

283931

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYENİN ÇEŞİTLİ YERLERİNDEN İZOLE  
EDİLEN RHİZOBİUM PHASEOLİ SUŞLARININ ETKENLİK  
DURUMLARININ SAPTANMASI

DOKTORA TEZİ

**DENİZ GÖKTAN**

Ziraat Y. Mühendisi  
Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü  
Toprak Biyolojisi Laboratuvarı

ANKARA — 1974

67

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ENSTİTÜSÜ

# TÜRKİYENİN ÇEŞİTLİ YERLERİNDEN İZOLE EDİLEN RHİZOBİUM PHASEOLİ SUŞLARININ ETKENLİK DURUMLARININ SAPTANMASI

DOKTORA TEZİ

**DENİZ GÖKTAN**

Ziraat Y. Mühendisi  
Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü  
Toprak Biyolojisi Laboratuvarı

## İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sahife</u>
I. G İ R İ Ő .....	1
II. G E N E L B İ L G İ .....	3
A. Biyolojik Azot Bağlaması .....	3
B. Nodülasyon ve Azot Bağlamasına Değişik Faktörlerin Etkisi .....	12
C. Ana Besin Maddelerinin Etkisi .....	15
D. Mikroelementlerin Etkisi .....	17
E. Tarım Mücadele İlâçlarının Etkisi .....	19
F. Tohum Aşılması ve Hazırlaması .....	19
III. G E R E Ç ve Y Ö N T E M .....	21
1. Fasulya Kök Numunelerinin Alınması .....	21
2. Kùltürlerin İzolasyonu ve Saklanması .....	21
3. Rhizobium Bakterilerinin Belirlenmesine Yardımcı Olan Testler .....	23
4. Sera Denemesi .....	25
IV. B U L G U L A R .....	32
V. T A R T İ Ő M A .....	44
VI. Ö Z E T .....	57
VII. K A Y N A K L A R .....	58

T A B L O L A R

<u>Tablo</u> <u>No</u>	<u>Sahife</u> <u>No</u>
1. Rhizobium cinsinin, çapraz aşılama gurubuna göre türlerine ayırımı .....	7
2. Bazı baklagillerin simbiyotik yolla bağladıkları azot miktarları .....	12
3. Fasulya kök numunelerinin alındığı yerler .....	22
4. Suşların bazı morfolojik ve boyama özellikleri .....	33
5. Suşların üreme süresi ve koloni özellikleri .....	34
6. Suşların bazı kültürel özellikleri .....	36
7. Suşlarla aşılı köklerde meydana gelen nodozitelerin özellikleri .....	39
8. Saksılardaki kuru madde ağırlıkları .....	40
9. Saksılardaki azot miktarı .....	41
10. Varyans analiz tablosu (ortalama kuru madde gr/saksı).	42
11. Varyans analiz tablosu (ortalama azot mgr/saksı).....	42
12. Saksılardaki ortalama azot miktarları ve suşların etkenlik dereceleri ve girdikleri guruplar .....	43
13. Rhizobiumların özellikleri .....	45
14. Türkiye'nin çeşitli yerlerinden izole edilen suşların etkenlik derecelerine göre bulunma oranları .....	55

## Ş E K İ L L E R

<u>Şekil</u> <u>No</u>		<u>Sahife</u> <u>No</u>
1.	Rhizobiumların hayat dönemindeki morfolojik değişiklikleri .....	5
2.	Baklagillerde simbiyotik azot bağlama mekanizması...	11
3.	Değiştirilmiş leonard'ın şişe kavanoz sistemi .....	26
4.	Kontrol ve aşılı saksılarda bitki gelişmeleri .....	37
5.	Kontrol ve aşılı bitkinin kök yapıları .....	37
6.	Etkili suşlarla aşılı bitkilerin kuru ağırlıkları ve azot miktarları .....	50
7.	Tesbit edilen azot miktarları .....	52
8.	Ortalama kuru ağırlık ile ortalama azot miktarları arasındaki ilişki .....	54

## G İ R İ Ő

Bugün, son 15 yılda dünyamıza katılan 1 milyar civarındaki topluluğu yeterince besleyebilmek, çözümlenmesi gerekli bir sorun olarak ortaya çıkmış bulunmaktadır. Bu artışın % 82'sinin Uzak Doğu, Lâtin Amerika, Afrika ve Yakın Doğu'da yaşıyanlara ait olması ve beslenme yönünden yarı aç bulunmaları durumun önemini açıklığa kavuşturmaktadır. Eğer toprak ve su varlığı, ekonomik kaynaklar, modern ilim yöntemleri uygun ve bilgili bir şekilde kullanılacak olursa yeterli bir tarım ile gerekli besinleri sağlamak mümkün olur.

Bitkisel ve hayvansal besinlerin esas kaynağı olan toprağın, azami verim gücüne ulaşabilmesi için fiziksel ve kültürel işlemlerin yanında, bitki besin maddelerini dengeli ve yeterli seviyede bulundurmak en önemli hususlardan birisidir.

Bu besin maddeleri arasında azot, canlı hücrenin protoplazmasını ve çekirdeğini oluşturan organik bileşiklerin çoğunda temel madde olarak görev aldığı için ayrıca hayati öneme sahip bulunmaktadır.

Doğa, orijinal toprağı azot bakımından çok fakir bırakmasına karşılık, atmosferin volüm esasına göre % 79'unu azot gazı ile doldurmuştur. Bir dekar arazi üzerinde 8.750 ton civarında olan bu azottan yüksek bitkiler ve hayvanlar yararlanamazlar. Çünkü bu moleküller azotun asimilasyonu için gerekli reaksiyonları katalize edebilecek enzim veya enzim sistemlerinden yoksundurlar.

Bitkilerin ihtiyaç duyduğu azotun başlıca kaynağı toprakta bulunan organik maddedir. Mineral topraklar, ortalama % 2 civarında organik maddeye sahip olup, bunun da % 5 kadarı azottur. Bitkilerin faydalanamayacağı, büyük moleküllü organik yapı içinde bulunan bu azotun optimum şartlarda bir yılda, ancak % 5'i mikroorganizmalar aracılığı ile

bitkinin kökleri tarafından alınabilir,  $\text{NO}_3$  ve  $\text{NH}_4$  iyonları haline dönüştürülür. Her sene küçük miktarlarda faydalanılabilir forma gelen bu azotun bir kısmının yıkanma ve erozyon ile kayba uğradığı gözönünde tutulursa genellikle topraktaki azot miktarının bitkilere yeterli bulunmadığı kolayca anlaşılır. Ortaya çıkan bu büyük azot isteği, dünyadaki yıllık üretimi 30 milyon tona ulaşan azotlu gübrelerle karşılanmaya çalışılmaktadır. Ancak üretilen bu miktar, ihtiyacın ancak 1/4'ü olup, geri kalan kısım doğada meydana gelen biyolojik azot bağlama mekanizması ile karşılanmaktadır.

Baklagil cinsine ait bitkilerin köklerinde ortak yaşamak sureti ile havanın serbest azotunu bağlayarak bitkiye ve toprağa kazandıran Rhizobium cinsi bakterileri, biyolojik azot bağlanmasında en önemli rolü oynamaktadır. Yalnız bu yolla dünya azot kazancının yılda 14 milyon tonun üzerinde olduğu hesaplanmaktadır.

Ülkemizde ilk ciddi toprak biyolojisi çalışmaları Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsünde başlatılmış olup, 11 seneden beri devam etmektedir. Sunulan tez bu Enstitünün toprak biyolojisi laboratuvarında hazırlanmıştır.

Çalışmanın Amacı :

- 1- Türkiye'nin çeşitli yörelerinden izole edilen R.phaseoli suşlarının azot bağlama yeteneklerini saptamak,
- 2- Bunlarla aşılama sonucu meydana gelen ürünlerdeki artışı ortaya çıkartmaktır.

Çalışmanın yapılmasında değerli yardımlarını gördüğüm rehber hocam Prof.Dr.Muvaffak Akman'a, Doç.Dr.Melahat Okuyan'a, Doç.Dr.Hüseyin Şahinkaya'ya ve bütün olanakları sağlayan Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürü Mesut Özuygur ile Enstitünün diğer elemanlarına teşekkür ederim.

## I- GENEL B İ L G İ

### A) B İ Y O L O J İ K A Z O T B A Ğ L A N M A S I :

Atmosferdeki elementer azotun ( $N_2$ ) mikroorganizmalar aracılığı ile organik azotlu bileşiklere dönüştürülmesine biyolojik azot bağlanması denir. Doğada bulunan 2 gurup mikroorganizma bu işlemi gerçekleştirir (1,2).

1- Başka bir canlının yardımına istek duymadan ve serbest yaşayarak havanın azotunu bağlarlar. Farklı cinslere ait olan bu çeşitli mikroorganizmalar arasında en önemlileri Azotobacter, Clostridyum, maviyeşil algler, bazı maya ve mantarlardır (3). Bu yolla 1 senede bağlanan azot miktarı optimum şartlarda dekara ancak 3-5 kg. kadardır (4).

2- Yüksek bitkiler ile ortak yaşama sonucu ekseriya köklerde nodozite (yumru) meydana getirerek havanın azotunu bağlarlar. Simbiyotik azot bağlanmasını gerçekleştiren bu gurup 2 alt guruba ayrılır.

a) Aktinomycetes oldukları sanılan değişik tip mikroorganizmaların bazı çalı ve ağaç köklerinde meydana getirdiği simbiyotik sistem (5).

b) Yalnız baklagil bitkileri köklerinde Rhizobium cinsine ait bakterilerin meydana getirdiği simbiyotik sistem (6).

Çin, Yunan ve Roma çağlarında yaşayanlar, baklagil bitkilerinin ekili bulunduğu alanlarda toprak verimliliğinin ve ürünün arttığını biliyorlardı. Fuchsius 1542'de ilk olarak baklagil köklerindeki nodoziteleri inceledi. 1938'de Boussingault bu bitkilerin azot bağladıklarına gösterdi. Frank 1879'da nodozitelerin bir bakteri enfeksiyonu sonucu meydana getirildiğini saptadı ve Rhizobium adını verdi. 1884 yılında Hellriegel ve Wilfarth bu bakterilerin bitki ile ortak yaşama sonucu havanın serbest



azotunu bağladıklarını deneysel olarak gösterdi. 1888 yılında Beijerinck ilk olarak Rhizobium bakterisini saf kültür halinde izole etmeyi başarak fizyolojik karakterlerin incelenmesinde ilk adımı attı (7).

6000 yıldan beri yetiştirilen baklagiller çift çenekli bitkiler olup, Leguminosae familyasına aittirler. Bugün botanistler 10-12.000 türe sahip olduğunu tahmin etmektedirler. Ancak 200 kadarı insanlar tarafından kültüre alınmıştır. Baklagillerin 1200 kadar türü nodülasyon bakımından incelenmiş olup, 133 türü Rhizobium ile ortak yaşama yeteneğinden yoksun bulunmuştur (8.9).

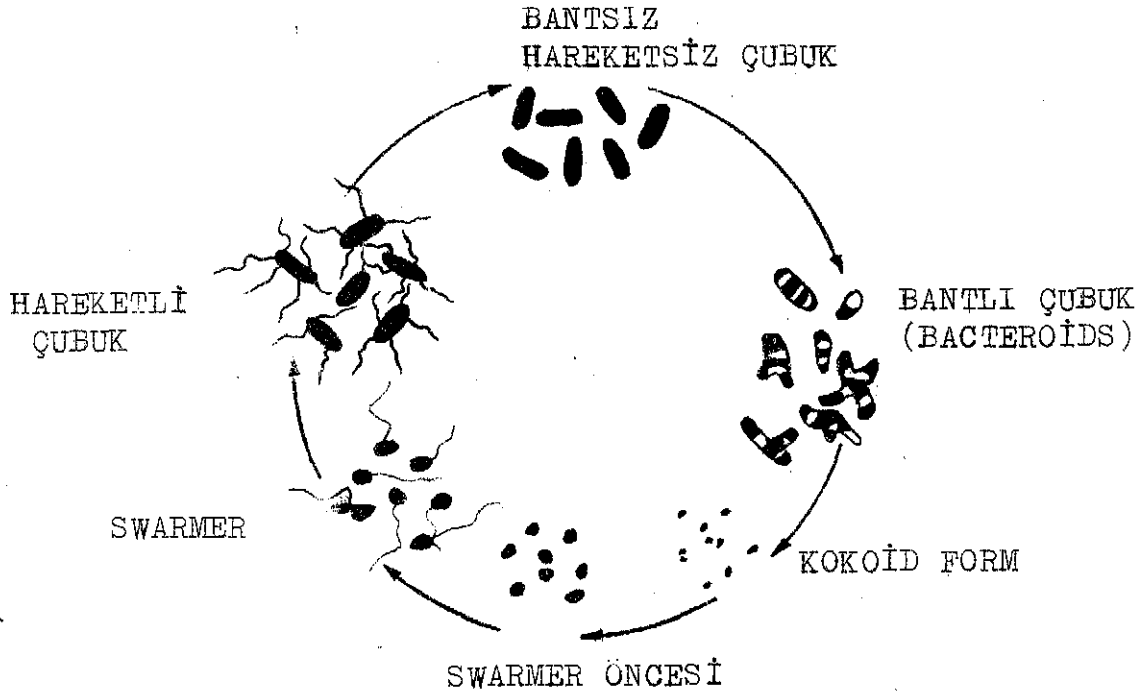
Bakterinin Özelliği : Bergey's Manual'e göre baklagil köklerinde nodozite yapan bakteriler, Eubacteriales takımının Rhizobiaceae familyasından olup, Rhizobium cinsini meydana getirirler. Gram negatif, sporsuz, aerob, heterotrof 0.5-0.9 mikron genişliğinde 1.2-3.0 mikron uzunluğunda çubuk şeklinde olup, genç kültürlerde hareketlidirler (10). Hücreler ekseriya karakteristik Polimerize  $\beta$ -hydroxy butyrate granüllerine sahiptir. Enerji kaynağı olarak maltoz, sukroz, glukoz gibi çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilmekle beraber en iyisi mannitoldür. Bazı suşlar optimum üreme için amino asitlere ve üreme faktörlerine ihtiyaç gösterir. Major inorganik elementler besiyerlerine katılır. Vitaminler ekseriya mikroorganizmaların gelişmesini arttırır, fakat bazıları tüm vitamin eksikliğinde dahi üreyebilir (11). Suşların çoğu bol miktarda polisakkarit tabiatında yapışkan, hücre dışı salgılar meydana getirir (12). Yapma besiyerlerinde amonyum veya nitrat, üreme için gereklidir. Hiçbir suş simbiyozis dışında kültür solüsyonunda atmosferik ( $N_2$ ) bağlamaz (13).

Rhizobium bakterileri yapma besiyerlerinde üretildiğinde gram negatif, çubuk şeklinde görülmekle beraber hayat döneminde morfolojik bakımdan değişiklik gösterir. Thornton ve Gangulee'ye göre bu durum şekil 1'de şematize edilmiştir. Bakteri nodozite içerisinde büyüyüp

dallanarak bakteroid olarak adlandırılan şekli alır. Bu dallanma bir de-  
jenerasyon olmayıp, organizmanın özel biyolojik fonksiyonunu görebilmesi  
için hayat seyrinde lüzumlu bir dönemdir. Bakteroidlerden meydana gelen  
kokkoid formdaki Rhizobiumlar toprak solüsyonunda bol miktarda bulunur-  
lar (12,13).

ŞEKİL : I

Rhizobiumların Hayat Dönemindeki Morfolojik  
Değişiklikler



Agrobakterium, Rhizobiumun dahil olduğu familyanın diğer bir  
cinsi olup, toprakta bol miktarda bulunur. Birbirlerine oldukça benzer  
karakterdedirler. Agrobakterium baklagil köklerinde nodozite yapma. Ke-  
sin ayırım bu karakterin araştırılması esasına dayanır (11,12).

Antijenik Yapısı : Rhizobium bakterileri antijenik yapı bakımından geniş ölçüde farklılık gösterirler. Bir çok araştırmacılar serolojik yöntem kullanmak sureti ile bunu göstermiştir (14). R.meliloti ve R.trifolii türlerinin 2 şer suşunun hücre içi ve hücre dışı antijenleri incelenmiş, suşlar arasındaki farklılığın türler arasından daha büyük olduğu saptanmıştır (15). Bir araştırmada R.japonicum'un 25 suşundan elde edilen 14 somatik antijen antiserumları bu suşlarla teste tabi tutulmuş, antijenik farklılık açıkça ortaya çıkmıştır. 3 suş yalnız homolog antiserumla reaksiyon vermiş ortak somatik antijen bulunamamıştır (14). Diğer bir araştırmacı yine R.japonicum'un 62 suşu ile yapmış olduğu bir araştırmada benzer sonuçlar elde etmiştir. Rastgele seçtiği 11 suşun antiserumunu 62 suşla teste tabi tutmuş, 22 suş 1/10 sulandırmada dahi reaksiyon vermemiştir. Geri kalanları 4 grup altında toplayabilmiş, ancak ortak antijen bulmayı başaramamıştır (16).

Sınıflandırılması : Bunun üzerinde Wilson (17), Zipfel, Allen ve Allen (1958), Jensen (1958) ve diğer birçok araştırmacılar aydınlatıcı çalışmalar yapmışlardır. Ancak bu husus hala tartışma konusudur (13,17). Sınıflamadaki zorluk Rhizobium suşlarının değişik karakterlere sahip olmasından ileri gelmektedir. Fizyolojik olarak 2 geniş guruba ayrılabilir. Asit salgılamayanlar, yavaş üreyen Rhizobium bakterileri olup, geniş olarak tropik bölgelerde rastlanır. Asit salgılayanlar ise, çabuk üreyen Rhizobiumlar olarak bilinir (10,11,12). Bugün Rhizobium cinsinin tür ayırımı bakterinin enfekte edebildiği baklagil bitkisi gurupları esas alınmak üzere yapılmaktadır. Herhangi bir baklagil bitkisinden izole edilen bakteri suşu, baklagil bitkisinin değişik türleri ile teste tabi tutulduğunda, nodozite meydana getirebildiği bitki topluluğu çapraz aşılama gurubu olarak adlandırılır. Aynı bitki topluluğunu enfekte eden suşlar aynı türe girer. Diğer bir ifade ile aynı türe dahil olan bakteri suşları, aynı grup baklagil bitkisi üzerinde nodozite meydana getirebilirler. Çapraz aşılama gurupları esas alınmak üzere bugün Rhizobium cinsi 6 türe ayrılmaktadır (9,10,11,19). (Tablo 1).

Kültüre alınmamış baklagiller dahil olmak üzere tarımsal öneme sahip birçok baklagiller enfeksiyon için farklı bakteri suşlarına istek gösterirler. Büyük bir kısmı altıncı tür içerisinde yer alan bu bakteriler tam anlamı ile çapraz aşılama gurubu karakterlerini taşımaz. Ayrıca birçok baklagil değişik bakteri türleri ile enfekte olabilirler. Bu durum karışıklıklara sebep olur. Buna rağmen aşağıdaki sınıflandırma bugün geçerli olarak kabul edilmektedir (7,9,11).

Tablo 1: Nodozite Meydana Getirebildikleri  
Baklagil Bitki Guruplarına Göre Rhizobium'larda  
Tür Ayrımı

<u>RHIZOBIUM TÜRLERİ</u>	<u>ÇAPRAZ AŞILAMA GURUPLARI</u>
1- Rhizobium Leguminosarum	Bezelye, fiğ, mercimek
2- Rhizobium Phaseoli	Fasulyalar
3- Rhizobium Trifolii	Üçgüller
4- Rhizobium Lupini	Acı bakla ve saredella
5- Rhizobium Meliloti	Taş yoncası, yonca, trigonella
6- Rhizobium Japonicum	Soya, börülce, yerfıstığı ve diğer baklagiller

Nodozite Oluşumu : Rhizobium bakterilerinin uyumlu baklagil bitkileri üzerinde nodozitemeydana getirebilmeleri aşağıdaki faktörlerin ortak etkilerine bağlıdır (6).

- Rhizobium suşunun kök civarında bulunması
- Rhizosferde Rhizobium suşlarının çoğalması
- Bakteri tarafından kök enfeksiyonu
- Üreme
- Aktivite

Nodozite meydana gelebilmesi için herşeyden önce toprakta bitkiye uyumlu Rhizobium suşunun bulunması gereklidir. Rhizosferde (kök çevresi mikroflorası) bu bakterilerin çoğalması önemli olan diğer bir husustur. Optimal şartların yanında bitki kök salgıları, çoğalmaya büyük ölçüde yardım eder. Mulder ve Veen 1960'da yaptığı saksı denemesiyle bunu açıkça göstermiştir (20). Köklerin Rhizosfer'e salgıladığı triptofan, mikroorganizmalar tarafından çabucak bir üreme faktörü olan indolasetik aside çevrilir. Bu özelliğe ilâveten yine salgıda bulunan gibberelin ve pektik enzimin saçak kök enfeksiyonuna yardımcı olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (6). Lie fasulya bitkisinin kültür solusyonundaki salgılarını ayrıntılı olarak incelemiş, ısı - ışık salgı miktarı ve cinsi arasındaki ilgileri göstermiştir (21). Diğer bir araştırmacı gamma ışınlarının etkisini incelemiştir (22).

Bakteri tarafından kök enfeksiyonu ve nodozite oluşumu çok karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bütün dönemleri tam olarak aydınlığa kavuşmamıştır (23). İlk önce bitkinin emici kılcal kökü, kıvrılıp kanca halini alır. Burada kökün salgıladığı triptofandan Rhizobium'un meydana getirdiği  $\beta$ -indolasetik asit (IAA) önemli rol oynar. Ancak IAA tek başına bu işlemi tamamlayamaz. Diğer birkaç faktörün mekanizmaya dahil olması lazımdır (11). Kökün bakteri tarafından enfeksiyonu hala tartışma konusudur. İlk enfeksiyon yanlara uzanan ve kıvrılarak kanca şeklini almış emici kılcal köklerin ucunda görülür. Kök ucu muhtemelen pektik tabiatında bir kütikül tabakası ile kaplıdır (17). Mc Cog ve Tracery'e göre Rhizobium saf kültüründe pektik ve kitinaz enzimleri yoktur. Fahraeus ve Ljunggren'e göre Rhizobium özel, suda çözülür polisakkaritler salgılar. Bunlar baklagilin emici kılcal kökünün hücre duvarından geçerek, kök hücresinin protoplazmasındaki bazı hücre maddeleri ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonucu bir pektik enzim olan poligalakturonaz sentez edebilecek bir yapıya kavuşur. Bu enzim hücre duvarının yumuşamasına neden olarak bakteri enfeksiyonunda rol oynar (23,24). Bakteri, enfeksiyondan sonra emici

kılcal kök ucu ile korteks arasında bitki tarafından meydana getirilen bölmesiz enfeksiyon lifinden hareket eder. Wipf ve Cooper'e göre lifin kortekste ki ucunda tetra ploid hücreler bulunur. Funke bu tetra ploid hücrelerin nodül oluşumunda rol aldığına söylemektedir. Buraya ulaşan bakteriler tipik gram negatif olup, bölünme yeteneğine sahiptirler. Bitki hücresinin endoplazmik retikülümünden meydana gelmiş bir zarla çevrili olduğu söylenmektedir. Daha sonra büyüklükleri artarak çubuk veya dallanmış şekilli, bölünemez bakteroid formunu alırlar. Işık mikroskopunda bantlı ve granüler bir görünümde dir (23). Bakteroid oluşumunun bitkide mevcut alkaloid tesiri ve özel şartlar sonucu meydana geldiği söylenmektedir (13). Bakteroid ile beraber kırmızı pigment maddesi olan hemoglobin de oluşur. Solunumda oksijen taşıyıcı görevinde bulunan bu maddenin eriyebilir formda, bakteroid ile bitki hücre zarı arasında bulunduğu söylenmektedir (23). Enfeksiyon tüpünün kortekste daha evvelce meydana gelmiş tetraploid hücreye kadar ulaştığı yerde nodozite oluşumu başlar. Bu hücre ve etrafındaki diploid hücreler hızla bölünerek oluşum gerçekleşir. 4 farklı yapı saptanmıştır.

- 1- Parankima dokusu ile sarıllı dış tabaka
- 2- Meristamatik alan
- 3- Vasküler doku
- 4- Bakteroid zon veya azot bağlama zonu (25).

Oluşumu tamamlanan nodoziteler, morfolojik bakımdan baklagil türüne bağlı olarak değişiklikler gösterir. Üçgülde çomak, yoncada uzun dallanmış, yer fıstığında ve fasulyada yuvarlaktır (11).

Azotu Bağlama Mekanizması : Serbest azotun bağlanması için önce aktive olması yani moleküler azotun iki serbet atoma ayrılması lazımdır. Bağlama döneminde ise bu iki azot atomu, üç molekül hidrojen ile birleşerek iki molekül amonyak meydana getirir. Bu işlemlerin tamamlanması

için toplam 147 kaloriye ihtiyaç vardır. Bu büyük enerjiye lüzum gösteren mekanizmayı katalize eden enzimatik reaksiyonlar nodozite içinde cereyan eder (26).

Santrifikasyon ile nodoziteden dört ayrı fraksiyon ayrılmıştır (27).

- a) Bitki hücre artıkları ve nişasta
- b) Bakteroid
- c) Intrasisitoplazmik zar
- d) Eriyebilir materyal

Radyoaktif  $N_2$  ile yapılan çalışmalar bağlanma mekanizmasını kısmen açıklamıştır. Abel'e göre ilk dönemde nodozitede bulunan ferrohüoglobin azot molekülüne iki elektron vererek ferrihüoglobine okside olurken iki elektron kazanmış olan azot, ortamda bulunan iki hidrojen protonu ile birleşerek diimid ( $HN=NH$ ) meydana gelir (23). Burada ATP'ye bağlı hidrogenaz enzimi önemli rol oynar. Ferrihüoglobinin redüksiyonu bakteroidler tarafından gerçekleştirilir. (Şekil 2)

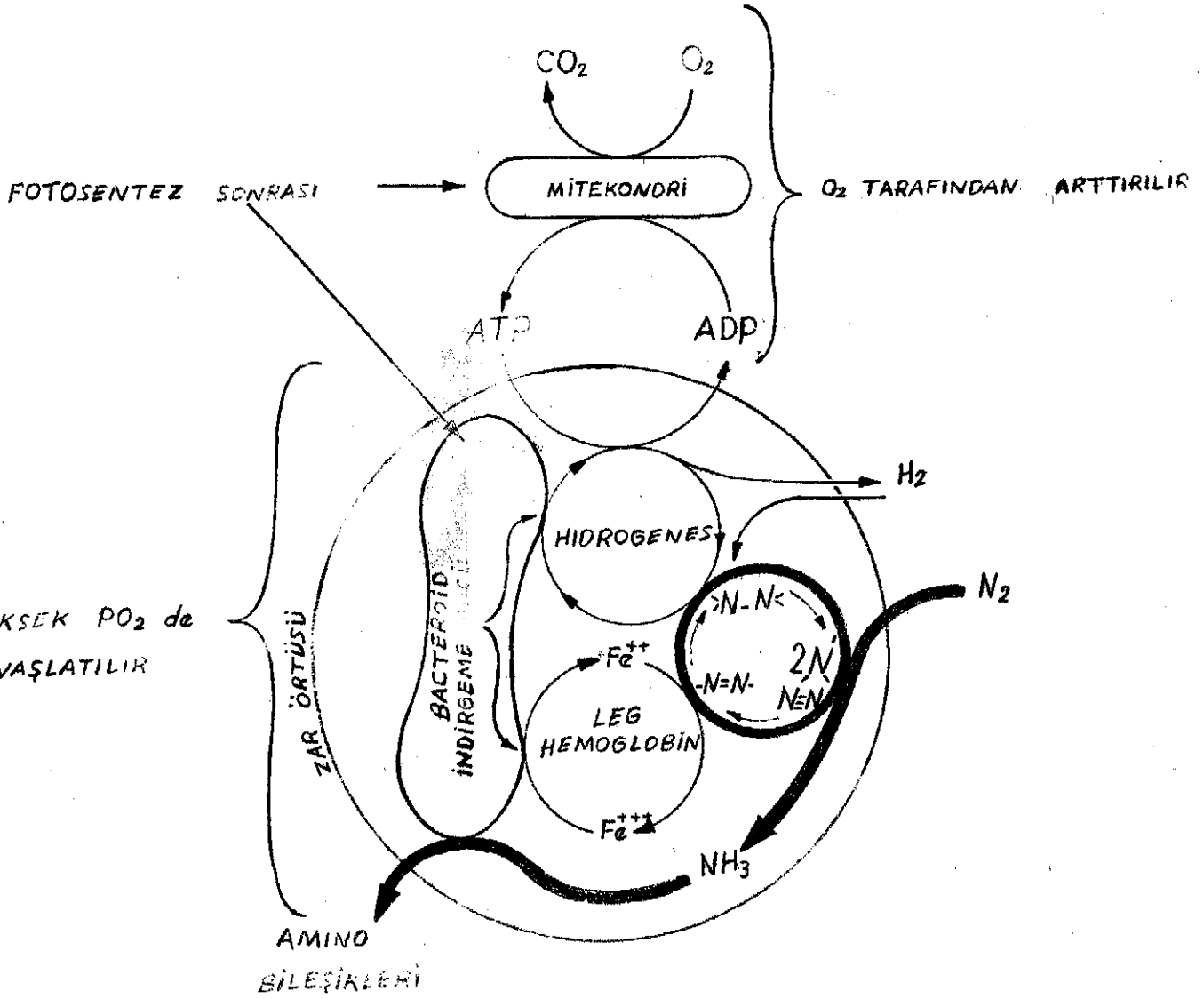
Diimid'in daha sonraki redüksiyonunda ilk ürün olan  $NH_3$  meydana gelir.  $NH_3$  amino asit yapımında kullanılarak bitkinin azot ihtiyacı karşılanır. Yapılan araştırmalara göre simbiyotik azot bağlanması sonunda meydana gelen amino asitler aspartik asit, asparagin, glutamin, hidroksiprolin ve treonin olarak bulunmuştur. Glumatik asidin saptanamaması bunun çabucak glutamine dönüştüğü fikrini vermektedir (28,29).

Azotu bağlama yetenekleri bakımından Rhizobium bakterileri aynı özelliğe sahip değildir. Bitki-bakteri özel ilişkilerine bağlı olarak etkili, orta derecede etkili, etkisiz olarak ayrılabilirler (11,25). Bunların baklagil üzerinde meydana getirdiği nodoziteler de aynı şekilde adlandırılır.

Baklagillerin bağladığı bu azotun bir kısmı bitki tarafından kullanılır, bir kısmı ise kökler tarafından salgılanır. Böylece toprak verimliliği arttırılmış olur.

ŞEKİL : 2

Baklagillerde Simbiyotik Azot Bağlama Mekanizması



Bugünkü bilgilerimize göre azot bağlama mekanizması yukarıda Őematik olarak gösterilmiştir.



Erdman ve Wilson'a göre baklagillerin simbiyotik yolla bağladıkları azot miktarı Tablo 2'de gösterilmiştir (6,13,30).

Tablo: 2 Bazı Baklagillerin Simbiyotik Yolla Bağladıkları Azot Miktarları

Baklagil Türü	Her Gün Bağlanan Azot Miktarı		Dekar başına bir yılda bağlanan azot (kg.)
	Bitki başına ortalama bağlanan azot (mg)	Her gr.kuru nodozite başına bağlanan azot (mg)	
Bezelye	8.7	98	8
Fasulya	7.8	67	5
Acı bakla	5.8	65	17
Fiğ	3.2	80	9
Yonca	1.2	67	22
Kırmızı üçgül	1.0	55	13

B) NODÜLASYON VE AZOT BAĞLANMASINA DEĞİŞİK FAKTÖRLERİN ETKİSİ :

İç Faktörler : Bir Rhizobium suşu ile buna uyumlu baklagil türleri ve varyeteleri arasında nodülasyon ve azot bağlama miktarı yönünden önemli farklılıklar vardır (31). Bir baklagil bitkisi kökünden izole edilen etkisiz Rhizobium suşu oldukça değişik bir türdeki bitki üzerinde etkili nodozite yapabilir, veyahut bunun tersi de doğrudur (8).

Çevrede tabii olarak yetişen çok çiçekli fasulya (phaseolus multiflorus) bitkisinin etkisiz nodozitesinden izole edilen bakteri, ak üçgül üzerinde etkili, fasulya, bezelye ve fiğde etkisiz nodozite meydana getirmiştir (32). Rhizobium ile kırmızı üçgül bitkisinin genetik hatları arasındaki simbiyozis farklılığını Nutman açık olarak göstermiştir. Bir genetik hatta bitki hücresi içinde Rhizobium'un çoğalması önlenmiş, dolayısı ile bakteroid oluşumu ve hemoglobin sentezi başarısızlamıştır. Diğer

bir genetik hatta Rhizobiumun bakteroid forma geçmesi önlenmiştir (6). İki tip bitkide de nodozite oluşumunun ilk dönemleri normal olup, hangi faktörlerin bu duruma sebep olduğu bilinmemektedir. Diğer taraftan Elkan (1961-1962) soya fasulyasının nodüllenmiyen genetik hattını bulmuştur (6).

Baklagil tohumu kabuklarının bazı antibiyotik maddelere sahip olduğu Ivanoics ve Horvath tarafından bildirilmiştir. Ferency 512 tür baklagil tohumunu teste tabi tutmuş, 52 sinde antibiyotik maddelere rastlamıştır. Bu maddelerden gram pozitif bakteriler, gram negatif bakterilere oranla daha çok etkilenmektedirler. Yapılan bir araştırmada bazı baklagil tohum kabukları salgılarında suda erir, ısıya dayanıklı, geniş ölçüde Rhizobium ve gram negatif bakterilere antibiyotik etki yapan maddeler bulunmuştur. Bu etkinin değişik baklagil tohumları ve Rhizobium suşlarına göre değiştiği bilinmekle beraber yeraltı üçgülü tonumlarında daha fazla olduğu belirtilmektedir (33).

Fotosentez miktarı azot bağlanması üzerinde önemli rol oynar. Optimum bağlanma bitkideki karbonhidrat azot arasındaki orana bağlıdır. Bu oranın büyüklüğü azot bağlanmasını hızlandırır. Ancak ışık fazlalığında fotosentezin artması ile meydana gelen yüksek karbonhidrat miktarı simbiyotik mekanizmayı geciktirir (11). Işık yetersizliğinde ise azalan fotosentez dolayısı ile düşen karbonhidrat miktarı azot bağlanmasını azaltır. Yapraklara sukroz püskürtmekle yükseltile karbonhidrat miktarı bu durumun düzeltilmesine sebep olur (13,34).

Isı : Toprakta yaşayan bakterilerin faaliyetlerini sınırlayan ısı 0-50 C° dir (13). Ancak nodülasyon ve azot bağlanması için gerekli ısı istekleri daha dar sınırlar içerisindedir. Yeraltı üçgülünde 7 C° den aşağıda nodozite meydana gelememiş, 8 C° de nodozite oluşabilmes ne rağmen azot bağlanması başarılammıştır (35,36). Ayrıca nodülasyonda önemli rol oynayan bitki kök salgıları ısıdan önemli ölçüde etkilenmektedir. Nodülasyon ve azot bağlanması için optimum ısı şartlara göre değişmekle beraber 20-22 C° ler civarındadır (37).

Işık : Direk güneş ışığı Rhizobium'u aksi yönden etkilemekle beraber difüze olan ışık etkilemez (11). Nodülasyon ve azot bağlanması fotosentez sonucu meydana gelen karbonhidrat miktarına bağlı olup, ışık intensitesinin azalması ile nodülasyon da azalır (21,34). Lie yaptığı çalışmada mavi ışığın, nodülasyonu azalttığını, kırmızı ötesi (730 m $\mu$ ) ışığın da aynı etkiyi yaptığını fakat bu önleyici durumun kırmızı ışığa kısa süre maruz bırakılmakla (660 m $\mu$ ) kaldırıldığını bulmuştur (38). Ayrıca Gama ışınları nodüllenmeyi arttırıcı yönde etki yapmaktadır (22).

Rutubet : Topraktaki rutubet tansiyonu 3 atmosferden devamlı solma noktası olan 15 atmosfere yükseldikçe bakterilerin aktiviteleri azalır (39). Yapılan birçok araştırmalarda Rhizobium suşlarının kuraklığa dayanıklılık bakımından oldukça farklılık gösterdiği saptanmıştır. Rhizobium'lar için topraktaki optimum rutubet miktarı tarla kapasitesindeki rutubettir. Bu miktarın % 70'ini kapsıyan bir ortamda acı baklada nodozite oluşmamıştır. Bezelye ve fasulye nodoziteleri kuraklığa acı bakladan çok daha duyarlı olup, optimum rutubetin altında çabucak fonksiyonlarını kaybetmektedir (40). Fazla rutubet ise havalanmanın az olmasından dolayı nodülasyonu önlemektedir (41).

PH : Toprak PH sı tabii ortamda baklagil ile Rhizobium ortak yaşamasını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Birçok simbiyotik sistem fonksiyonunu optimal düzeyde tutabilmesi için nötr ve hafif alkali toprak reaksiyonuna ihtiyaç gösterir (42). Yonca gurubu bitkiler asit ortama çok duyarlı olmasına karşılık acı bakla ve soya fasulyası gurubu asit topraklardan daha az etkilenir (6).

Asit topraklarda nodozite oluşumunu önleyen nedenler şunlar olabilir (6).

1) Asit ortamda Rhizobium'ların hayatlarını zayıfça devam ettirmeleri,

2) Direk asitlik veya asidite dolayısı ile baklagil köklerdeki salgıların yetersizliği, kök çevresinde Rhizobium'lar için uygun olmayan gelişme ortamının bulunması,

3) Kök yüzeyinde meydana gelen değişmeler dolayısıyla enfeksiyonun önlenmesi.

Asit ortamın Rhizobium'a zararlı etkisini Mulder ve Veen açıkça göstermişlerdir. R.trifolii'nin koyu bir suspansiyonu ile aşılana PH sı 5.0 olan toprağın her 0.2 gramında Rhizobium adedi  $2.3 \times 10^8$  den  $3.3 \times 10^3$  e düşmüştür (43). PH'nın Rhizobium, nodülasyon ve azot bağlanmasına olan etkileri ile ilgili araştırmalar bir hayli geniştir. Bir araştırmacı yonca için sıvı kültürde en düşük PH toleransını 3.5 bulmuş, PH 10 da üreyebilmiştir (55).

Karbondioksit : Heterotrofik mikroorganizmaların üremesi ve bitki kök gelişmesinin sağlanması için az bir miktar karbondioksit istek duyulduğu bilinir. Ayrıca nodülasyon ve azot bağlanmasının gerçekleşmesinde de önemli rol oynar. Kırmızı üçgül, bezelye ve fasulye ile yapılan çalışmalarda optimal nodülasyon ve azot bağlanması için kültür solusyonunda  $CO_2$  nin bulunması şarttır. Bilhassa asit ortamda PH'nın 4.8 civarında olduğu hallerde  $CO_2$  ye şiddetle ihtiyaç duyulur.  $CO_2$  olmadığı zaman azot bağlanmasındaki azalma büyüktür (45). Bunun sebebi karbondioksitin mevcut olması halinde nodozitede daha fazla serbest  $\alpha$ -keto asidinin oluşmasından ileri geldiği söylenebilir (45).

Bir araştırmacı 5 Rhizobium türü üzerine  $CO_2$  nin etkisini incelemiş, hiçbir tür  $CO_2$  den arınmış hava ile ürememiş, havanın kapsadığı  $CO_2$  de üreme çabuk olmuştur (46).

### C) ANA BESİN MADDELERİNİN ETKİSİ :

Bitkilerin gelişme için fazla miktarda kullandığı ve yetiştirme ortamında bulunması gerekli ana besin maddeleri simbiyotik mekanizmayı çeşitli yönlerden etkilemektedir.

1. Azot : Baklagil bitkilerine azotlu gübrelerin verilmesi nodülasyonu ve simbiyotik azot bağlanmasını önlemektedir (6). Bunun üzerine yapılmış birçok araştırma vardır. Bu etki gübre ve baklagil çeşidine, yetiştirme ortamındaki maddelerin cinsi ve miktarına göre değişiklikler göstermektedir (34). Simbiyotik azot bağlanmasını önleyici etki, mekanizma için gerekli organik bileşiklerin muhtemelen  $\alpha$ -keto asitlerin gübre azotu tarafından uzaklaştırılması dolayısıyla (6). Nitrat azotu emici kılcal kök oluşumunu ve nodülleme için gerekli enfeksiyon lifinin meydana gelmesini önlemektedir (47,48). Ancak bitki gelişmesinin ilk devresinde ve simbiyotik mekanizma gelişmeye başlayıncaya kadar geçen sürede az bir miktar başlangıç azotuna ihtiyaç duyulduğu birçok araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (49,50). Bu azot miktarı, dekara 2-3 kg. (51), kültür solusyonunda ise 1 mM.dir (52).

2. Fosfor : Fosfor baklagil bitkilerinin nodüllemesini arttırır (53). Enfeksiyon döneminde fosfor gereklidir. Noksanlığında kontrole nazaran nodozite adedi 1/3 dür. Yapılan bir araştırmada dekara verilen 4.5 kg.  $P_2O_5$  nodozite adedini % 62.5 civarında arttırmıştır (54). Bezelye ve bakla üzerinde yapılan bir saksı denemesinde yeterli olmayan fosfor miktarı atmosferik azot bağlanması ve nodülasyonu önlemiştir. Aşırı dönemdeki fosfor eksikliğinde Rhizobium bakterilerinin azot bağlayabilme yeteneklerinde azalma saptanmıştır (55).

3. Potasyum : Potasyum üzerine yapılan araştırmalar çok geniş değildir. Ancak Rhizobium ile eşilenmiş baklagillerin potasyuma daha fazla istek gösterdiği ve eksikliğinde nodozite adedinin ve azot bağlanmasının azaldığı belirtilmektedir (56). Ancak bazı Rhizobium suşları potasyumca fakir topraklarda fonksiyonunu daha iyi görebilmektedir (57).

4. Kalsiyum : Bergerben, birçok Rhizobium suşlarının kalsiyuma kesin olarak istek duyduklarını göstermiştir. Vincent ise yapmış olduğu çalışmada bazı suşların 1 ppm Ca konsantrasyonunda dahi üreyemediklerini

saptamıştır. Norris Rhizobium'un kalsiyuma çok az miktarda istek duyduğunu belirtmiştir (58). Özellikle asit ortamda kalsiyumun önemi büyüktür. Muns asiditenin artması halinde nodülasyon için daha fazla miktarda Ca iyonuna istek duyulduğunu göstermiştir. Ca burada enfeksiyon döneminde rol oynar. Enfeksiyon başladıktan sonra düşük Ca miktarı nodülasyonu etkilemez (59). Ayrıca düşük PH lı topraklara bir kalsiyum bileşiği olan  $CaCO_3$  ilavesi nodülasyonu ve azot bağlanmasını arttırmaktadır (60,61).

#### D) MİKROELEMENTLERİN ETKİSİ :

Bitkilerin az miktarda kullandığı ve gelişme için zorunlu olan mikroelementlerin Rhizobium üzerine etkileri çeşitli yönleri ile ayrıntılı olarak incelenmiştir.

1. Bakır : Hallsworth ve Greenwood kum kültürü ile yaptıkları denemede bakırın etkisini dikkat çekici bulmuşlardır. Bitki, ortamdaki yüksek azot bağlama kapasitesine ulaşmıştır (62). Diğer bir araştırmacıya göre bakır azlığında bakteroid miktarı azalır ve nodozite oluşumu önlenir. Sitokrom c oksidaz aktivitesi simbiyotik mekanizmanın ilk dönemlerinde azalarak hemoglobin sentezi ve azot bağlanması durur (63).

2. Kobalt : Baklagillerin simbiyotik azot bağlamada kobalta olan mutlak isteklerini Ahmet ve Evans göstermişlerdir (64). Saflaştırılmış besiyerine eseri miktarda bir kobalt ilavesi ile Rhizobium türleri birkaç katı daha fazla ürer. Kobalta olan isteği en hassas olan R. meliloti'dir. Bu Rhizobium türü test mikroorganizması olarak kullanılarak kolorimetrik yönteme nazaran 10.000 defa daha duyarlı biyolojik kobalt tayin yöntemi geliştirilmiştir (65). Yapılan bir çalışmada bir litre Rhizobium kültürü en az 0.1.  $\mu$  gr. kobalta ihtiyaç göstermektedir (66). Kobamit koenzimin nodozite içinde bulunması kobaltın bağlanma mekanizmasında rol oynadığını göstermektedir (67). Kobalt eksikliğinde bitkide yeterli olmayan azotun nedeni olduğu gelişme bozuklukları görülür. 0.1-1.0 ppb (part per billion) verildiğinde bu durum düzeltilmektedir (64). Radyoaktif kobalt ile yapılan

denemelerde optimum nodülleme ve azot bağlanması için kök bölgesinde 10 ppt civarında kobalta ihtiyaç duyulduğu bulunmuştur (66,68).

3. Manganez : Genellikle asit topraklarda Mn ve Al yüksek düzeyde bulunur. Mn'nin toksik etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Denemeye alınan ve dört türü temsil eden beş Rhizobium suşu kültür solusyonunda ve mangan yokluğunda kontrole nazaran % 10-0.4 az üremiştir. Maksimum üreme  $10^{-6}$  M Mn varlığında gerçekleşmiştir (69). Laboratuvarda kurulan saksı denemesinde 64.1 ppm Mn nodozite oluşumunu geciktirmiş ve sayılarının azalmasına sebep olmuştur (70). Buna benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir. Kleiver, besin solusyonuna 20 ppm Mn ilave etmekle yoncada nodülasyonun % 20 azaldığını saptamıştır. Asit toprağa 40 ppm Mn ilavesi nodülasyonu ve azot bağlanmasını türlere bağlı olarak azaltmıştır (71). Ancak bu toksik etki bitki varyeteleri arasında geniş farklılıklar göstermektedir (72). Yonca çok duyarlı olup, kırmızı üçgül, ak üçgül ve fiğ daha dirençlidir (73).

4. Molibden : Bortlels bezelye, soya fasulyası ve üçgülden yapılmış olduğu denemelerde Rhizobiumun azot bağlayabilmesi için önemli bir miktar molibdene ihtiyacı olduğunu göstermiştir (74). Mo yokluğunda nodozite normalden daha az sayıda oluşmuş ve normal pembe rengini kaybetmiştir. Molibden eksikliğinde baklagilde iyi nodozite meydana gelmesine rağmen azot bağlamayı başaramamıştır. Nodozitelerde amino asit miktarı çok düşük bulunmuş Mo ilavesi ile miktar artmıştır (75). Saksı denemesinde Mo ilavesi Rhizobium bakterilerinin Rhizosfer'de çoğalmasına neden olmuştur (76). Maksimum Rhizobium çoğalması 0.75 - 3.75 ppm Mo varlığında gözlenmiştir (77).

5. Çinko : Kültür solusyonunda yapılan bir denemede Zn yokluğunda üreme kontrole nazaran % 1 ile 20 arasında azalmıştır. Maksimum üreme  $10^{-7}$  M Zn varlığında olmuş ve  $10^{-5}$  M Zn toksik etki yapmıştır (69). Bazı metal iyonların Rhizobium üzerine etkilerini inceleyen bir çalışmada Zn iyonu nikelin toksik etkisini arttırmış ve kromun arttırıcı etkisini azaltmıştır (78).

**E) TARIM MÜCADELE İLAÇLARININ ETKİSİ :**

Yapılan birçok araştırmalara göre genellikle kullanılan tarım mücadele ilâçlarının normal dozları zararlı etki yapmamaktadır. Normal ve hatta 10 katı dozda kullanılan DDT aksi tesir yapmamıştır (79). Bir insektisit olan dieldrin ve lundane'nin normal ve 20 katı dozları baklagillerle saksı denemesine tabi tutulmuş ve bu iki ilâcın normal dozu nodülasyonu çok hafif etkilemiştir (80). Zararlı ot mücadele ilâcı olan 2.4 DB ve dalapon ile yapılan bir denemede YMA vasatına 50-100 µg/ml 2.4 DB ilavesi L C 296 no.lu Rhizobium suşunda üremeyi geçici olarak azaltmıştır (81). 2.4 DB yalnız başına ve dalapon ile birlikte bitkinin nodülasyon ve azot bağlama yeteneğini azaltmıştır. Araştırmacı bu toksik etkinin bitkinin zarara uğraması ve normal olmayan kök gelişmesinden ileri geldiğini söylemektedir (82).

Spergon ve Thiram, fungistlerle tohum dezenfeksiyonun baklagil Rhizobium simbiozisine az zararlı olduğunu söylemişlerdir. Bünyesinde civa bileşikleri olan fungisitler Rhizobiumlar için daha toksiktir. Fungisitlerin zararlı tesirlerini önlemek için bunlarla muamele edilmiş tohum Rhizobium ile aşıladıktan hemen sonra toprağa ekilmelidir. Yapılan bir araştırmada, bir fungusit olan amertan ile dezenfekte edilmiş tohumlar Rhizobium üzerine zararlı etki yapmıştır (83).

**F) TOHUM AŞILAMASI VE HAZIRLAMASI :**

Simbiyotik azot bağlanmasının arzu edilebilen bir düzeye ulaşabilmesi için toprakta etkili ve baklagil bitkisine uyumlu Rhizobium suşlarının bulunması gereklidir. Genellikle ilk olarak baklagil ekimi yapılan sahalarda uyumlu bakteri mevcut değildir. Devamlı ekili yerlerde de etkili suşların yeterli düzeyde olmadığı anlaşılmaktadır. Yapılan araştırmalara göre toprakta tabii olarak bulunan Rhizobium suşlarının % 25'i etkili, % 50'si orta derecede etkili ve % 25'i etkisizdir (11).



Azot bağlanmasını arttırmak için laboratuvarında seçilen suşlarla baklagil tohumları aşılanır. Böylece toprakta bulunan etkili Rhizobium oranı büyük ölçüde arttırılmış olur (13).

Ayrıca bakterinin fonksiyonunu iyi bir şekilde görebilmesi için uygun olmayan çevre şartlarından ve toprakta bulunan bazı maddelerin toksik etkisinden mümkün olduğu kadar az zarar görmesi lâzımdır. Bu durumu gerçekleştirmek için son zamanlarda tohumlar bazı kimyasal bileşiklerle karıştırılmaktadır. (Seed pelleting) Önce tohum yapışkan bir madde tercihan gum arabic'in % 40 solusyonu veya sellüloz ile karıştırılır daha sonra Rhizobium kültürü ile muamele edilerek tohuma bulaşması sağlanır. Son olarak ince elekten geçirilmiş kalsiyum karbonatla karıştırılarak hemen ekim yapılır. Araştırmalar bu işlemin, nodülasyonu ve azot bağlanmasını arttırdığını ortaya koymuştur (84).

## II- G E R E Ç ve Y Ö N T E M

### 1. Fasulya Kök Numunelerinin Alınması :

Fasulya nodozite numuneleri, Türkiye'nin çeşitli yörelerinde fasulya ekimi yapılan yerlerden alındı Tablo (3). Kürek yardımı ile sökülen nodoziteli kökler toprağı ile beraber naylon torbalara konarak etiketlendi. Kurumayı ve çürümeyi önlemek için toprak hafifçe nemlendirildi ve naylon torba birkaç yerinden delinerek havalanması sağlandı.

### 2. Kültürlerin İzolasyonu ve Saklanması :

Kök numuneleri naylon torbadan çıkarıldı, bir kap içerisinde suyla yıkanarak temizlendi. Kökün üzerinde sıhhatli olan nodotizelerden rastgele bir tanesi seçildi. Seçilen bu nodozite işlemden kolaylık sağlamak amacıyla ile küçük bir kökçüğe bağlı olacak şekilde ana kökten koparılıp numaralandı. İzolasyon da O.N.Allen'in yöntemi kullanıldı (85). Nodozitelerin dış yüzey sterilizasyonu için önceden su ile temizlenmiş nodoziteler ayrı ayrı petri kutularında aşağıda belirtilen solusyonlar içinde belli süre bekletildi.

% 95 lik etanol	1 dk.
Asitli civaoklorür ( $HgCl_2$ 1 gr. kon.HCL 5 ml.su 1 lt.)	4 dk.
Steril musluk suyu	5 dk.

Her numune için 4 petri kutusu alındı. İçlerine pipetle 1 ml. destile su kondu. Dış yüzeyi sterilize edilmiş nodozite pensle alınarak 1. petri kutusuna kondu ve ezildi. Nodoziteden çıkan sıvının koyduğumuz 1 ml. su ile karışması sağlandı. Bu sıvıdan bir öze dolusu alınarak 2. petriye ve buradan yine öze ile 3. ve 4. petri kutularına aktarılıp seyreltildi. Üzerine  $50\text{ C}^\circ$  de YMA besi yeri dökülerek  $28\text{ C}^\circ$  de inkübe edildi. Kullanılan gereçler önceden sterilize edildi ve yukarıdaki işlemler bakteriyolojik kontrol koşullarına uygun olarak yapıldı.

## Fasulye Kök Nummelerinin Alındığı Yerler

SUŞ NO.	İZOLE EDİLDİĞİ FASULYE-NİN TİPİ	ALINDIĞI YER	İLİ	YIL
1	Sırlık	Göksun	MARAS	1973
2	Bodur	Karagöl	ANKARA	1972
3	Sırlık	Göksun	MARAS	1973
4	Sırlık	Göksun	Maras	1973
5	Bodur	Sungurlu	ÇORUM	1973
6	Sırlık	Su-Çatı	MARAS	1973
7	Bodur	Alaca	ÇORUM	1973
8	Sırlık	Yalova	İSTANBUL	1971
9	Bodur	Haymana	ANKARA	1972
10	Bodur	Merkez	AMASYA	1973
11	Sırlık	Merkez	SAMSUN	1973
12	Bodur	Toh. Islâh	SAMSUN	1973
13	Bodur	Suluova	AMASYA	1973
14	Bodur	Sungurlu	ÇORUM	1972
15	Bodur	Toh. Islâh	SAMSUN	1972
16	Bodur	Kazova	TOKAT	1973
17	Sırlık	Merkez	SAMSUN	1973
18	Bodur	Suluova	AMASYA	1973
19	Sırlık	Toh. Islâh	ORDU	1973
20	Sırlık	Sungurlu	ÇORUM	1973
21	Sırlık	Terme	SAMSUN	1973
22	Bodur	Kazova	TOKAT	1973
23	Bodur	Karamank	ANKARA	1973
24	Bodur	Mecitözü	ÇORUM	1972
25	Sırlık	Terme	SAMSUN	1973
26	Sırlık	Terme	SAMSUN	1973
27	Sırlık	Terme	SAMSUN	1973
28	Bodur	Merkez	ESKİŞEHİR	1972
29	Sırlık	Merkez	ESKİŞEHİR	1972
30	Bodur	Gelemen	SAMSUN	1973
31	Bodur	Euluova	AMASYA	1973
32	Sırlık	Merkez	BURSA	1973
33	Sırlık	Terme	SAMSUN	1973
34	Sırlık	Terme	SAMSUN	1973
35	Bodur	Merkez	ERZİNCAN	1973
36	Bodur	Yalnızbağ	ERZİNCAN	1973
37	Bodur	Yılbant	ANKARA	1973
38	Bodur	Çağlıyan	ERZİNCAN	1973
39	Sırlık	Merkez	ÇANKIRI	1972
40	Sırlık	Kızılcahamam	ANKARA	1972
41	Bodur	Merkez	ORDU	1972
42	Bodur	Kazan	ANKARA	1973
43	Bodur	Bayburt	GÜMÜŞHANE	1973
44	Sırlık	Merkez	SİVAS	1973
45	Bodur	Siran	GÜMÜŞHANE	1973
46	Bodur	Yassıören	ANKARA	1973

Yeast ekstrakt mannitol agar (YMA) besiyeri

Mannitol	10 gr.
$K_2HPO_4$	0.5 gr.
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.2 gr.
NaCl	0.1 gr.
Yeast Ekstrakt	1 gr.
Agar	15 gr.
Destile su	1 lt.

Maddeler karıştırılarak PH 7'ye ayarlandı ve 121 C° de 15 dakika sterilize edildi (12).

Laboratuvara uzak yerlerden alınan bazı numunelerin izolasyonları mahallinde yapıldı. Evvelce petrilere dökülmüş agarlı YMA besiyeri ve izolasyon için gerekli malzeme beraber götürüldü. Nodozitelere dış yüzey sterilizasyonu yapılarak YMA besiyeri üzerine kondu ve bir pensle ezilerek içinden çıkan öze ile gizilerek tek koloni düşürüldü.

Her numune için bir koloni seçilerek tüplerdeki eğik (YMA) üzerine ekim yapıldı. Böylece çeşitli yerlerden alınmış 46 Rhizobium phaseoli suşu elde edildi. Ayrıca Hollanda'nın Kampen Polder ve İngiltere'nin Rothamsted Araştırma Enstitülerinden temin edilen A 47 ve CC 511 suşları da araştırmaya alınarak toplam 48 suş üzerinden çalışma yapıldı.

3. Rhizobium Bakterilerinin Belirlenmesine Yardımcı Olan Testler:

a) Mikroskopik Deneyler :

Mikroskopik muayeneler için bir hafta inkübe edilmiş kültürler kullanıldı.

Gram Boyama : Rhizobiumlar için modifiye edilmiş yöntem kullanıldı (86).

Karbolfuksin ile Boyama : Preparatlar 20 saniye karbolfuksin ile boyanarak bakterilerin boyutları saptandı.

p-hydrorybutric asit granüllerinin boyanması : Preparatlar sudan black B ile boyanarak bakteri içinde granüllerin mevcudiyeti araştırıldı (86,87).

Bakteroidlerin Boyanması : Nodozitelere dış yüzeyleri sterilize edildi. 2 temiz lām arasında ezilerek yayıldı. Kuruduktan sonra 3-4 damla susuz alkolle tesbit edildi. Karbolfuksinle 5 dakika boyanarak morfolojileri ve boyutları incelendi (88).

Spor Boyama : Preparatlar kuruyup tesbit edildikten sonra Schaeffer ve Fulton'un tarif ettiği spor boyama yöntemi ile boyandı ve spor olup olmadığı incelendi (87).

b) Koloni Özellikleri :

Tüplerin dibine biraz kum ve 1 ml. su konarak sterilize edildi. Stok kültürlerden bir öze dolusu alınarak tüplere kondu ve iyice çalkalandı. Buradan YMA plaklarına tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. 28 C° de inkübe edilerek bir hafta müddetle hergün üreme durumları kontrol edildi. 7. gün koloni şekilleri, renkleri, büyüklükleri ve polisakkarit madde salgıları incelendi.

c) Hareket Muayenesi :

Edward ve Ewing besiyeri ile % 0.4 agar ilave edilmiş (YMA) besiyeri dik olarak tüplere kondu. İğne öze ile ekim yapılarak 28 C° de 1 hafta inkübe edildi (89).

d) Kongo Kırmızısı Absorbsiyonu :

1 lt. YMA besiyeri için 10 ml. 1/400 kongo kırmızısı kondu. 28 C° de 1 hafta inkübe edildi. Yetişmenin kırmızı renk blup olmadığı kontrol edildi (12).

e) Litmus Sütte Üreme :

Yarıya kadar litmus süt konmuş tüplere ekim yapılarak 28 C° de bir ay inkübe edildi (12).

f) Pepton Glukoz Agarda Üreme :

İçine indikatör olarak fenol kırmızısı konulan pepton glukoz agar plaklarına ekim yapılarak 28 C° den 2 gün inkübasyona bırakıldı (12) 90).

4. Sera Denemesi:

Sera denemesinde Leonard'ın modifiye ettiği şişe-kavanoz sistemi kullanıldı.

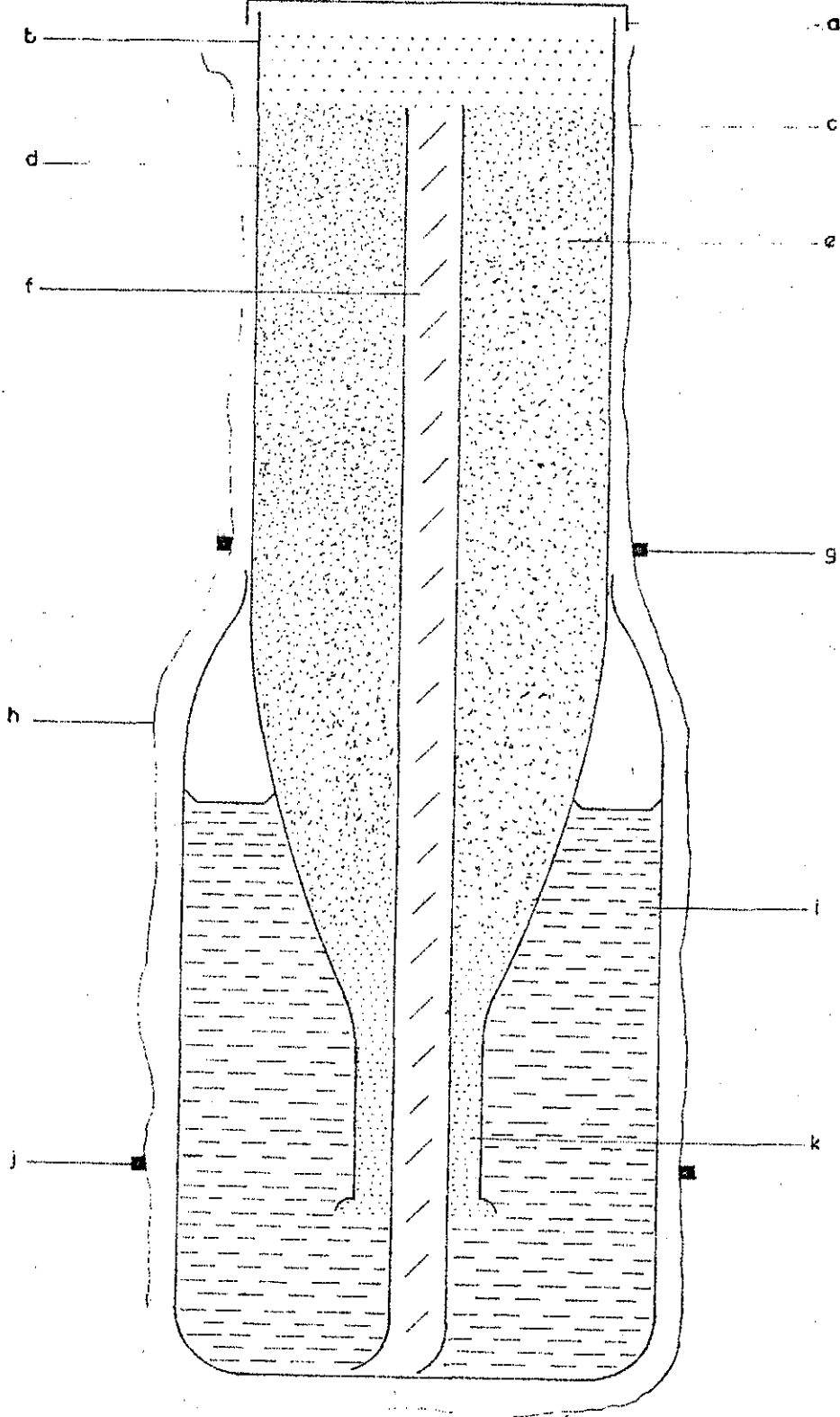
Steril şartlarda azotsuz besiyerinde fasulya bitkisi yetiştirilerek izole ettiğimiz R.phaseoli suşları ile aşılandı. Böylece bitkilerin azot ihtiyaçları suşların köklerde meydana getirdiği nodozitelerin aracılığı ile havadan bağlanan azottan sağlanmış oldu. Hasattan sonra bitkilerin kuru ağırlıkları ve total azotları tayin edilerek suşların etkinlik dereceleri saptandı.

a) Leonard'ın modifiye ettiği şişe-kavanoz sisteminin hazırlanması (86): sistemin üst ünitesi için 700 ml.lık şişeler kullanıldı. Köklerin ışıktan zarar görmemesi için renkli olanları seçildi. Şişelerin dipleri kesildi ve keskin yerler taşlanarak düzeltildi. (Şekil 3)

Sistemin alt ünitesi için kavanoz seçimi yapıldı. Şişe ters çevrilip ağzı kavanozun içine yerleştirildiğinde kavanozun ağzı şişenin boğazına oturacak ve dipten 2-4 cm. yukarıda kalacak şekilde 1 lt. kapasiteli cam kavanozlar seçildi. Ağız kısmı, şişe boğazına tamamen oturması için ince pamukla beslendi.

Kavanozdaki besin solusyonunu yetiştirme ortamı olan sistemin üst kısmına çıkartıp, gerekli rutubeti sağlamak amacı ile lâmba fitili kondu. Fitol önce deterjanlı su ile yıkanıp ıslatıldıktan sonra şişe ağzında pamukla muhafaza içine alındı.

ŞEKİL 3



ŞEKİL 3 : DEĞİSTİRİLMİŞ LEONARD'IN ŞİŞE KAVANUZ SİSTEMİ

- a) Petri kutusu kapağı
- b) Parafinli kum
- c) Sarılı kağıt
- d) Dip kısmı kesilip ters olarak yerleştirilmiş şişe
- e) Kaba kum
- f) Fıtil
- g) Sarılı ip
- h) Kavanoz
- i) Besin solusyonu
- j) Sarılı ip
- k) Pamuk

Nehirden alınan ve iyice yıkanarak parça büyüklükleri aşağıda gösterilen kum denemede kullanıldı. 1 kg. kuma 1 gr. hesabı ile gereken miktar  $\text{CaCO}_3$  konarak iyice karıştırıldı. Fıtil kumun orta yerinde kalacak ve kumun üst hizasına intibak edecek şekilde tutuldu. Kum yukarıdan 5 cm. aşağıya gelecek pozisyona kadar dolduruldu.

<u>%</u>	<u>Kumun Çeşidi</u>	<u>Parça Büyüklüğü</u>
51.54	Kaba kum	1 mm.
48.05	Orta kum	1/2 mm.

Bitkilerin yetişmesi için gerekli besin maddelerini kapsayan azotsuz Jensen besiyeri hazırlandı. 1/5 sulandırıldı. Sistem başına 750 ml. solusyon kullanıldı. Bununla kum üstten ıslatıldı ve alttaki kavanoza damlayıncaya kadar işleme devam edildi. Geri kalan solusyon kavanozun içine doğrudan döküldü (86).

Jensen Besiyeri :

$\text{CaHPO}_4$	1 gr.
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.2 gr.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 gr.
NaCl	0.2 gr.
$\text{FeCl}_3$	0.1 gr.
x Agar	8 gr.
Çeşme suyu	1 lt.

Hazırlanan besiyerinin litresine 1 cc mikroelement çözeltisi ilave edilerek PH 6.8'e ayarlandı (86).

(x) Sıvı besiyeri olduğu için agar kullanılmamıştır.



Mikroelement Cözeltileri :

Bo	% 0.05
Mn	% 0.05
Zn	% 0.005
Mo	% 0.005
Cu	% 0.002
Co	10 ppm

Sistemin üstü yarım bir petri ile kaplanarak kağıt ve ipe sarıldı. Otoklavda 121 C° de 2 saat sterilize edildi.

b) Tohumların Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi: Denemede Ziraf Araştırma Enstitüsünden alınan kızılbaş (contander) bodur fasulya tohumları kullanıldı. Sağlam, genellikle aynı boy ve ağırlıkta olan tohumlar seçildi. 250 ml.lik erlenmayerlere konarak önce hafif sabunlu su ile 3 dakika çalkalandı. Musluk suyu ile yıkanarak erlenmayerlerin ağzı lâstik tapa ile kapatıldı. Dış yüzey sterilizasyonu için 2 kısım su 1 kısım satüre brom ihtiva eden solusyon kullanıldı. Tohumlar bu solusyonda 4 dakika çalkalandı. Çeker ocak altında aseptik şartlarda defalarca brom kokusu gelmeyinceye kadar steril sudan geçirildi. Sterlize edilen tohumlar çimlendirme agarına ekildi (1 lt. çeşme suyu 10 gr. agar) ve 28 C° de inkübe edildi (86).

c) Kültürlerin Hazırlanması : Stok kültürlerden bir öze dolusu alınarak 100 ml. sıvı (YMA) besiyerlerine ekim yapıldı. 28 C° de 7 gün inkübe edildi. Bu kültürlerden tekrar 100 ml. sıvı (YMA) besiyerlerinde 1 ml. ekim yapılarak aynı ısı ve süre inkübe edildi. Bitkilerin aşılansında bu kültürler kullanıldı.

d) Ekimin Yapılması : Leonard'ın modifiye ettiği ve sterilize edilmiş sistemin (saksı) üstündeki kağıt açılarak diğer kısımlar kağıtlı bırakıldı. Üstte kapak görevi gören yarım petri kutusu kaldırıldı. Çimlendirilmiş fasulya tohumlarından 3 tane steril pens ile kuru yüzeyin hemen

altındaki rutubetli kısma ekildi ve petri tekrar kapatıldı. Fasulyalar kök salıp üst kısmı petriye değinceye kadar laboratuvarında bekletildi. Petri kutusu kaldırılarak hazırlanan bakteri kültürlerinden her saksıya steril pipetle 30 ar ml. konarak aşılandı. Havadan gelecek kontaminasyonu önlemek için 2 cm. kalınlığında parafinli kum ile kaplandı ve seraya taşındı.

e) Parafinli Kumun Hazırlanması : Van Schreven tarafından 1959'da tarif edilen yöntem kullanıldı. 10 gr. yüksek erime noktalı parafin, 1 lt. benzolde eritildi. Eriyik 10 kg. kum ile karıştırılarak temiz bir naylon üzerine serildi ve benzolün uçması sağlandı. Parafinli kum, ağzı pamukla kapanmış erlenmayerlere konarak 160 C° de 2 saat kuru sterilizeye tabi tutuldu (86).

İşlemlerin yapılması esnasında mümkün olduğu kadar steril çalışılmaya dikkat edildi. Deneme 3 paralelli, tesadüf parselleri desenine uygun olarak kuruldu. Ayrıca 3 saksı aşılanmadan azotsuz kontrol olarak bırakıldı. Azotlu kontrol olan 3 saksıya ise 70 ppm. N hesabı ile KNO<sub>3</sub> verilerek toplam 150 saksı ile çalışıldı.

f) Saksıların seradaki bakımı : Saksılar seraya götürülerek masaların üzerine yerleştirildi. Tabii güneş ışığında ve 20-22 C° ısıda gelişmeye bırakıldı. Ekilen 3 fideden zayıf gelişen bir tanesi alınarak bitki sayısı ikiye indirildi. Her gün kontrol edilerek gelişmenin seyri incelendi. Kuruyup düşen yapraklar ait olduğu saksıya konarak kuru madde ve azot tayininde hatanın asgariye indirilmesine çalışıldı.

g) Fasulyaların Hasadı : Saksılara musluk suyu konarak 1 gün bekletildi. Fitile sarılmış kökler dikkatlice çıkarılarak ritilden ayrıldı. Kökün sapla birleştiği yerlerden koparılarak üst kısmı zarflara kondu ve numaralandı. Köklerde nodozite sayısı, rengi, büyüklüğü ve dağılımı saptandı.

h) Kuru Madde Tayini : Zarflara konup numaralanan bitki numuneleri 65 C<sup>o</sup>deki fırında 48 saat bırakılarak tartıldı.

i) Azot Tayini : Kuru ağırlıklarına alınmış bitki numuneleri özel değirmenlerde öğütülerek ince parçacıklar haline getirildi. Belli gram tartılarak (genellikle 0.5 gr.) modifiye edilmiş Kjelhahl yöntemi ile % azot tayini yapıldı (91) Bu yöntem ile organik formda bulunan azot ile inorganik azot tayin edildi. Bitki materyali sülfürik asitle karıştırılmak sureti ile organik bileşikler parçalandı ve mevcut azot amonyum formuna dönüştürüldü. Alkali ortamda destile edildi. Açığa çıkan ve boric asitte toplanan amonyak uygun bir indigatör kullanılarak standart sülfürik asitle titre edildi. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\% N = \frac{(T-B) N \times 14 \times 100}{1000 \times A} = (T-B) N \frac{1.4}{A}$$

- T: Numune için titrasyonda harcanan standart asit miktarı ml.  
B: Kontrol için titrasyonda harcanan standart asit miktarı ml.  
N: Standart asidin normalitesi  
A: Alınan bitki numunesinin ağırlığı gr.

j) İstatistikî Değerlendirme : Araştırma genellikle laboratu-  
ar ve sera denemelerinde kullanılan tesadüf parselleri desenine uygun  
olarak kuruldu. İstatistikî analizde varyans analiz yöntemi kullanıldı.  
işer tarafından ortaya konan bu yöntemde unsurun genel varyanstaki payı  
ayın edildi (92).

k) Etkenlik Derecesinin Saptanması : Bitkinin kapsadığı ortalama  
azot miktarları aşağıdaki formüle uygulanarak etkenlik derecesi saptandı(93).

$$\text{Etkenlik derecesi} = \frac{\text{Test bitkisinin ortalama azot miktarı}}{\text{Azotlu kontrol bitkisinin ortalama azot miktarı}}$$

Suşların etkenlik derecelerine göre sınıflara ayrılmasında aşağıdaki sınırlar kullanıldı.

- 1) Etkenlik derecesi 100-75 olanlar Etkili
- 2) Etkenlik derecesi 75-50 olanlar Orta derecede etkili
- 3) Etkenlik derecesi < 50 olanlar Etkisiz

### III- B U L G U L A R

#### Mikroskopik Muayeneler :

Suşların hepsi mikroskopta gram negatif çomaklar şeklinde görülmüştür. Karbol Fuksin ile boyanan preparatlarda bakterilerin boyları 0.8 - 3.2 mikron, enleri 0.5 - 1.3 mikron arasında değişmektedir.

Sudan blak ile boyanan preparatlarda 34 suşta  $\beta$  hidoksibu-tirik asit granüllerine rastlanmıştır (Tablo 4).

Özel boyama sonucu suşların hiçbirisinde spor gözlenememiştir.

Bakteroid şekiller, orijinal suşlardan daha büyüktür. Genellikle çomak görünümünde olup, dallanmış şekillerine ender rastlanmıştır. Boyları 6.6 - 4.1, enleri 3.0 - 1.0 mikron arasında değişmektedir (Tablo 4).

#### Hareket Muayenesi :

Kullanılan 2 çeşit besiyerinde 2 suş hariç, diğerlerinin hareketli oldukları saptanmıştır. Yukarıdaki bulgular (Tablo 4) de gösterilmiştir.

#### Koloni Özellikleri :

Suşların tamamı (YMA) plaklarında 1-5 gün arasında üremişlerdir. 24 saat sonundaki üremeler çok hafif olarak gözlenmiştir. Meydana gelen koloniler yuvarlak kenarları düz ve hafif kabarıktır. 7 günlük inkübasyondan sonra çapları 1.2 - 4.2 mm. arasında değişmektedir. 36 suş beyaz 12 suş krem renklidir. 24 tanesi çok, 14 tanesi orta, 4 tanesi az miktarda polisakkarit maddeler salgılamış 6 suşta salgılama görülmemiştir (Tablo 5).

TABLO 4

Suşların Bazı Morfolojik ve Boyama Özellikleri

Suş No.	BAKTERİ		BAKTERİOLD		B-hydroxy butyrate Cranilleyi	Hareket
	Uzunluk µ	Genişlik µ	Uzunluk µ	Genişlik µ		
1	0.8	1.0	5.0	1.1	+	+
2	1.8	1.2	-	-	-	-
3	2.0	0.7	6.3	2.5	+	+
4	2.0	1.3	6.6	2.5	+	+
5	1.5	1.2	4.8	1.5	+	+
6	1.0	0.7	-	-	-	+
7	1.5	0.7	5.0	1.5	+	+
8	1.8	1.0	6.0	1.8	+	+
9	1.8	0.8	-	-	+	+
10	1.5	0.6	4.6	1.6	+	+
11	1.2	0.8	5.8	1.5	+	+
12	1.3	0.8	6.3	1.5	+	+
13	2.2	0.7	5.0	1.6	+	+
14	1.2	0.7	5.0	1.0	+	+
15	1.5	0.8	-	-	-	+
16	1.3	1.0	5.2	2.0	+	+
17	1.7	0.8	-	-	+	+
18	1.2	1.0	2.0	2.6	+	+
19	1.5	0.9	5.0	1.1	+	+
20	3.0	1.0	-	-	-	+
21	1.2	0.5	5.0	1.0	+	+
22	2.0	1.0	5.8	1.1	+	+
23	1.7	1.0	6.3	2.1	-	+
24	1.3	1.0	-	-	-	+
25	2.0	1.2	5.8	3.0	+	+
26	3.0	1.2	-	-	-	+
27	1.7	1.2	-	-	+	+
28	1.2	0.5	-	-	+	+
29	1.5	1.0	-	-	+	+
30	2.2	1.3	6.1	2.0	+	+
31	2.5	1.2	5.1	1.3	+	+
32	2.0	1.0	-	-	-	+
33	2.3	1.2	6.6	2.3	+	+
34	2.0	1.2	-	-	+	+
35	3.2	1.0	4.1	1.5	+	+
36	1.5	1.0	-	-	+	+
37	2.6	1.2	5.8	3.0	-	+
38	1.5	0.8	-	-	-	+
39	1.8	0.7	-	-	-	+
40	1.7	0.8	5.3	1.5	+	+
41	1.0	0.7	-	-	-	-
42	1.5	0.7	6.5	1.6	-	+
43	2.2	1.0	5.8	1.0	-	+
44	2.0	0.0	6.3	2.6	+	+
45	2.5	0.8	5.7	1.1	-	+
46	1.2	0.8	6.6	2.0	+	+
A 47	1.5	0.8	6.6	2.8	+	+
CC 511	3.0	0.9	4.3	1.6	+	+

## Suçların Üreme Süresi ve Koloni Özellikleri

Sok. No.	ÜREME ZAMANI/gün	KOLONİ ÖZELLİKLERİ		
		Büyüklik Çap/mm	Renk	Kolisakkarit Mad. Bulunlana
1	5	3.6	Beyaz	Orta
2	1	2.8	Beyaz	Yok
3	3	4.0	Beyaz	Çok
4	5	1.6	Beyaz	Yok
5	4	2.7	Beyaz	Çok
6	1	2.6	Krem	Orta
7	4	2.2	Beyaz	Çok
8	1	3.5	Beyaz	Çok
9	3	3.4	Beyaz	Orta
10	5	2.0	Beyaz	Çok
11	2	2.9	Beyaz	Orta
12	2	4.0	Beyaz	Çok
13	3	2.0	Beyaz	Az
14	3	3.8	Beyaz	Çok
15	3	1.8	Krem	Orta
16	2	3.6	Beyaz	Çok
17	2	3.8	Beyaz	Çok
18	1	3.0	Krem	Çok
19	2	1.2	Beyaz	Yok
20	3	1.8	Beyaz	Az
21	2	2.2	Beyaz	Az
22	2	4.2	Beyaz	Çok
23	2	2.4	Krem	Orta
24	1	2.0	Krem	Çok
25	3	1.6	Beyaz	Orta
26	3	2.0	Beyaz	Orta
27	1	2.6	Beyaz	Çok
28	1	2.8	Beyaz	Çok
29	3	2.8	Beyaz	Çok
30	3	3.6	Beyaz	Çok
31	3	1.6	Beyaz	Az
32	3	3.2	Beyaz	Çok
33	2	2.5	Beyaz	Orta
34	1	1.6	Krem	Orta
35	2	3.0	Beyaz	Orta
36	1	2.6	Beyaz	Yok
37	3	3.2	Beyaz	Çok
38	1	1.8	Krem	Yok
39	1	1.8	Beyaz	Çok
40	3	2.5	Krem	Çok
41	1	1.6	Krem	Yok
42	3	4.0	Beyaz	Çok
43	2	1.8	Krem	Çok
44	3	3.0	Beyaz	Orta
45	2	2.6	Krem	Orta
46	3	2.8	Beyaz	Çok
47	3	3.2	Krem	Çok
CC 511	4	1.8	Beyaz	Orta

Kongo Kırmızısı Absorbsiyonu :

Suşlar kongo kırmızısının genellikle az absorbe etmişlerdir. 6 suş hiç absorbe etmemiş 35 suş az 3 suş orta 4 suşda çok miktarda da absorbsiyon gözlenmiştir.

Litmus Sütte Üreme :

Bütün suşlar yavaş üremiş, 31 tanesinde sezum zonu meydana gelmiş, 17 suşta böyle bir zon görülmemiştir. Hafif alkali reaksiyon meydana getiren suş sayısı 33 dür. 14 suşda herhangi bir reaksiyon değişikliği görülmemiştir (Tablo 6).

Pepton-Glukoz Agarda 2 Günde Üreme :

Bu besiyerinde üzerinde gelişme zayıf olarak saptanmıştır. 26 suşta bu süre zarfında üreme olmamış, 20 sinde az ve 2 sinde de orta derecede üreme kaydedilmiştir. Üreme olan plaklar da hafif PH değişikliği mevcuttur (Tablo 6).

Sera Çalışmaları Sonuçları :

Deneme süresince kırılma, çimlenme yetersizliği ve tek bitki kalması sebebi ile 150 saksıdan 14 tanesi kayba uğrayarak denemeden çıkarılmıştır. İstatistikî analizde bunlar kayıp parseller olarak değerlendirilmiştir.

Denemede fasulya bitkisinin kökleri kum içinde geliştiğinden nodozite oluşumu gözlenememiştir. İlk olarak yapraklarda sararma ve kuruma azotsuz kontrol ile bazı suşlarla aşılı saksılarda görülmüştür. Deneme süresince azotlu kontrol ile bir kısım aşılı saksılarda ise gelişme normal seyrini takip etmiştir (Şekil 4).

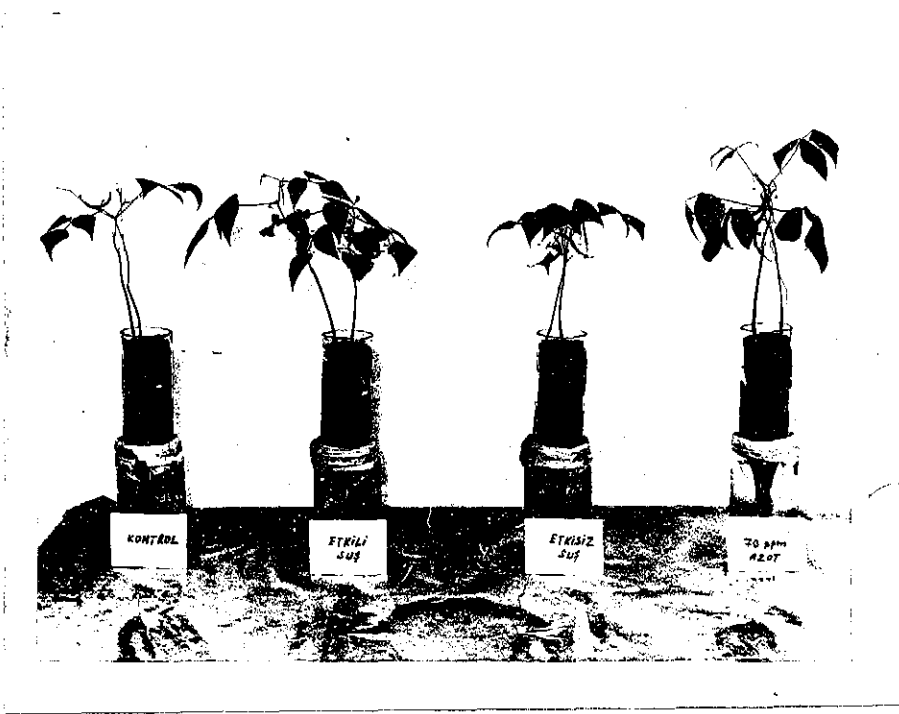
Bitkilerde çiçeklenmenin başlangıcı 4. hafta sonuna rastlamaktadır. İyi gelişme gösteren aşılı bitkilerin ana ve yan kökleri üzerinde özellikle ana kökün sapa yakın yerinde nodoziteler oluşmuştur. Yuvarlak



TABLO 6

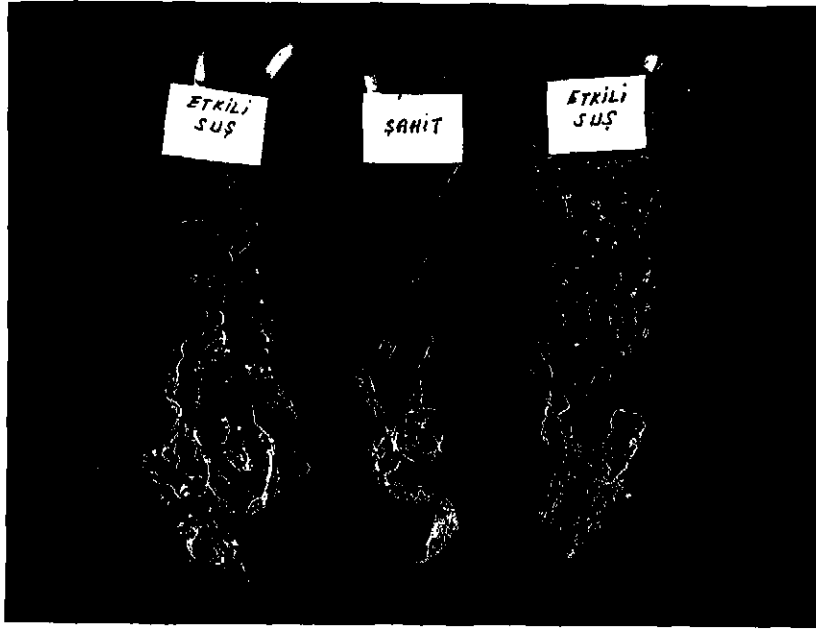
Buzların bazı kültürel özellikleri

SÜŞ NO.	LİFERİK SÜT		Kongo RED Absorbasyonu	Pepton-Glukoz Ağarda 2 günde üreme
	SERUM KONU	ANALİTİK REANİSYON		
1	+	+	Yok	Yok
2	-	+	Çok	Orta
3	+	+	Yok	Yok
4	+	+	Az	Az
5	+	+	Az	Yok
6	+	+	Yok	Az
7	+	-	Az	Yok
8	+	+	Az	Az
9	-	-	Az	Yok
10	-	+	Az	Yok
11	+	+	Az	Az
12	+	+	Az	Az
13	+	+	Az	Yok
14	+	+	Az	Yok
15	-	+	Az	Yok
16	+	+	Az	Az
17	-	-	Orta	Yok
18	+	+	Az	Az
19	-	-	Az	Az
20	+	+	Az	Yok
21	+	+	Az	Az
22	+	+	Az	Yok
23	-	-	Az	Az
24	-	-	Yok	Az
25	-	+	Az	Yok
26	+	-	Az	Yok
27	+	-	Az	Az
28	-	-	Çok	Az
29	+	-	Orta	Yok
30	+	+	Az	Yok
31	+	+	Orta	Yok
32	-	+	Çok	Yok
33	+	+	Az	Az
34	+	-	Yok	Orta
35	-	-	Az	Yok
36	-	+	Yok	Az
37	+	-	Az	Yok
38	-	-	Az	Az
39	+	+	Az	Az
40	-	+	Az	Yok
41	+	+	Çok	Az
42	+	+	Az	Yok
43	-	+	Az	Az
44	+	+	Az	Yok
45	+	-	Az	Az
46	+	-	Az	Yok
A 47	-	+	Az	Yok
CC 511	-	+	Az	Yok



ŞEKİL : 4

Kontrol ve Aşılı Saksılarda Bitki Gelişmeleri



ŞEKİL : 5

Kontrol ve Aşılı Bitkinin Kök Yapıları

çeşitli büyüklüklerde, tek olduğu gibi 3-4 tanesi bir arada küme şeklinde üzeri alacalı ve girintili olan nodoziteler tipiktir (Şekil 5). Sayıları 27 ile 93 arasında, çapları 0.2-6 mm. arasında değişmektedir. Renkleri genellikle pembedir. 16 suş nodozite meydana getirememiş kontrol bitkilerinde de nodüllenme olmamıştır (Tablo 7).

Aşılı saksılardaki bitkilerin ortalama kuru ağırlıkları 0,7267 - 1,8167 gram arasında azot miktarları ise 14.16 - 48.05 mg. arasında değişmektedir. Azotlu kontrol saksıdaki ortalama kuru ağırlık 1,5533 gr. azot miktarı ise 47.85 mgr.dır. Değerleri Tablo (8) ve (9) da gösterilmiştir.

Kuru madde ve azot miktarları esas alınarak düzenlenen varyans analiz cetvelleri Tablo (10) ve (11) de gösterilmiştir. Konular arasındaki farklılık saksıların ortalama azot miktarları etkenlik dereceleri ve girdiği gruplar Tablo (12) de gösterilmiştir.

Suğlarla Açılı Köklerde Meydana Gelen Nodazitelerin Özellikleri

SUS NO.	N O D O Z İ T E				
	ORTALAMA SAYI	EN BÜYÜK Çap/mm	EN KÜÇÜK ÇAP/mm	RENK	DAĞILIM
1	86	6	0.3	Pembe	Ana kök
2	-	-	-	-	-
3	68	5	0.2	Pembe	Ana kök
4	46	6	0.5	Açık pembe	Ana kök
5	41	5	0.2	Pembe	Ana kök
6	-	-	-	-	-
7	68	6	0.2	Pembe-gri	Ana kök
8	65	5	0.4	Pembe	Ana saçak kök
9	-	-	-	-	-
10	76	4	0.2	Koyu pembe	Dağınak
11	73	5	0.2	Pembe	Dağınak
12	81	6	0.5	Pembe	Ana kök
13	56	3	0.2	Pembe	Dağınak
14	68	5	0.3	Pembe	Saçak kök
15	-	-	-	-	-
16	58	4	0.5	Açık pembe	Dağınak
17	27	4	0.2	Beyaz	Ana kök
18	82	5	0.5	Pembe-yeşil	Dağınak
19	81	5	0.3	Koyu pembe	Ana kök
20	-	-	-	-	-
21	83	5	0.6	Pembe-gri	Ana kök
22	73	3.5	0.5	Yeşil-pembe	Dağınak
23	79	5	0.4	Pembe	Ana kök
24	-	-	-	-	-
25	93	4.5	0.3	Pembe	Ana kök
26	-	-	-	-	-
27	58	4	0.5	Pembe-yeşil	Dağınak
28	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-
30	45	4	0.5	Pembe	Ana kök
31	69	5	0.5	Pembe	Ana kök
32	-	-	-	-	-
33	85	6	0.5	Pembe	Ana kök
34	-	-	-	-	-
35	32	2	0.5	Beyaz	Dağınak
36	-	-	-	-	-
37	74	5	0.5	Pembe-yeşil	Dağınak
38	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-
40	65	5	0.4	Pembe	Ana kök
41	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-
43	48	4	0.3	Pembe-beyaz	Ana kök
44	90	5	0.3	Pembe	Ana kök
45	54	4	0.5	Pembe	Ana kök
46	66	1	0.8	Beyaz	Dağınak
A 47	53	4	1.0	Pembe-beyaz	Ana kök
CC 551	78	5	0.5	Pembe	Dağınak
+ N	-	-	-	-	-
- N	-	-	-	-	-

TABLO 8

Saksilerdeki Kuru Madde Ağırlıkları

KONULAR	TEKRARLAMALAR (Saksi/gr.)			TOPLAM	ORTALAMA
	I	II	III		
1	0.78	1.95	1.45	4.18	1.3933
2	1.12	0.80	0.85	2.77	0.9233
3	1.10	1.80	1.40	4.30	1.4333
4	0.70	0.85	1.10	2.65	0.8833
5	1.35	1.25	-	2.60	1.3000
6	1.10	0.70	-	1.80	0.9000
7	0.80	1.70	0.35	2.85	0.9500
8	1.52	1.16	1.20	3.88	1.2933
9	1.12	0.60	-	1.72	0.8600
10	1.35	1.20	0.40	2.95	0.9833
11	1.45	0.90	-	2.35	1.1750
12	1.50	1.20	1.35	4.05	1.3500
13	1.32	0.60	1.25	3.17	1.0567
14	2.18	1.20	1.45	4.83	1.6100
15	1.02	0.50	-	1.52	0.7600
16	1.05	0.70	0.85	2.60	0.8667
17	0.79	0.70	1.43	2.92	0.9733
18	1.45	0.70	1.20	3.35	1.1167
19	0.65	1.72	-	2.37	1.1850
20	1.00	0.82	0.30	2.72	0.9067
21	1.71	1.65	1.05	4.41	1.4700
22	0.80	1.18	0.90	2.88	0.9600
23	1.35	1.65	-	3.00	1.5000
24	1.09	0.83	0.87	2.79	0.9300
25	1.23	1.33	1.25	3.81	1.2700
26	0.55	0.50	1.25	2.30	0.7667
27	0.50	1.10	-	1.60	0.8000
28	0.85	0.65	-	1.50	0.7500
29	0.90	0.74	-	1.64	0.8200
30	1.00	0.65	0.70	2.35	0.7833
31	0.98	0.70	1.00	2.68	0.8933
32	0.55	1.35	0.55	2.45	0.8167
33	1.55	0.95	-	2.50	1.2500
34	1.13	1.02	0.70	2.85	0.9500
35	1.20	0.55	0.80	2.55	0.8500
36	0.65	1.02	0.95	2.62	0.8733
37	0.53	1.07	0.75	2.35	0.7833
38	1.22	0.70	-	1.92	0.9600
39	0.90	1.10	1.06	3.06	1.0200
40	2.32	1.68	1.45	5.45	1.8167
41	0.92	0.61	0.76	2.29	0.7633
42	0.80	0.73	0.65	2.18	0.7267
43	1.20	0.90	0.65	2.75	0.9167
44	1.05	1.35	0.60	3.00	1.0000
45	1.05	1.03	0.95	3.03	1.0100
46	1.10	1.38	-	2.48	1.2400
A 47	1.30	1.30	1.29	3.89	1.2967
CC 511	0.96	2.22	-	3.17	1.5850
+ N	1.42	1.55	1.69	4.66	1.5533
- N	1.02	0.98	0.69	2.69	0.8966

TABLO 9

Saksilerdeki Azot Miktarı

KONULAR	TEKRARLAMALAR (Saksa/m <sup>2</sup> r.)			TOPLAM	ORTALAMA
	I	II	III		
1	24.90	53.37	42.99	121.26	40.42
2	22.40	16.00	17.00	55.40	18.47
3	37.82	59.26	47.14	144.16	48.05
4	21.85	21.77	19.41	63.03	21.01
5	35.99	51.56	-	67.55	33.78
6	18.91	15.23	-	34.14	17.07
7	23.86	32.22	9.82	65.90	21.97
8	37.09	21.85	23.64	82.56	27.52
9	20.43	12.21	-	32.64	16.32
10	38.84	36.20	12.63	87.67	29.22
11	47.31	23.68	-	70.99	35.50
12	48.42	35.78	41.91	126.11	42.04
13	34.27	17.89	34.86	87.02	29.00
14	51.27	34.57	41.57	127.41	42.47
15	17.89	11.62	-	29.51	14.76
16	34.26	21.12	14.61	69.99	23.33
17	19.28	23.25	40.99	83.52	27.84
18	36.24	25.52	32.46	94.22	31.41
19	19.67	52.49	-	72.16	36.08
20	18.20	15.42	16.65	50.27	16.76
21	41.98	39.77	28.40	110.15	36.72
22	20.46	27.06	22.23	69.75	23.25
23	40.26	46.89	-	87.15	43.57
24	19.71	15.26	20.46	55.43	18.48
25	38.40	40.25	42.10	120.75	40.25
26	13.51	2.76	21.92	44.19	14.73
27	15.13	30.87	-	46.00	23.00
28	17.30	11.02	-	28.32	14.16
29	20.21	18.95	-	39.16	19.58
30	30.87	20.53	18.91	70.31	23.44
31	27.16	11.29	18.95	57.40	19.13
32	12.14	21.29	15.25	49.18	16.39
33	56.54	35.99	-	92.53	46.27
34	19.82	20.40	16.78	57.00	19.00
35	22.31	10.80	16.56	49.67	16.56
36	24.94	21.47	16.66	63.07	21.02
37	16.04	36.41	24.11	76.56	25.52
38	23.12	10.70	-	33.82	16.91
39	17.64	21.34	19.16	58.14	19.38
40	55.91	36.31	32.61	124.83	41.61
41	21.37	16.14	20.33	57.84	19.28
42	14.31	14.60	18.01	46.92	15.64
43	31.57	19.56	16.65	67.78	22.59
44	35.36	34.10	14.10	83.56	27.85
45	30.94	17.34	22.23	70.51	23.50
46	19.68	23.72	-	43.40	21.70
A 47	27.95	31.34	28.44	87.73	29.24
CC 551	26.33	66.20	-	92.53	46.27
+ N	46.97	44.42	52.17	143.56	47.85
- N	21.29	22.19	9.94	53.42	17.80

Tablo (10)

Ortalama Kuru Madde gr/saksı  
Değerlerine Göre  
Varyans Analiz Cetveli

V.K.	S.D.	K.T.	K.O	F	Cetvelden F	
					% 5	% 1
Mevzular	49	24.1772	0.4934	5.17 <sup>**</sup>	1.50	1.76
Hata	100	9.5509	0.0955			
Total	149	33.7281	-			

Tablo (11)

Ortalama Toplam Azot mgr/saksı  
Değerlerine Göre  
Varyans Analiz Cetveli

V.K.	S.D.	K.T.	K.O	F	Cetvelden F	
					% 5	% 1
Mevzular	49	22889.1063	467.1246	7.34 <sup>**</sup>	1.50	1.76
Hata	100	6364.9835	63.6498	-		
Total	149	29254.0898	-			

TABLO 12

Saksılardaki Ortalama Azot Miktarları, Suşların Etkenlik Dereceleri ve Girdikleri Gruplar

BAŞ NO.	ORTALAMA AZOT MİKTARI mg/saksı	ETKENLİK DEREJELERİ	GRUP SINIRLARI	GRUP AYIRIMI
3	48.05	100		
CG 511	46.27	97		
33	46.27	97		
23	43.57	91		
14	42.47	89	100-75	Etkili suşlar
12	42.04	88		
40	41.61	87		
1	40.42	84		
25	40.25	84		
21	36.72	77		
19	36.09	74		
11	35.50	74		
5	33.78	71		
18	31.41	67		
A 47	29.24	61	75-50	Orta derecede etkili suşlar
10	29.22	61		
13	29.00	61		
44	27.85	58		
17	27.64	58		
8	27.52	58		
37	25.52	53		
45	23.50	49		
30	23.44	49		
16	23.33	49		
22	23.25	49		
27	23.00	48		
13	22.59	47		
7	21.97	46		
46	21.70	45		
36	21.02	44		
4	21.01	44		
39	19.58	41		
39	19.36	41		
41	19.28	40	< 50	Etkisiz suşlar
31	19.13	40		
34	19.00	40		
24	18.48	39		
2	18.47	39		
6	17.07	36		
38	16.91	35		
20	16.76	35		
35	16.56	35		
32	16.39	34		
9	16.32	34		
42	15.64	33		
15	14.76	31		
26	14.73	31		
28	14.16	30		
+N	47.85			
-N	17.80			



#### IV- T A R T I Ş M A

Çalışmada önce Rhizobium cinsi bakterilerde genellikle görülen bazı özelliklerin izole ettiğimiz suşlarda olup olmadığı araştırılmıştır.

Çeşitli ilim adamlarının Rhizobium bakterilerinin morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve antijenik karakterleri üzerinde yaptığı birçok araştırmalar vardır. Ancak bu özellikler, Rhizobiumun diğer cinse ait bakterilerden ayırmasına yardımcı olmakla beraber bizi kesin bir tanımlamaya götürmez (12,86) Tablo (13).

Bergey's Manual'de Rhizobiumun boylarının 0.9 - 3.0 mikron genişliklerinin 0.5 - 0.9 mikron arasında değiştikleri belirtilmiştir (10). İzole ettiğimiz suşların boyları bu sınırlar içinde kalmakla beraber 24 suşun enleri 0.9 mikrondan büyük bulunmuştur (Tablo 4). Graham yapmış olduğu bir araştırmada suşların enlerini 0.7 - 1.2 mikron arasında saptamıştır (.94). Bizim bulgularımızda bununla uyum sağlamaktadır. 14 suşta Rhizobiumlar için karakteristik özellik taşıyan hidrosibutirat granüllerine rastlanmamıştır Ancak Tablo (13) ün incelenmesinden anlaşılacağı gibi granüllerin ekseriya mevcut olduğu belirtilmiş olup, mutlak bulunması gerektiğine dair kesin bir kayıt yoktur. Rhizobiumlarda hareket genellikle çok yavaştır (94). İzole ettiğimiz suşlardan 2 sinde hareket gözlenememiştir. Bergey's Manual'de bazı suşların hareketsiz oldukları belirtilmektedir (10) (Tablo 4). Graham'da denemeye aldığı suşların bir tanesini hareketsiz bulmuştur (94). Tablo 4 de morfolojik ve boyama testlerinde Rhizobiumda rastlanmayan küçük kök, büyük çubuk, uzun zincirlenme, spor ve gram pozitif özellikler suşlarımızda mevcut değildir.

Kültürel karakterlerini incelemek için YMA plaklarına ekim yapılmış ve suşlar üreme için değişik sürelerle istek göstermiştir (Tablo 5).

## TEST

RHIZOBİUM CİNSİ BAKTERİLERİNİN  
KARAYERSEL ÖZELLİKLERİRHIZOBİUM CİNSİ BAKTERİLERDE  
SOPORİJEN ÖZELLİKLER

## A. Morfoloji ve boyama özellikleri

Kısa-orta çubuklar, (genellikle 1-3 ) gençken hareketli, ekseriye H- hydroxyوترate granülleri mevcut, sporlanma görülmez. Gram (-)

Kok, çok büyük çubuk, uzun zincir-  
lenme, sporlanma Gram (+)

## B. Kültürel özellikleri

1- Yeast mannitol aşar üzerinde  
üreme 25-29 C°

24 saat sonra çok hafif üreme, 3-5 gün içinde orta ve bol üreme, renksiz veya ojeaz genellikle orta veya çok polisakkarit madde salgılama (R. trifolii, R. Lefmannia-  
strum, R. fransesoli, R. meliloti bazı R. japonicum suşları)  
veya

1-2 gün içinde bol üreme beyazdan  
başka renk (Lotononis suşu hariç)

5 gün sonra çok hafif üreme, 10 günde hafif ve orta dere-  
cede üreme, renksiz beyaz nadiren pembe, hafif polisakkarit  
madde salgılama (R. Lupini, R. Japonicum,) Lotononis  
binesli den izole edilen Rhizobium karakteristik olarak  
pembedir.

2. Konşo kırmızısı yeast mannitol  
ağarda 20° -20° de üreme

Fazla boya absorpsiyonu

3. Pepton glukoz ağarda 30 C° de  
iki günlük üreme ve pH değişikliği

Rhizobium bu vasat üzerinde çok zayıf ürer ve pH'ı  
çok az değiştirir

Boi üreme ve kesin pH değişikliği

4. Litmus süt te 26 C° üreme  
(değiştirme)

Asit veya alkali reaksiyona geçirme olmaz veya çok  
yavaş olur. Hazen cerrak, sarım zonu meydana gelir.

Çabuk üreme ve reaksiyon değişikliği

## C. Baklagil Enfeksiyonu

Bakteriyolojik kontrollü şartlarda uyumlu baklagil  
üzerinde nodozite teşkil eder.

## D. Serology

Rhizobium'un kırık ve gomatik antiserumu ile 1/200  
ve daha aşağıdaki aglütinasyon. Burada Agrobacterium  
ile bazı R. suşları arasında çarpaz reaksiyon mevcuttur.

## E. Bakteriyofaj Hassasiyeti

D. Jaki sınırlayıcı durum burada da mevcuttur.

1 günde üreyen suşlarda yetiştirme çok hafiftir. *Rhizobium phaseoli* türü çabuk üreyen guruba dahildir (10,12). Denemeye aldığımız suşların hepsi 5 gün içinde koloni meydana getirerek çabuk üreme karakteri göstermiştir. Polisakkarit madde salgılaması bazı suşlarda görülmemekle beraber genellikle azdan çok miktarlara kadar değişmektedir (Tablo 5). 7 günlük inkübasyon sonunda suşların koloni çapları 1.2 - 4.2 mm. arasında değişmektedir. Graham çalışmasında yavaş üreyen tiplerin aynı süre içinde koloni çaplarını 1 mm.den küçük, çabuk üreyenlerin ise 2-4 mm. arasında değiştiğini bulmuştur. Teste aldığımız suşların büyük bir kısmının büyük- lükleri bu sınırlar arasında bulunmaktadır (Tablo 5). Kültürel testlerde *Rhizobium*da bulunmayan 1-2 gün içinde fazla üreme ve beyazdan başka renkli koloni özellikleri suşlarımızda gözlenmemiştir (Tablo 5).

Kongo kırmızısı absorpsiyon testlerinde 4 suş fazla miktarda absorpsiyon göstermiştir (Tablo 6). Bu durum *Rhizobium*larda görülmeyen bir karakterdir (Tablo 13). Pepton glukoz agarda 2 gün içinde genellikle az, veya hiç üreme olmamıştır. Kesin PH değişikliği de yoktur. Litmus sütte ise üreme yavaş olup, bazı suşlar hafif alkali reaksiyon ve serum zonu meydana getirmişlerdir (Tablo 6). Bergey's Manuel'de, *Rhizobium phaseoli* türlerinin Litmus sütü alkali yaptıkları ve serum zonu meydana getirdikleri belirtilmişse de, bu bütün suşlar için doğru değildir. Ishizawa *Rhizobium* suşlarının Litmus sütteki reaksiyonlarını farklı bulmuş (95) Graham ise 37 suştan ancak 18 tanesinin serum zonu meydana getirebildiğini saptamıştır (94). Yapılan morfolojik ve kültürel testler Tablo (13) de gösterilen *Rhizobium*un karakteristik özellikleri ile büyük bir uyum içindedir. Ancak 4 suş *Rhizobium*da görülmeyen kuvvetli kongo kırmızısı absorpsiyon özelliği göstermiştir. Bazı hallerde *Rhizobium*da bu özelliğin de var olduğu belirtilmektedir (12).

Antijenik yapı bakımından geniş ölçüde farklılık göstermektedir (14). Yapılan araştırmalarda ortak bir antijen bulunamamıştır (14,16). Bazı agrobakterium cinsleri ile çapraz reaksiyon vermesi serolojik testlerin değerini sınırlamaktadır (12,86).

Yukarıdaki açıklamalardan anlaşılacağı gibi morfolojik ve kültürel karakterlere dayanarak Rhizobiumu kesin olarak ayırmak çok güçtür (12,86).

En güvenilir sonuç, bakteriyi uyumlu baklagil bitkisine aşıllı olarak, nodozite yapabilme yeteneğini araştırmak yolu ile elde edilmiştir (12,86).

İzole ettiğimiz suşların nodozite yapabilme ve azot bağlama yeteneklerini saptamak amacı ile fasulya bitkisine aşılama yapılmış ve sonuçlar bulgular bölümünde gösterilmiştir.

Suşlardan 16 sı fasulya bitkisi üzerinde nodozite meydana getirememiştir (Tablo 7). İlk akla gelen bu suşların Rhizobium cinsine ait olmadığı görüşüdür. Ancak çeşitli araştırmacılar bazı koşullarda Rhizobium bakterilerinin kök enfeksiyonunu ve nodozite oluşumunu başaramadıklarını belirtmektedirler. Bu durum aşağıda tartışılmıştır.

Rhizobiumlarda meydana gelen bazı mutant suşlar bitki kökünü enfekte etme yeteneğini kaybederler. Yapılan bir araştırmada bu tip bir mutant bitki kök ucunda üreyememiştir. Antijenik yapı ve salgıladığı polisakkarit maddeler bakımından orijinal bakteri ile aralarında fark bulunamamıştır (96) (97).

Kök enfeksiyonununun gerçekleşmesi Rhizobiumların Rhizosferde çoğalarak yeterli hücre sayısına ulaşması ile mümkündür. Bitki kökü hızla büyüyüp alt kısımlara indiğinden enfeksiyon için lazım olan süre sınırlıdır. Çünkü aşağı kısımlarda koşullar genellikle Rhizobiumların üremesi için uygun değildir (25).

Bazı Rhizobium suşları toprak şartlarında hayatiyetlerini kuvvetle devam ettirme yeteneğinde değildir. Dolayısıyla Rhizobiumlar enfeksiyon için yeterli sayıya ulaşamazlar (93).

Bazı baklagil tohum kabukları, suda erir ısıya dayanıklı geniş ölçüde Rhizobium bakterileri üzerine antibiyotik etki yapan maddeler salgırlarlar. Bu salgırların aktiviteleri tohum cinsine göre değiştiği gibi bakteri üzerindeki etkileri de suşlara bağlı olarak farklılık gösterir (33).

Rhizobium suşları uyumlu bitki türü üzerinde nodozite meydana getirebilmekle beraber bu durum her zaman geçerli olamamıştır. Elkan soya fasulyasının nodüllenmiyen bir genetik hattını bulmuş (8) ve bir diğer araştırmada ise bazı baklagil varyeteleri bir çok uyumlu Rhizobium suşu ile enfekte olamamıştır. Bu durum bazı suşların varyetelere karşı seçici özellik gösterdiğini kanıtlamaktadır (98).

Kökü enfekte etme yeteneği ( $Inf^+$ ) ve etkenlik ( $Eff^+$ ) Rhizobium bakterilerinin 2 genetik karakteri olup Altigashi'ye göre plasmid DNA tarafından kontrol edilir.  $Inf^+$  ve  $Eff^-$  olan suşlar nodozite teşekkül ettirir ancak azot bağlıyamaz.  $Inf^-$  ve  $Eff^-$  veya  $Inf^-$ ,  $Eff^+$ , baklagillerde nodozite meydana getirmeyi başaramaz. Bazı toprak ve kültür koşullarında suşlar bu karakterlerini kaybetmektedirler. Bu değişebilen karakterlerin genetik esası bilinmemektedir. Balassa ve diğer bir çok araştırıcılar Rhizobiumun transformasyon, transdüksiyon ve konjügasyonla genetik değişmeye uğradığını göstermişlerdir. Bu çalışmalar  $Inf$  ve  $Eff$  nin genetik esasını anlamamıza veya Rhizobiumların bu özelliklerinin bazen kaybetmesini açıklamaya, ilmi bakımdan yardımcı olamamaktadır. Ancak bilindiği gibi plasmid genetik element olup bakteri hücresinde fazladan kromozomal yerleşmeye sahiptir. Genetik özellikler bunların üzerinde taşınıp nadiren bu karakterler kendi kendine kaybolur veya ağır metallerle karışma, değişik ısılarda inkübasyon gibi hallerde elimine olur (99).

Yukarıdaki açıklamaların ışığı altında nodozite meydana getiremeyen 16 suşun kesin olarak Rhizobium cinsine ait olmadığını söylemek güçtür.

Yapılan sera denemesinde suşlarla aşılama fasulya bitkisinde kuru madde ve azot miktarlarını büyük ölçüde etkilemiştir. Aralarındaki farklılık istatistikî bakımdan % 1 seviyesinde önemlidir (Tablo 10,11).

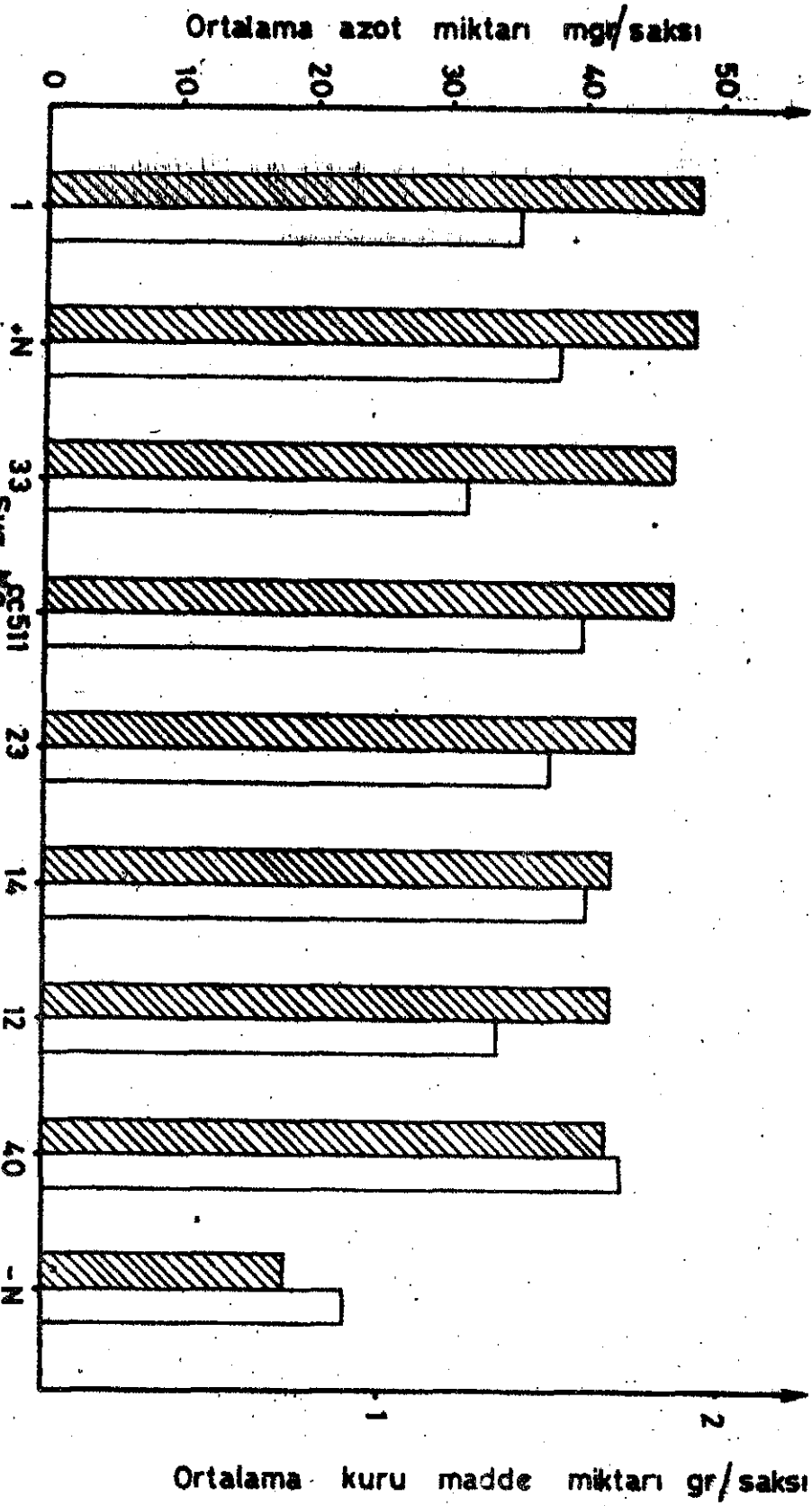
Aşılı bitkilerde ortalama kuru madde ağırlıkları 0,72.67-1,81.67 gr. ortalama azot miktarı ise 14.16 - 48.05 mgr. arasında değişmektedir. Etkili ve etkisiz suşların değerleri arasında 2 katı fark olduğu görülmektedir (Tablo 8,9).

J.C.Burton ve arkadaşları fasulya nodozitelerinden izole ettikleri 85 R.phaseoli suşunun etkenlik derecelerini saptamak için denemeye tabi tutmuşlardır. Aşısız kontrol 10 bitkinin kapsadığı azot miktarını 116 mgr. olarak bulmuşlardır. Bizim yaptığımız çalışmada ise 2 bitkinin kapsadığı azot miktarı 18 mgr. civarında olup, değerler oldukça birbirine yakındır. Buna karşılık çok etken olarak seçtikleri 5 suşla aşılı fasulya bitkilerindeki azot miktarı kontrole nazaran 3 katı fazla iken bizim araştırmamızda etken suşlar 2,5 katı fazla azot değeri vermişlerdir (100) (Şekil 6).

Yine fasulya üzerinde yapılan diğer bir araştırmadan elde edilen sonuçlar yukarıdaki çalışma ile paralellik göstermektedir. Hasat 45 günlük bir gelişme periyodundan sonra yapılmıştır. Aşısız kontrolde 10 bitkinin kapsadığı azot miktarı 129, etken suşun ise 350 mgr.dır. Etkisiz suşla aşılanan bitkilerdeki miktar 110 mgr.dır. Dikkat edildiğinde bu değer aşısız kontrolden daha düşük olduğu görülür (101). Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda (Tablo 9) aynı duruma rastlanmaktadır. 35 no.lu suş aşısız kontrolden daha düşük bir ortalama azot miktarı vermiştir. Bazı Rhizobiumların uyumlu bitki üzerinde parazitik etki yapması bu olayı meydana getirebilir (25).

ETKİLİ SUSLARLA ASIL BİTKİLERİN KURU AĞIRLIKLARI VE AZOT MİKTARLARI

AZOT  
 KURU MADDE



Yukarıdaki açıklamalardan anlaşılacağı gibi etkili suşlar fasulya bitkisindeki kuru madde miktarı ve azot kapsamını önemli miktarda etkilemiştir (Şekil 6). Azotsuz ve aşısız kontrolün azot miktarı etkili suşlarla aşılınmış bitkilerin vermiş olduğu değerlerden çıkarılacak olursa Rhizobiumlar tarafından havadan bağlanan azot ortaya çıkar (102). Bu 3 no.lu suş için 30.25 ve 33 no.lu da 28.47 mgr.dır (Şekil 7). Etken suşlarla azotlu kontrol kıyaslanırsa dışardan gübre olarak verilmiş 70 ppm azotun bitkide meydana getirdiği kuru madde ve azot miktarı artışına eş değer bir artışı, etken suşlar havadan tesbit ettikleri azotla gerçekleştirmişlerdir (Şekil 7).

İlk bakışta kuru madde ile azot miktarları arasında yakın bir ilişkinin bulunduğu görülmektedir (Şekil 6). Yapılan istatistikî değerlendirmeler ikisi arasında % 1 düzeyinde yüksek bir korelasyonun varlığını ortaya koymuştur (Şekil 8).

J.C.Burton ve arkadaşlarının fasulya bitkisi üzerinde yapmış oldukları aynı tip araştırmada da bu korelasyonun varolduğu görülmektedir (100, 101).

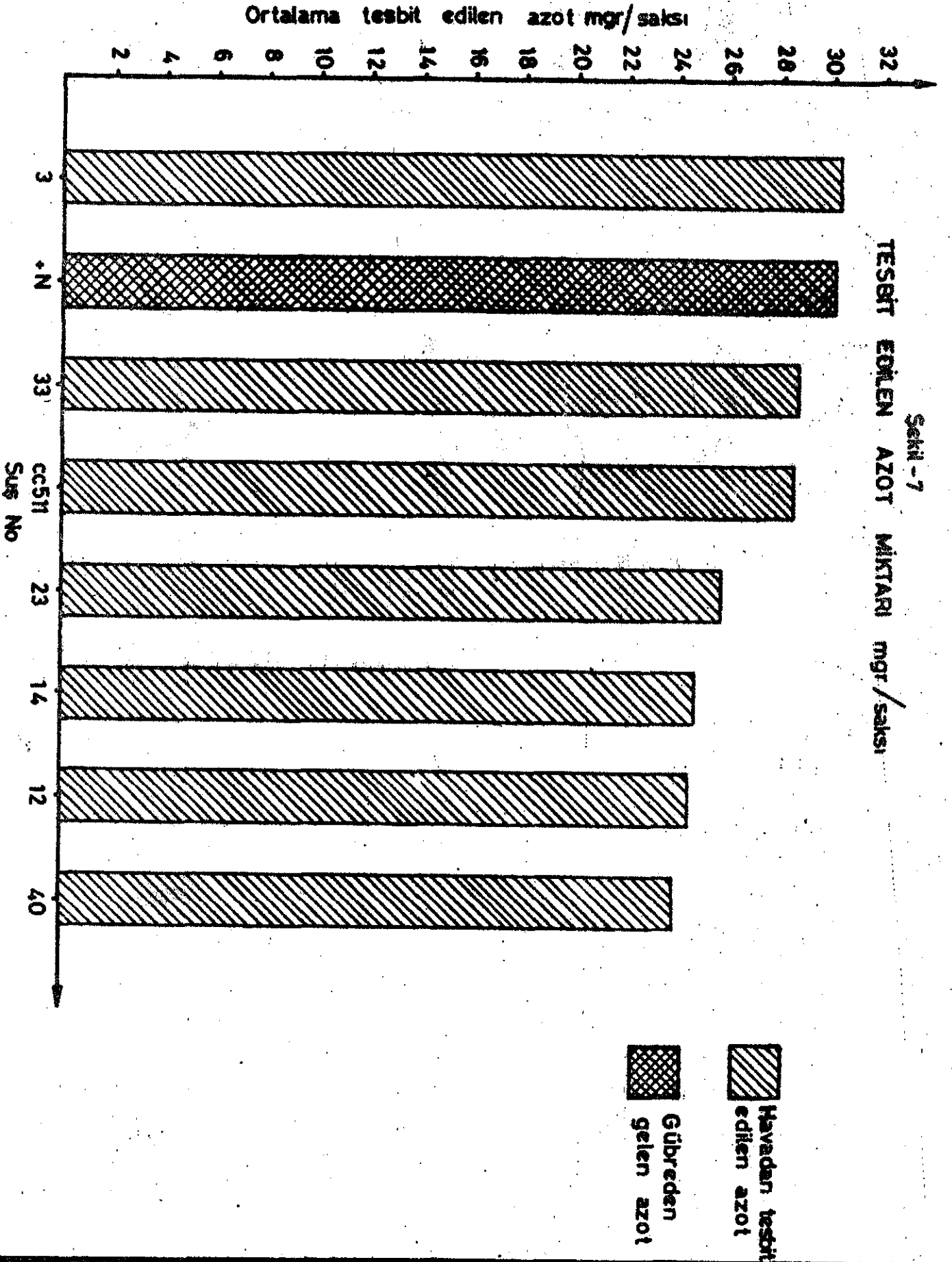
Azotun kısıtlayıcı faktör olduğu bu tip denemelerde yalnız bitki kuru ağırlığının saptanması bizi yeterli bir sonuca götürebilir (86). Ancak bazı bitkilerde N konsantrasyonunun fazla, bazılarında düşük olması sebebi ile her zaman kuru ağırlıklarda fark olmadığını (Schiffman 1958) göstermiştir. Ayrıca azotu yeterli olan bitkinin sap, dal ve yaprak kısmının köke oranı azotu noksan bitkiye nazaran daha fazladır. Azot bağlama yeteneklerinden farklılık üst kısmının analizi ile ortaya çıkarılır. Bitkinin kaldırmış olduğu toplam azot belli bir Rhizobium suşunun kıymetlenmesinde en direk yollardan biridir (86).

Yukarıdaki görüşlerin ışığı altında değerlendirmede üst kısım dikkate alınmış ve kuru madde ağırlıklarının yanında azot tayini yapılarak toplam azot miktarları hesaplanmıştır.



Sekil - 7

TESBIT EDİLEN AZOT MİKTARI mgr/saksı



Etkili ve etkisiz suşların meydana getirdiği nodozitelerin renk, sayı, büyüklük ve kök sistemi üzerindeki dağılımlarının farklı olduğu bir çok araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Etkili suşlar ana kök üzerinde ve genellikle sap kısmına yakın iri pembe nodoziteler etkisiz suşlar ise kök sistemine dağılmış ufak beyaz nodoziteler meydana getirirler (11,13). Pembe rengin hemoglobinin maddesinden ileri geldiği ve azot tesbiti ile yakından ilgili olduğu bilinmektedir (23,76). Araştırmamızda tesirli suşlarla aşılana fasulyalarda meydana gelen nodoziteler köklere dağılmakla beraber ana kök üzerinde daha fazladır. Genellikle 3-4 tanesi bir arada küme meydana getirmiş olup renkleri pembedir (Şekil 5).

Etkisiz suşların nodozitelerinde ise kümelenme görülmemiş renkleri beyaz, açık pembe, pembemsi yeşil olarak saptanmıştır. Bu durum diğer araştırmacıların gözlemlerine uymaktadır.

Fasulya bitkisi üzerinde yapılan bir çok araştırmada etkili Rhizobium suşu ile aşılama sonucu ürünün arttığı saptanmıştır.

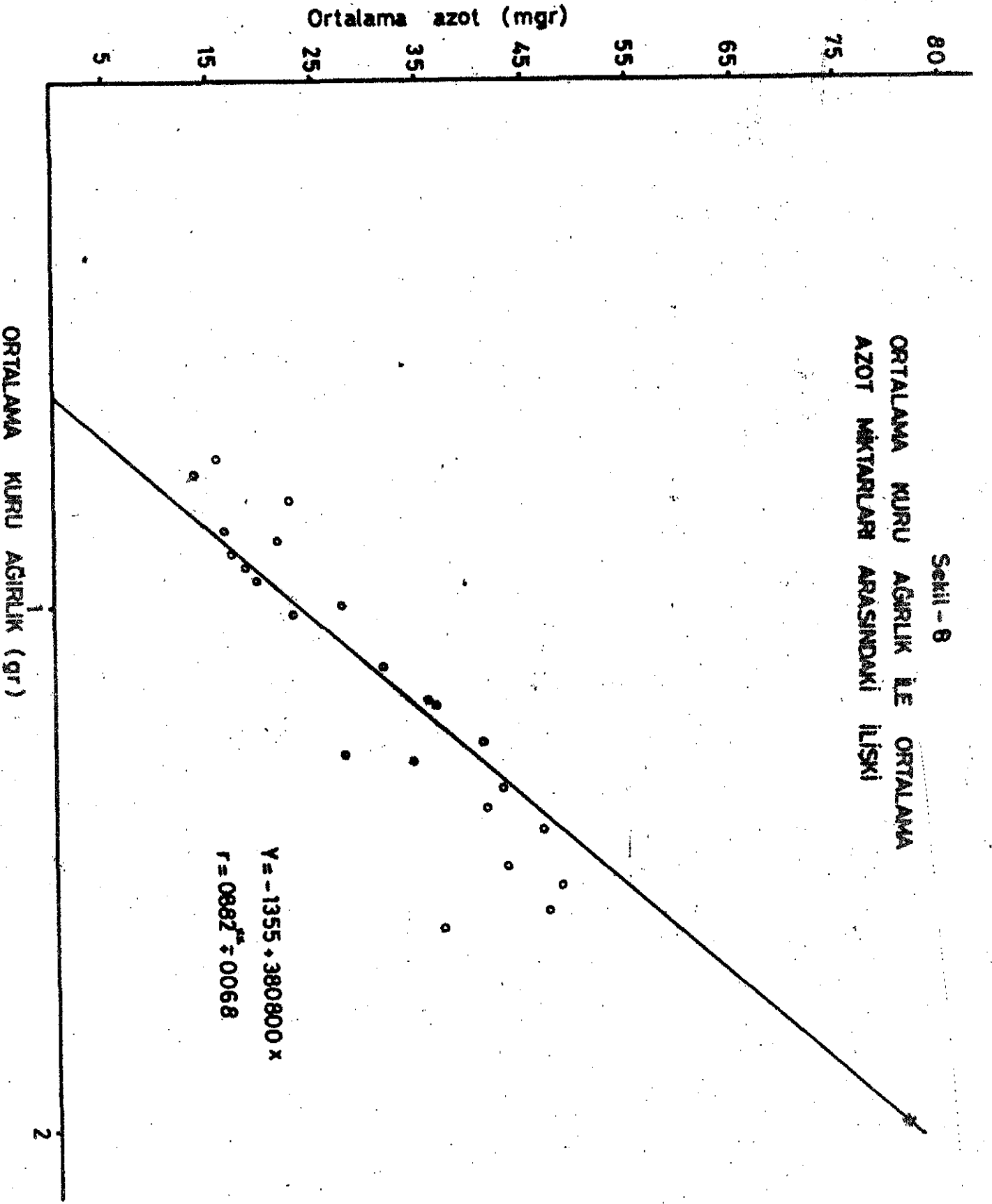
Brakel fasulyayı tarlada etkili suş ile aşılanmış ve 5 kg/dk. saf azot verilmiş parselde eşit verim almıştır. Ayrıca aşıllı bitkinin sap kısmı gübreliliye nazaran daha sağlam olup, yatmaya dirençlidir. Etkisiz suşdan kontrole nazaran daha az verim alınmıştır (103).

Diğer bir araştırmada aşılama sonucu meydana gelen verim artışının oldukça önemli olduğu ancak süperfosfatın bakteri ile temas etmesi halinde nodülasyon ve azot bağlanmasının azaldığı gösterilmiştir (104).

Madagaskar'da yapılan bir araştırmada etkili suş ile aşılama aşısız nazaran dekara 80 kg. kadar fazla fasulya tanesi vermiştir. Aşılama ile beraber çiftlik gübresi kullanıldığı zaman bu fark 125 kg. a yükselmektedir (105).

Sekil - 6

ORTALAMA KURU AĞIRLIK İLE ORTALAMA  
AZOT MİKTARLARI ARASINDAKİ İLİSKİ



Aşılama ile üründe meydana gelen bu artışın yanında bitkideki protein miktarı da yükselmektedir. Alarie isimindeki araştırmacı üçgül bitkisinde aşılama sonucu protein miktarında % 3 civarında bir artma olduğunu saptamıştır (106). Genellikle insan beslenmesinde hayvansal protein; bitkisel proteine nazaran daha değerli olarak kabul edilmektedir. Ancak bir çok baklagil, protein ve amino asit bakımından hayvansal besinlerle kıyaslanabilir. (106)

Meksika'da protein noksanlığının az olması beslenmede fasulyanın fazla kullanılmakta olmasından ileri gelmektedir (106).

Baklagil ekili sahalarda tabii olarak bulunan Rhizobiumlar arasında etken suşlar oldukça azdır. Yapılan araştırmalara göre tabii Rhizobium popülasyonununun % 25 etkili, % 50 orta derecede etkili ve % 25'i etkisizdir (11).

İzole ettiğimiz suşlardan nodozite yapanlar arasında böyle bir değerlendirme yaparsak % 29 unun etkili, % 32 sinin orta derecede etkili ve % 39 unun da etkisiz olduğunu görürüz (Tablo 14). Değerler, diğer araştırmacıların bulgularından farklılık göstermektedir. Bunun çeşitli yerlere göre değişmesi tabiidir. J.C.Burton ve arkadaşlarının Amerika'da yaptıkları araştırmada, izole ettikleri R.phaseoli suşlarının % 14.1 etkili, % 63.4 ü orta derecede etkili ve % 16.4 ü de etkisizdir.

Tablo : 14 Türkiye'nin Çeşitli Yerlerinden İzole Edilen Suşların Etkenlik Derecelerine Göre Bulunma Oranları ( % )

	Etkili	Orta derecede etkili	Etkisiz
Nodozite yapabilen suş sayısı	9	10	12
%	29	32	39

Gözlemlerimize göre bugün Türkiye'de yetiştirilen fasulya bitkisinin % 50 sinde nodozite yoktur. Geri kalan diğer yarısının da ancak % 29 u etkili bir azot kazancını gerçekleştirmektedir (Tablo 14). Böylece fasulya ekili alanlarımızın % 85'inin etkili Rhizobium kültürü ile aşılması gerekmektedir.

1973 yılı istatistiklerine göre Türkiye'de 1.000.000 dönüm civarında fasulya ekilmektedir. Böylece 850.000 dekar tarlanın aşılması, simbiyotik azot bağlanmasından gerekli faydayı sağlayabilmek için zorunludur. Yapılan araştırmalara göre fasulya bitkisi bir yıl içinde dekara 5-20 kg. azotu simbiyotik bağlama mekanizması ile toprağa kazandırmaktadır (107).

En düşük değer olan 5 kg.dan hesaplanacak olursa 850.000 dönümde 4 bin tonun üzerinde azot aşılama ile havadan kazanılacaktır. Aynı miktar azotu ancak 20 bin ton amonyum sülfat gübresi vermek sureti ile karşılamak olanağı bugünkü fiyatlarla 40 Milyon TL. civarında bir harcamayı gerektirmektedir.

Yukarıda belirtilen alanı 40 Milyon TL. tutarındaki azotlu gübre ile gübrelemek yerine değeri 2,5 Milyon(108) TL. olan bakteri kültürü ile aşılama çiftçi ve yurt ekonomisi yönünden bize büyük kazanç sağlayacaktır.

Bugün dünya ülkeleri bu konudaki araştırmalarını hızla geliştirmekte olup simbiyotik azot bağlanmasından yeterli seviyede faydalanmak için çaba göstermektedirler. Ayrıca tarım alanlarında, baklagil bitkilerini rotasyona sokarak toprak verimliliğini arttırmaktadırlar. Ülkemizde bu tip çalışmalara hızla girilmeli ve baklagil bitkilerini etkili suş ile aşılayarak bu kaynaktan faydalanma geciktirilmemelidir.

V- Ö Z E T

Türkiye'nin fasulya yetiştirilen çeşitli yörelerinden 46 adet R. phaseoli suşu izole edilmiş ve ayrıca dış memleketlerden getirtilen 2 suşda denemeye alınmıştır.

İzole ettiğimiz suşlar, bazı morfolojik ve kültürel testlere tabi tutularak, değerler tablolar halinde gösterilmiştir. Bulgular, genellikle Rhizobiumun gösterdikleri karakterlere uygundur.

Suşların etkenlik dereceleri, bitki üzerinde meydana getirdikleri kuru ağırlık ve toplam azot miktarları arasındaki farklılık değerlendirilerek saptanmış ve 3 gurup altında toplanmıştır.

- 1- Etkili
- 2- Orta derecede etkili
- 3- Etkisiz

Suşların etkenlik dereceleri Tablo 12'de gösterilmiştir.

Etkili suşlar tarafından havadan tesbit edilen azot, bitkinin kuru ağırlık miktarlarını % 100'e yakın bir oranda arttırmıştır. Toplam azot miktarlarındaki yükselme buna paralel olup, ikisi arasındaki korelasyon % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. 16 suş fasulya bitkisi üzerinde nodozite meydana getirememiş ve muhtemel sebepleri tartışılmıştır.

Etkili suşlar daha iri ve pembe nodoziteler meydana getirmiş, genellikle ana kökte sapa yakın yerde toplanmışlardır.

İzole ettiğimiz suşların % 29'u etkili, % 32'si orta derecede etkili, % 39'u etkisizdir. Böylece fasulya ekili alanların büyük bir kısmını etkili suşlarla aşlamak gerekmektedir. Bu işlemin çiftçiye sağlayacağı fayda ve yurt ekonomisine katkısı tartışılmıştır.

VI K A Y N A K L A R

- 1- MULDER E.G.: Nitrogen fixation and nitrogen fixers, Coloquio sobre problemas actuales de biologia, Madrid, 1966.
- 2- GÜNER HIFZI : Bitkilerde beslenme bozuklukları, Ege Üniversitesi Rektörlük Yayınları, No. 8, 1964.
- 3- BURGESS ALAN : Micro-organisms in the soil, Hutchinson and Co.LTD. 143-148, 1958.
- 4- RUBENCHIK L.I: Azotabacter and its use in agriculture, Israel program for scientific translations Ltd. Copyright, 1963.
- 5- BOND, G.FLETCHER W.W. and FERGUS T.P.: The development and function of the root nodules of Alnus, Myrica and Hippophae Plant and Soil 5: 309-323, 1954
- 6- MULDER E.G., LIE T.A.WOLDENDORP J.W.: Biology and Soil Fertility, soil biology reviews of research Unesco, Paris 163-196.
- 7- RANGASWAMI G.: Agricultural microbiology, Asia publishing house, London W.C.2, 212-218, 1966.
- 8- ALLEN O.N. and BALDWON I.L.: Rhizobium-Legume relationships, soil science, 78: 415-427, 1954.
- 9- WHYTE R.O.: Legumes in agriculture, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy, 175-189, 1953.
- 10- BREED R.S.,MURRAY E.G.D., SMITH N.R.: Bergey's manual of determinative bacteriology, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 285-288, 1957.
- 11- ALEXANDER M.: Introduction to soil microbiology, John Wiley and sons Incb, London, 326-349, 1961.

- 12- GIBBS B.M.; SHAPTON D.A.: Identification methods for microbiologists, technical series 2 academic press inc., London, 51-61, 1958.
- 13- WAKSMAN A.S.: Soil microbiology, John Willy and sons Inc Newyork 208-229, 1952.
- 14- KOONTZ F.P, FABER E.J.: Somatic antigens of Rhizobium japonicum soil science vol 91, 228-232, 1960.
- 15- RODRIGUEZ H.C.; A.RCOS J.M.Cellular and extra cellular antigens from four Rhizobium strains. Soils and fertilizers 33 (2080) 1970.
- 16- SKRDLETA V.: Somatic sero-groups of Rhizobium japonicum plant and soil, Vol 23; 43-48, 1965.
- 17- GRAY T.R.G. and PARKINSON D.: The ecology of soil bacteria published by Liverpool University press, 396-421, 1968.
- 18- NORRIS D.O.: The biology of nitrogen fixation, Commonwealth agricul- tural bureaux bulletin 46, 113-127, 1962.
- 19- GRAY T.R.G. and WILLIAMS S.T.: Soil micro-organisms printed by T.and A.Constable Ltd. Edinburgh, 120-124, 1971.
- 20- MULDER E.G. and VEEN W.L.: Effect of PH and organic compounds on nitrogen fixation by red clover, pland and soil, Vol. 13, 91-113, 1960.
- 21- LIE T.A.: Nodulation of Leguminous plants as affected by root secretions and red light, H.Veenmanen zonen R.V.Wageningen, 1964.
- 22- MIGAHID A.M., ELNADY A.F., ABDELRAHMAN A.A.: The effect of gamma ra- diation on bacterial nodul formation, plant and soil, Vol. XI, 139-144, 1959.
- 23- STEWART W.D.P.: Nitrogen fixation in plants published by the athlone press, University of London, 1966.
- 24- SUBRA-RAO N.S. and SARMA K.S.B.: Pectin methyl esterase activity of root exudates of legumes in relation to Rhizobia, plant and soil Vol. 28. 407-412, 1968



- 25- DATE R.A.: Microbiological problems in the inoculation and nodulation of Legumes, plant and soil, Vol. 37, 707-725, 1970.
- 26- DELWICHE C.C.: The nitrogen cycle, scientific American, 137-148, September 1970.
- 27- BERGERSEN F.S.: Nitrogen fixation in the Legume root nodule, IX international Congress for microbiology Moascow 97-101, 1966.
- 28- STEWARD F.C.: Plant physiology, Volume III. Academic press. Newyork and London. 593-595, 1963.
29. WIERING A.K.T. and JANNY BAKHUIS.A.: Chromotography as a means of selecting effective strains of Rhizobia, plant and soil, Vol. 8, 254-261, 1957.
- 30- PELCZAR J.M. DEID D.R.: Microbiology Mc.Graw Hill book Company Inc. London 473-490, 1958.
- 31- KROULIK T.J. and GAINNEY P.L.: Relative nodulation of varieties of medicago sativa varying in susceptibility to alfa alfa wilt soil science Volume 50. 135-140, 1940.
- 32- BJALEVE G.: The effectiveness of nodule bacteria, plant and soil Vol. 18. 70-76, 1963.
- 33- BOWEN G.D.: The toxicity of Legume seed diffusates toward Rhizobia and other bacteria, plant and soil Vol. 15 155-165, 1961.
- 34- VAN SCHREVEN D.A.: Effects of added sugars and nitrogen on nodulation of legumes plant and soil Vol.XI 93-112, 1959.
- 35- GIBSON A.H.: Physical environment and Symbiotic nitrogen fixation. Soils and fertilizers Vol 31: (1848) 1968.
- 36- NUTMAN P.S.ROUGHLEY R.J.DART P.J. and SUBBA-RAO N.S.: Effect of Low temperature pre-treatment on infection on clover root hairs by Rhizobium plant and soil Vol. 33. 257-259, 1970.

- 37- TREPACHEV E.P.; N.N.EKIMENKO : Utilization by clover of mineral and atmospheric nitrogen in relation to the temperature regime of the substrate and rates on nitrogen fertilizers. Soil and fertilizers, Vol. 34 (1357) 1970.
- 38- LIE T.A. Nonphotosynthetic effects of red and far-red LIGHT on root-nodule formation by Leguminous plants, plant and soil Vol. 30, 391-404 1969.
- 39- BURGESS S.A. and RAW F.: Soil Biology Academic press London 26-28. 1967
- 40- POSYPANOV G.S.: Conditions for symbiosis between legumes and nodule bacteria, and the effect of this symbiosis on the yield of legume crops. Soil and fertilizers Vol. 35 (4093) 1973.
- 41- DIATLOFF A.: Effect of soil moisture fluctuation on legume nodulation and nitrogen fixation in a black earth soil. Soils and fertilizers Vol. 31 (4187) 1968.
- 42- MULDER E.G., LIE T.A. DIL Z.K. and HOUWERS A.: Effect of PH on symbiotic nitrogen fixation for some leguminous plants. Symposia IX. International Congress for microbiology. Moscow 1966. 133-151. 1966.
- 43- MULDER E.G. and VAN VEEN W.L.: Effect of PH and organic compounds on nitrogen fixation by red clover. Plant and soil Vol. 13 91-113, 1961.
- 44- YADAV N.K.; VYAS S.R.: Respons of root-nodule Rhizobia to saline, alkaline and acid conditions. Soils and fertilizers Vol.35. (3162) 1972.
- 45- MULDER E.G. and VAN VEEN W.L.: The influence of carbondioxide on symbiotic nitrogen fixation, plant and soil Vol. 13. 265-278, 1961.
- 46- LOWE R.H. and EVANS H.J.: Carbondioxide requirement for growth of legume nodule bacteria. Soil science Vol. 94 351-356, 1962.

- 47- MUNNS D.N.: Nodulation of medicago sativa in solution culture plant and soil Vol. 29 33-47, 257-262, 1968.
- 48- SHIL'NIKOVA V.K.; SIDEROKNO O.D.KORKINA N.I.: Effect of mineral compounds containing nitrogen on nodule bacteria under symbiotic conditions. Soils and fertilizers Vol. 35 (3164) 1972.
- 49- MODUCHOVA H.ALPTAVER J.: Effect of mineral nitrogen on the fixation of atmospheric nitrogen and on the yield of horse bean. Soils and fertilizers Vol. 35. (5591) 1971.
- 50- STRZELEC A.: The influence of urea on the capability of free nitrogen fixation by Rhizobium strains. Soils and fertilizerb Vol. 35 (5025)1972.
- 51- DATE J.S. and DART P.J.: Nodulation studies in Legumes. Plant and Soil Vol. 15. 329-346, 1961.
- 52- MUNNS D.M.: Nodulation of Medicago sativa in solution culture. Plant and soil Vol. 28. 246-256, 1958.
- 53- KITTI C.P.; KRISHNAMURTHY K.PATIL R.B.: Studies on Rhizobium treatment and phosphate application to soyabean and their residual effecton cereals. Soils and fertilizer Vol. 34. (2554) 1971.
- 54- KAUSHIK,S.K.; SINGH V.: A note on the effect of different forms and levels of phosphorus and molybdenum on the nodulation and seed yield of berseem. Soils and fertilizerb Vol. 34 (5277) 1971.
- 55- GUKOVA M.M. ARBUZOVA I.N.: Phosphorus requirements of legumes utilizing nitrogen symbiotically. Soils and fertilizers Vol.32 (2867) 1969.
- 56- GUKOVA M.M.; TYULINA O.V.: Effect of potassium on utilization of nitrogen by legumes. Soils and fertilizers Vol. 31 (4311) 1968.
- 57- LIE T.A.: Simbiotic Nitrogen Fixation under stress conditions. Plant and soil special volume 117-127, 1970.
- 58- NORRIS D.O.: Aci@ production by Rhizobium, a unifying concept. Plant and soil Vol. 22. 143-164, 1965.

- 59- MUNNS D.N.: Nodulation of medicago sativa in solution culture. Plant and soil Vol. 32. 90-102, 1970.
- 60- ROBSON A.D.; LONERAGAN J.F.: Nodulation and growth of medicago truncatula on acid soils. Soils and fertilizers Vol. 34 (824) 1971.
- 61- ODU C.T.I. FAYEMI A.A. OGUNWALE J.A.: Effect of PH on the growth, nodulation and nitrogen fixation controsema pubescens. Soils and fertilizers Vol. 34 (4851) 1971.
- 62- YATES M.G. and HALLSWORTH E.G.: Some effects of copper in the metabolism of nodulated subterranean clover. Plant and soil Vol. 19. 265-284, 1963.
63. CARTWRIGHT B. and HALLSWORTH E.G.: Effects of copper deficiency on root nodules of subterranean clover. Plant and soil Vol. 33. 685-698, 1970.
- 64- AHMED S. and EVANS H.J. COBALT : A micronutrient element for the Growth of soybean plants under symbiotic conditions Soil science Vol. 90 205-210, 1960.
- 65- KLIEWER M; LOWE R.; PATRICA A.M.; EVANS H.J.: A biological assay for cobalt using Rhizobium meliloti. Plant and soil Vol. 21. 153-162, 1964.
- 66- WILSON D.O. and REISENAUER H.M.: Cobalt requirement of symbiotically Grown alfa alfa. Plant and soil Vol. 19. 364-373, 1963.
- 67- WILSON S.B. and HALLSWORTH E.G.: Studies on the nutrition of the forage Legumes IV. plant and soil Vol. 22. (260-279) 1965.
- 68- VANEK, V. KNOP K.: Influence of molybdenum and cobalt on nitrogen fixation in peas. Soils and fertilizers Vol. 35 (5009) 1972.
- 69- WILSON D.O. REISENAUER H.M.: Effect of manganese and zinc ions on the growth of Rhizobium. Soils and fertilizers Vol. 34 (439) 1971.

- 70- LOWE J.F.HOLDONG A.J.: Influence of clover source and of nutrient manganese concentrations on the Rhizobium white clover association. Soils and fertilizer. Vol. 34 (2217) 1971.
- 71- DÖBEREINER J.: Manganese toxicity on nodulation and nitrogen fixation of beans in acid soils. Plant and soil Vol. 34. 153-166, 1966.
- 72- VOSE D.B.and JONES D.G.: The interaction of manganese and calcium on nodulation and growth in varieties of trifolium repens. Plant and soil Vol. 18. 372-385, 1965.
- 73- LÖHNIS M.P.: Manganese toxicity in field and market garden crops. Plant and Soil Vol. 3. 193-222, 1951.
- 74- ANDREW C.S.: Influence of nutrition on nitrogen fixation and growth of Legumes. Commonwealth Agricultural Bureaux 130-146, 1962.
- 75- MULDER E.G.BAKEMA K. and VAN VEEN W.L.: Molybdenum in symbiotic nitrogen fixation and in nitrate assimilation plant and soil Vol. 10. 319-334, 1959.
- 76- KLINTSARE A.V.: Effect of inoculation with nitrogen and of some trace elements on green yield of Lupin. Soils and fertilizers Vol. 35. (5035) 1972.
- 77- PILLAI R.N.; SEN A.: Note on the influence of some trace elements on the growth rhizobium from ground nut under stationary culture. Soils and Fertilizers Vol. 34. (3913) 1971.
- 78- ŞAHİNKAYA H.: The effect of some metalions on Rhizobium Growth, 8<sup>th</sup> intern. Congress of Soil Science, Bucharest, ROMANIA. III. 53 1037-1045, 1964.
- 79- PAREEK R.D. and GAUR A.C.: Effect of (DDT) on symbiosis of Rhizobium Sp. with phaseolus aureus. Plant and soil Vol.33 297-304, 1970.

- 80- SELIM K.G.; MAHMOUD A.Z. and MEHRESHAN T.: Effect of dieldrin and Lindane on the Growth and nodulation of vicia faba. Plant and soil Vol. 33. 325-329, 1970.
- 81- JORDAN D.C. and GARCIA M.M.: Interactions between 2.4-DB and the root nodule bacteria of lotus corniculatus. Plant and soil Vol.30. 360-372, 1969.
- 82- GARCIA M.M. and JORDAN D.C.: Action of 2.4-DB and dolapon on the symbiotic properties of Lotus corniculatus. Plant and soil Vol.30. 317-334, 1969.
83. VAN SCHREVEN D.A.: Influence of seed disinfection with A.Amertan on Rhizobial inoculation of medicago Lupulina L. Plant and soil Vol.27. 443-446, 1967.
- 84- CHHONKAR P.K. ISWARAN V.JAUHRI K.S.: Seed pelleting in relation to nodulation and nitrogen fixation by phaseolus aureus L. in salina alkali soil. Plant and soil Vol. 35. 449-452, 1971.
- 85- ALLEN O.N.: Experiments in soil bacteriology burgess publishing co. Minnesota. 1961.
- 86- VINCENT J.M.: A manual for the practical study of root nodule bacteria. Burgess and son. Abigton 1970.
- 87- SALLE A.J.: Fundamental principles of bacteriology. Mc Graw-Hill book Company Inc. 1961.
- 88- PRAMER D.SCHMIDT E.L.: Experimental soil microbiology. Burgess Publishing Company 63. 1965.
- 89- DARBY K.G.E.: Çetinkaya Ş. Pratik mikrobiyoloji El Kitabı Hacettepe Üniversitesi Ankara 91-191.
- 90- ÇETİN E.T.: Pratik Mikrobiyoloji. İsmail Akgün Matbaası İSTANBUL Sayfa 522, 1965.

- 91- ÜLGEN N. ATEŞALP M.: Toprakta total azot tayini Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Teknik Yayınlar Serisi Sayı 22, 1972.
- 92- YURTSEVER N.: İstatistik metotlar II. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Teknik Yayınlar Serisi Sayı 30, 1974 .
- 93- BERGERSEN F.J. BROCKWELL J.GIBSON A.H.SCHWINGHAMER E.A.: Studies of natural populations and mutants of Rhizobium in the improvement of Legume inoculants. Plant and soil special Volume 3-16, 1971.
- 94- GRAHAM P.H. and PARKER C.A.: Diagnostic fetures in the characteri- sation of the root-nodule bacteria of legumes. Plant and soil Vol. 20. 383-396, 1964.
- 95- ISHIZAWA S.: Studies on the root-nodule bacteria of leguminous plants. Changes in Litmus Milk and gelatin Liquefaction. Soils and fertilizers Vol.17. (1500) 1954.
- 96- MACGREGOR A.N. and ALEXANDER M.: Comparison of nodulating and non nodulating strains of Rhizobium trifolii. Plant and Soil Vol.36, 129-139, 1972.
- 97- ZELAËNA I - KOWALSKA: Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in Rhizobium trifolii. Plant and soil special volume 67-71, 1971.
- 98- LIE T.A.: Symbiotic nitrogen fixation under stress conditionst. Plant and soil special volume 117-127, 1971.
- 99- DUNICAN L.K. and CANNON F.C.: The genetic control of symbiotic pro- perties in Rhizobium evidence for plasmid control. Plant and Soil Special volume 73-79, 1971.
- 100- BURTON J.C. ALLEN O.N. and BERGER K.C.: The prevelence of strains of Rhizobium phaseoli in some midwestern soils. Soil science society of America proceedings. Vol.16. 167-172, 1952.

- 101- BURTON J.C. ALLEN and BERGER K.C.: Respons of beans to inoculation with Mixtures of Effective and ineffective Rhizobia. Soil science soc of America proceedings. Vol.18. 156-159, 1954.
- 102- VIRTANEN A.I. and SAUBERT S.: A method for determining in pea cultures the amount of molecular nitrogen. Fixed and the amount of combined nitrogen taken up from the soil. Plant and soil Vol.4. 171-178, 1952.
- 103- BRAKEL J.: Symbiotic nitrogen fixation in beans. A Companson of the fixing activity of various Rhizobium strains. Soils and fertilizers Vol. 30. (3522) 1967.
- 104- BRAKEL J.: Symbiotic nitrogen fixation and cultivation of phaseolus vulgaris L. Soils and fertilizers Vol. 33 (397) 1970.
- 105- HAI V.H.; ANDRIAMANAMTENA S.: Legume inoculation. Results from 1968 Experiments Agron. Trop. Paris 25. No: 6-7, 596-603, 1970.
- 106- DAWSON R.C.: Potential for increasing protein production by legume inoculation. Plant and soil Vol. 32. 656-673, 1970.
- 107- HENZELL and NORRIS D.O.: Processes by which nitrogen is added to the soil/plant system. Commanwealth Agricultural Bureaux. 1-18, 1962.
- 108- ŞAHİNKAYA H.: Ziraatimizde mikrobiyolojik gübreleme imkânları. Topraksu Dergisi No: 22/Kasım/1965