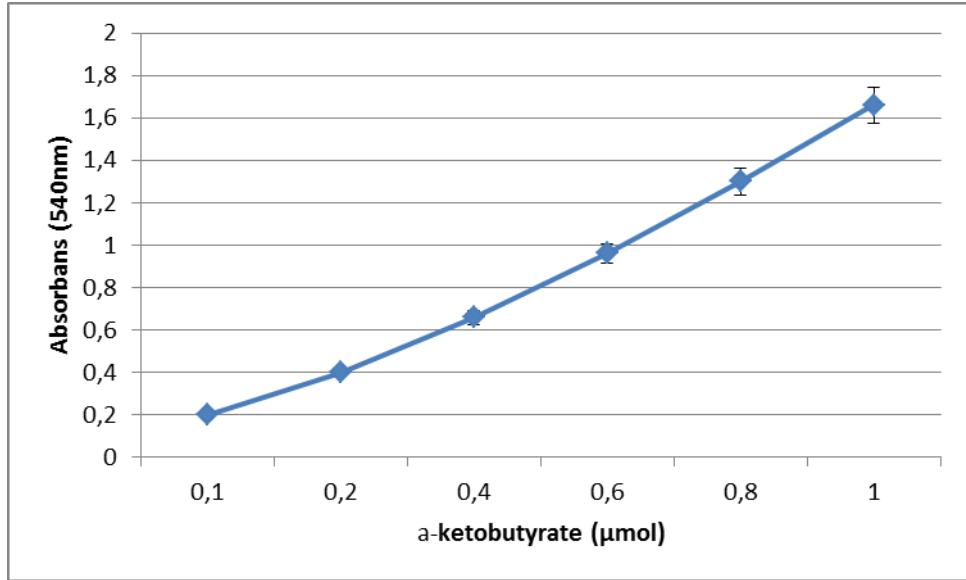
Şekil 3.7. Elde edilen süpernatanta 2M 2 ml NaOH eklendikten sonra gözlemlenen renk değişimleri

3.2.6. ACC deaminaz aktivite tayini için standart grafiğin hazırlanması

ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan metotta (Honma and Shimomura 1978) ACC deaminazın ACC'yi parçalaması durumunda oluşan α -ketobütirat miktarı ölçülmüştür. Bu reaksiyon sonucu oluşan α -ketobütiratın μ mol sayısı, örneğin 540 nm'de ölçülen absorbans değeri ile α -ketobütiratın 0,1-1 μ mol aralığındaki standart eğri değerleri karşılaştırılarak belirlenmiştir.

100 mM α -ketobütiratın stok çözeltisi 0,1M Tris-HCl (pH:8,5) ile hazırlanmış ve 4°C'de saklanmıştır. Kullanmadan önce, standart konsantrasyon eğrisi oluşturmak için aynı tamponla stok çözelti dilüe edilerek 10 mM'lık çözelti elde edilmiştir. Bilinen α -ketobütirat konsantrasyonlarına 300 μ l 2,4- dinitrofenil- hidrazin ayırıcı eklenmiş, vortekslenmiş ve 30°C'de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Bu sırada α -ketobütiratın fenilhidrazona dönüşmesi beklenmiştir. Daha sonra üzerine 2 M 2 ml NaOH eklenip vortekslenerek spektrofotometrede 540 nm'de ölçüm yapılmıştır.

Penrose and Glick (2003) tarafından yapılan çalışmada 0-1,0 μmol aralığındaki α -ketobütirat, 540 nm’ de 0-1,6 aralığında absorbans değeri göstermiştir. En düşük α -ketobütirat miktarı ise 0,1 μmol olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.8. Standart eğri grafiği

Şekil 3.8’den anlaşılacağı gibi 0,1 μmol α -ketobütirat 0,13; 0,2 μmol α -ketobütirat 0,22; 0,4 μmol α -ketobütirat 0,53; 0,6 μmol α -ketobütirat 0,75; 0,8 μmol α -ketobütirat 0,98 ve 1 μmol α -ketobütirat 1,66 absorbans değeri göstermiştir.

3.2.7. 16S rDNA gen analizi

En yüksek ACC deaminaz aktivitesine sahip izolatlar seçilerek bu izolatlar (GBK 1, GBK 2, GBK 3, GBK 4, GBK 5, GBK 6, GBK 7 ve GBK 8) için 16S rDNA geni analizi uygulanmıştır. 16s rRNA gen analizi için REFGEN firmasından hizmet alımı yapılmıştır. İzolatların komşuluk analizi Şekil 4.5’te verilmiştir.

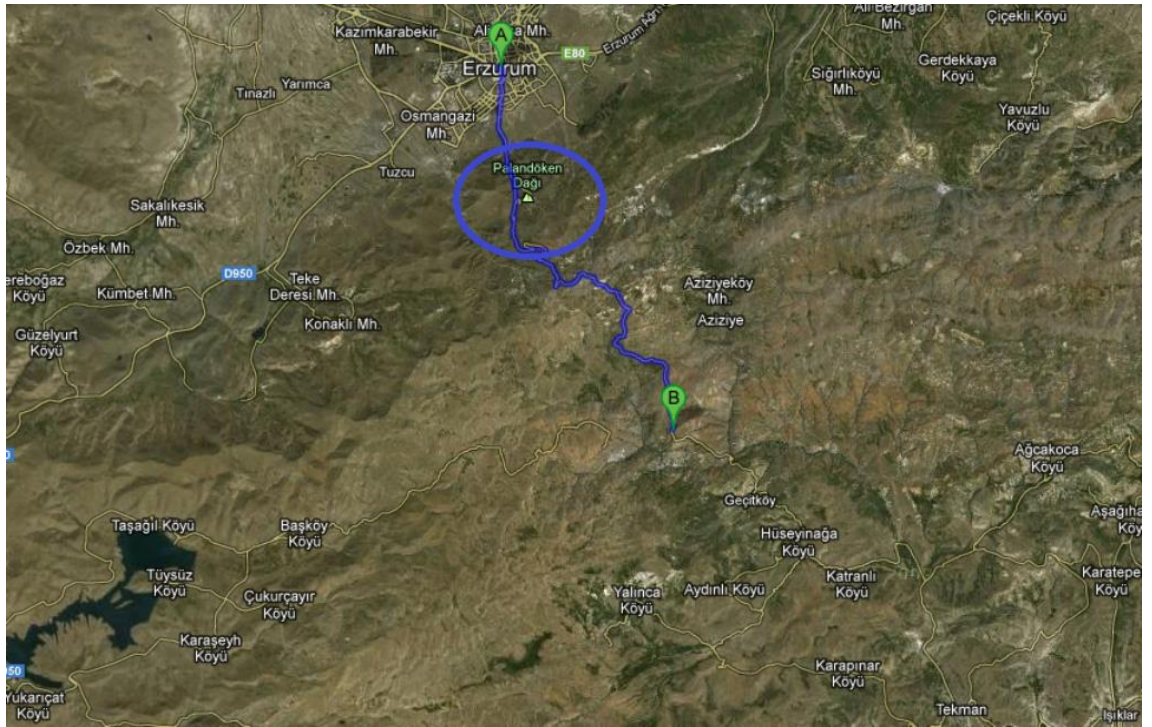
3.2.8. İstatistiksel analiz

Tez çalışmasında yapılan bütün deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak önemli olup olmadıkları, SPSS 15 paket programı kullanılarak, 0.05 önem seviyesinde tek yönlü ANOVA testi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5’de ifade edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bitki Toplanan Yerlerin Özellikleri

Bu çalışmada 2011 ve 2012 yıllarının Ekim-Kasım aylarında çeşitli bitkiler rizosfer toprağıyla birlikte toplanarak 3.2.3’de belirtilen izolasyon ve saflaştırma işlemlerine tabi tutulmuş ve ACC deaminaz aktivitesine sahip soğuga dirençli bakteriler elde edilmeye çalışılmıştır. Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te araştırma alanlarının uydu görüntüleri, Çizelge 4.1’de ise konum ve yükseklik değerleri ile bu bölgelerden toplanan bitki kodları verilmiştir.



Şekil 4.1. Palandöken Dağlarının uydu görüntüsü



Şekil 4.2. Hasانبaba Dağlarının uydu görüntüsü



Şekil 4.3. Kargapazarı Dağlarının uydu görüntüsü

Çizelge 4.1. Bitkilerin toplandığı yerlerin konum ve yükseklikleri

| Örnek Toplanan Bölge | Bitki Kodu | Konumu | Yüksekliği |
|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|------------|
| Palandöken Dağı/ Tekman yolu | 1/6, 1/13, 1/24, 1/2, 1/3, 1/4 | 39° 50' 10 K 41° 16' 39 D | 2531 m |
| Palandöken Dağı | 1/21, 1/22, 1/8, 1/7, 1/12 | 39° 49' 40 K 41° 17' 18 D | 2724 m |
| Palandöken Dağı | 1/5, 1/16 | 39° 50' 43 K 41° 16' 41 D | 2425 m |
| Pasinler | 1/17 | 39° 59' 18 K 41° 39' 39 D | 1764 m |
| Pasinler/ Hasanbaba Dağı | 1/23, 1/15, 1/18, 1/19 | 39° 59' 06 K 41° 40' 25 D | 1760 m |
| Palandöken | Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7 | 39° 49' 15 K 41° 17' 34 D | 2132 m |
| Kargapazarı Dağları / Tortum yolu | 2/4, 1/9, 2/9, 2/8, 2/3 | 40° 18' 37 K 41° 49' 54 D | 2650 m |

Yapılan çalışmada; soğuk koşullarda canlılığını koruyabilen bakteriler elde etme şansının fazla olacağı düşünülerek, bitki örnekleri düşük sıcaklıklara sahip olan yüksek rakımlı dağların kuzeye bakan kesimlerinden toplanmıştır. Ayrıca örnekleme işleminin yapıldığı aylarda ortalama sıcaklığın 4-6°C olduğu gözlemlenmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı üzere; bitki örneklerinin toplandığı en yüksek rakım 2724 m (Palandöken Dağı), en düşük rakım ise 1760 m (Pasinler/ Hasanbaba Dağı) olarak tespit edilmiştir. Yine çizelgeden de çıkarılacağı gibi; 2531 m rakıma sahip bölgeden sırasıyla 1/6, 1/13, 1/24, 1/2, 1/3, 1/4 kodlarıyla belirtilen; *Artemisia* spp. (Pelin otları), *Chenopodium album* (Tel pancarı), *Onosma* sp. (Emzik otu), *Salvia* sp. (Adaçayı), *Verbascum* sp. (Sığırkuyruğu) ve *Artemisia* sp. (Pelin otları) bitkileri toplanmıştır. 2724 m rakıma sahip bölgeden sırasıyla 1/21, 1/22, 1/8, 1/7, 1/12 kodlarıyla belirtilen; Asteraceae

(Papatyagiller), *Astragalus* sp. (Geven otu), *Malva sylvestris* Linnaeus (Kuşekmeği), *Veronica* sp. (Yavşan otu) ve *Senecio* sp. (Kanarya otu) bitkileri toplanmıştır. 2425 m rakıma sahip bölgeden sırasıyla 1/5, 1/16 kodlarıyla belirtilen; *Festuca* sp. (Yumak) ve *Avena* sp. (Yulaf) bitkileri toplanmıştır. 1764 m rakıma sahip bölgeden 1/17 koduyla belirtilen *Euphorbia* sp. (Sütleğen) bitkisi toplanmıştır. 1760 m rakımlı bölgeden sırasıyla 1/23, 1/15, 1/19 kodlarıyla belirtilen; *Achillea millefolium* (Civanperçemi), *Avena* sp. (Yulaf) ve *Xeranthemum annuum* (Dağ karanfili) bitkileri toplanmıştır. Bu bölgeden alınan 1/18 kodlu bitki ise teşhis edilememiştir. 2132 m rakımlı bölgeden sırasıyla Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7 kodlarıyla belirtilen; *Senecio* sp. (Kanarya otu), *Artemisia* spp. (Pelin otları), *Chenopodium foliosum* (İt üzümü), *Anchusa azurea* (Sığırdili), *Melilotus officinalis* (Taş yoncası), *Ziziphora* sp. (Dağ reyhanları) bitkileri toplanmıştır. 2650 m rakıma sahip bölgeden ise 2/4, 1/9, 2/9, 2/8, 2/3 kodlarıyla belirtilen bitkiler toplanmıştır. Bu bitkilerin teşhisleri yapılamamakla beraber, bölgeden alınan 2/9 kodlu bitki hariç diğer bitki rizosferlerinden izolat elde edilmiştir.

4.2. Toplanan Bitki Örneklerinin Teşhisi

Bölüm 3.2.2’de belirtildiği gibi toplanmış olan bitki örnekleri teşhis edilmiştir. Çizelge 4.2’de bitkilerin Latince ve Türkçe isimleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. Toplanan bazı bitkilerin isimleri

| Bitki Kodu | Bitkinin Latince İsmi | Bitkinin Türkçe İsmi |
|------------|--|--------------------------------|
| Y6 | Fabaceae / <i>Melilotus officinalis</i> | Baklagiller / Taş yoncası |
| Y5 | Boraginaceae / <i>Anchusa azurea</i> | Hodangiller / Sığırdili |
| Y2 | Asteraceae / <i>Senecio</i> sp. | Papatyagiller / Kanarya otu |

Çizelge 4.2 (devam)

| | | |
|------|--|--|
| Y3 | Asteraceae / <i>Artemisia</i> sp. | Papatyagiller / Pelin otları |
| Y7 | Labiatae / <i>Ziziphora</i> sp. | Ballıbabagiller / Dağ reyhanları |
| Y4 | Chenopodiaceae / <i>Chenopodium foliosum</i> | Kazayağigiller / İt üzümü |
| 1/23 | Asteraceae / <i>Achillea millefolium</i> | Papatyagiller / Civanperçemi |
| 1/21 | Asteraceae / | Papatyagiller / |
| 1/6 | Asteraceae / <i>Artemisia</i> sp. | Papatyagiller / Pelin otları |
| 1/13 | Chenopodiaceae / <i>Chenopodium album</i> | Kazayağigiller / Tel pancarı |
| 1/15 | Poaceae / <i>Avena</i> sp. | Buğdaygiller / Yulaf |
| 1/24 | Boraginaceae / <i>Onosma</i> sp. | Hodangiller / Emzik otu |
| 1/18 | Teşhis edilemedi | |
| 1/22 | Fabaceae / <i>Astragalus</i> sp. | Baklagiller / Geven otu |
| 1/19 | Asteraceae / <i>Xeranthemum annuum</i> | Papatyagiller / Dağ karanfili-ölmez otu |
| 1/2 | Labiatae / <i>Salvia</i> sp. | Ballıbabagiller / Adaçayı |
| 1/3 | Scrophulariaceae / <i>Verbascum</i> sp. | Sıracaotugiller / Sığırkuyruğu |
| 1/8 | Plumbaginaceae / <i>Malva sylvestris</i> Linnaeus | Dişotugiller / Kuşekmeği-madımak |

Çizelge 4.2 (devam)

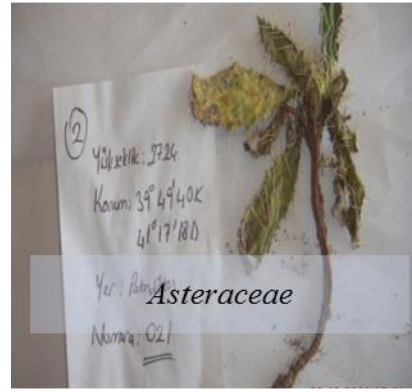
| | | |
|------|---|---------------------------------|
| 1/5 | Poaceae / <i>Festuca</i> sp. | Buğdaygiller / Yumak |
| 1/7 | Scrophulariaceae / <i>Veronica</i> sp. | Sıracaotugiller / Yavşan otu |
| 1/4 | Asteraceae / <i>Artemisia</i> sp. | Papatyagiller / Pelin otları |
| 1/17 | Euphorbiaceae / <i>Euphorbia</i> sp. | Sütleğengiller / Sütleğen |
| 1/12 | Asteraceae / <i>Senecio</i> sp. | Papatyagiller / Kanarya otu |
| 1/16 | Poaceae / <i>Avena</i> sp. | Buğdaygiller / Yulaf |
| 2/8 | Teşhis edilemedi | |
| 2/3 | Teşhis edilemedi | |
| 2/4 | Teşhis edilemedi | |
| 1/9 | Teşhis edilemedi | |
| 2/9 | Teşhis edilemedi | |

Çizelge 4.2 incelendiğinde; en çok bitki türüyle temsil edilen familyanın Asteraceae/ Papatyagiller (8 tür) olduğu görülmektedir. Bu familyayı Poaceae/ Buğdaygiller (3 tür) familyası takip etmektedir. Fabaceae (Baklagiller), Boraginaceae (Hodangiller), Labiatae (Ballıbabagiller), Chenopodiaceae (Kazayağıgiller) ve Scrophulariaceae (Sıracaotugiller) familyalarını 2 bitki türü temsil etmekle beraber Plumbaginaceae (Dişotugiller) ve Euphorbiaceae (Sütleğengiller) ailelerine ait 1 bitki türü tespit edilmiştir.

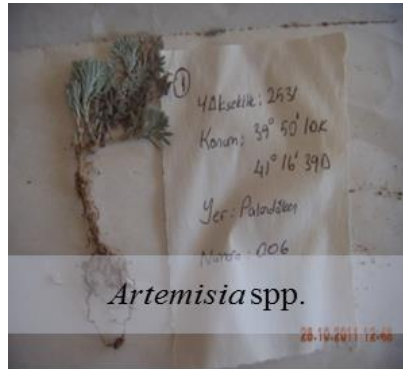
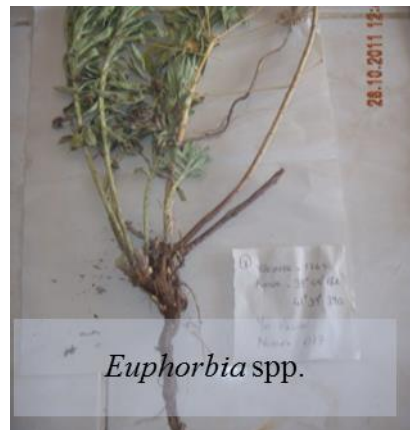
Palandöken, Kargapazarı ve Hasanbaba Dağları civarından rizosfer toprağıyla birlikte toplanan bitkiler Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 (devam)

*Achillea millefolium*

Asteraceae

*Artemisia* spp.*Chenopodium album**Avena* spp.*Salvia* spp.*Euphorbia* spp.*Avena* spp.

Şekil 4.4 (devam)



Şekil 4.4 (devam)



Şekil 4.4. Toplanan bitki örnekleri

4.3. Rizosfer Topraklarından Elde Edilen İzolatların Bazı Özellikleri

3.2.3'te belirtildiği gibi toprak örneklerinden izole edilip saflaştırılan izolatlar 3.2.4.'te ifade edildiği gibi gram özellikleri, hücre şekilleri, koloni renkleri, büyüklükleri, endospor ve katalaz enzimi bulundurma özelliklerine göre incelenmiştir. Çizelge 4.3.'te yapılan çalışmanın sonuçları özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların bazı kültürel ve sitolojik özellikleri

| İzolat No | Gram Reaksiyonu | Hücre Şekli | Koloni Rengi ve Şekli | Büyüklik (µm) | Endospor | Katalaz |
|-----------|-----------------|--------------|---------------------------|----------------|----------|---------|
| GBK1 | - | Basil | Krem-yuvarlak | 3,7 x 1,2 | - | + |
| GBK 2 | + | Basil | Krem-yuvarlak | 3,7 x 1,2 | - | + |
| GBK 3 | - | Basil | Yeşilimsi sarı-yuvarlak | 1,5 x 0,5 | - | + |
| GBK 4 | - | Kokobasil | Sarı-yuvarlak | 0,8 x 0,3 | - | + |
| GBK 5 | - | Basil | Yeşilimsi sarı-yuvarlak | 1,5 x 0,5 | - | + |
| GBK 6 | - | Basil | Açık sarı-yuvarlak | 5,0 x 1,2 | - | + |
| GBK 7 | - | Basil | Krem-bulutsu | 6,2 x 0,7 | - | + |
| GBK 8 | - | Basil | Krem-bulutsu | 3,7 x 1,2 | - | + |
| GBK 9 | + | Kok | Krem-yuvarlak | 3,0 x 3,0 | + | + |
| GBK 10 | - | Basil | Krem-bulutsu | < 1 | - | + |
| GBK 11 | - | Basil | Açık sarı -yuvarlak | 3,7 x 1,5 | - | + |
| GBK 12 | + | Streptobasil | Beyaz-yuvarlak | 6,2 x 1,2 | - | + |
| GBK 13 | + | Streptobasil | Beyaz-yuvarlak | 3,7 x 1,2 | - | + |
| GBK 14 | + | Basil | Şeffaf-kare yuvarlak | 1,2 x 0,9 | - | + |
| GBK 15 | - | Basil | Krem-bulutsu | 5,0 x 1,5 | - | + |
| GBK 16 | + | Kok | Krem-yuvarlak | 2,5 x 2,5 | - | + |
| GBK 17 | + | Diplobasil | Krem-bulutsu | 2,5 x 1,2 | - | + |
| GBK 18 | - | Kok | Pembe-yuvarlak | 3,0 x 3,0 | - | + |
| GBK 19 | - | Basil | Şeffaf Krem-kare yuvarlak | 5,0 x 1,2 | - | + |
| GBK 20 | + | Kok | Krem-yuvarlak | 2,5 x 2,5 | - | + |
| GBK 21 | + | Basil | Beyaz-bulutsu | 7,5 x 2,5 | - | + |
| GBK 22 | + | stafilokok | Krem-yuvarlak | 2,5 x 2,5 | + | + |
| GBK 23 | - | Basil | Krem- bulutsu | 5,0 x 1,2 | - | + |
| GBK 24 | - | Basil | Krem-bulutsu | 3,7 x 1,8 | - | + |
| GBK 25 | + | Kokobasil | Sarı- yuvarlak | 0,5 x 0,3 | - | + |
| GBK 26 | - | Kok | Sarı-yuvarlak | 1,5 x 1,5 | - | + |
| GBK 27 | + | Kok | Turuncu-yuvarlak | 2,5 x 2,5 | + | + |
| GBK 28 | - | Basil | Krem- bulutsu | 5,0 x 1,5 | - | - |
| GBK 29 | + | Kok | Krem- yuvarlak | 3,2 x 3,2 | + | - |
| GBK 30 | + | streptokok | Açık sarı-yuvarlak | 1,5 x 1,5 | + | + |
| GBK 31 | - | Kok | Krem- bulutsu | 3,0 x 3,0 | - | + |
| GBK 32 | - | Basil | Krem- bulutsu | 5,0 x 1,5 | - | + |

Sonuçlar; elde edilen izolatların genelinin katalaz pozitif özellikte olduğunu ortaya çıkarmıştır. İnceleme sırasında sentral ve subterminal endosporlara rastlanmıştır. En ve

boy ölçüleri arasında fazla bir fark bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin yanında en ve boy farkı az olan kokobasiller de görülmüştür. Diplobasil, streptobasil, monobasil, monokok, streptokok ve stafilokok şekillerinde bakteriler bulunmuştur. Petrilerde incelenen bakterilerin koloni renkleri genelde krem olmakla birlikte beyaz, açık sarı, turuncu, pembe, yeşilimsi sarı ve şeffaf renkte koloniler de incelenmiştir. Ayrıca ekim sırasında; kolonilerin bazılarının mukoid bazılarının mat-katı sabunsu ve bazılarının ise floresan özellikte olduğu fark edilmiştir. Gram özelliği bakımından sayısal anlamda bir grubun üstünlük göstermediği (Gram pozitif izolat sayısı: 14, Gram negatif izolat sayısı: 18) sonucuna varılmıştır.

4.4. ACC Deaminaz Enzimi Bakımından Aktif İzolatların Seçimi

3.2.3’de bahsedildiği gibi ACC içeren DF besiyerinde daha iyi gelişen mikroorganizmalar seçilerek saflaştırılmış ve ACC deaminaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Bu besiyerinde izolatların üreme durumları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. İzolatların ACC içeren ve DF besiyeriyle hazırlanan petrilerde 2-6 gün içindeki üreme durumları

| Rizosfer Örneği Alınan Bitki Kodu | Topraklardan Elde Edilen İzolat Kodu | | | 5°C | 15°C | 20°C |
|---|---|--------|--------|-----|------|------|
| | 5°C | 15°C | 20°C | | | |
| 2/8 | GBK 1 | | GBK 2 | 3 | 1 | 4 |
| Y7 | | GBK 22 | GBK 31 | 1 | 3 | 4 |
| 1/2 | | | GBK 8 | 2 | 1 | 4 |
| Y2 | | | | 2 | 2 | 3 |
| 2/4 | | GBK 23 | | 1 | 3 | 3 |
| 2/3 | GBK 7 | GBK 20 | | 3 | 4 | - |
| 1/22 | | | | 1 | 1 | 3 |
| 1/16 | GBK 3 | | | 3 | 1 | 2 |
| 1/21 | | | GBK 32 | 2 | 2 | 5 |
| Y5 | GBK 10 | GBK 16 | GBK 25 | 4 | 4 | 5 |
| 1/19 | GBK 13 | GBK 19 | GBK 29 | 2 | 3 | 4 |
| Y3 | GBK 11 | GBK 17 | GBK 27 | 3 | 4 | 4 |
| Y4 | | | | 2 | 1 | 3 |

Çizelge 4.4 (devam)

| | | | | | | |
|------|--------|--------|--------|---|---|---|
| 1/9 | GBK 9 | GBK 15 | GBK 24 | 3 | 3 | 4 |
| 1/23 | GBK 12 | GBK 18 | GBK 28 | 2 | 3 | 4 |
| 1/5 | | | GBK 30 | 2 | 2 | 4 |
| 1/24 | GBK 14 | GBK 21 | | 3 | 3 | 3 |
| 2/9 | | | | - | 2 | 3 |
| 1/18 | | | GBK 4 | 2 | 2 | 4 |
| 1/3 | GBK 5 | GBK 6 | GBK 26 | 3 | 4 | 4 |

-: üreme yok 1:çok düşük 2:düşük 3:orta 4:iyi 5:çok iyi

Çalışma sırasında petrilere 2-3 gün içinde en az üremenin 5°C’de olduğu, diğer sıcaklıklara göre en iyi üremenin ise 20°C’de olduğu sonucuna varılmıştır. Üreme görülmeyen veya üremenin düşük olduğu izolatların DF besiyerinde 3. günden sonra gelişmelerinde ilerleme görülmüştür. En iyi üreme sergileyen izolatlar; 5°C’ de; GBK 1, GBK 7, GBK 3, GBK 10, GBK 11, GBK 9, GBK 14, GBK 5 kodlu izolatlar, 15°C’ de ise GBK 22, GBK 23, GBK 20, GBK 16, GBK 19, GBK 17, GBK 15, GBK 18, GBK 21, GBK 6 kodlu izolatlar olarak gözlemlenmiştir.

4.5. Seçilen İzolatların ACC Deaminaz Aktivite Değerleri

3.2.5’te belirtilen işlemler sonrasında bakterilerin ACC’yi parçalayarak oluşturduğu α -ketobütirat sonucu ortaya çıkan absorbans değerleri 540 nm’de ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.5’de ifade edilmiştir.

Çizelge 4.5. Elde edilen izolatların ACC deaminaz aktivite değerleri

| İZOLAT NO | ACC Deaminaz Aktivite Değeri (25°C) | |
|-----------|--------------------------------------|-------|
| | Absorbans (540 nm) | µmol |
| GBK1 | 1,300 | 0,951 |
| GBK 2 | 1,528 | 0,993 |
| GBK 3 | 1,474 | 0,962 |
| GBK 4 | 1,688 | 1,207 |
| GBK 5 | 0,320 | 0,309 |
| GBK 6 | 0,787 | 0,689 |
| GBK 7 | 0,656 | 0,545 |
| GBK 8 | 0,318 | 0,307 |
| GBK 9 | 0,276 | 0,265 |
| GBK 10 | 0,182 | 0,171 |
| GBK 11 | 0,249 | 0,237 |
| GBK 12 | 0,157 | 0,145 |
| GBK 13 | 0,210 | 0,196 |
| GBK 14 | 0,146 | 0,135 |
| GBK 15 | 0,208 | 0,194 |
| GBK 16 | 0,245 | 0,233 |
| GBK 17 | 0,200 | 0,189 |
| GBK 18 | 0,172 | 0,160 |
| GBK 19 | 0,223 | 0,212 |
| GBK 20 | 0,242 | 0,230 |
| GBK 21 | 0,145 | 0,133 |
| GBK 22 | 0,304 | 0,295 |
| GBK 23 | 0,156 | 0,144 |
| GBK 24 | 0,177 | 0,166 |
| GBK 25 | 0,236 | 0,225 |
| GBK 26 | 0,249 | 0,237 |
| GBK 27 | 0,173 | 0,161 |
| GBK 28 | 0,209 | 0,195 |
| GBK 29 | 0,174 | 0,163 |
| GBK 30 | 0,204 | 0,190 |
| GBK 31 | 0,165 | 0,154 |
| GBK 32 | 0,162 | 0,151 |

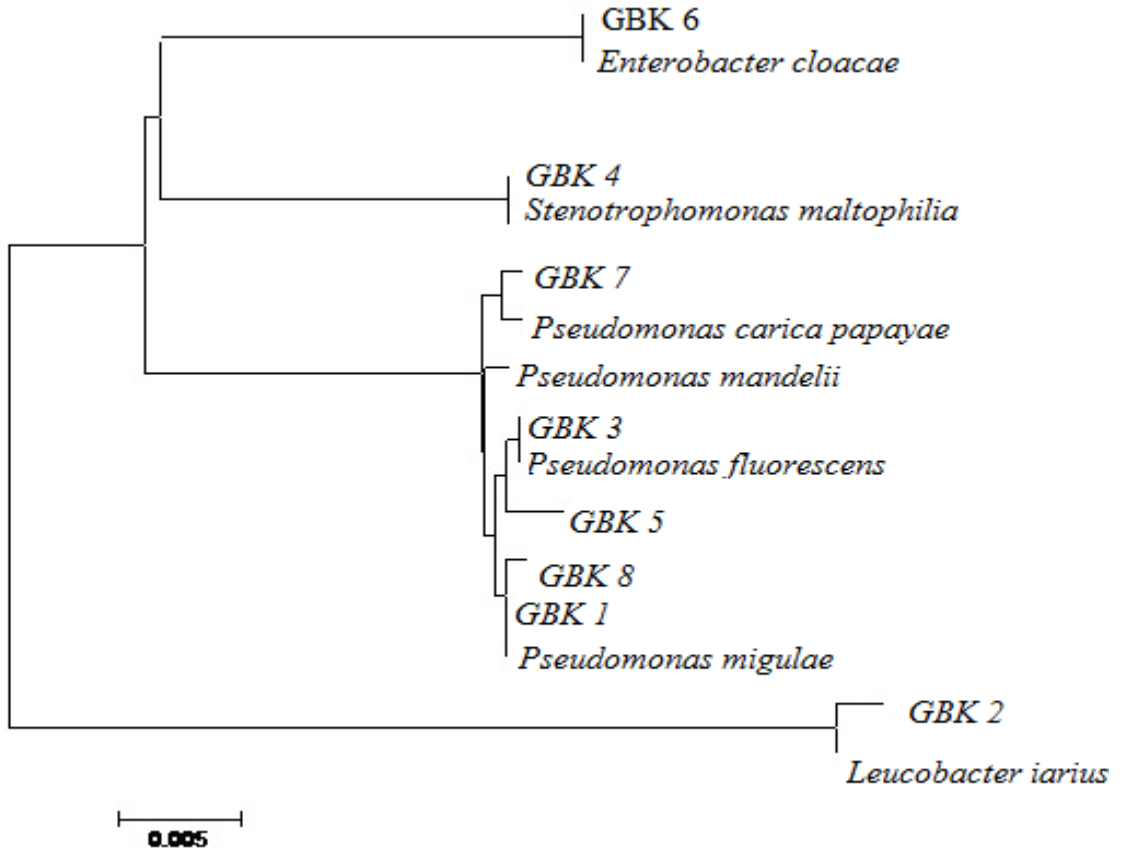
En düşük absorbans değerinin (0,145) 15°C’de gelişen GBK 21 kodlu izolata, en yüksek absorbans değerinin ise (1,688) 20°C’de gelişen GBK 4 kodlu izolata ait olduğu bulunmuştur.

4.6. ACC Deaminaz Aktivitesi Yüksek Bulunan Bakterilerin Genetik Karakterizasyonu

ACC deaminaz aktivite değerleri en yüksek bulunan 8 izolata genetik karakterizasyonu 3.2.7.’de belirtildiği gibi 16S rDNA analizi ile yapılmıştır. Çizelge 4.6’da bu izolatların Latince isimleri, absorbans değerleri, izole edildiği sıcaklıklar, ait olduğu bitki ve toprak kodları verilmiştir. Komşuluk analizi ise Şekil 4.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.6. ACC deaminaz aktivite değerleri en yüksek bulunan 8 izolata ait veriler

| İzolat Kodu | Alındığı Bitki Kodu | Geliştiği Sıcaklık | ACC deaminaz aktivite değeri | | İsmi |
|-------------|---------------------|--------------------|------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| | | | (540 nm) | (μ mol) | |
| GBK 1 | 2/8 | 5°C | 1,300 | 0,951 | <i>Pseudomonas migulae</i> |
| GBK 2 | 2/8 | 20°C | 1,528 | 0,993 | <i>Leucobacter iarius</i> |
| GBK 3 | 1/16 | 5°C | 1,474 | 0,962 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| GBK 4 | 1/18 | 20°C | 1,688 | 1,207 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| GBK 5 | 1/3 | 5°C | 0,320 | 0,309 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| GBK 6 | 1/3 | 15°C | 0,787 | 0,689 | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| GBK 7 | 2/3 | 5°C | 0,656 | 0,545 | <i>Pseudomonas carica papayae</i> |
| GBK 8 | 1/2 | 20°C | 0,318 | 0,307 | <i>Pseudomonas migulae</i> |



Şekil 4.5. GBK 1, GBK 2, GBK 3, GBK 4, GBK 5, GBK 6, GBK 7 ve GBK 8 izolatlarının yakınlığını gösteren dendrogram

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, ACC deaminaz aktivitesi bakımından etkili bulunan türler 4 ana gruba ayrılmaktadır. Birinci grupta tek türle *Enterobacter cloacae* (GBK 6) türü, ikinci grupta yine tek türle *Stenotrophomonas maltophilia* (GBK 4) türü temsil edilmektedir. Üçüncü grupta yakın akrabalık gösteren *Pseudomonas carica papayae* (GBK 7), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 3), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 5), *Pseudomonas migulae* (GBK 8) ve *Pseudomonas migulae* (GBK 1) türleri bulunmaktadır. Dördüncü grupta ise *Leucobacter iarius* (GBK 2) türü yer almaktadır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tarımda verimi artırmak için çeşitli kimyasalların (gübre, pestisid vb.) kullanımı bu kimyasalların yeraltı ve yerüstü sularında ve toprakta birikimine yol açmış ve başta insan olmak üzere bütün canlıların sağlığını tehdit eder bir boyut kazanmıştır. Üstelik, kimyasalların bilinçsiz ve aşırı kullanımı, giderek artırılması hedeflenen tarımsal verimi de düşürmüştür. Bu durum, verimi artırıcı ve çevre dostu yeni ürünlerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Yoğun mikrobiyal etkinliğin olduğu bitki rizosferinde yaşayan mikroorganizmaların farklı yol ve mekanizmalarla bitki büyümesini olumlu yönde etkilediği konusundaki gözlemler, bu mikroorganizmalar ile yapılacak preparasyonların, yukarıda belirtilen kimyasal madde kullanımına bir alternatif olabileceğini düşündürmüştür ve rizosfer topraklarından izole edilerek tek veya karışık inokülantlar olarak hazırlanan preparatlara biyogübre, bu preparatlar içerisindeki mikroorganizmalara da “Bitki Büyümesini Teşvik Edici Rizobakteriler (PGPR)” adı verilmiştir. Bu mikroorganizmaların bir grubu topraktaki besin elementlerinin alımını kolaylaştırarak veya bitki gelişimine yardımcı salgılar üreterek bitki gelişimini teşvik eder. Diğer grup ise bitki patojen ve zararlılarının etkilerini azaltarak büyümeye katkı sağlar.

PGPR'nin yaygın olarak kullanımını sınırlayan en önemli engel, laboratuvar koşullarında gösterdikleri performansı, tarla koşullarında gösterememeleridir. Bunun sebebi ya bölgenin iklimik şartlarına adaptasyon sağlayamamaları ya da yerel mikroflora ile rekabet edememeleridir. Örneğin Erzurum ve çevresinde, rakımın yüksek olması, kış mevsiminin uzunluğu, üretim sezonunun kısalığı ve oldukça düşük ortalama sıcaklık derecelerine sahip olması gibi sebeplerle, PGPR üyeleri bu şartlara adaptasyonda zorlanmakta ve uygulanmalarından kısa bir zaman sonra elenerek yerlerini yerel mikroflora terk etmektedir. İşte bu nedenlerle, araştırmamızda PGPR olarak kullanılacak ACC deaminaz aktiviteli türlerin, aynı zamanda soğuk şartlara dirençli olmaları hedeflenmiş ve çalışma bu hedef doğrultusunda yürütülmüştür.

Tarımsal verim, özellikle kış ayları boyunca düşük atmosfer ve toprak sıcaklığına bağlı olarak azaldığından dolayı; düşük sıcaklıkların negatif etkisini dengeleyen, soğuğa adapte olmuş, bitki büyüme ve gelişimini olumlu olarak etkileyen rizobakteri ırklarını inokülant olarak kullanmak son derece gereklidir (Kottmeier *et al.* 1990; Mishra *et al.* 2009).

Mikroorganizmaların izole edildiği rizosfer topraklarının yüksek rakımlı bölgelerden toplanması ve 20°C'nin altında üreme gösteren ACC deaminaz etkinliğine sahip bakterilerin seçimi, böyle izolatların bölgemiz koşullarında kullanılabileceği düşüncesiyle gerçekleştirilmiştir.

Soğuğa dirençli bu mikroorganizmalar düşük sıcaklıktaki çevrelerde başarıyla gelişebilmek için, bir dizi fonksiyonel ve güçlü etkili adaptasyon geliştirmişlerdir. Bu adaptasyonlar; düşük sıcaklıklarda yüksek katalitik etkili, soğukta aktif kalabilen enzim üretimi, hücre membranlarına membran akışkanlığını korumak için doymamış yağ asitlerinin katılması ve düşük sıcaklıklarda soğuk şok proteininin sentezi olarak bilinir (Gerday and Glansdorff 2007; Margesin *et al.* 2008).

Bir PGPR elemanı olarak ACC deaminaz üreten bakteriler, sadece bu enzimi ürettikleri için değil, başka birçok yol ve mekanizma ile bitki büyümesine katkı sağladıkları için de büyük öneme sahiptirler. Şöyle ki; 1) ACC deaminaz üreten bakteriler dışında, biyotik ve abiyotik stres etilenine karşı başka bir inhibitör kullanılmamaktadır. 2) Yaygın bir şekilde ACC deaminaz enzimine sahip olan toprak mikroorganizmaları, ACC'yi azot ve karbon kaynağı olarak kullanabildiği için kök rizosferine kolonize olma bakımından diğer bakterilere oranla daha yüksek rekabet şansı kazanırlar. Örneğin yürütülen bir çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen 233 *Rhizobium* suşundan 27 adedi hariç diğerlerinin ACC deaminaz enzim aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (Duan *et al.* 2006). 3) Bakteriyel ACC deaminaz geni aktarılmış transgenik bitkiler, gen aktarımı yapılmamış bitkilere nispeten toksik metal etkilerine karşı daha dayanıklı bulunmuştur

(Grichko *et al.* 2000; Nie *et al.* 2002; Stearns *et al.* 2005). *Pseudomonas putida* ile muamele gören ayçiçeğinde kadmiyum toksik etkisinin azaldığı ve kökler tarafından metal alımının %40 oranında arttığı belirlenmiştir (Wu *et al.* 2006). 4) Çiçekli türlerde yaşlanma ve çiçeklerin solmasında etilen ve onun öncüsü ACC'nin etkisi göz ardı edilemez (Woltering and van Doorn 1988; Reid and Wu 1992). ACC deaminaz içeren PGPR preparatlarıyla bitkinin muamele edilmesi sonucu çeşitli çiçeklerde raf ömrünün uzatılabileceği (Nayani *et al.* 1998) ve bu yöntemin ticari olarak süs bitkisi yetiştiriciliğinde kullanışlı bir biyoteknolojik çalışma olabileceği düşünülmektedir (Çakmakçı 2009). 5) Nodülasyon sürecinde *Rhizobium* bakterilerinin kökleri enfekte etmesi bitkide biyotik strese neden olur ve köklerde üretilen ACC dolayısıyla da etilen seviyesi artış gösterir. Bu durumda etilen ve onun öncüsü olan ACC, baklagil bitkilerinde nodülasyonu olumsuz yönde etkiler (Lee and La Rue 1992; Nukui 2000; Oldroyd *et al.* 2001). Yani sonuçta rizobiyal enfeksiyon adeta kendi kendini engelleyici bir süreç olarak işler (Guinel and Geil 2002; Ma *et al.* 2003 a). 6) Yapılan araştırmalarda; uç sıcaklıklar, yüksek ışık, sel, kuraklık, toksik metaller, radyasyon, yaralanmalar, predatör böcekler, çeşitli patojenlerin varlığı, yüksek tuz miktarı, çevresel organik kirleticiler gibi çok sayıda abiyotik ve biyotik stres koşullarının bitki gelişimini inhibe ettiği vurgulanmıştır (Abeles *et al.* 1992; Glick *et al.* 2007). ACC deaminaz enzimi içeren PGPR ile muamele edilen bitkilerde bu enzim sayesinde stres koşullarının bir sonucu olarak sentezlenen stres etileninin miktarı azaltılarak bitkideki bu aşırı etilenin yol açabileceği yıkıcı etkilere karşı bitkinin daha dirençli olması sağlanmıştır (Burd *et al.* 1998; Grichko *et al.* 2000; Grichko and Glick 2001; Mayak *et al.* 2004a,b; Arshad *et al.* 2008). 7) ACC deaminaz aktivitesine sahip PGPR inokulantlarının bahçecilik ve zirai alanlarda kullanışlı olacağı görüşü yaygındır (Penrose and Glick 2003). Çeşitli çalışmalar sonucunda ACC deaminaz özelliğinin tespit edilmesinin, verimli PGPR'nin taranmasında etkili bir yol olabileceği (Hye *et al.* 2007) ve ACC deaminaz aktivitesinin bitki gelişimini artıran bakterileri tanımda bir anahtar niteliği taşıdığı (Glick *et al.* 2007) kaydedilmiştir.

Yukarıda maddeler halinde anlatılan özellikleri nedeniyle son yıllarda bir PGPR elemanı olarak ACC deaminaz üreten bakterilerin izolasyonu konusundaki araştırmalar

yoğunluk kazanmıştır (Penrose and Glick 2003; Selvakumar *et al.* 2008; Jalili *et al.* 2009; Li *et al.* 2011). Bu organizmaların izolasyonunda genellikle iki yol izlenmiştir. Bunlardan birincisi tek azot kaynağı olarak ACC içeren minimal besiyerlerinde gelişen kolonileri seçme esasına dayanır (Zafar-Ul-Hye 2007). Ancak araştırmamız boyunca yapılan ön denemeler sonunda, bu yöntemin sonuçlarının yeterince güvenilir olmadığı, ACC içermeyen minimal ortamda da bazı kolonilerin geliştiği görülmüştür. Bu nedenle sonuçları itibariyle daha güvenilir olan “ α -ketobütirat” ölçümü esasına dayalı yöntem kullanılmıştır. Üstelik bu yöntem hem kantitatif hem de kalitatif bilgiler vermektedir. Giriş kısmında da belirtildiği gibi ACC deaminaz enzimi, etilenin öncüsü olan ACC’yi α - ketobütirat ve amonyağa dönüştürmektedir. Dolayısıyla ACC deaminaz enzim aktivitesini belirlediğimiz bu metotta ürünlerden α - ketobütiratın ölçümü esas alınmaktadır. İlk olarak Honma and Shimomura (1978) tarafından önerilen bu yöntem, günümüzde de bu tip çalışmalarda güvenle kullanılmaktadır.

Araştırma sonuçlarımıza göre; dağ reyhanı bitkisinin rizosferinden 2 izolat (GBK 22 ve GBK 31), adaçayı bitkisinin rizosferinden 1 izolat (GBK 8), yulaf bitkisinin rizosferinden 1 izolat (GBK 3), papatyagiller familyasına ait bitki rizosferinden 1 izolat (GBK 32), sığırdili bitkisinin rizosferinden 3 izolat (GBK 10, GBK 16 ve GBK 25), dağ karanfili bitkisinin rizosferinden 3 izolat (GBK 13, GBK 19 ve GBK 29), pelin otu bitkisinin rizosferinden 3 izolat (GBK 11, GBK 17 ve GBK 27), civanperçemi bitkisinin rizosferinden 3 izolat (GBK 12, GBK 18 ve GBK 28), yumak bitkisinin rizosferinden 1 izolat (GBK 30), emzik otu bitkisinin rizosferinden 2 izolat (GBK 14 ve GBK 21), sığırkuyruğu bitkisinin rizosferinden 3 izolat (GBK 5, GBK 6 ve GBK 26) elde edilmiştir. Ayrıca 2/8 kodlu bitki rizosferinden 2 izolat (GBK 1 ve GBK 2), 2/4 kodlu bitki rizosferinden 1 izolat (GBK 23), 2/3 kodlu bitki rizosferinden 2 izolat (GBK 7 ve GBK 20), 1/9 kodlu bitki rizosferinden 3 izolat (GBK 9, GBK 15 ve GBK 24), 1/18 kodlu bitki rizosferinden 1 izolat (GBK 4) elde edilmekle beraber teşhisleri yapılamamıştır. Bu yüzden daha sonraki çalışmalarda bahar aylarında ve çiçeklenme döneminde aynı bitkilerin tekrar toplanması, böylelikle bitki teşhislerinin daha kolay yapılabileceği düşünülmektedir. Bu bitkilerin rizosferinden elde edilen ve bu tez kapsamında olmayan birçok izolatımız da bulunmaktadır. Bu izolatların inorganik

fosfatı çözebilme, azot fikse edebilme, mineralizasyonda görev alabilme, patojenleri inhibe edebilme vb. potansiyelleri, daha sonraki araştırmalarımız için yeterli bir koleksiyon oluşturmuştur.

5°C’de; GBK 1, GBK 7, GBK 3, GBK 10, GBK 11, GBK 9, GBK 14, GBK 5 kodlu izolatlar, 15°C’ de ise GBK 22, GBK 23, GBK 20, GBK 16, GBK 19, GBK 17, GBK 15, GBK 18, GBK 21, GBK 6 kodlu izolatlar en iyi üreme göstermesi bakımından soğukçul mikroorganizma grubunun temsilcileri olarak düşünölmüştür. Hem düşük sıcaklıklarda üremeleri hem de yüksek ACC deaminaz aktivite değerlerine sahip olmaları açasından GBK 1, GBK 7, GBK 3, GBK 5 (5°C) ; GBK 6 (15°C) kodlu izolatların çalışma yaptığımız bölgenin tarla koşullarında da etkili olabileceğini ön görerek kullanımı önerebiliriz.

Bu araştırmada ACC deaminaz enzimi bakımından etkili 8 izolat elde edilmiş ve 16s rDNA analizi sonucu bunların *Pseudomonas migulae* (GBK 1), *Leucobacter iarius* (GBK 2), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 3), *Stenotrophomonas maltophilia* (GBK 4), *Pseudomonas fluorescens* (GBK 5), *Enterobacter cloacae* (GBK 6), *Pseudomonas carica papayae* (GBK 7) ve *Pseudomonas migulae* (GBK 8) oldukları tespit edilmiştir. Çizelge 4.6.’da da göröldüğü gibi ACC deaminaz aktivitesi bakımından en yüksek performansı *Stenotrophomonas maltophilia* türü göstermiştir. Daha önce yapılan araştırmalarda (Naz and Bano, 2012; Anonim 2013) bu türün çeşitli bitkilerin rizosferinde bulunan endofitik bir tür olduğu, bazı suşların İAA, GA, ABA ve trans-zeatin gibi büyüme düzenleyici maddeler üreterek bitki büyümesine katkı sağladığı, proteaz ve kitinaz gibi ekstraselöler enzimler bakımından zengin olduğu, bazı antimikrobik maddeler üretebildiğı ve dolayısıyla hem bir biyokontrol ajanı hem de bir PGPR olarak kullanılabilceğı kaydedilmiştir (Anonymus 2013). Ancak bu türün ACC deaminaz aktivitesine sahip olduğunu gösteren bir kaynağa ulaşılamamıştır. Bu nedenle araştırmamız, *S. maltophilia*’nın ACC deaminaz aktivitesine sahip olduğunu gösteren ilk çalışma olarak değerlendirilebilir. Diğer taraftan bu araştırmada izole edilen *S. maltophilia*, yukarıda bu türde bulunduğu belirtilen PGPR ve biyokontrol özellikleri bakımından da araştırılmalıdır.

Araştırmamızdan elde edilen sonuçlara göre, ACC deaminaz bakımından etkili bulunan 8 türün 5 tanesi *Pseudomonas* cinsine aittir. Daha önce bu konu üzerinde yapılmış araştırma sonuçları incelendiğinde, ACC deaminaz aktivitesine sahip türlerin *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter* ve *Rhizobium* cinslerine ait olduğu, ancak *Pseudomonas* cinsinin bu konuda bariz bir üstünlük gösterdiği anlaşılmaktadır (Meyer *et al.* 2004; Kausar *et al.* 2006; Jalili *et al.* 2009; Mishra *et al.* 2009). Araştırma sonuçlarımızda 8 etkili türden 5'inin *Pseudomonas* cinsine ait olması, yukarıdaki araştırma sonuçlarını destekler niteliktedir. Diğer taraftan, gerek endüstriyel mikrobiyoloji alanında yapılan üretimler, gerekse tarımsal biyoteknoloji çalışmalarında *Pseudomonas* türlerinin en çok kullanılan organizmalar olduğu ve aynı türün birden fazla amaçla kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Toprak *Pseudomonad*'ları çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarında fazla miktarda bitkiye dayanıklılık sağlayıcı enzimler ve metabolitler üretme kapasitesi, köklere mükemmel bir şekilde kolonize olma kapasitesi ve katabolik olarak çok yönlü olmalarından dolayı bilim dünyasında önemli bir yere sahiptir. Örneğin gram negatif özellikteki *P. fluorescens*, bitki gelişimine, canlılığına ve patojenlerle başa çıkmada bitkinin kabiliyetini artırarak yüksek verim elde edilmesine pozitif etkiye bulunmaktadır (Ramamoorthy *et al.* 2001; Nandakumar *et al.* 2001; Vivekananthan *et al.* 2004; Mayak *et al.* 2004a; Saravanakumar *et al.* 2006). Yine alpin ve subalpin bölgelerde soğuğa adapte olan bakterilerle ilgili yapılan mevcut çalışmalarda en çok *Pseudomonas* cinslerinin varlığından söz edilmekle beraber, bu bölgelerde yaşamak için etkili mekanizmalara sahip diğer cinslerin genellikle az olduğu vurgulanmıştır (Meyer *et al.* 2004).

Pseudomonas türlerinin PGPR elemanı olarak bir başka üstünlükleri biyodegradasyon ve mineralizasyon yetenekleridir. Yağ artıkları, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve polisiklik bifenil gibi organik çevre kirleticilerini bitkisel olarak temizleme yolları ve bununla ilgili birçok ticari ürün geliştirilmiştir. Ancak çoğu bitki ve ağaç türü bazı organik bileşikleri ayrıştırırken yüksek moleküller ve su eksikliğinden ötürü degradasyon zorlaştığından bu maddelerin bitki kökleri tarafından ayrıştırılmasını kolaylaştırıcı degradatif bakterilere son derece ihtiyaç vardır. Normal topraklarda

bulunan bakteri popülasyonu kompleks organik molekülerin parçalanmasında bir etkiye sahip olmazken, rizosferdeki ayrıştırıcı bakteriler normal popülasyonlarının 100-1000 katı daha fazla bir popülasyonla bu işi yapabilmektedir. Ancak bu bakterilerle aynı rizosferde bulunan bitkiler bu sonuçtan olumsuz etkilenebilir. Bu durum bitkiler tarafından bir stres faktörü olarak algılanır ve bitkide stres etileni sentezi artar.

ACC deaminaz aktivitesine sahip olduğu ilk olarak bu araştırmada belirlenen bir başka dikkat çekici tür de *Leucobacter iarius*'tur. İlk olarak Vishal *et al.* (2007) tarafından entomopatojenik bir nematod olan *Steinernema thermophilum*'dan izole edilerek tanımlanan bu bakteri, Microbacteriaceae familyasına mensuptur. GBK 2 koduyla araştırmamızda yer alan bu türün Gram pozitif ve çubuk şekilli bir bakteri olduğu, katalaz ürettiği, endospor oluşturmadığı ve krem renginde koloniler oluşturduğu görülmüştür. Bu özellikler Vishal *et al.* (2007) tarafından ilk tanımlanan türe ait özelliklerle de benzerlik arz etmektedir.

Araştırmamızda etkili bulunan 8 izolata ait α -ketobütirat değerleri μmol olarak şöyledir: *Stenotrophomonas maltophilia*: $1,207\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; *Leucobacter iarius*: $0,993\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; *Pseudomonas fluorescens*: $0,962\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; *Pseudomonas migulae*: $0,951\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; *Enterobacter cloacae*: $0,689\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; *Pseudomonas carica papayae*: $0,545\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; *Pseudomonas fluorescens*: $0,309\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$; *Pseudomonas migulae*: $0,307\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$.

İzolatlarımızdan en etkili bulunan ve ilk üçü olan *S. maltophilia*, *L. Iarius* ve *P. fluorescens* ile daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından elde edilen izolatlara ait en yüksek α -ketobütirat değerleri Çizelge 5.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Belirtilen izolatlara ait α -ketobütirat değerleri

| İzolat | α -ketobütirat (μmol) | Kaynak |
|-------------------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1,207 | Bu araştırma |
| <i>Leucobacter iarius</i> | 0,993 | Bu araştırma |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0,962 | Bu araştırma |
| ACC5 | 0,174 | Shaharoona <i>et al.</i> 2006 |
| S20 | 0,442 | Nadeem <i>et al.</i> 2006 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> TDK1 | 0,342 | Saravanakumar and Samiyappan 2006 |
| <i>Burkholderia</i> sp. | 16,5 | Li <i>et al.</i> 2011 |

Çizelge 5.1.'de de görüldüğü gibi izolatlarımızın ACC deaminaz aktivitesi ACC5, S20 ve *P. fluorescens* TDK1 türlerinden yüksek, *Burkholderia* cinsine göre ise daha düşüktür. Ancak araştırmamızda elde edilen izolatların soğuğa toleranslı olması nedeniyle soğuk bölgelerde kullanılabilirliği açısından ayrı bir üstünlüğe sahip olduğu da hesaba katılmalıdır. Ayrıca ACC deaminaz aktivitesinin düşük bir miktarı (≥ 20 nmol α -ketobütirat $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) bakterinin ACC üzerinde gelişmesi ve PGPR olarak davranması için yeterli bulunmuştur. Üstelik daha fazla miktarda ACC deaminaz aktivitesine (300-400 nmol) sahip olan bakterilerin daha düşük aktiviteye sahip olanlardan daha fazla miktarda kök gelişimine sebep olmadığı saptanmıştır (Penrose and Glick 2003). Bu bağlamda düşük ACC deaminaz aktivitesi gösteren izolatlarımız da PGPR olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abd-Alla, M.H., 1994. Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum biovar. v viceae* phosphatases. *Biol Fertil Soils*, 18, 216–218.
- Abeles, F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E., 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego. CA. p. 414.
- Abeles, F.B., Morgan, P. W., Saltveit M. E., 1992. Ethylene in plant biology. New York: Academic Press
- Abeles, F.B., 1993. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York
- Akhtar, M. J., Arshad M., Khalid A., and Mahmood H. M., 2005. Substrate-dependent biosynthesis of ethylene by rhizosphere soil fungi and its influence on etiolated pea seedlings. *Pedobiol.*, 49, 211-219.
- Alcoma, I. E., 1996. Fundamental of Microbiology. An Imprint of Addison Westley Longman, Inc., 15nd ed., 770-771.
- Altındağ, M., Şahin, M., Eşitken, A., Ercişli, S., Güleriyüz, M., Dönmez, M.F., Şahin, F., 2006. Biological control of Brown rot (*Monilia laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholdria*, and *Pseudomonas* application under in vitro and in vivo conditions. *Biological Control*, 38, 369-372.
- Amer, G. A. and 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.
- Anonim, 2013. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas> 03.01.2013.
- Anonymous, 2003a. Pesticides in bottled water. *The Times of India*, New Delhi, 5 February.
- Anonymous, 2013. [www.http://genome.jgi-psf.org/stema/sterarhome.html](http://genome.jgi-psf.org/stema/sterarhome.html)
- Antoun, H., 2003. Field and Green house Trials Performed with Phosphate Solubilizing Bacteria and Fungi <http://www.webcd.usal.es/web/psm/abstracts/antoun.htm> (15.01.2012).
- Arshad, M. and W.T. Frankenberger, Jr., 1991. Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*, 133: 1-8.
- Arshad, M., Frankenberger, W.T., 1998. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Adv. Argon.*, 62,146–151.
- Arshad, M., Frankenberger, Jr.W.T., 2002. Ethylene: Agricultural sources and applications. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic/Plenum Publishers New York
- Arshad, M., M. Saleem and S. Hussain., 2007. Perspectives of bacterial ACC-deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology*. 25, 356-362.
- Arshad, M., B. Shaharoon and T. Mahmood., 2008. Inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of water stress on growth, yield and ripening of *Pisum sativum* L. *Pedosphere*, 18(1), In Press.
- Babalola, O.O., Osir, E.O., Sanni, A.I., Odhaimbo, G.D., Bulimo, W.D., 2003. Amplification of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic (ACC) deaminase from

- plant growth promoting rhizobacteria in *Striga*-infested soils. *African J. Biotechnol*, 2, 157-160.
- Bakermans C., 2007. Genetic approaches to determining psychrotolerance mechanisms. Oral presentation, 108th General Meeting, ASM, Toronto, Canada.
- Banik, S. and Dey, B.K., 1982. Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphatesolubilizing microorganisms. *Plant Soil*, 69, 353-364.
- Barka, E.A., Nowak, J., Clément, C., 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *Appl Environ Microbiol*, 72, 7246-7252.
- Bashan, Y., Harrison, S. K. and Whitmoyer, R. E., 1990. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl Environ Microbiol*, 56, 769-775.
- Bashan, Y., 1994. Symptom expression and ethylene production in leaf blight of cotton caused by *Alternaria macrospora* and *Alternaria alternata* alone and combined. *Can. J. Bot.*, 72, 1574-1579.
- Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Lebsky, V.K., Moreno, M. and Bashan, Y., 2000. Improved growth and water bioremediation capacity of the microalgae *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate beads with the plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense*. 5th International plant growthpromoting rhizobacteria workshop. Villa Carlos Paz, Argentina
- Belimov, A.A., Safronova, V.I., Mimura, T., 2002. Response of spring rape to inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylatedeaminase depends on nutrient status of the plant. *Can. J. Microbiol*, 48, 189-199
- 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.,
- Bensalim, S., Nowak, J., Asiedu, S.K., 1998. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *Am J Potato Res*, 75, 145–152.
- Bernard, R., Glick Zhenyu C., Jennifer C. and Jin Duan., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria *Eur J Plant Pathol*, 119, 329–339 DOI 10.1007/s10658-007-9162-4
- Biswas, J. C., Ladha, J.K. and Dazzo, F.B., 2000a. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci Soc Am J*, 64, 1644-1650.
- Biswas, J. C., Ladha, J.K. Dazzo, F.B., Yani, Y.G. and Rolfe, B.G., 2000 b. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agron. J*, 92, 880-886.
- Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M.S., Moëgne-Loccoz, Y., 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol*, 56, 455–470.
- Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Cur Opin Plant Biol*, (4), 343–350.
- Blumwald, E., 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 431–434.

- Bray, E.A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci*, 2, 48–54.
- Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R., 1998. A plant growthpromoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3663–3668.
- Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R., 2000. Plant growthpromoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol*, 46, 237–245.
- Canbolat, M., Bilen, S., Cakmakçı, R., Fiahin, F., Aydın, A., 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol. Fertil. Soils*, 42, 350–357.
- Cattelana, A.J., Hartela, P.G. and Fuhrmann, J.J., 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J*, 63, 1670-1680.
- Cheikh, N. and Jones, R.J., 1994. Disruption of maize kernel growth and development by heat stress (role of cytokinin/abscisic acid balance). *Plant Physiol*, 106, 45-51.
- Chen, Y., Mei, R., Lu, S., Liu, L. and Kloepper, J.W., 1996. The use of Yield Increasing Bacteria (YIB) as Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Chinese Agriculture. *Management of soil borne diseases*, R. S. Utkhede and V. K. Gupta ed. Kalyani publishers, Ludhiada. New delhi.
- Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N. and Paulitz, T.C., 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Physiol Mol Plant Pathol*, 56, 13-23.
- Cheng, Z., Park, E. and Glick, B.R., 2007. 1-Aminocyclopropane-1- carboxylate (ACC) deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Can J Microbiol*, 53, 912-918.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*, 71, 4951-4959.
- Cuartero, J. And Fernandez-Munoz, R., 1999. Tomato and salinity. *SciHortic*, 78, 83-125.
- Cunningham, J.E. and Kuyucak, C., 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphates by *Penicillium bilaii*. *Appl Environ Microbiol*, 58, 1451-1458.
- Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydın, A. ve Şahin, F. 2004. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, soil properties and bacterial counts. *Can J Microbiol*
- Çakmakçı, R., 2005a. Bitki gelişiminde fosfat çözücü bakterilerin önemi. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (35), 93-108.
- Çakmakçı, R., 2005b. Bitki gelişimini teşvik eden rizobakterilerin tarımda kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36, 97-107.
- Çakmakçı, R., Aydın, D.F. ve Şahin, A.F., 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under green house and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1482-1487.
- Çakmakçı, R., Dönmez, M.F., Erdoğan, Ü., 2007a. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish J. Agric. For.*, 31, 189-199.

- Çakmakçı, R., Erat, M., Erdoğan, Ü., Dönmez, F., 2007b. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci*, 170, 288-295.
- Dart, P.J., 1986: Nitrogen fixation associated with non-legumes in agriculture. *Plant Soil*, 90, 303-334.
- Data, M., Banish, S. and Dupta, R.K., 1982. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil*, 69, 365-373.
- de Freitas, J.R., Banerjee M.R., Germida, J.J., 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but no phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.), *Biol. Fertl. Soils*, 24, 358-364.
- de Prado, J.L., de Prado, R.A., Shimabukuro, R.H., 1999. The effect of diclofop on membrane potential, ethylene induction, and herbicide phytotoxicity in resistant and susceptible biotypes of grasses. *Pestic Biochem Physiol*, 63, 1-14.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., Chauhan, S.M., 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Aracis hypoggaea* L.) by application of plant growth-promotin rhizobacteria. *Microbiol Res*, 159, 371-394
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y., 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol*, 28, 871-879.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y., 2003. Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci*, 22, 107-149.
- Dodd, I.C., Belimov, A.A., Sobeih, W.Y., Safronova, V.I., Grierson, D., Davies, W.J., 2005. Will modifying plant ethylene status improve plant productivity in water-limited environments 4th International Crop Science Congress.
- Domenech, J., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Ramos, B., Gutierrez- Mañero, J., 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Biocontrol*, 51, 245-258.
- Döbereiner, J., Reis, V.M., Paula, M.A., Olivares, F., 1993 b. Endophytic diazotrophs in sugarcane, cereals and tuber plants.. in *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios R. et al., (eds.). Boston: Kluwer Academic. 671-676
- Duan, J., Müller, K. M., Charles, T. C., Vesely, S., Glick, B. R., 2006. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in *Rhizobia*: Isolation, characterization and regulation. *Proceedings of the 7th International PGPRWorkshop*. Amsterdam. 205-216.
- Ehrlich, H.L., 1990. Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik. In: Einsele, A. Finn, R.K. and Samhaber, W. Eds., *Geomicrobiology* (2nd ed.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- E.J., van Doorn, W.G., 1988. Role of ethylene in senescence of petals-morphological and taxonomical relationships. *J Expl Bot*, 39, 1605-1616.
- E. Knill, B.R Glick and G. Defago. 2000. Effect of transferring 1- aminocyclopropane 1- carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain

- CHAO and its *gacA* derivative CHA96 on their growth promoting and disease suppressive capacities. *Can. J. Microbiol*, 46, 898-907.
- Else, M.A., Hall, K.C., Arnold, G.M., Davies, W.J., Jackson, M.B., 1995. Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid, phosphate, and nitrate from roots to shoots of flooded tomato plants. *Plant Physiol*, 107, 377–384.
- Else, M.A., Jackson, M.B., 1998. Transport of 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in the transpiration stream of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in relation to foliar ethylene production and petiole epinasty. *Australian J. Plant Physiol*, 25, 453-458.
- Ernst, W.H.O., 1998. Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. In: Schüürmann G, Markert B (eds) *Ecotoxicology*. Wiley, New York, 587-620.
- Esashi Y., 1991. Ethylene and seed germination. In: Matoo AK, Suttle JC, (eds) *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL,. 133-157
- Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S., Sahin, F., 2002. Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu-142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum blight*) of apricot. *Gartenbauwissenschaft*, 67, 139-142.
- Estevez de Jensen C. , Percich, J. A. and Graham, P. H. 2002. Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Field Crop Res*, 74, 107-115.
- Fallik, E., Sarig, S., Okon, Y., 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: Okon Y (ed) *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, London, 77-86.
- Farwell, A.J., Vesely, S., Nero, V., Rodriguez, H., Shah, S., Dixon, Flaishman, M.A., Z. Eyal, A. Zilberstein, C. Voisard and D. Hass. 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. *Molecular and Plant-Microbe Interaction*, 9, 642-645.
- Foolad, M.R. and Lin, G.Y., 1997. Genetic potential for salt tolerance during germination in *lycopersicon* species. *Hortscience*, 32(2), 296-300.
- Frankenberger, W.T.and Arshad, M., 1995. *Phytohormones in soil: microbial production and function*. Marcel Dekker, NewYork.
- Frommel MI., Nowak J., Lazarovits G.,1991. Growth enhancement and development modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol*, 96, 928-936.
- Fürnkranz M., Müller H. and Berg G., 2009. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116 (4), 149-155.
- Gadd, G., 1999. Fungal production of citric and oxalic acid: Importance of metal specification, physiology and biogeochemical processes. *Adv Microb Physiol*, 41, 47-92.
- Georgakopoulos, D. G., Fiddaman, P., Leifert, C. and Malathrakis, N. E., 2002. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *J Appl Microbiol*, 92, 1078-1086.
- Gerday C. and Glandorff N., 2007. *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press, Washington D.C., USA.

- Ghosh, S., Penterman, J.N., Little, R.D., Chavez, R., Glick, B.R., 2003. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the growth of canola seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 41, 277-281.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109-117.
- Glick B.R., Karaturović D.M., Newell P.C., 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can J Microbiol*, 41, 533-536.
- Glick, B.R., Changping, L., Sibdas, G. and Dumbroff, E.B., 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biol Biochem*, 29, 1233-1239.
- Glick, B.R., D.M. Penrose and J. Li. 1998. A model for lowering plant ethylene concentrations by plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190, 63-68.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. and Penrose, D.M., 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London, 134-179.
- Glick, B.R. and Pasternak, J.J., 2003. *Molecular Biotechnology*. Third Edition. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 345-364.
- Glick, B.R., 2005: Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett*, 252, 1-7.
- Glick, B.R., 2006. The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. *Plant Soil*, 288, 309-318.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European J. Plant Pathol*, 119, 329-339.
- Glick, B.R., 2004. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*, 56, 291-312.
- Glick, B.R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett*, 251, 1-7.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., American Society 2003. *Molecular Biotechnology*. Third Edition. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 345-364.
- Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.M.K. and Pasternak, J.J. 1994a. 1 aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase plays a role in plant growth promotion by *Pseudomonas putida* GR12-2? *In: Ryder, M. H., Stephens, P. M., and G. D Bowen, (eds). Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Adelaide: CSIRO, 150-152.*
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol*, 41, 109-117.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G., Penrose, D.M., 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London: Imperial College Press.
- Goldstein, A.H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am J Altern Agric*, 1, 51-57.
- Goldstein, A.H., 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol Agric Hort*, 12, 185-193.

- Greenberg, B.M., Huang, X.D., Gurska, Y., Gerhardt, K.E., Wang, W., Lampi, M.A., Zhang, C., Khalid, A., Isherwood, D., Chang, P., Wang, H., Dixon, D.G., Glick, B.R., 2006. Successful field tests of a multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent petroleum and organic contaminants, Proceedings of the 29th Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar, 1, 389-400.
- Greenland D. and Losleben M., 2001. Structure and function of an alpine ecosystem. In: Bowman WD, Seastedt TR (eds) Climate. Oxford University Press, Niwot Ridge, Colorado, New York, 15-31
- Grichko, V.P., Filby, B. and Glick, B.R., 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC-deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *J. Biotechnol*, 81, 45-53.
- Grichko, V. and Glick, B.R., 2001a. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 11-17.
- Grichko, V.P. and Glick, B.R., 2001b. Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35S, *rolD* or PRB-1*b* promoter. *Plant Physiol Biochem*, 39, 19-25.
- Gull, M., F.Y. Hafeez, M. Saleem, K.A. Malik, 2004: Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Austral. J. Exp. Agric*, 44, 623-628.
- Guinel, F.C. and Geil, R.D., 2002. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. *Canadian J. Bot*, 80, 695-720.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N, Parekh, L.J., Poole, P.S., 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245, 83-93.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., 1998. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *W J Microbiol Biotchnol*, 14, 669-673.
- Hadler, A.K., Mishra, A.K. Bhattacharyya P. and Chakrabarty, P.K., 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J Gen Appl Microbiol*, 36, 81-92.
- Hadler, A.K. and Chakrabarty, P.K., 1993. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol*, 38, 325-330.
- Hägglblom, M. and Margesin, R., 2005. Microbial life in cold ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol Thematic*, 53, 186-188.
- Herbraud, M. and Potier P., 1999. Cold shock response and low temperature Adaptation in Psychrophilic Bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1, 211-219
- Hirsch, A.M. and Fang.Y., 1994. Plant hormones and nodulation: What's the connection? *Plant and Molecular Biology*, 26, 5-9.
- Holguin, G. and Glick, B.R., 2001. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecol*, 41, 281-288.
- Hong, Y., Glick, B.R., Pasternak, J.J., 1991. Plant-microbial interaction under gnotobiotic conditions: a scanning electron microscope study. *Curr Microbiol*, 23, 111-114.

- Honma, M. and Shimomura, T., 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem*, 42, 1825-1831
- Hontzeas, N., Zoidakis, J., Glick, B.R., Abu-Mar, M.M., 2004. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochim Biophys Acta*, 17, 11-19.
- Hyodo, H., 1991. Stress/wound ethylene. In A. K. Mattoo, J. C. Shuttle (Eds.), *The plant hormone ethylene*. Boca Raton: CRC Press, 65-80.
- Huang, X.-D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2004. Responses of plants to creosote during phytoremediation and their significance for remediation processes. *Environ. Pollut*, 130, 453-463.
- Huang, X.-D., El-Alawai, Y., Gurska, J., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2005. A multi process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem. J*, 81, 139-147.
- Illmer, P. and Schinner, F., 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*, 24, 389-395.
- Ingram, J., Bartels, D., 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 377-403.
- Jackson, M.B., 1991. Ethylene in root growth and development. In: Mattoo AK, Suttle JC (eds) *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL, 159-181
- Jackson, M.B., 1997. Hormones from roots as signal for the shoots of stressed plants. *Trends Plant Sci*, 2, 22-28.
- Jacobson, C.B., Pasternak, J.J. and Glick, B.R., 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol*, 40, 1019-1025.
- Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A. and Asadi Rahmani, H., 2009. Use of ACC Deaminase –Containing Fluorescent *Pseudomonads* to Alleviate Effects of Salinity on Canola (*Brassica napus* L.) Growth in Germination Stage Iranian J. Soil Research (Soil Water Sci), 23(1).
- Jansonius, N.J., 1998. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Cur Opin Struct Biol*, 8, 759-769.
- Ji, P., Campbell, H.L., Kloepper, J.W., Jones, J.B., Suslow, T.V., Wilson, M., 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol Control*, 36, 358-367.
- Jia, Y.J., Kakuta, Y., Sugawara, M., Igarashi, T., Oki, N., Kisaki, M., Shoji, T., Kanetuna, Y., Horita, T., Matsui, H., Honma, M., 1999. Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 542-549.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L.M., 2005. Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol*, 187, 6488-6498.
- Johnson, P.R. and J.R. Ecker., 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu. Rev. Genet*, 32, 227-254.

- Jones, D.L. and Darrah, P.R., 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil*, 166, 247-257.
- Kadıoğlu, A., 1998. Bitki Fizyolojisi, Trabzon, 84-99.
- Kantar, F., 1997. Proceeding of Training Course on Bio-organic Farming systems for Sustainable Agriculture (Nov. 26 to Dec. 6, Cairo Egypt) Cairo-Egypt, 270-272.
- Kantar, F., Kızıloğlu, T. ve Algur, Ö.F., 1999. GAP için Biyo-organik tarım sistemleri.I. Tarım Kongresi, Şanlıurfa.
- Karagöz, H.,2012. ACC deaminaze içeren bitki büyümesini teşvik edici bakteriler tarafından su stresinin azaltılması ve şeker pancarı (*B.eta vulgaris* l.) gelişmesinin artırılması. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kausari, R. and Shahzad, S.M., 2006. Effect of ACC deaminase Containing Rhizobacteria on Growth Promotion of Maize under salinity stress *Journal of agriculture & Social Sciences M.*, 02(4), 216-218
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 44,283-307.
- Kennedy, I.R., L.L. Pereg-Gerk, C. Wood, R. Deaker, K. Gilchrist and S. Katupitiya. 1997. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant Sciences*, 194, 65-79.
- Khalid, A., Akhtar, M.J., Mahmood, M.H., and Arshad, M., 2006. Effect of substrate-dependent microbial produced ethylene on plant growth. *Microbiol*, 75, 231-236
- Khosravi, H. A., Alikhani and Yakhchali B., 2008. Effect of ACC Deaminase Producing *Rhizobium* Strains on Growth of Wheat in Salinity Stress Conditions *Iranian Journal Of Soil And Water Research*, 39(1), 93-102.
- 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 sugar beet with fungicides and antagonistic bacteria. *Pant Dis*, 85, 718-722.
- Kim, K.Y, Jordan D. and McDonald G.A., 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biol Biochem*, 30, 995-1003.
- Kim, K.Y, McDonald G.A., and Jordan D., 1999. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *E. Coli* in culture medium. *Biol Fert Soil*, 24, 347-352.
- Klement, Z., Rudolph K., Sands, D.C., 1990. *Methods in phytopathology*. Akademiai Kiado, 153-180, Budapest.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R, Schroth, MN., 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sci: Anim Plant Sci*, 20, 60-64.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, K. and Zablutowicz, R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*, 7, 39-43.
- Kloepper, J.W. and Beauchamp, C.J., 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can J Microbiol*, 38, 1219-1232.
- Kloepper, J.W., 1994. Plant growth promoting bacteria (other systems). In: J. Okon Editor, *Azospirillum/Plant Association* CRC Press, Boca Raton, FL, 137-154.
- Kottmeier, S.T, Sullivan C.W., 1990) Bacterial biomass and production in pack ice of Antarctica marginal ice age zones. *Deep Sea Res*, 37, 1311-1330

- Kucey, R.M.N., Janzen, H.H. and Legett, M.E., 1989. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Adv Agron*, 42, 199-228.
- Kumar, V. and Narula, N., 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum*. *Biol Fert Soils*, 28, 301-305.
- Kumar, J., Negi, Y.K., Gerg, S.K., 2005. Cold-tolerant fluorescent *Pseudomonas* isolates from Garhwal Himalayas as potential plant growth promoting and biocontrol agents in pea. *Curr Sci*, 89, 2151-2156
- Küçük, Ç., Güler, İ., 2009. Bitki gelişimini teşvik eden bazı biyokontrol mikroorganizmalar. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 07(1), 30-42. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702090103.pdf
- Lee, K.H., LaRue, T.A., 1992. Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol*, 100, 1759-1763.
- Li Z., S., Chang, L., Lin, Y. Li, and Q. An., 2011. A colorimetric assay of 1 aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. *Letters in Applied Microbiology*, 266, 8254.
- Ligero, F., Caba, J.M., Lluch, C. and Olivares, J., 1991. Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinyl glycine. *Plant Physiology*, 97, 1221-1225.
- Lipson, D.A., Schmidt, S.K., and Monson, R.K., 1999. Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem. *Ecology* 80, 1623-1631.
- Lipson, D.A., Schmidt, S.K., and Monson, R.K., 2000. Carbon availability and temperature control the post-snowmelt decline in alpine soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem*, 32, 441-448.
- Lipson, D.A., Schadt, C.W., and Schmidt, S.K., 2002. Changes in soil microbial community structure and function in an alpine dry meadow following spring snowmelt. *Microb. Ecol.*, 43, 307-314.
- Liu, L., Kloepper, J.W. and Tuzun, S., 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 85, 695-698.
- Liu, T.S., Lee, L.Y., Tai, C.Y., Hung, C.H., Chang, Y.S., Wolfram, J.H., Rogers R. and Goldstein, A.H., 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101. *J Bacteriol*, 174, 5814-5819.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., 2004. Application of Free Living Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Kluwer Academic Publishers*. Printed in Netherlands, 86, 1-25.
- Lund, S.T., Stall, R.E., Klee, H.J., 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*, 10, 371-382.
- Lürssen K., Naumann, K. And Schröder, R., 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid an intermediate of the ethylene biosynthesis in higher plants, *Z. Pflanzenphysiol.*, 92, 285-294.
- Ma, W., Guinel, F.C. and Glick, G.R. 2003. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4396-4402.

- Ma, J.H., Yao, J.L., Cohen, D., Morris, B., 1998. Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Rep*, 17, 211-214.
- Ma, W., Sebestianova, S., Sebestian, J., Burd, G.I., Guinel, F., Glick, B.R., 2003a. Prevalence of 1-aminocyclopropa-1- carboxylate deaminase in *Rhizobia* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83, 285-291.
- Ma, W., Guinel, F.C., Glick, B.R., 2003b. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ACC deaminase protein promotes the nodulation of pea plants. *Appl Environ Microbiol*, 69, 4396-4402.
- Ma, W., Charles, T.C., Glick, B.R., 2004. Expression of an exogenous 1 aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Appl Environ Microbiol*, 70, 5891-5897.
- MacDermott, T.R., 1999. Phosphorus assimilation and regulation in Rhizobia. In *Nitrogen Fixation in Prokaryotes: Molecular and Cellular Biology*. Ed. EW Triplett. Horizon Sci. Pres USA.
- Machackov, C., N. Dewitte and W. Van Onckele.,1997. Diurnal fluctuation in ethylene formation in *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiol*, 113, 981-985.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Ryu, J., Sa, T., 2006. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fissawaense*. *Planta*, 224, 268-278.
- Margolin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C(eds) (2008). *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Mattoo, A.K., Suttle, J.C., 1991. *The Plant Hormone Ethylene*. CRC Press, Boca Raton,
- Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B.R., 1999. Effect of wild type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mungbean cuttings. *J. Plant Growth Regul*, 18, 49-53.
- Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R., 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato to salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 42, 565-572.
- Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R., 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. *Plant Sci*, 166, 525-530.
- Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B.R., 2004b. Plant growth promoting bacteria that confer resistance in tomato and pepper to salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 167, 650-656.
- McCune, J.M., 1975. Definition of invisible injury in plants. In: Treshow M (ed) *Interaction of air pollutants and plant diseases* (In: *Responses of Plants to Air Pollution* (ed. Mudd), J.B. and Kozlowski, T.T), Academic Press, New York, 122, 307-334.
- McKeon T.A., Hoffmann, N.E. and Yang, S.F., 1982. The effect of plant-hormone pretreatments on ethylene production and synthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in water-stressed wheat leaves. *Planta*, 155, 437-443.
- Mendelsohn, F.L., Rosenberg, N.J., 1994. Framework for integrated assessments of global warming impacts. *Clim Change*, 28, 15-44.
- Meyer, A.F., Lipson D. A., Martin A. P., Schadt C. W. and Schmidt S. K., 2004. Molecular and Metabolic Characterization of Cold-Tolerant Alpine Soil *Pseudomonas*. *Sensu Stricto Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 483-489
- Minami, R., Uchiyama, K., Murakami, T., Kawai, J., Mikami, K., Yamada, T., Yokoi, D., Ito, H., Matsui, H., Honma, M., 1998. Properties, sequence, and synthesis in

- Escherichia coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. J Biochem (Tokyo), 123, 1112-1118.
- Mishra P.K., Bisht, S., Selvakumar S.C., Kundu, G., Bisht, S., and Gupta, J.K., 2009. Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium *Pseudomonas* sp. NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas Biol Res, 42, 305-313.
- Moeder, W., Barry, C.S., Tauriainen, A.A., Betz C., Tuomainen, J., Utriainen, M., Grierson, D., Sandermann, H., Langebartels, C., Kangasjärvi, J., 2002. Ethylene synthesis regulated by bi-phasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. Plant Physiol, 130, 1918-1926.
- Morgan, P.G. and M.C. Drew. 1997. Ethylene and plant responses to stress. Physiol. Plant, 100, 620-630.
- Mordukhova, E.A., Skvortsova, N.P., , Kochetkov, V.V., A.N and. Dubeikovskii Boronin, A.M., 1991. Synthesis of the phytohormone indole-3-acetic acid by rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*. Mikrobiologiya, 60, 494-500.
- Morita, R.Y., 1975. Psychrophilic bacteria of microorganism. Bacterial Rev, 39, 144-167
- Nadeem, S.M., Z.A. Zahir, M. Naveed, M. Arshad and S.M. Shahzad. 2006. Variation in growth and ion uptake of maize due to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria under salt stress. Soil and Environment, 25, 78-84.
- Nadeem, S. M. , Hussain I., Naveed, M., Asghar, H.N., Zahir, Z. A. and Arshad, M., 2006. Performance of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase activity for improving growth of maize under salt-stressed conditions. Pak. J. Agri. Sci, Vol. 43(3-4),
- Nadeem, S.M., Z.A. Zahir, M. Naveed and M. Arshad. 2007. Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC-deaminase activity. Canadian Journal of Microbiology, 53, 1141-1149.
- Nakajima, N., Itoh, T., Takikawa S., Asai N., Tamaoki M., Aono, M., 2002. Improvement in ozone tolerance of tobacco plants with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. Plant Cell Environ, 25, 727-735.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microb Lett, 170, 265-270.
- Nautiyal, C. S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verma, D., 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS Microb Lett, 182, 291-296.
- Nayani, S., Mayak, S., Glick, B.R., 1998. The effect of plantgrowth promoting rhizobacteria on the senescence of flower petals. Ind J Exp Biol, 36, 836-839.
- Naz, I. and Bano, A., 2012. Assesment of phytohormones producing capacity of *Stenotrophomonas maltophilia* SSA and its interaction with *Zea mays*, Pak. J. Bot.,44(1), 465-469.
- Nie, L., Shah, S., Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R., 2002. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. Plant Physiol Biochem, 40, 355-361.
- Nukui, N., Ezura, H., Yuhashi, K., Yasuta, T., Minamisawa, K., 2000. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on

- nodulation in *Lotus japonicus* and *Macrotium atropurpureum*. *Plant Cell Physiol*, 41, 893-897.
- Okazaki, S., Nukui, N., Sugawara, M., Minamisawa, K., 2004. Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Microbes Environ*, 19, 99-111.
- Oldroyd, G.E.D., Engstrom, E.M., Long, S.R., 2001. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 13, 1835-1849.
- Ögütçü, H., Algur, O. F., Elkoca, E., Kantar, F., 2008. The determination of symbiotic effectiveness of *Rhizobium* strains isolated from wild chickpeas collected from high altitudes in Erzurum. *Turk J. Agric. Res. For.*, 32, 241-248.
- Pandey, P., Kang, S.C., Maheshwari, D.K., 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr Sci*, 89, 170-180.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, 3795-3801.
- Peng, S., Biswas, J. C., Ladha, J. K., Gyaneshwar, P. and Chen, Y. 2002. Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. *Agron J.*, 94, 925-929.
- Penrose, D.M., Moffatt, B.A., Glick, B.R., 2001. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase containing bacteria on roots of canola seedlings. *Can J Microbiol*, 47, 77-80.
- Penrose, D.M. and Glick, B.R., 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118, 10-15.
- Phadtare, S., Alsina, J., Inouye, M., 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol*, 2, 175-180.
- Ping L. and Boland W., 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis, *Trends in Plant Science* Vol. 9 No.6 Elsevier
- Prasad, M.N.V., Strazalka, K., 2000. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Publishers, Boston, s. 153-160.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moenne-Loccoz, Y., 2008. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, (6).
- Reed, M.L.E. and Glick, B.R., 2005. Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Microbiol*, 51, 1061-1069.
- Reid, M.S. and Wu, M.J., 1992. Ethylene and flower senescence. *Plant Growth Regul* 11, 37-43.
- Reid M.S., 1995. Ethylene in plant growth, development and senescence. *In: Davies, P. J. (ed.) plant hormone, physiology, biochemistry and molecular biology.*
- Remans, R., Croonenborghs, A., Gutierrez, R.T., Michiels, J., Vanderleyden, J., 2007. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *European J. Plant Pathol*, 119, 341-351.

- Renwick, A., Campbell, R. and. Coe, S., 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40, 524-532.
- Robison, M.M., Shah, S., Tamot, B., Pauls, K.P., Moffatt, B.A., Glick, B.R., 2001b. Reduced symptoms of *Verticillium* wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Mol Plant Pathol*, (2), 135-145.
- Robertson, G.P., Paul, E.A., Harwood, R.R., 2000. Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science*, 289, 1922-1924.
- Rodecap, K.D., Tingey, D.T., Tibbs, J.H., 1981. Cadmium-induced ethylene production in bean plants. *Z Pflanzenphysiol*, 105, 65-74.
- Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promoting. *Biotechnol Adv.* 17, 319-339.
- Rubinstein, B., 2000. Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol Biol*, 44, 303-318.
- Russell, N.J., Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A., Abee, T., 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *Int J Food Microbiol*, 28, 255-261.
- Saber, M.S.M., 2001. Clean Biotechnology for sustainable farming. *Eng. Life Sci.*, 1, 217-223.
- Sadrnia, M., maksımava, N., Khromsova, E., Stanislavich, S., Owlia, P., Arjomandzadegan, M., 2011. Study the effect of bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) on resistance to salt stress in tomato plant *Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie Tom.*, 18(2), 120-123
- Safronova, V.I., Stepanok, V.V., Engqvist, G.L., Alekseyev, Y.V., Belimov, A.A. 2006. Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biol. Fertil. Soils*, 42, 267-272.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S., 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Trends Biotechnol*, 25, 356-362
- Salisbury, B.F. and W.C, Ross. 1992. *Plant Physiology*, Wadsworth Publ. Co, 14. Assimilation of Nitrogen and Sulfur.
- Saravanakumar, D. and Samiyappan, R., 2006. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.
- Schadt, C.W., Martin, A.P., Lipson, D.A., and Schmidt, S.K., 2003. Seasonal dynamics of novel fungal lineages in tundra soils. *Science* (301), 1359-1361.
- Scher F.M. and Baker, R., 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 72, 1567-1573.
- Schmidt, S.K., . Lipson, D.A, Ley, R.E., Fisk, M.C. and West.A.E. Impacts of chronic nitrogen additions vary seasonally and by microbial functional group in tundra soils. *Biogeochemistry*, in press.
- Selvakumar, G., Kundu, S., Joshi, P., Sehar Nazim A.D., Gupta, P.K., Mishra, H. S. Gupta., 2008. Characterization of a cold-tolerant plant growth-promoting bacterium *Pantoea dispersa* 1a isolated from a sub-alpine soil in the north Western Indian Himalayas *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 955-960

- Sergeeva, E., Shah, S., Glick, B.R., 2006. Tolerance of transgenic canola expressing a bacterial ACC deaminase gene to high concentrations of salt, *World J. Microbiol Biotechnol*, 22, 277-282.
- Seshadri, S., Muthukumarasamy, R., Lakshminarasimhan, C., Lgnacimuthu, S., 2000. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current science*, 79 (5), 565-567.
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Barka, E., Wang-Pruski, G., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., Nowak, J., 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. Nov., a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 1187-1192.
- Shaharoon, B., Arshad, M. and Zahir, Z.A., 2006a. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett. Appl. Microbiol*, 42, 155-159.
- Shaharoon, B., Bibi, R., Arshad, M., Ahmed Zahir, Z., and Zia-Ul, H., 2006. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-Vdeaminase rhizobacteria extenuates acc-induced classical triple response in etiolated pea seedlings *Pak. J. Bot.*, 38(5), 1491-1499
- Shahzad, S.M., Arshad, M., Kalil-ur-Rehman., 2010. Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. *Soil & Environ*, 29(1), 38-46.
- Shanahan, P., O'Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D. and O'Gara F., 1992. Isolation of 2, 4- Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied Environment and Microbiology*, 58, 353-358.
- Shanthaam, S. and Mattoo, A.K., 1997. Enhancing biological nitrogen fixation: An appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. *Plant Soil*, 194, 205-216.
- Sheehy, R.E., Honma, M., Yamada, M., Sasaki, T., Martineau, B. and Hiatt, W.R., 1991. Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *J Bacteriol*, 173, 5260-5265.
- Sinn, J.P., Schlaghauer, C.D., Arteca, R.N., Pell, E.J., 2004. Ozone-induced ethylene and foliar injury responses are altered in 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase antisense potato plants, *New Phytol*, 164, 267-277.
- Sisler, E. C., Serek, M., 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *PhysiolPlant*, 100, 577-582.
- Skrary, F.A. and Cameron, D.C. 1998. Purification and characterization of a *Bacillus licheniformis* phosphatase specific for D-alpha-glycerphosphate. *Arch Biochem Biophys*, 349, 27-35.
- Stearns, J.C., Glick, B.R., 2003. Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances*, 21, 193-210.
- Stearns, J.C., Shah, S., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., Glick, B.R., 2005. Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. *Plant Physiol Biochem*, 43, 701-708.

- 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, 642-652.
- Strzelczyk, E., Kampert, M., Pachlewski, R., 1994. The influence of pH and temperature on ethylene production by mycorrhizal fungi of pine. *Mycorrhiza*, 4, 193-196.
- Sundara, B., Natarajan, V. and Hari, K., 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crop Res*, 771, 43-49.
- Şahin, F., Çakmakçı, R., Kantar, F., 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil*, 265, 123-129.
- Tabor, C.W. and Tabor, H., 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev*, 49, 81-99.
- Tahir, M., M. Arshad, M. Naveed, Z.A. Zahir, B. Shaharoon and R. Ahmad. 2006. Enrichment of recycled organic waste with N fertilizer and PGPR containing ACC-deaminase for improving growth and yield of tomato. *Soil and Environment*, 25, 105-112.
- Taiz, L. and Zeiger, E., 1991. *Plant Physiology*, The Benjamin / Cumming Pub. Co. Inc. California, 405-421.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., 1989. 4. Sınıf mikrobiyoloji laboratuvarı klavuzu TC Anadolu Üniv. eğitim sağlık ve bilimsel araştırma çalışmaları vakfı yayınları no: 74(3), Eskişehir.
- Thaller, M.C., Berlutti, F., Schippa, S., Iori, P. Passariello C. and Rossolini, G.M., 1995. terogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass Polipeptides in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Int J Syst Bacteriol*, 4, 255-261.
- Thomas, G.V., 1985. Occurrence and ability of phosphate-solubilizing fungi from coconut plant soils. *Plant Soil*, 87, 357-364.
- Tuomainen, J., Betz, C., Kangasjarvi, J., Ernst, D., Yin, Z.H., Langebartels, C., Sandermann, H. Jr., 1997. Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: Regulation by differential transcript accumulation for the biosynthetic enzymes. *Plant J*, 12, 1151-1162.
- Vahala, J., Ruonala, R., Keinanen, M., Tuominen, H., Kangasjarvi, J., 2003. Ethylene insensitivity modulates ozone-induced cell death in birch. *Plant Physiol*, Woltering,
- Van Loon, L.C., 2007. Plant responses to plant growth promoting bacteria. *Eur. J. Plant Pathol*, 119, 243-254.
- Van Peer, R. and Schippers B., 1989. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Can J Microbiol*, 35, 456-463.
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. M. and Vassilev, N., 2000. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Proc Bioch*, 35, 693-697.
- Vazquez, P., Holguin G., Puente, M. E., Lopez-Cortes A., Bashan Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils*, 30, 460-468.

- Vedder-Weiss, D., Jurkevitch, E., Burdman, S., Weiss, D., Okon, Y., 1999. Root growth, respiration and beta-glucosidase activity in maize (*Zea mays*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis*, 26, 363-377.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
- Walsh, C., Pascal, R. A., Johnston, M., Raines, R., Dikshit, D., Krantz, A., Honma, M., 1981. Mechanistic studies on the pyridoxal phosphate enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate from *Pseudomonas* sp. *Biochemistry*, 20, 7509-7519.
- Wang, C., Zahir, Z.A., . Munir, A., Asghar, H.N., Shaharoon, B. and Arshad, M., 2007. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of pea (*Pisum sativum*) under drought conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 958-963.
- Wang, S.Y., Wang, C.Y. and Welborn, V.A.R., 1990. Role of ethylene under stress conditions. In: Alscher, R. and J. Cumming (eds.), *Stress Responses in Plant Adaptation and Acclimation Mechanisms*,: 147-173.
- Wang, C., Knill, E., Glick, B.R., Défago, G., 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane -1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. *Can J Microbiol*, 46, 898-907.
- Wang, C., Ramette, A., Punjasamarnwong, P., Zala, M., Natsch, A., Moëgne-Loccoz, Y., Défago, G., 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous Wang, S.Y., C.Y. Wang and A.R. Welborn, 1990. Role of ethylene under stress conditions. In: Alscher, R. and J. Cumming (eds.), *Stress Responses in Plant Adaptation and Acclimation Mechanisms*, Pp: 147-73. Wiley Liss, New York, USA
- Wang, C., Ramette, A., Punjasamarnwong, P., Zala, M., Natsch, A., Moëgne-Loccoz, Y., Défago, G., 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated *Pseudomonads* of worldwide origin. *FEMS Microbiol Ecol*, 37, 105-116
- Wang, K.L., Li, H., Ecker, J.R., 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14, 131-151.
- Walsh, C., Pascal, R. A., Johnston, M., Raines, R., Dikshit, D., Krantz, A., Honma, M., 1981. Mechanistic studies on the pyridoxal phosphate enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate from *Pseudomonas* sp. *Biochemistry*, 20, 7509-7519.
- Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv Agron*, 69, 99-151.
- Whitelaw, M. A., Hardenand, T. A. and Bender, G. L., 1997. Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. *Australian J Soil Res*, 35, 291-300.
- Whipp, J.M., 1990. Carbon utilization. In: Lynch JM (ed) *The rhizosphere*. Wiley, Chichester, 59-97.

- Wu, C.H., Wood, T.K., Mulchandani, A., Chen, W., 2006. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metal, *Appl. Environ. Microbiol*, 72, 1129-1134.
- Yadav, K.S. and Dadarwal, K.R., 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. In: *Biot. Appr. Soil Micr. Sust. Crop Prod. Sci Publis Jodhpur*, 293-308.
- Yildirim, E. and Taylor, A.G., 2005. Effect of biological treatments on growth of bean plants under salt stress. *The Xlviii Report of the Bean Improvement Cooperative*, 48, 84-87.
- Yuhashi, K. I., Ichikawa, N., Ezura, H., Akao, S., Minakawa, Y., Nukui, N., Yasuta, T., Minamisawa, K., 2000. Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. *App Environ Microbiol*, 66, 2658-2663.
- Zahir, Z.A., Arshad, M., Frankenberger, W.T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Adv Agron*, 81, 97-168.
- Zafar-Ul-Hye M., Zahir Z.A., Shahzad S.M., Naveed M., Arshad M. and Khalid M., 2007. Preliminary screening of rhizobacteria containing ACC-deaminase for promoting growth of lentil seedlings under axenic condition. *Pak. J. Bot*, 39(5), 1725-1738.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.