

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ENSTİTÜSÜ

283926

**RHİZOBİUM MELİLOTİ SUŞLARININ  
ÖZELLİKLERİ VE ETKENLİK  
DERECELERİNİN SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

**EMEL GÜRBÜZER**

Ziraat Yüksek Mühendisi

Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü  
Toprak Biyolojisi Laboratuvarı

ANKARA — 1973

br

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ENSTİTÜSÜ

**RHİZOBİUM MELİLOTİ SUŞLARININ  
ÖZELLİKLERİ VE ETKENLİK  
DERECELERİNİN SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

**EMEL GÜRBÜZER**

Ziraat Yüksek Mühendisi

Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü

Toprak Biyolojisi Laboratuvarı

ANKARA — 1973

## İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
G İ R İ Ő .....	1
G E N E L B İ L G İ .....	3
M A T E R Y A L V E M E T O T .....	21
I. Yonca kök numunelerinin alınışı.....	21
II. Kùltürlerin izolasyonu ve muhafazası .....	21
III. Rhizobium meliloti suşlarının özellikleri ile ilgili testler.....	22
IV. Sera denemesi ile etkenlik derecelerinin saptanması .....	27
B U İ G U L A R .....	31
T A R T İ Ő M A .....	41
Ö Z E T .....	52
K A Y N A K L A R .....	54

## T A B L O L A R

<u>Tablo No.</u>	<u>Sayfa</u>
1- Enfekte ettikleri bitki gruplarına göre Rhizobium'larda tür ayırımı .....	6
2- Rhizobium ve baklagil köklerinde enfeksiyondan evvel meydana gelmesi mümkün olan karşılıklı reaksiyonlar (Nutman'a göre) .....	10
3- Simbiyotik ve serbest yaşayan mikroorganizmalarda N <sub>2</sub> tesbiti (Wilson'a göre) .....	17
4- Gıda maddesi olarak kullanılan baklagillerin ve hayvansal kaynakların protein ve amino asit miktarları (100 gr.yenilebilir kısımda/mg.)..	19
5- Suşların bakteri ve bakteroid formlarının boyutları ve koloni özellikleri .....	32
6- Suşların pH toleransları .....	34
7- Suşların biyokimyasal özellikleri .....	35
8- Suşların karbonhidratları kullanışları .....	36
9- Kavanozların ortalama nodozite sayıları, ortalama nodozite uzunlukları, nodozite renk ve dağılımları .....	39
10- Kavanozların ortalama kuru madde ağırlıkları, suşların etkenlik dereceleri ve girdikleri gruplar .....	40

## Ş E K İ L L E R

<u>Şekil No.</u>	<u>Sayfa</u>
1- Bergersen hipotezine göre azot tesbitinde meydana gelen reaksiyonlar .....	12
2- Kontrol ve aşılı kavanozlarda bitki gelişmeleri .....	37
3- Kontrol ve aşılı bitkilerin kök yapıları .....	38
4- Ortalama kuru madde ağırlıkları ile ortalama nodozite uzunlukları arasındaki ilişki .....	49

## G İ R İ Ő

Tarımda alınan mahsul miktarını sınırlayan en önemli element azottur. Yüksek bitkilerin nitrat veya amonyum iyonlarına olan ihtiyacı gayet fazla olduğu halde, toprak ana materyali içerisinde çok az azot bulunmaktadır. Bu sebeple, bütün dünyada azotlu kimyasal gübrelerin üretimi, diğer kimyasal gübrelerin üretiminden çok daha hızla artmaktadır. Buna rağmen, üretilen azotlu kimyasal gübrelerin miktarı, tarımsal ürünle topraktan kaldırılan azotu karşılamaktan çok uzaktır. Bütün dünyada her sene topraktan kaldırılan azot miktarı 100-110 milyon ton iken, dünya kimya endüstrisinin yıllık azotlu gübre üretimi saf azot olarak ancak 25 milyon tonu bulmaktadır. Özellikle, üretilen bu kimyasal gübrelerin % 70' i Batı Avrupa ve Kuzey Amerika memleketlerinde kullanılmakta ve gelişmekte olan memleketlerde azot ihtiyacının büyük bir kısmı organik gübreler ve biyolojik azot tesbitiyle karşılanmaktadır.

Baklagil bitkilerinin köklerinde bitki ile ortak yaşayarak havanın serbest azotunu tesbit eden Rhizobium bakterileri, biyolojik azot tesbitinin en önemli kaynağıdır. Zira, bu yolla azotun tesbit edilmesi halinde hem bitkinin azot ihtiyacı temin edilmekte, hemde toprağın azot miktarı zenginleşmektedir.

Toprak biyolojisi çalışmaları, memleketimizde Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsünün Toprak Biyolojisi Laboratuvarında başlatılmış olup, henüz 10 senelik bir geçmişi bulunmaktadır. Laboratuvarda çeşitli Rhizobium türlerinin etkenlik dereceleri tayin edilmiş ise de, ilk kez bu çalışma ile bakterilerin

Karakteristik özelliklerini tesbit etme yoluna gidilmiştir.\*

Bu çalışmanın amacı:

1-Rhizobium meliloti suşlarının çeşitli karakterlerini tayin etmek.

2- Etkenlik derecelerini saptamak ve memleketimizdeki yoncalıkların aşılmasında kullanılacak en etkili suşları tesbit etmektir.

Bu maksatla İç Anadolu'nun tabii florasından 16 Rhizobium meliloti suşu izole edilmiş, ayrıca Hollanda'dan temin edilen üç etkili suş da denemeye alınmıştır.

Bu çalışmanın yapılmasında katkıda bulunan rehber hocam Doç.Dr.Melâhat Okuyan'a, Prof. Dr. Muvaffak Akman'a, Doç.Dr. Hüseyin Şahinkaya'ya ve bu imkânı sağlayan Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Md. Mesut Özuygur'a teşekkür ederim.

\* Sunulan tez konusuna ait çalışmalar Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Toprak Biyolojisi Laboratuvarında yapılmıştır.

## G E N E L B İ L G İ

Yüksek bitkiler topraktan aldıkları bütün elementler içinde en fazla azota ihtiyaç gösterirler. Canlı hücrelerin en önemli yapıları olan protein ve nukleik asitler azot bileşikleridir. Kültüre alınan toprakların çok büyük bir kısmı normal ürün almak için gerekli olan azotu karşılayacak kapasitede değildir. Tarımda az mahsul almanın en büyük sebeplerinden biri azot noksanlığıdır ve insanlığın eksik beslenmesi problemiyle yakından ilgilidir.

Tabiatta azotun ana kaynağı havadır. Nefes aldığımız havanın ortalama % 80' ni serbest azottur. Bir dekar alan üzerinde 8.000 ton serbest azot gazı bulunmaktadır. Oysa bitkiler ve hayvanlar direkt olarak bu kaynaktan faydalanamazlar. Azotun kullanılabilmesi için hidrojen ve oksijenle birleşmesi gereklidir. Tabiatta yalnız azot tesbit eden organizmalar havadaki serbest azotu kullanabilme yeteneğine sahiptirler (1).

Azot tesbiti, elementel azotun ( $N_2$ ) mikroorganizmalar tarafından organik bileşiklere çevrilmesi işlemidir. Bu olay tabiatta iki tip biyolojik sistemle yürütülür. 1-Serbest yaşayan mikroorganizmalar gaz halindeki azotu diğer bir organizmanın yardımı olmaksızın tesbit ederler. 2-Mikroorganizmalar genellikle yüksek bitkilerin kök dokusunda simbiyosis meydana getirerek azot tesbiti yaparlar. Bitki yaprak florasında ve rhizosferde (bitki kök çevresi mikroflorası) serbest azot tesbiti yapabilen bazı bakterilerin bitki karbonhidrat salgılarıyla beslenerek yaptıkları azot tesbiti ise, bir ara sistem olarak kabul edilebilir (2).



Serbest azotu tesbit edebilen mikroorganizmaların bu gün bilinen sayıları 100 civarında olup, en önemlileri Azotobacter, Beijerinckia, Clostridium, Darxia, Nocardia, Pseudomonas, Rhodospirillum, mavi-yeşil alglerin bir kısmı ve bazı mantar ve mayalardır (3,4). Bu mikroorganizmalar arasında en fazla azot tesbit edenler Azotobacterler ve mavi-yeşil alglerdir. Optimum şartlar altında Azotobacterler yılda hektara 20-50 kg. (N) tesbit edebilirler. Fakat bu işlem için 1 - 2,5 ton organik maddeyi okside etmeleri gerekmektedir. Bu durum, tesbit edilen azot miktarını sınırlıyan en önemli faktördür (5). Mavi-yeşil algler ise fotosentetik organizmalar olup, azot tesbiti için gerekli enerjiyi güneş ışığından temin ederler. Tarımda bilhassa çeltik tarlalarında önemli miktarda azot tesbit etmeleri bakımından önem kazanmışlardır. Direkt gazometrik metotla yapılan bir çalışmada, 6 haftalık bir periyotta dekara 4,8 kg. azot tesbit ettikleri saptanmıştır (6).

Simbiyotik azot tesbiti iki grup altında toplanabilir. Birinci grupta Rhizobium cinsine ait bakteriler baklagil bitkileri köklerinde, ikinci grupta ise muhtemelen aktinomycetes'ler baklagil olmayan kıızıllağaç, ılgın, yabani iğde gibi ağaç ve çallıların köklerinde nodoziteler meydana getirerek azot tesbit ederler. Baklagil bitkileriyle olan azot tesbiti tarımda, diğer grup ise orman sahalarında önem kazanır (7,8).

Baklagiller familyası (Leguminosae) bitkiler aleminin büyük bir familyası olup, 10.000 den fazla türü içine alır. Bunlardan yalnız 200 tanesi insanlar tarafından kültüre alınmıştır. Bu gün baklagil bitkilerinin nodozite meydana getirme oranı henüz bilinmemektedir. Teste tabi tutulan bitkilerin % 89'unda nodozite tesbit edilmiş ise de, tropik bölgelerde yetişen baklagillerin büyük bir kısmı üzerinde çalışılmamıştır (1,9).

Baklagil bitkilerinin toprak verimliliğini artırdığı çok eski devirlerde Çinliler, Romalılar ve Yunanlılar tarafından biliniliyordu. Bu bitkilerin havanın serbest azotundan istifade ettikleri ilk defa 1838 yılında Fransız ilim adamı Boussingault, yapmış olduğu denemelerle açıkladı. Fakat, bu fikir devrin diğer bilim adamları tarafından benimsenmedi. Daha sonra 1879 yılında Frank, kökdeki nodozitelerin bir organizmanın enfeksiyonu ile meydana geldiğini ispat etti ve bu bakteriye Rhizobium adını verdi. Nihayet, 1884 yılında Hellriegel ve Wilfarth isimli araştırmacılar, nodozitelerde yaşayan bakterilerin havanın serbest azotunu tesbit ettiklerini deneysel olarak izah ettiler. Gene aynı yıl Beijerinck bu organizmayı saf kültür halinde izole ederek, fizyolojik özellikleri üzerinde çalıştı (10,11).

Bergey's Manual (1957) ya göre Rhizobium bakterileri Rhizobiaceae familyasının Rhizobium cinsine ait olup;  $0,5 - 0,9^{\mu}$  genişliğinde  $1,2 - 3^{\mu}$  uzunluğunda gram negatif çomaklardır (12). Zorunlu aerobdurlar ve spor teşkil etmezler (13). Hücrelerinde karakteristik olarak  $\beta$ -hydroxybutyric asit granülleri bulunur. Boya almayan bu kısımlar mikroskopta hücrelere bandlı bir görünüm verir (14). Suşlar genellikle glukoz, mannoz, galaktoz, glukuronik asit ve 4-O-methylglukuronik asit gibi akışkan veya zamklı polisakkarit maddeler salgırlar (15). Biyolojik ekstratları ihtiva eden besinlerinde kolaylıkla ürerler (16). Karbonhidratların çoğunu kullanabilir, bazılarında zayıf asitlik veya alkalilik meydana getirirler (17). Azot kaynağı olarak, amonyum ve nitrat gibi inorganik azot bileşiklerini kullanırlar. Glutamat, histidin, aspartat ve prolin gibi amino asitleri de kullanabilirler (18). Bazı suşlar optimum gelişme için biotin, thiamin, pantotenik asit gibi vitaminlere ihtiyaç gösterirler (19). Nikel, krom, kobalt, molibden gibi mikro elementler de Rhizobium kültürlerinde gelişmeyi teşvik ederler (20,21). Nodozite içinde bakteri morfolojik değişmelere uğrar. Dallanıp genişleyerek bölünme kabiliyeti olmayan hareketsiz

bakteroid forma geçer (22). Rhizobium bakterileri kültürlerinde kesinlikle azot tesbit etmezler (23).

Rhizobium bakterileri suşların baklagil bitkilerini enfekte edebilme yeteneğine dayanılarak sınıflandırılmaktadır. Rhizobium suşları bir grup baklagil bitkisini enfekte ederek nodozite meydana getirebilir. Fakat, diğer baklagil bitkilerini enfekte edemezler. Suşların bu seçici özelliği göz önüne alınarak, Rhizobium cinsi 6 türe ayrılmaktadır. Aynı bakteri tarafından enfekte edilen bitkiler, çapraz aşılama grupları teşkil ederler. Tür ayrımında esas, aynı çapraz aşılama grubunda nodozite yapabilme yeteneğidir. Bu özelliği gösteren bakteri suşları aynı tür içine girerler (4,9,24). (Tablo: 1).

TABLO: 1 Enfekte Ettikleri Bitki Gruplarına  
Göre Rhizobium'larda Tür Ayrımı

<u>Rhizobium Türleri</u>	<u>Çapraz Aşılamaya Grupları (Buldukları Bitki Grupları)</u>
1-Rhizobium meliloti	Yonca ve taş yoncası türleri
2-Rhizobium trifolii	Üçgüller
3-Rhizobium leguminosorum	Bezelye ve fiğler
4-Rhizobium phaseoli	Fasulyeler
5-Rhizobium lupini	Acı bakla ve seradella
6-Rhizobium japonicum	Soya fasulyesi, börülce, yer fıstığı ve diğer baklagil cinslerine ait türler.

Birbirlerine gayet yakın özellikler göstermeleri nedeni ile, Agrobacterium ve Rhizobium cinslerini kültürel karakterlerine dayanarak ayırt etmek oldukça zordur. Agrobacterium cinsine ait türler (A. radiobacter, A. rhizogenes, A. tumefaciens) adi toprak bakterileri olup, bunlardan A. tumefaciens kök galleri meydana getiren patojen bir bakteridir. Agrobacterium cinsine ait bakteriler, özellikle

Rhizobium meliloti'ye benzer özellikler göstermekte ve en kesin ayırım baklagil köklerinde nodozite teşekkül ettirme testlerine dayanmaktadır. Fakat, baklagil köklerini enfekte etme yeteneğini kaybetmiş Rhizobium suşlarını Agrobacterium'lerden ayırmak çok zordur (11,14).

Aynı tür içine giren Rhizobium suşları, azot tesbit etme kapasiteleri, teşekkül ettirmiş oldukları nodozitelerin renk, sayı ve şekilleri gibi özellikleri bakımından farklılıklar gösterirler. Suşların azot tesbit etme kapasitesi genetik yapılarıyla ilgili bir özelliktir. Rhizobium suşları azot tesbit etme yeteneklerine göre; etkili, orta derecede etkili, etkisiz ve çok etkisiz olarak sınıflandırılmaktadır (24,25).

Etkili suşların meydana getirdikleri nodoziteler sayıca azdır ve ana kök civarında büyük gruplar halinde lokalize olmuşlardır. Nodozitelerin orta kısmında hemoglobin pigmentinin nisbetine bağlı olarak pembe veya koyu pembe bir doku görülür. Bu pigment yalnız etkili nodozitelerin aktif çalışma periyodunda teşekkül eder. Etkisiz suşların meydana getirdikleri nodoziteler ise, sayıca fazla, küçük, beyaz renklidir ve bütün kök sistemi üzerine dağılmış durumdadır (26,27).

Simbiyotik azot tesbiti yalnız Rhizobium suşlarının etkinlik derecelerine bağlı olmayıp, keza üzerinde bulunduğu bitkiye de bağlıdır. Çapraz aşılama gruplarında bakteri suşları aynı cinse ait bitki türlerinin bazılarında etkili, bazılarında ise etkisiz nodoziteler meydana getirebilir. Nutman'ın yapmış olduğu bir çalışmada, beyaz ve kırmızı üçgüllerde etkili nodoziteler meydana getiren bir suş, yeraltı üçgülünde etkisiz nodoziteler meydana getirmiştir (28). Aynı türe ait bitki varyeteleri bile, simbiyotik azot tesbitinde farklı sonuçlar vermektedir. Kroulik ve Gainey'in (29) yapmış oldukları bir çalışmada, çeşitli adi yonca varyeteleri aynı suşla aşılanmış ve deneme sonunda bir varyetede 0,15 mgm. diğerinde 0,26 mgm. bir diğerinde ise 0,46 mgm. azot tesbit edildiği saptanmıştır.

Etkili bir suşun diğer bir bitki üzerinde etkisiz nodoziteler meydana getirmesi halinde, bakterinin genetik özellikleri değişmektedir. Bjalfve'nin (30) yapmış olduğu bir çalışmada, yoncada etkili olan bir suş bezelyede etkisiz nodoziteler meydana getirmiştir. Etkili bir acı bakla suşu da, yonca üzerinde çok az ve küçük nodoziteler teşekkül ettirmiştir. Bu etkisiz nodozitelerden yapılan yeni izolasyonlar, orijinal bitkileri üzerinde daima etkili nodoziteler meydana getirmişlerdir.

Rhizobium bakterileri özel bakteriofajları ile muamele edildiği zaman faja dirençli mutantlar elde edilmekte ve mutant tiplerin azot tesbit etme kapasiteleri genellikle değişmektedir. Kleczkowska'nın (31) çalışmalarında, faja dirençli mutantlarda çoğunlukla azot tesbit etme yeteneğinin kaybolduğu, fakat bazı durumlarda etkisiz suşlardan etkili mutantların da elde edildiği bildirilmektedir.

Antibiyotiklere direnç kazanan mutant suşların etkenlik derecelerinde de değişmeler görülmektedir. Damery ve Alexander (32), yonca, gazal boynuzu ve üçgül üzerinde etkili olan suşların kanamycin'e direnç kazanmaları halinde, azot tesbit etme kapasitelerini kaybettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada viomicin ve neomycin'e direnç kazanan mutant suşların etkenlik derecelerinin değişmediği tesbit edilmiştir. Etkenlik derecelerinin azalmasına kullanılan antibiyotik seviyesi de tesir etmektedir. Kowalska (33), etkili bir *R. trifolii* suşunun  $10^{-6}$  g/ml. streptomycin'e direnç kazanması halinde nodozite meydana getirme yeteneğini kaybettiğini, fakat diğer iki suşta bu tip mutasyonların meydana gelmesi için bakterinin  $100^{-6}$  g/ml'den fazla streptomycin'e direnç kazanmasının gerekli olduğunu göstermiştir.

Rhizobium suşları arasında transformasyonla mutant suşların meydana gelmesi de mümkündür. Yapılan çalışmalar çeşitli çapraz aşılama grupları hatta, Rhizobium ve Agrobacterium suşları arasında transformasyonların mümkün olduğunu göstermektedir. Bir nodoziteden

fazla miktarda çözülmüş DNA'nın açığa çıkması toprakta bu tip mutasyonların meydana gelmesine sebep olabilir (28,34).

Rhizobium bakterilerinin çoğalması özellikle baklagil bitkilerinin kök salgıları tarafından teşvik edilir. Bu tesir toprakta kök yüzeyini çevreliyen 10-20 mm.lik alanda görülmektedir (35). Bununla beraber kök salgılarının kendilerini enfekte edebilen Rhizobium bakterilerine karşı özgül bir etkisi yoktur. Üçgül ve bezelyede nodozite yapabilen suşlar, yonca köklerinde de kolaylıkla üreyebilmektedir (36). Baklagil bitkilerinin kök salgılarında çeşitli amino asitler, şekerler ve vitaminler tesbit edilmiştir. Bu maddelerden hangisinin Rhizobium'ların gelişmesini teşvik ettiği henüz kesinlikle bilinmemekte fakat, biotin önemli bir rolü olduğu tahmin edilmektedir (37).

Enfeksiyon hadisesinde ilk görülen olay, kök emici kılların uzaması, deforme olması ve kanca şeklinde kıvrılmasıdır. Bitki kökleri tarafından salgılanan tryptofan, Rhizobium bakterileri tarafından  $\beta$ -indol asetik aside çevrilmekte ve kök emici kıllarının kanca şeklinde kıvrılmasına sebep olmaktadır (4). Deformasyona sebep olan maddelerin yapısı kesinlikle bilinmemekte, fakat selulozu eriten enzimlerin rol oynadığı tahmin edilmektedir (34). Daha sonra Rhizobium'lar tarafından salgılanan suda eriyebilir polisakkaritler emici kılların hücre duvarından geçmekte ve bitki hücrelerinde polygalakturonase (PG) enziminin sentez edilmesine sebep olmaktadır. Bu enzim emici köklerin büyüme noktasındaki pektik duvarın zayıflamasında rol oynamakta ve bitki bakteri arasındaki özüllüğü temin etmektedir (17). Bakteri ve bitki arasında enfeksiyondan evvel meydana gelen karşılıklı reaksiyonlar Tablo: 2 de (4) görülmektedir.

TABLO: 2 Rhizobium ve Baklagil Köklerinde Enfeksiyondan evvel Meydana Gelmesi Mürkün olan Karşılıklı Reaksiyonlar (Nutman'a göre)

BAKTERİ	BİTKİ KÖKÜ	
2 Bakteri çoğalması	Kök salgıları (Özgül değil)	1
4 IAA e oksitlenme	Tryptofan salgılanması Bilinmeyen kofaktör Kök kıvrılması ve dallanması	3 5 6
7 Bakteriyal polisakkaritler	Polygalacturonase yapımı Polygalacturonase salgılanması	8 9
ENFEKSİYON		10

Hücre duvarının zayıflaması ve emici kolların enfekte olması septasız bir enfeksiyon lifinin teşekkül etmesini sağlar. Nutman, bu lifin meydana geliş mekanizmasını, bir hücre invaginasyonunun meydana gelmesi ve emici kılın büyüme istikametinin ters yöne dönmesi şeklinde açıklamaktadır (37). Nitekim, Salman ve Fahraeus'un elektron mikroskopla yapmış oldukları çalışmalarda da enfeksiyon lifinin bitki orjinli olduğu tesbit edilmiştir (38). Enfeksiyon lifinin kökün korteks hücrelerine kadar uzaması döneminde emici kılın nukleusu dairesel lif ucunun önünde bulunmaktadır. Bu bağlantının kaybolması lif büyümesinin durmasına sebep olur (34). Korteks hücrelerine kadar uzanan enfeksiyon lifi, bu kısımda bulunan tetraploid hücrelere girer. Lif ucunun açılmasıyla bakteriler hücre stop-

lazması içinde serbest kalırlar (39). Tetraploid hücrelerin enfekte olmaları normal bitkilerde de görülmesi, enfeksiyon hadisesinin kromozomların iki misline çıkmasıyla ilgili olmadığını göstermektedir (37).

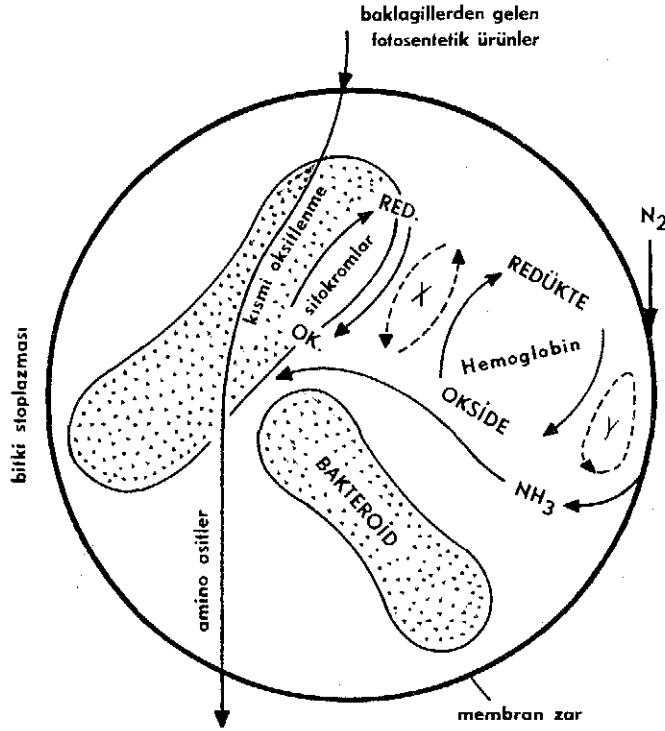
Enfekte olan hücrelerin hızla çoğalması, enfeksiyon bölgesinin meydana gelmesini sağlar. Daha sonra bakterilerin hacimleri artar, büyümeleri durur ve gayri muntazam şekiller alarak bakteroid forma geçerler (40). Jordan ve Coulter (41), nodozite içinde oksijen seviyesinin düşük olması nedeniyle bakteroidlerin teşekkül ettiklerini bildirmektedirler. Bakteroidler hücre sitoplazması içinde, tek veya gruplar halinde bir membranla çevrilirler. Bu membran hücrenin endoplazmik retikulumundan teşekkül ettiği tahmin edilmektedir (42). Bakteroidlerin teşekkül etmeye başladığı anda, membran içinde hemoglobin maddesinin de teşekkül etmesi, enfeksiyon bölgesinin perbe bir renk almasına sebep olur (26). Tetraploid hücrelerin etrafında bulunan diploid hücrelerin hızla çoğalması ve farklılaşması ergin bir nodozitenin meydana gelmesiyle sonuçlanır (24).

Tesbit edilen azot miktarı ile nodozite ağırlığı ve hemoglobin maddesi arasında yüksek bir korelasyon mevcuttur (43). Bu durum havadaki serbest azotun enfekte olan hücrelerde tesbit edildiğini göstermektedir. Bergersen (44), koparılmış soya fasulyesi nodozitelerini  $N_2^{15}$  ihtiva eden bir gaz karışımına maruz bırakarak, azot tesbitinin hangi kısmında gerçekleştiğini göstermeye muvaffak olmuştur. Bu maksatla, çeşitli periyodlarda  $N_2^{15}$  e maruz bırakılan nodoziteleri sentrifuj ederek, membran fraksiyonu, bakteroid fraksiyonu, suda eriyen fraksiyon olmak üzere üç kısma ayırmıştır. Her fraksiyonu  $N^{15}$  ce zenginleşmesi bakımından analize tabi tutmuş ve aşağıdaki bulguları tesbit etmiştir. Membran fraksiyonu kısa bir süre içinde işaretlenmekte, fakat bakteroid fraksiyonu iki saatin üstündeki bir periyotta bile işaretlenmemektedir. Suda eriyen fraksiyonda ise  $N^{15}$  in çok büyük bir kısmı akümüle olmakta ve 3-4 saatlik bir periyoda linier bir artış görülmektedir. Bu durum,



azot tesbitinin membran zarında gerçekleştiğini ve buradan suda eriyen fraksiyona geçtiğini göstermektedir.

Bergersen'in hipotezine göre, yalnız bakteroidler redüksiyon kapasitesine sahiptirler ve redüksiyonda bakteroidlerin plazma membranında bulunan strokromlar önemli bir rol oynarlar. Elektronlar bir elektron taşıyıcısı olarak çalışan hemoglobin vasıtası ile membrana taşınırlar. Fakat bu sistemde, bakteroidler ile hemoglobin ve hemoglobin ile membran arasındaki halka bilinmemektedir (44). Azotun redüksiyonu ile meydana gelen ilk stabil ürün amonyaktır. Bu durum, işaretli azot kullanılarak yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır (42). Bu hipoteze göre azot tesbiti işlerinin nasıl ilerlediği Şekil: 1 de (37) görülmektedir.



Şekil: 1 Bergersen hipotezine göre azot tesbitinde meydana gelen reaksiyonlar. X elektron transport zincirinde bakteroid sitokromları ile hemoglobin arasındaki bilinmeyen halka. Y hemoglobin ile moleküler azotun amonyığa çevrildiği membran zar arasındaki bilinmeyen halka.

Teşekkül eden amonyağın amino asitlere dönmesi için gerekli olan karbon iskeletleri, bitkinin sağlamış olduğu fotosentetik ürünlerle karşılanır. Koparılmış nodozitelerle yapılan çalışmalarda, glutamik asitin çok fazla işaretlenmiş oluşu, amonyağın kolaylıkla  $\alpha$ -keto glutarik asitle reaksiyona girdiğini ve glutamik asidi meydana getirdiğini göstermektedir (40,42). Bu ürün, nodozite hücrelerinin amino asit metabolik havuzuna girerken ve hızla meydana gelen transaminasyon reaksiyonları sonunda, çeşitli amino asitler ve amidler teşekkül etmektedir (39,44). Wieringa ve Bakhuis (45), etkili suşlarla aşıladıkları 4 haftalık bezelyelerin bitki özünde, aspartik asit, asparajin, valin, leusin, trionin gibi amino asitleri tesbit etmişlerdir. Kağıt kromatografisiyle yaptıkları bu çalışmalarda, hiç bir zaman glutamik asit lekesini bulamamışlardır. Araştırmacılara göre bu durum, glutamik asidin bitkiye verilmesinde hızla glutamine dönüşmesinden ileri gelmektedir.

Simbiyotik azot tesbitini toprak pH sı ve bitki besin maddeleri geniş ölçüde etkiler. Azot tesbitine tesir eden en önemli besin maddeleri, azot, fosfor, kalsiyum gibi makro elementler ve bazı mikro elementlerdir. Bu faktörlerden bir kısmı nodozite teşekkülü ve fonksiyonunu, bir kısmı ise bitki gelişmesini etkiler.

Simbiyotik azot tesbitini <sup>/etkiliyan</sup> en önemli faktörlerden biri, toprağın pH reaksiyonudur. Genellikle baklagil bitkileri, simbiyotik azot tesbiti için daha yüksek pH derecelerine ihtiyaç gösterirler. Meselâ yonca bitkisi, azot bileşikleri verildiği zaman pH 5,5 de yetişebildiği halde, azot tesbiti için 6,5 - 7,0 arasında bir pH ya ihtiyaç göstermektedir (46). Asit topraklar genellikle Rhizobium bakterileri için uygun olmayan bir ortam yaratır. Yapılan bir çalışmada 0,1 gr. asit toprağın R.trifolii hücresi ihtiva etmediği fakat, 0,1 gr. nötr pH lı bir toprağın 17 R.trifolii hücresi ihtiva ettiği tesbit edilmiştir (47). Asit topraklara fazla miktarda Rhizobium hücresi verildiği veya CaCO<sub>3</sub> ile nötralize edildiği zaman normal nodülasyon meydana gelmektedir. Bu durum asit ortamda

Rhizobium bakterilerinin üreyemediklerini göstermektedir (48). Toprak asitliği simbiyosisi indirekt olarak etkiler. Zira düşük pH seviyelerinde Fe, Mn, Al gibi elementlerin erirliği artmakta, Ca, P, Mo gibi elementlerin ise yararlılığı azalmaktadır. Bu elementlerin fazla veya eksik oluşu, bitki gelişmesi için zararlıdır (2).

Toprakta yüksek seviyede azot bileşikleri bulunduğu zaman, tesbit edilen azot miktarı azalır. Bu durum, yüksek seviyede azot bileşiklerinin bulunması halinde, bitkinin karbonhidrat-azot oranının düşmesi ve köklerin yeteri kadar karbonhidratla beslenmemesi şeklinde açıklanmaktadır. Zira fotosentez, ilâve ışık, CO<sub>2</sub> veya karbonhidratlı maddelerle teşvik edildiği zaman azotun önleyici etkisi önemli miktarda azalmaktadır (49,50). Allons ve Bartholomew'in (51) yaptıkları su kültürü çalışmalarında, yoncalar 7 lt. lik kaplarda yetiştirilerek aşılanmıştır. 10 haftalık bir periyod sonunda, 109 mg. N<sup>15</sup> verilen bitkilerde azot tesbiti % 59 a, 432 mg. N<sup>15</sup> verilen bitkilerde ise % 17 ye düşmüştür. Pete ve Dart'ın (52) fiğ ile yapmış oldukları çalışmaya göre, ekim zamanında tatbik edilen düşük seviyedeki azot, tesbit edilen azot miktarını artırmaktadır. Fakat, suşların verilen azot miktarlarına toleransları farklıdır. Genellikle 30 mg. N verilen sakallarda nodülasyon % 50 azalmakta, fakat V.1 suşu için bu miktar 100 mg. N' ye kadar yükselmektedir. Verimli topraklara aşılama yapılırken azot toleransı yüksek olan suşların kullanılması tavsiye edilmektedir.

Fosfor, protein sentezine rol oynayan önemli bir elementtir. Baklagil<sup>ler</sup> bu sebeple fosfora diğer bitkilerden daha fazla ihtiyaç gösterirler. Fosfor yetersizliği, kök gelişmesini etkilemesi sebebiyle nodülasyona indirekt olarak tesir eder. Bu durumda, nodozite sayısı ve ağırlığı önemli miktarda azalmaktadır (53). Fosfor, nodozitelerin azot tesbit etme kapasitesini artırmaktadır. Her gr. nodozitenin tesbit etmiş olduğu azot miktarı ile, nodozitenin ihtiyaç ettiği fosfor miktarı arasında yüksek bir korelasyonun mevcut olduğu bildirilmektedir (50). Fosfor toprakta Rhizobium populasyo-

nunun artması bakımından da önem taşımaktadır. Güney Avustralya'da, rhizobial popülasyonu muayyen bir seviyede tutmak için her sene toprağa fosfatlı gübrelerin verilmesi gerekmektedir (26).

Kalsiyum hem düşük pH lı topraklarda toprak reaksiyonunun düzeltilmesi, hemde normal nodozite teşekkülü için gerekli olan bir elementtir. Munns'un (54) yapmış olduğu bir çalışmada yonca bitkilerinin % 50'sinin nodülasyon yapması için gerekli olan Ca miktarı, pH 6,5 da 0,1 mM, pH 4,8 de ise 6 mM olarak bulunmuştur. Norris (55), serbest yaşayan Rhizobiumlar için kalsiyum ihtiyacının düşük olduğunu göstermiştir. Greenwood ve Hallswort'un (56) çalışmalarında, 64 ppm kalsiyum verilen üçgül bitkilerinde normal bir nodülasyon görülmüştür. Kalsiyum eksikliği olan bitkilerde ise, genel bir klorosis ve ufak negrotik nodoziteler tesbit edilmiştir.

Simbiyotik azot tesbitinde rol oynayan en önemli mikro elementler, bor, molibden ve kobaltdır.

Bor, Rhizobium'ların yetişmesi için gerekli olmadığı halde, kök ve nodozitelerin gelişmesi için gereklidir. Yeterli miktarda bor bulunmadığı zaman iletken doku sistemi iyi gelişmemekte ve nodoziteler karbonhidratlı maddeleri yeteri kadar alamamaktadır (17,54).

Molibden, doğrudan doğruya nodozitenin fonksiyonuyla ilgili bir elementtir. Molibden eksikliğinde fazla sayıda sarı renkli nodoziteler teşekkül etmekte ve tesbit edilen azot miktarı çok azalmaktadır (58). Mulder (59), molibden eksikliği olan yonca bitkilerini molibden çözeltisi ile muamele etmiş ve 5 saat sonra glutamik asit miktarınının 2,7 den 4,7 mg/g'a yükseldiğini tesbit etmiştir. Özellikle küçük tohumlu bitkiler, molibdene karşı büyük tohumlu bitkilerden daha hassastır (28).

Kobalt, hem Rhizobium'ların yetişmesi, hemde nodozitelerde vitamin B<sub>12</sub>'nin sentezi için gerekli olan bir elementtir (57,60). Kobaltın simbiyotik sistemle olan ilgisi, Ahmet ve Evans (61),

tarafından su kültüründe yetiştirilen soya fasulyelerinde araştırılmıştır. Kobalt ilâve edilmeden yetiştirilen bitkilerde, azot miktarının ve yapraklardaki klorofil maddesinin düşük olduğu, aynı zamanda nodozitelerde de daha az miktarda B<sub>12</sub> vitamini sentez edildiği bildirilmektedir. Kültür solusyonuna 0,1 - 1 ppb Co ilâve edildiği zaman ise, normal bitkiler elde edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca V, Ni, Ga ve Al gibi elementlerin kobaltın yerini almadığı da tesbit edilmiştir.

Baklagil bitkilerinin simbiyosis ile havadaki serbest azotu tesbit etmesi, bitki ve toprak verimliliği yönünden çok önemlidir. Bunun nedeni, simbiyotik sistemle tesbit edilen azotun, diğer azot tesbit eden organizmalara nisbetle çok daha fazla olmasındandır.

Nodozitetlerin azot tesbit etme süresi 30 ile 50 gün, ortalama 40 gündür. Tablo: 3 deki değerlere göre, Rhizobium'larla bitki kuru maddesinde tesbit edilen azot miktarı, Azotobacter'e kıyasla 100 mislinden daha fazladır. Bunun sebebi serbest yaşayan mikroorganizmaların yalnız hücre teşekkülü esnasında azot tesbit etmeleridir ki, bu miktar hücre ağırlığının % 10 - 20'si kadardır. Simbiyotik azot tesbitinde ise, nodoziteler tam olarak teşekkül ettikten sonra da azot tesbiti devam eder ve oldukça küçük bir nodozite dokusu, hayli fazla miktarda bitki dokusuna yetebilecek kadar azot tesbit edebilir (23).

Tarla şartlarında yapılan çalışmalardan elde edilen değerler; toprak şartları, genel büyüme şartları, bakterinin etkenlik derecesi ve bitki türü gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak büyük değişiklikler göstermektedir. Ortalama olarak baklagil bitkileri ile yılda hektara 100-200 kg. azot tesbit edilmektedir.

Batı Avrupa memleketlerinde, yonca bitkisi ile yılda hektara 300 kg. kadar azot tesbit edilmekte ve uygun şartlar altında iyi bir yonca mahsulü hektara 450 kg. kadar azot tesbit edebilmektedir. (2,62,63). Arizona'da % 0,052 N ihtiva eden bir toprakta, yonca ile hektara 820 kg. azot tesbit edildiği bildirilmektedir ki, bu rakam şimdiye kadar yapılan çalışmalardan elde edilen en yüksek değerdir (5).

TABLO: 3 Simbiyotik ve Serbest Yaşayan Mikroorganizmalarda N<sub>2</sub> Tesbiti (Wilson'a göre)

Bitki	<u>Hergün tesbit edilen azot (mg)</u>		
	Her gr.kuru nö- dülün tesbit et- tiği azot miktarı	Her gr.kuru madde- de tesbit edilen azot miktarı	40 günde her gr. kuru madde ile tesbit edilen azot miktarı (gr)
Bakla	38	190	7,6
Bezelye	98	490	19,6
Fasulye	67	335	13,4
Acı bakla	65	325	13,0
Fiğ	80	400	16,0
Yonca	67	335	13,4
Kırmızı üçgül	55	275	11,0
Azotobacter	--	100*	0,1

\*40 günde tesbit edilen azot

Baklagil bitkilerinin tesbit etmiş olduğu azot miktarının önerli bir kısmı, bitkinin hasat edilmesiyle topraktan kaldırılmış olur. Bununla beraber tesbit edilen azotun ortalama % 20'si

kök ve alt yapraklar vasıtasıyla toprakta kalır. Bazı baklagil bitkilerinin yeşil gübre olarak toprağa gömülmesi halinde ise, tesbit edilen azotun tümü toprağa ilâve edilmiş olur. Toprak hem azot, hemde organik madde miktarı bakımından zenginleşir. Bu gibi bitki artıkları karbon-azot oranı düşük olduğu için toprakta kolaylıkla dekompoze olurlar. Bitkilerin kullanabilecekleri amonyum ve nitrat formları teşekkül eder (26,64). Dekompozisyon sırasında topraktaki mikrobiyal faaliyetin artışı, toprak strüktürünün gelişmesi bakımından da faydalıdır. Toprağın su tutma kapasitesi artar ve toprak erozyonu önlenir (65).

Baklagil bitkileri uygulanan tarım sistemi içerisinde mutlaka rotasyona konulması gerekli bitkilerdir. Buğday-nadas ve buğday-bezelye-çayır-nadas sistemleri uygulanan bir denemeye 8 yıl devam edilmiştir. Bu süre sonunda, topraktaki nitrat azotunun birinci sistemde 11,5 ppm, ikinci sistemde ise 17,8 ppm olduğu bildirilmektedir (26). Diğer bir çalışmada ise, yonca ve fiğ bitkilerinin yeşil gübre olarak kullanılması halinde, arpaya 158 kg/hektar amonyum sulfat gübresine eşdeğer azot temin ettikleri saptanmıştır (37).

Baklagil bitkileri yalnız toprak verimliliği yönünden önemli olmayıp, gıda maddesi olarak da büyük bir değer ifade etmektedir. Hayvansal proteinler gıda maddesi olarak bitkisel proteinlerden daha üstün sayılmanaktaysa da, bazı baklagil bitkileri protein ve amino asitler bakımından çok daha zengindir. Özellikle gelişmekte olan memleketlerde, tryptofan ve kükürt ihtiva eden amino asitler diyetle eksik olarak alınmaktadır. Gıda maddesi olarak kullanılan başlıca baklagil bitkilerinin, protein, tryptofan ve kükürt ihtiva eden amino asitler bakımından hayvansal kaynaklardan daha üstün olduğu Tablo: 4 de görülmektedir. Yalnız soya fasulyesi hariç tutulursa, baklagil bitkileri methionine miktarı bakımından daha düşük değerler vermektedir (66).

TABLO: 4 Gıda Maddesi Olarak Kullanılan Baklagillerin ve Hayvansal Kaynakların % Protein ve Amino Asit Miktarları (100 gr.yenilebilir kısımda/mg.)

<u>Kaynaklar</u>	<u>Protein</u>	<u>Tryptofan</u>	<u>Methionine</u>	<u>Cystine</u>	<u>S-İhtiva eden A.A.</u>
<u>Baklagiller</u>					
Börülce	22,9	220	352	297	649
Lima fasulyesi	20,7	195	331	311	642
Yer fıstığı	26,9	340	271	463	734
Bezelye	23,8	251	286	308	594
Soya fasulyesi	34,9	526	513	678	1191
<u>Hayvansal kaynaklar</u>					
Sığır eti (Yağsız)	18,8	220	466	238	704
Tavuk eti	20,6	250	537	277	814
Yumurta	12,8	211	401	299	700
Balık (mezit balığı)	18,2	181	530	245	775

Hayvansal ürünleri artırmak, ancak verilen yemde karbonhidrat-protein oranının uygun bir şekilde ayarlanmasıyla mümkün olmaktadır. Baklagil bitkilerindeki protein miktarı ortalama % 13,8 olmasına rağmen, diğer çayır otlarında ancak % 5,3 kadardır. Aynı zamanda baklagil bitkileri kalsiyum, fosfor, A ve D vitaminleri bakımından da zengin olmaları sebebiyle hayvancılıkta önem kazanır (4). Özellikle verimsiz topraklarda baklagil bitkilerinin çayır otları ile karışık olarak ekilmesi, çayır otlarından alınan mahsul miktarını ve total azot miktarını artırmaktadır (47). Bunun sebebi, Rhizobium bakterileri ile baklagil bitkilerinde tesbit edilen azotun organik bileşikler halinde toprağa salgılanmasıdır. Dilz ve Mulder'in (67) çalışmalarına göre, köklerde salgılanan azot miktarı beyaz üçgülde üst aksamda bulunan total azotun % 32'si, yoncada da % 16'sı kadardır.



Simbiyotik yolla tesbit edilen azotun ekonomik bir değer ifade etmesi, ancak toprakta etkili Rhizobium suşlarının bulunması ile mümkün olur. Genellikle yeni kültüre alınan veya ilk defa baklagil bitkilerinin ekildiği sahalarda, ilgili Rhizobium bakterileri mevcut değildir. Bir süre baklagil bitkisi ekiminin ihmal edildiği bölgelerde ise, etkili Rhizobium suşları azalmıştır. Yapılan tahminlere göre, toprakta tabii olarak bulunan Rhizobium bakterilerinin % 25'i etkili, % 50'si orta derecede etkili, geri kalan % 25'i ise etkisizdir (27,35,66).

Toprak veya tohum aşılamaında, laboratuvarlarda seçilmiş etkili suşlar kullanılarak azot tesbiti garanti altına alınmalıdır. Tabii yoldan mümkün olduğu kadar fazla azot temin etmek için bu işlem bütün dünyada tatbik edilmektedir. Bu amaçla azot tesbit etme kapasiteleri yüksek olan suşlar devamlı olarak araştırılmalı ve pratikte uygulanması sağlanmalıdır.

## MATERYAL VE METOD

Rhizobium meliloti suşlarının çeşitli özelliklerini ve etkinlik derecelerini saptamak amacıyla yapılan bu çalışma, laboratuvar ve sera denemeleri ile yürütüldü.

### I. Yonca kök numunelerinin alınışı:

Çalışmamız için gerekli olan yonca nodoziteleri, İç Anadolu'nun Ankara, Konya ve Eskişehir illeri bölgesindeki yoncalıklardan temin edildi. Numuneler Nisan ayı içerisinde alındı. Nodoziteli kökler kök civarındaki toprak ile beraber plastik torbalara konularak, etekentlendi. Laboratuvara hemen gelme imkanı olmayan numuneler, yolda geçen süre dışında buz dolabında muhafaza edildi. Ankara ili bölgesinden 5, Eskişehir'den 4, Konya'dan 7 nodoziteli kök numunesi temin edildi.

### II. Kültürlerin izolasyonu ve muhafazası:

Laboratuverda kök numuneleri naylon bir bezin üzerinde yıkanarak temizlendi. Nodozitelerin üzerinde kök bölgesinden az bir kısım kalacak şekilde kesildi. Her numuneden sıhhatli bir nodozite seçilerek numaralandı. İzolasyon işlemi için laboratuvarımızda modifiye edilen O.N.Allen metodu uygulandı (68). Nodozitelerin dış sathlarının sterilize edilmesi için sırasıyla aşağıdaki petrilere bekletildi.

% 95 lik etanol..... 1 dk.

Asit civa klorür ( $HgCl_2$  1 gr, kon.HCl 5 ml. su 1 lt....4 dk.

Steril musluk suyu.....5 dk.

Her numune için içlerinde 1 ml. steril destile su bulunan 4 petri kutusu hazırlandı. Birinci petride nodoziteler steril bir pens ile ezilerek, içlerindeki sıvının tamamen suya geçmesi temin edildi. Bu sıvıdan bir öze dolusu alınarak ikinci petri açıldı. Bu işlem, her defasında öze yakılarak ve bir petriden

diğerine aşılama yapılarak diğer petriler için de uygulandı. Bu şekilde petriler gittikçe daha seyreltik olarak aşılandı. Üzerlerine 50°C de YMA besiyeri dökülerek, 28°C de 5 gün enkübe edildi.

Yeast ekstrakt mannitol agar (YMA besiyeri)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 gr.
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	0,2 gr.
NaCl .....	0,1 gr.
Mannitol .....	10 gr.
Yeast ext.....	1 gr.
Agar .....	15 gr.
Destile su .....	1 lt.

Maddeler karıştırılarak pH 7'ye ayarlandı ve 121°C de 15 dakika sterilize edildi (14).

Her numune için bir koloni seçilerek, tüplerdeki (YMA) eğik yüzeylerine ekim yapıldı. Bu şekilde İç Anadolu bölgesinden 16 R.meliloti suşu izole edilmiş oldu. Ayrıca, Hollanda'nın Kampen Polder Araştırma Enstitüsünden temin edilen, A 145, A 148 ve A 161 nolu 3 R.meliloti suşu da araştırmaya dahil edilerek, toplam olarak 19 suş üzerinde çalışıldı.

Stok kültürler buz dolabında 3-4°C de muhafaza edildi ve her ay eğik yüzeylere ekim yapılarak yenilendi.

III. Rhizobium meliloti suşlarının özellikleri ile ilgili testler:

Rhizobium türlerinin, kültürel, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri farklı olan suşları kapsadığı bildirilmektedir (17,27). Çalışmamızda, R. meliloti suşlarının sabit ve değişken özelliklerini saptamak amacıyla 55 özellik araştırıldı. Bu özellikler şunlardır: Gram reaksiyonu, bakteri boylarının 1-3 $\mu$  arasında olması, bakteri genişliklerinin 0,5 - 0,9 $\mu$  arasında olması, bakterilerde  $\beta$ -hydroxybutyric asit granüllerinin bulunuşu, bakteroid teşekkülü, kolonilerin yuvarlak, muntazam kenarlı, kabarık olması,

polisakkarit maddeler salgılaması, 3 günde üreme, kolonilerin beyaz, krem, renksiz olması, koloni büyüklüklerinin 1 mm den büyük olması, bakterilerin hareketli olması, kongo kırmızısı absorpsiyonu, % 2, % 3 tuza toleransı, 39°C de üreme, 4°C de üreme, 50°C de 10 dakika bekletildiği zaman üreme, pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10 da üreme, litmuslu sütte asit reaksiyonu, litmuslu sütte serum zonu teşekkülü, 3 şekerli demir besiyerinde H<sub>2</sub>S teşekkülü, 3 şekerli demir besiyerinde gaz teşekkülü, bizmut sülfid besiyerinde H<sub>2</sub>S teşekkülü, üreaz aktiviteleri, katalaz aktiviteleri, oksidaz aktiviteleri, nitrat redüksiyonu, nitrit redüksiyonu, jelatini eritme, metilen mavisi redüksiyonu, sitratın kullanılması, metil kırmızısı testi, indol, Voges-Proskauer testleri, mannitol, glukoz, laktoz, galaktoz, rafinoz, maltoz, nişastayı kullanmaları, yoncada nodozite testi.

a) Mikroskopik muayeneler:

Mikroskopik muayeneler için (YMA) eğik yüzeylerinde bir hafta enkübe edilen kültürler kullanıldı.

Gram boyama: Gram boyama için Rhizobium'lara modifiye edilen ve özellikle dekolere işleme değişik olan bir metod uygulandı (69).

Karbol fuksin ile boyama: Preparatlar 20 saniye karbol fuksin ile boyanarak bakterilerin boyutları tesbit edildi.

$\beta$ -hydroxybutyric asit granüllerinin boyanması: Preparatlar Sudan Black B ile boyanarak bakteri içinde granüllerin bulunup bulunmadığı tetkik edildi (69,70).

Bakteroidlerin boyanması: Nodozitelerin dış sathları sterilize edildi. İki temiz lâm arasında ezilerek yayıldı. Havada kurutulan preparatlar, 3-4 damla susuz alkol damlatılarak tesbit edildi. Karbol fuksin ile 5 dakika boyanarak morfolojik yapıları ve boyutları tetkik edildi (71).

b) Koloni özellikleri:

Ufak tüpler içerisinde, 1 ml. musluk suyu ve az miktarda temiz kum konularak sterilize edildi. Stok kültürlerden bir öze do-

lusu aktarılarak iyice çalkalandı. Bu tüplerden (YMA) plâklarına tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. Petrilere 28°C de enkübe edildi. Üçüncü gün yetişmenin olup olmadığı tesbit edildi. Yedinci gün ise koloni şekilleri, renkleri, büyüklükleri ve polisakkarit maddeler salgılayıp salgılamadıkları araştırıldı.

c) Hareket muayenesi:

Bu maksatla Edwards ve Ewing besiyeri ile % 0,4 agar ilave edilen (YMA) besiyerleri kullanıldı. Dik olarak dondurulan tüplere iğne öze ile ekim yapılarak, 28°C de bir hafta enkübe edildi (72).

d) Kongo kırmızısı absorpsiyonu:

Kongo kırmızısı ihtiva eden (YMA) plâklarına (1 lt. YMA. 10 ml. 1/400 kongo kırmızısı) ekim yapılarak, 28°C de bir hafta enkübe edildi. Yetişmenin kırmızı renkte olup olmadığı kontrol edildi (68).

e) % 2, % 3 tuza (NaCl) toleransları:

Tuz konsantrasyonu % 2 ve % 3 olarak artırılan (YMA) plâklarına ekim yapıldı. 28°C de bir hafta enkübe edildi (73).

f) Değişik ısılarda üreme toleransları:

Kültürlerin 4 ve 39°C deki üreme yeteneklerini tesbit etmek için (YMA) plâklarına ekim yapılarak, bu ısı derecelerinde bir hafta enkübe edildi. Ayrıca sıvı besiyerinde yetiştirilen kültürlerin 1 ml. si su banyosunda 50°C de 10 dakika bekletilerek petrilere döküldü. Üzerlerine (YMA) besiyeri ilâve edilerek, 28°C de bir hafta enkübe edildi.

g) pH toleransları:

Sıvı YMA besiyerlerininin pH dereceleri sterilizasyondan sonra 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10 olacak

şekilde ayarlandı. Tüplere aseptik olarak dağıtıldı. Sıvı kültürlerden bir öze dolusu ekim yapılarak, 28°C de bir hafta enkübe edildi. Yetişme kolorimetrede okunarak tesbit edildi.

h)Biyokimyasal özellikleri:

Litmuşlu sütte üreme: Litmuşlu süt tüplerine ekim yapılarak, 28°C de bir ay enkübe edildi (14).

Üreaz aktiviteleri: Steril tüplere 7 cc üreaz testi besiyeri konuldu. Eğik yüzeylere ekim yapılarak, 28°C de bir hafta enkübe edildi (72).

Hidrojen sülfid teşekkülü: H<sub>2</sub>S teşekkülü 3 şekerli demir ve bizmut sülfid besiyerlerinde araştırıldı. Bacto bizmut sülfid 10 gr. mannitol ve 5 gr. NaCl ilâve edilerek kullanıldı. Üç şekerli demir besiyerlerinde tüplerin dip kısımlarına ayrıca iyne öze ile ekim yapılarak, gaz teşekkülü araştırıldı. Tüpler ve petrilere 28°C de 14 gün enkübe edildi (11).

Katalaz aktiviteleri: Temiz bir lâm üzerine bir damla % 10 luk hidrojen peroksit damlatılarak, bir öze dolusu kültür ile karıştırıldı. Gaz teşekkül edip etmediği araştırıldı (73).

Oksidaz aktiviteleri: (YMA) plâklarındaki kolonilere % 1 lik N-N-dimethyl-P-phenylene-diamine monohydrochlorid suşuonyonu damlatılarak, perbe rengin teşekkülü araştırıldı (72).

Nitrat ve nitritlerin redüksiyonu: Sagen'in nitrat besiyeri tüplerine ekim yapılarak, 28°C de bir hafta enkübe edildi. Nitrit teşekkülünü anlamak için, tüplere birer damla sülfanilik asit ve  $\alpha$  naftilamin miyarları damlatıldı. Perbe veya kırmızı rengin teşekkülü araştırıldı (68,74). Negatif tüplerde, nitritlerin redükte edilip edilmediğini anlamak için, az miktarda çinko tozu ilâve edilerek, karakteristik perbe rengin teşekkülü araştırıldı (75).

Jelatin eritme: % 12 jelatin ihtiva eden tüplere ekim yapılarak, 28°C de iki ay enkübe edildi. Bu süre sonunda buz dolabında bırakılarak, tüplerin katılaşıp katılaşmadığı kontrol edildi (75).

Metilen mavisinin redüksiyonu: 9 cc (YMA) sıvı besiyeri ihtiva eden tüplere ekim yapılarak, 28°C de bir hafta enkübe edildi. Üzerlerine 1 cc 1/20000 metilen mavisi ilâve edilerek, 28°C de bir saat bekletildi. Mavi rengin beyaza dönüşü kontrol edildi (70).

Sitaratın kullanılması: Sitrat testi tüplerde Simmons besiyerinde, petrilere ise, % 2 agarlı Koser sitrat besiyerinde olmak üzere iki ayrı şekilde araştırıldı. Tüpler 28°C de bir hafta, petrilere ise 15 gün enkübe edildi (74,76).

İndol, Metil kırmızısı ve Voges Proskauer testleri: Bu testler Amerikan standar metodlarına uygun olarak yapıldı. Tüpler 28°C de bir hafta enkübe edildi (76).

Karbonhidratları kullanmaları: Karbonhidrat kaynağı olarak D-mannitol, D-glukoz, laktoz, D-glaktoz, rafinoz, maltoz ve nişasta kullanıldı. Bu maddeler 100 cc destile su içerisinde eritilerek zais filitresinden süzüldü. Sterilize edilen özel besiyerlerine ilâve edildi.

(YMA) sıvı besiyerinde 5 gün enkübe edilen kültürler 13 mm çapında filitre kağıdı disklerine emdirilerek, hazırlanan plâkların yüzeylerine yerleştirildi. Ayrıca karbon kaynağı ihtiva etmeyen plâklara da diskler konularak kontrol olarak bırakıldı. Petrilere 28°C de bir hafta enkübe edildi. Yetiştirme kontrol diskleriyle mukayese edilerek değerlendirildi.

Karbonhidrat besiyeri

MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	0,25 gr.
CaSO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O .....	0,03 gr.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O .....	1,20 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,55 gr.
NaCl .....	0,25 gr.
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	0,0035 gr.
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	0,00016 gr.
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O .....	0,00008 gr.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,0005 gr.
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O .....	0,0004 gr.
Yeast ext.....	0,25 gr.
Fenolred .....	0,018 gr.
Karbon kaynağı .....	100 ml. (10 gr.)
Agar .....	20 gr.
Destile su .....	900 ml.

Maddeler karbon kaynakları ilâve edilmeden önce karıştırılarak pH 7 ye ayarlandı. 121<sup>0</sup> C de 15 dakika sterilize edildi (73).

IV.Sara denemesi ile etkenlik derecelerinin saptanması:

Steril yonca bitkileri azotsuz bir besiyerinde yetiştirilerek, R.meliloti suşları ile aşılandı. Bu şekilde, bitkilerin azot ihtiyacının sadece nodozitelerin havadan tesbit ettikleri azot ile karşılanması temin edildi. Yapılan çeşitli çalışmalarda kuru madde ağırlıkları ile tesbit edilen azot miktarı arasında yüksek bir korelasyonun mevcut olduğu bildirilmektedir (43,77,78). Bu nedenle, etkenlik derecelerinin saptanmasında kuru madde ağırlıkları esas olarak alındı (79).

a)Kavanozların hazırlanışı:

Denerede kullanılan Jensen besiyeri 10 ppb kobalt iyonu ilâve edilerek modifiye edildi. 350 ml.kapasiteli cam kavanozlara,



175 ml. besiyeri konularak ağızları pamuklandı. 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Kavanozlardaki besiyeri donduktan sonra üzerlerine 1 cm. kalınlığında (1 lt. destile su, 8 gr. agar) sıcak agarlı su ilâve edildi (69).

Jensen besiyeri

CaHPO <sub>4</sub> .....	0,1 gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,2 gr.
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,2 gr.
NaCl .....	0,2 gr.
Fe Cl <sub>3</sub> .....	0,1 gr.
Agar .....	8 gr.
Destile su .....	1 lt.

Hazırlanan besiyerine birer cc mikro element çözeltisi ilâve edilerek pH 6,8 e ayarlandı.

Mikro element çözeltileri

Bo .....	% 0,05
Mn .....	% 0,05
Zn .....	% 0,005
Mo .....	% 0,005
Cu .....	% 0,002
Co .....	10 ppm

b)Kültürlerin hazırlanması:

Stok kültürlerden bir öze dolusu alınarak, 50 ml. lik sıvı (YMA) besiyerlerine ekim yapıldı. 28°C de 3 gün ekbübe edildi. Bu kültürlerden tekrar 50 ml. lik sıvı (YMA) besiyerlerine birer ml. ekim yapılarak, 28°C de 3 gün enkübe edildi. Bitkilerin aşılmasında bu kültürler kullanıldı.

c) Tohumların sterilizasyonu:

Denemede adi yonca (*Medicago sativa* L.) tohumları kullanıldı. Tohumlar 100 ml. lik şişelere konularak, hafif sabunlu su ile 3 dakika çalkalandı. Musluk suyu ile yıkanarak, şişelerin ağzı lastik bir tıpa ile kapatıldı. Dış yüz sterilizasyonu için 1/2 oranında sulandırılmış sature brom solüsyonu kullanıldı. Tohumlar bu solüsyon içerisinde 4 dakika çalkalandı. Aseptik şartlar altında en az 10 defa steril sudan geçirilerek brom buharlarının tamamen uçması temin edildi. Brom buharlarından korunmak için çeker ocak altında çalışıldı. Sterilize edilen tohumlar agar plâklarına (1 lt. musluk suyu, 10 gr. agar) ekildi. Petriler ters çevrilerek, 28°C de 30 saat enkübe edildi.

d) Kavanozlara ekim:

Steril ve kökleri muntazam olarak çimlenen yonca fidecikleri, bir petri içerisinde 4 dakika bakteri kültürü ile muamele edildi. Steril bir pens ile kavanozların ortasında oyuklar açıldı. Her kavanoza 4 bitki ekildi. Açılan oyuklara birer ml. bakteri kültürü konuldu. Kavanozların ağızları pamukla kapatıldı. Ekim işlemi sırasında kontaminasyon olmaması için mümkün olduğu kadar steril çalışmaya dikkat edildi. Deneme 3 paralelli olarak ve tesadüf blokları desenine uygun olarak kuruldu. Ayrıca 9 kavanoz açılmadan azotsuz kontrol olarak bırakıldı. Azotlu kontrol olan 3 kavanoza ise, 70 ppm N hesabı ile  $KNO_3$  verildi (69).

e) Kavanozların serada muhafazası:

Bitki köklerinin ışıktan zarar görmemesi için kavanozların etrafı siyah karbon kağıdı ile kapatıldı. Kavanozların pamukları 20. gün kaldırıldı. Ekilen 4 fideden zayıf gelişen biri alınarak bitki sayısı üçe indirildi. Agar yüzeyleri steril bir pens yardımı ile pamukla örtüldü. Bir ay hiç bir işlem yapılmaksızın serada bırakıldı. İkinci ay ise her üç günde bir, 10 ml. steril Jensen solüsyonu verilerek agarların kurumaları önlendi.

f)Yoncaların hasadı:

Kavanozlara musluk suyu konularak 24 saat bekletildi.

Kökler zarar görmeyecek şekilde agardan çıkarıldı. Nodozitelere rengi, sayısı, büyüklüğü ve dağılışı tesbit edildi.

g)Kuru madde tayini:

Her kavanozdan alınan bitki materyali ayrı bir zarf içeri- sine konularak etiketlendi. 65°C deki fırında 48 saat bırakıla- rak tartıldı.

h)Etkenlik derecelerinin saptanması:

Ortalama kuru madde ağırlıkları aşağıdaki formüle uyularak etkenlik dereceleri saptandı (79).

$$\text{Etkenlik derecesi} = \frac{\text{Test bitkisinin ort.kuru mad.ağırlığı}}{\text{Azotlu kontrol bitkisinin ort.kuru mad.ağırlığı}} \cdot 100$$

Suşların etkenlik derecelerine göre gruplara ayrılmasında aşağıdaki sınırlar esas alındı (80).

1-	Etkenlik derecesi	100 >	olanlar	:	Çok etkili
2-	"	"	100-75	"	: Etkili
3-	"	"	75-50	"	: Orta derecede etkili
4-	"	"	50-25	"	: Etkisiz
5-	"	"	25 <	"	: Çok etkisiz

## BULGULAR

### a) Mikroskopik muayeneler:

Rhizobium meliloti suşları mikroskopda gram-negatif çoraklar şeklinde görülmüşlerdir. Karbol fuksin ile boyanan preparatlarda; uzunluklarının 1,2 - 2,5 $\mu$ , genişliklerinin ise 0,6 - 1,2 $\mu$  arasında değiştiği tesbit edilmiştir. Bergay's Manuel'de (12) Rhizobium cinsine ait bakterilerin uzunluklarının 1 - 3 $\mu$ , genişliklerinin 0,5 - 0,9 $\mu$  arasında değiştiği bildirilmektedir. Oysa, çalışmamızda 7 suşun genişliği 0,9 $\mu$  dan daha büyük olarak bulunmuştur. Sudan Black ile boyanan preparatlarda, suşların hepsinde  $\beta$ -hydroxybutyric asit granülleri tesbit edilmiştir. Nodozite içerisindeki bakteroid formları, normal hücrelerden daha büyük ve gayri muntazam şekillerde görülmüştür. Bu hücrelerin uzunlukları 4 - 7,2 $\mu$ , genişlikleri 1 - 2,5 $\mu$  arasında değişmektedir.

Suşların bakteri ve bakteroid formlarının boyutları Tablo: 5 de görülmektedir.

### b) Koloni özellikleri:

Rhizobium meliloti suşlarının hepsi (YMA) plâkları üzerinde yuvarlak, kenarları muntazam ve kabarık koloniler teşekkül ettirmişlerdir. Suşların hepsinde 3 günde üreme görülmüştür. Koloni büyüklükleri 1,8 - 4 mm arasında değişmektedir. Koloni renkleri 9 suşda beyaz, 3 suşda krem, 7 suşda ise renksizdir. Suşların 10 tanesi çok fazla, 6 tanesi orta veya az polisakkarit maddeler salgılamaktadır. Diğer 3 suşda bu tip bir salgılama görülmemiştir.

Suşların koloni büyüklükleri, koloni renkleri ve salgıladıkları polisakkarit maddeler Tablo: 5 de gösterilmiştir.

TABLO: 5 Suşların Bakteri ve Bakteroid Formlarının Boyutları\* ve Koloni Özellikleri

Suş No.	Bakteri		Bakteroid		Koloni Özellikleri		
	Uzun.	Geniş.	Uzun.	Geniş.	Büyük mm.	Renk	Polisak. mad.sal.
1	1,8	0,6	5,0	1,2	1,8	Beyaz	Yok
2	1,3	0,8	4,5	1,0	1,8	Beyaz	Yok
3	1,5	0,8	6,0	2,5	2,8	Renksiz	Az
4	2,5	1,0	4,0	1,3	1,8	Krem	Çok
5	1,3	0,8	4,5	1,2	3,8	Beyaz	Çok
6	2,5	0,8	5,0	1,4	2,8	Renksiz	Orta
7	2,0	1,2	6,0	1,3	3,2	Krem	Çok
8	1,2	0,8	4,0	1,0	3,8	Renksiz	Çok
9	2,2	0,9	5,0	1,3	2,5	Beyaz	Az
10	2,5	1,0	7,2	1,4	2,3	Beyaz	Çok
11	1,5	0,8	6,0	2,0	2,3	Beyaz	Çok
12	1,8	0,8	4,5	1,2	3,8	Beyaz	Çok
13	2,5	1,2	4,0	1,2	2,8	Renksiz	Orta
14	1,8	1,2	4,8	1,2	3,8	Krem	Çok
15	1,8	1,0	6,5	1,8	3,8	Beyaz	Çok
16	2,0	1,0	7,0	1,4	1,8	Beyaz	Çok
145	1,5	0,8	6,0	1,0	3,5	Renksiz	Orta
148	1,3	0,8	5,5	2,0	4,0	Renksiz	Az
161	1,5	0,8	6,5	1,0	3,5	Renksiz	Yok

\*Beş ölçümün ortalaması olarak

c) Hareket muayenesi:

Hareket muayenesi için kullanılan dik tüplerde bazen Edwards ve Ewing besiyeri, bazende % 0,4 agarlı (YMA) besiyeri daha iyi netice vermiş, fakat suşların hepsinin hareketli olduğu tesbit edilmiştir.

d) Kongo kırmızısı absorpsiyonu:

Rhizobium meliloti suşları kongo kırmızısını genellikle çok az absorbe etmişler ve açık pembe bir yetiştirme göstermişlerdir. Yalnız 6 nolu suş boyayı kuvvetle absorbe ederek koyu kırmızı bir yetiştirme göstermiştir.

e) % 2 ve % 3 tuza (NaCl) toleransları:

Suşların hepsi % 2 ve % 3 tuza tolerans göstermiş ve bu seviyelerde tuz ihtiva eden (YMA) plâkları üzerinde yetiştirilmişlerdir.

f) Değişik ısılarda üreme toleransları:

39°C de bir hafta enkübe edildiği ve 50°C de 10 dakika bekletildiği zaman suşların hepsi üremişlerdir. 4°C de bir hafta enkübe edildikleri zaman üreme görülmemiştir.

g) pH toleransları:

Rhizobium meliloti suşları, pH 3,5 ve 10 da ürememişlerdir. pH 5,5, 8,0, 8,5, ve 9,0 da suşların hepsinde üreme tesbit edilmiştir. Bunun dışında pH 4 de 3, pH 4,5 da 5, pH 5,0 da 16, pH 9,5 da ise 17 suş üreyebilmiştir.

Suşların pH toleransları Tablo: 6 de gösterilmiştir.

h) Biyokimyasal özellikleri:

Üreaz, bizmut sülfide H<sub>2</sub>S ve nitrat redüksiyonu testleri bütün suşlarda pozitif olarak bulunmuştur. İndol metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri, suşların hepsinde negatif sonuç vermiş ve 3 şekerli demir besiyerinde gaz teşekkül etmemiştir. Litmuslu sütte 10 suş asit reaksiyon vermiş ve 17 suşda da serum zonu teşekkül etmiştir. 3 şekerli demir besiyerinde 12 suşda H<sub>2</sub>S teşekkülü görülmüştür. Oksidaz ve katalaz testleri 16 suşda pozitif sonuç vermiştir. Nitritleri 6 suş, metilen mavisini 18 suş redükte etmiştir. Jalatini 3 suş eritmiş, sitratı ise sadece bir suş kullanmıştır.

Suşlar karbonhidrat kaynağı olarak en fazla galaktoz ve rafinozu kullanmışlardır. Bu karbon kaynaklarında suşların 17 tanesi üreme göstermiştir. Mannitolu 15, glukozu 11, laktozu 13, maltozu 14, nişastayı da 8 suş kullanmıştır.

TABLO: 6 Suşların pH Toleransları

Suş no.	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	8,0	8,5	9,0	9,5	10
1	-	-	-	+	+	÷	+	÷	+	-
2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	-	-	-	-	÷	+	+	÷	÷	-
4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
5	-	-	-	+	+	÷	+	÷	÷	-
6	-	-	-	÷	÷	÷	+	+	÷	-
7	-	-	-	÷	÷	+	+	÷	÷	-
8	-	÷	+	+	+	+	+	÷	÷	-
9	-	-	÷	÷	÷	÷	÷	÷	÷	-
10	-	+	÷	÷	÷	÷	÷	+	-	-
11	-	-	-	-	÷	+	+	÷	÷	-
12	-	-	-	÷	÷	÷	+	÷	÷	-
13	-	-	-	÷	+	÷	÷	÷	+	-
14	-	-	-	÷	÷	÷	÷	+	÷	-
15	-	-	-	÷	÷	+	÷	÷	+	-
16	-	-	-	-	÷	÷	÷	+	÷	-
145	-	-	-	÷	÷	÷	÷	÷	+	-
148	-	-	-	÷	÷	+	÷	÷	+	-
161	-	-	-	÷	÷	÷	÷	÷	÷	-
Toplam	0	3	5	16	19	19	19	19	17	0

Suşların biyokinyasal özellikleri Tablo: 7 de, kullandıkları karbon kaynakları Tablo: 8 de gösterilmiştir.

TABLO: 7 Suşların Biyokinyasal Özellikleri

Suş no.	Litmus		Üreaz	H <sub>2</sub> S		Katalaz	Oksidaz	Nitrat redük.	Nitrit redük.	Jelatin eritme	Metilen mavisi redük	Sitrat
	Serum zonu	Asit reak.		3 şerkerli demir	Bizmut sülfid							
1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
3	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
4	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
6	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
9	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
12	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
13	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
14	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
15	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
16	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
145	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
148	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
161	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Toplam	17	10	19	12	19	16	16	19	6	3	18	1



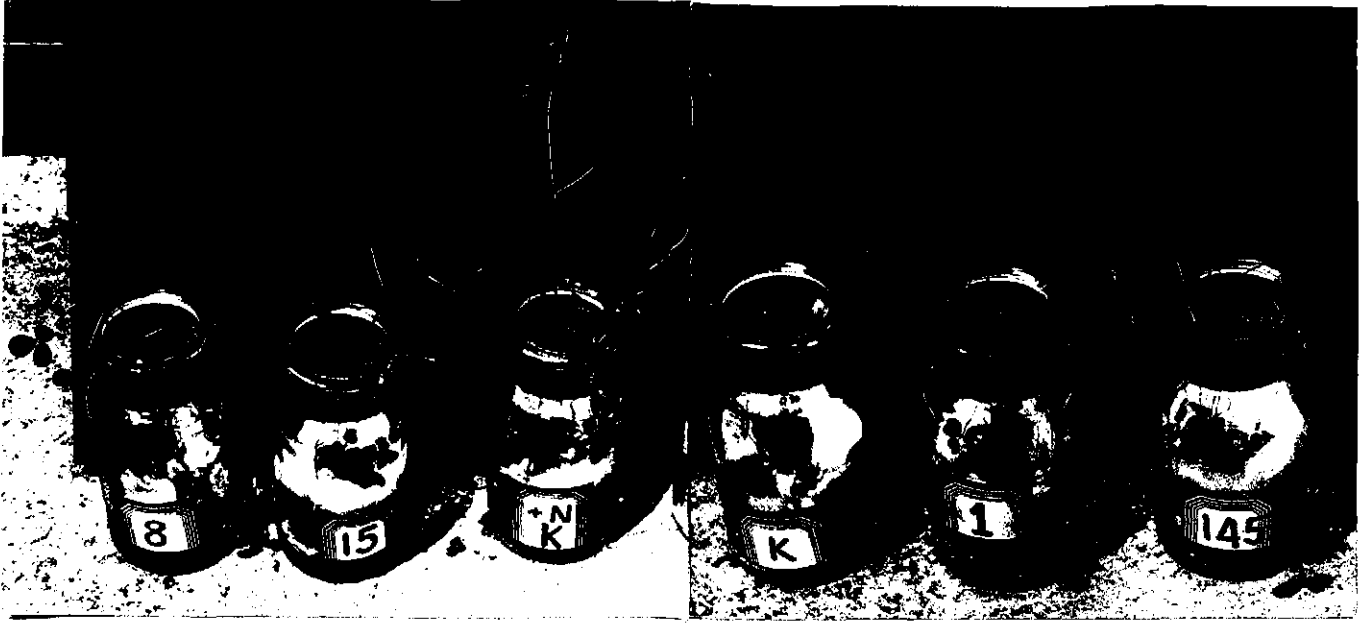
TABLO: 8 Suşların Karbonhidratları Kullanışları

Suş no.	Man.	Glu.	Lak.	Galak.	Raf.	Mal.	Niş.
1	+	-	+	+	+	-	+
2	+	-	+	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	-	+
5	+	-	+	+	-	-	+
6	-	-	-	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+
9	-	+	+	+	+	-	+
10	+	+	+	-	+	+	-
11	+	-	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	+	+	-
13	+	+	-	+	+	+	-
14	+	+	-	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	+	+
145	-	-	-	-	+	+	+
148	+	+	-	+	+	+	-
161	+	-	-	+	-	-	-
Toplar	15	11	13	17	17	14	8

i) Sera çalışmaları:

Aşılana bütün kavanozlarda 13 ve 18. günler arasında nodozitelerin teşekkül ettikleri tesbit edilmiştir. İki aylık bir gelişme süresi sonunda 70 ppm N verilen kontrol bitkilerde normal bir gelişme görülmüş, azotuz kontrol bitkiler ise çok ufak ve sarı

renkte kalmışlardır. Aşılı kavanozlarda bitki gelişmeleri azotlu ve azotsuz kontrol bitkiler arasında değişmektedir. Bazı aşılı kavanozlarda bitki gelişmesinin azotlu kontrol bitkiden daha iyi olduğu dikkati çekmiştir. (Şekil: 2 ).



ŞEKİL: 2 Kontrol ve aşılı kavanozlarda bitki gelişmeleri

İyi gelişme gösteren aşılı bitkiler, ana ve yan kökler üzerinde eldiven şeklinde iri nodoziteler teşekkül ettirmiştir. İyi gelişmeyen aşılı bitkilerin köklerinde, genellikle kök sistemi üzerine dağılmış küçük ve uzun nodoziteler görülmüştür. (Şekil:3). Kontrol bitkilerde nodozite teşekkül etmemiştir. Çeşitli suşlarla aşılanan kavanozların ortalama nodozite sayıları 41-9 arasında değişmektedir. Ortalama nodozite uzunlukları 5,4 ile 1,3 mm. arasındadır. Genellikle ana kök üzerinde bulunan nodozitelerin rengi pembe veya açık pembedir.

Suşların teşekkül ettirmiş oldukları nodozitelerin özellikleri Tablo: 9 da gösterilmiştir.



ŞEKİL: 3 Kontrol ve aşıllı bitkilerin kök yapıları

Aşıllı kavanzozlardaki bitkilerin ortalama kuru madde ağırlıkları 392 mg. ile 45 mg. arasında değişmektedir. Azotlu kontrol kavanzozların ortalama kuru madde ağırlıkları 381 mg., azotsuz kontrol kavanzozların ortalama kuru madde ağırlıkları ise 45 mg. dir.

Kuru madde ağırlıkları ile saptanan etkenlik dereceleri 105 ile 12 arasında değişmektedir. Azotlu kontrol bitkilerden daha fazla kuru madde ağırlığı veren 15 ve 1 nolu. suşların etkenlik dereceleri 100 den büyük olarak bulunmuştur.

Tablo:10 da, kavanzozların ortalama kuru madde ağırlıkları, suşların etkenlik dereceleri ve bu verilere göre hangi gruplara girdikleri gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi etkenlik dereceleri 100 den büyük olan 15 ve 1 nolu. suşlar çok etkili suşlardır.

Etkenlik dereceleri 100-75 arasında olan 7, 145, 8 ve 161 nolu. suşlar etkili suşlardır. Etkenlik dereceleri 50-25 arasında olan 16, 11, 12, 9, 14, 4 ve 6 nolu. suşlar etkisiz suşlardır. Etkenlik dereceleri 25 den küçük olan 5, 13, 10 ve 2 nolu. suşlar ise çok etkisiz suşlardır.

TABLO: 9 Kavanozların Ortalama Nodozite Sayıları, Ortalama Nodozite Uzunlukları, Nodozite Renk ve Dağılımları

Suş no.	Ortalama sayı	Ortalama uzunluk	Renk	Dağılım
1	23	5,2	Perbe	Ana kök
2	9	1,4	Beyaz	Dağınık
3	17	4,1	Pembe	Ana kök
4	20	3,0	Sarı	Dağınık
5	8	1,3	Beyaz	Şaçak kök
6	24	2,7	Açık pembe	Dağınık
7	29	5,0	Pembe	Ana kök
8	18	5,1	Pembe	Ana kök
9	17	2,1	Sarı	Şaçak kök
10	14	2,6	Beyaz	Şaçak kök
11	41	2,8	Beyaz	Dağınık
12	40	2,1	Açık pembe	Şaçak kök
13	27	2,0	Beyaz	Dağınık
14	25	3,2	Beyaz	Şaçak kök
15	17	5,4	Pembe	Ana kök
16	30	2,7	Açık perbe	Dağınık
145	33	4,9	Pembe	Ana kök
148	18	4,3	Açık pembe	Ana kök
161	20	5,1	Perbe	Ana kök

TABLO: 10 Kavanozların Ortalama Kuru Madde Ağırlıkları, Suşların Etkenlik Dereceleri ve Girdikleri Gruplar

Suş no.	Ortalama kuru mad. mg/kavanoz	Etkenlik dereceleri	Grup sınırları	Ayrıldıkları gruplar
15	401	105	1	Çok etkili suşlar
1	392	103	100	
7	378	99	2	Etkili suşlar
145	368	96	100-75	
8	313	82		
161	301	79		
3	269	71	3	Orta derecede etkili suşlar
148	228	60	75-50	
16	182	48	4	Etkisiz suşlar
11	166	44	50-25	
12	165	43		
9	157	41		
14	156	41		
4	144	38		
6	120	31		
15	69	18	5	Çok etkisiz suşlar
13	63	16	25	
10	46	12		
2	45	12		
+N	381			
-N	44			

## TARTIŞMA

Rhizobium cinsinin sınıflandırılması henüz kesinlikle aydınlanmış bir konu değildir. Rhizobium suşları baklagil bitkilerinde nodozite yapabilme yeteneği göz önüne alınarak, R.meliloti, R.trifolii, R.leguminosarum, R.phaseoli, R.lupini ve R.japonicum olarak üzere 6 türe ayrılmıştır. Tür ayrımının bitki gruplarına göre yapılması pratik bakımdan faydalıdır. Çünkü, bakteri kültürlerinin hazırlanmasında, bitki-bakteri sistemi arasında uygun bir çalışma olanağı dikkate alınır. Bununla beraber, günümüzde bu tip sınıflandırmalar yetersiz bulunmaktadır. Araştırmacıların sınıflandırılmanın değiştirilmesi için ileri sürdükleri sorunları başlıca 4 grup altında toplamak mümkündür.

1-Bazı Rhizobium suşları çeşitli gruplardaki bitkiler üzerinde nodozite meydana getirebilmektedir. Bu durumda herhangi bir suşu bir çalışmada R.meliloti, diğer bir çalışmada ise R.trifolii olarak tanımlamak mümkündür (30,81).

2-Rhizobium japonicum suşları, grubunda bulunan bitkilerin bazıları üzerinde nodozite meydana getirmemektedir. Bu grupta bulunan bitki cinslerinin çok çeşitli olması, özel bir problem teşkil etmektedir (26,82).

3-Türlerin, morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikleri arasında kesin bir ayırım yapmak mümkün değildir. Aynı bitkiden izole edilen 2 suş bile, tamamen farklı özellikler gösterebilir (17,27,81).

4-Aglutinasyon, presipitasyon ve kompleks birleşmesi ile yapılan serolojik çalışmalarda türler arasında çapraz reaksiyonlar görülmektedir. Aynı türe giren bakteriler de müşterek bir somatik veya kirpik antijenine sahip değildirler (14,83,84).

Son senelerde sınıflandırılmanın değiştirilmesi, pek çok araştırmacı tarafından kabul edilmiş, fakat henüz kesin bir çözüm yolu bulunamamıştır.

Graham, 1964 de yapmış olduğu bir çalışmada, Rhizobium, Agrobacterium, Bacillus, Chromobacterium ve Beijerinckia türlerine ait 121 suşun 100 değişik özelliklerini karşılaştırmıştır. Birbirlerine çok yakın özellikler göstermeleri nedeni ile R.leguminosarum, R.trifolii ve R.phaseoli türlerini R.leguminosarum adı altında tek bir tür olarak birleştirmiştir. R.meliloti'yi ikinci tür ve bu türe çok yakın özellikler gösteren A.tumefaciens ile A.radiobacter suşlarını da R.radiobacter adı altında nc bir tür olarak tanımlamıştır. Bu sınıflandırmaya göre, Agrobacterium cinsine ait iki tür Rhizobium cinsine dahil edilmektedir. Diğer taraftan, yavaş üreyen R.lupini ve R.japonicum türleri de Rhizobium cinsinden çıkarılarak, Phytomyxa adı verilen yeni bir cins altında toplanmıştır (85).

Noris, 1965 de yapmış olduğu bir çalışmada, Rhizobium bakterilerini iki esas grup altında toplamıştır. Birinci grupta, asit topraklara adapte olan ve alkali salgılayan bakteri suşları bulunmaktadır. Tropikal bitki türlerinin çoğunda nodozite yapabilen bu bakteriler R.japonicum'a takebl etmektedir. İkinci grupta, kalsiyumca zengin ılıman iklim bölgelerine adapte olan bakteri suşları bulunmaktadır. Asit salgılayan bu grup, diğer 5 türü kapsamaktadır. Noris'e göre, bakteri alkali topraklara adapte olduğu zaman, metabolizması asit salgılayacak şekilde değişmekte ve bunun sonucu olarak çabuk üreyen tipler meydana gelmektedir (86).

Çalışmamızda, suşların yonca bitkisi üzerinde nodozite yapabilme yeteneği göz önüne alınmış ve R.meliloti olarak isimlendirilmiştir.

Rhizobium meliloti suşlarının sabit ve değişken özelliklerini saptamak amacı ile incelenen 55 özelliğinden elde edilen veriler, % de olarak değerlendirilerek, Tablo: 11 düzenlenmiştir.

TABLO: 11 Rhizobium meliloti Suşlarının Çeşitli Özelliklerinin % de Değerleri

Morfolojik özellikleri	Koloni Özellikleri		NaCl tol.	pH toleransları	
	% +	% -		% +	% -
Gram <sup>-</sup>	100	0			100
Uzunluk(1-3M )	100	0			100
Genişlik(0,5-0,9M')	63	37			100
Bakteroid teş.	100	0			100
β-hyro.but.gra.	100	0			100
Hareket	100	0			100
Yuvarlak	100	0			100
Muntazam kenar	100	0			100
Kabarık	100	0			100
Büyükük 1 mm.	100	0			100
Beyaz	47	53			100
Krem	16	84			100
Renksiz	37	63			100
3 günde üreme	100	0			100
Poli.sak.mad.sal.	84	16			100
Kongo kır. absorb,	5	95			100
% 2	100	0			100
% 3	100	0			100
3.5	0	100			100
4.0	16	84			100
4.5	26	74			100
5.0	84	16			100
5.5	100	0			100
8.0	100	0			100
8.5	100	0			100
9.0	100	0			100
9.5	89	11			100
10	0	100			100

Isı toleransları	Biyokimyasal özellikleri		Karbon hid.kullanmaları	
	% +	% -	% +	% -
50°C de 10 dk.	100	0		
39°C de 1 haf.	100	0		
4°C de 1 haf.	0	100		
Litmus	53	47		
Asit reak.	53	47		
Serum zonu	89	11		
H <sub>2</sub> S	100	0		
Biz.sülfit	100	0		
3 şekerli demir	63	37		
Üreaz	100	0		
Katalaz	84	16		
Oksidaz	84	16		
Nitrat red.	100	0		
Nitrit red.	32	68		
Jelatini erit.	16	84		
Met.mavi.red.	95	5		
Gaz	0	100		
Sitrat	5	95		
İndol	0	100		
Metil kırmızısı	0	100		
Voges-Pros.	0	100		
Mannitol	79	21		
Glukoz	58	42		
Laktoz	68	32		
Galaktoz	89	11		
Rafinoz	89	11		
Maltoz	74	26		
Nişasta	42	58		
Yonca nod.teş.	100	0		



Tablonun tetkikinden görüleceği gibi, 29 özellik sabit, 26 özellik ise değişebilir karakterler göstermiştir. Elde etmiş olduğumuz bulgulara göre, suşların değişken özellikleri şunlardır: Bakteri genişlikleri, koloni renkleri, polisakkarit maddeler salgılanması, kongo kırmızısı absorpsiyonu, üreme pH ları, litmuslu sütte asit reaksiyunu, litmuslu sütte serum zonu teşekkülü, 3 şekerli demir besiyerinde  $H_2S$  teşekkülü, katalaz aktivitesi, oksidaz aktivitesi, nitrit redüksiyonu, jelatini eritme, metilen mavisi redüksiyonu, sitratın kullanılması, mannitol, glukoz, laktoz, galaktoz, rafinoz, maltoz ve nişastada üreme. Bu durum bize yonca üzerinde nodozite yapabilme yeteneğine sahip olan bakterilerin oldukça heterojen bir grup teşkil ettiklerini göstermektedir.

Suşlar arasında benzeyen özelliklerin sayıları tesbit edilerek Tablo: 12 düzenlenmiştir. Tablonun tetkikinden görüleceği gibi, suşlar arasında araştırdığımız 55 özelliğin en fazla 52'si, en az ise 39'u benzemektedir. Graham (85), yapmış olduğu bir çalışmada, 11 R. meliloti suşunun 100 değişik özelliğini araştırmıştır. Bu çalışmada, suşlar arasındaki benzerliğin % 94-74 arasında değiştiği bildirilmektedir. Bizim elde ettiğimiz verilere göre ise, suşlar arasındaki benzerlik % 94-71 arasında değişmektedir. Bu sonucun Graham'ın bulgularına çok yakın bir değer olması dikkati çekmektedir.

Genellikle, çapraz aşılara gruplarına ait bakterilerin, diğer bir grup üzerinde etkisiz nodoziteler meydana getirdiği kabul edilmiştir(14,30). Etkisiz olarak nitelendirdiğimiz suşların başka gruplara ait olup olmadıkları sorusu akla gelebilir. Ancak, Tablo: 12, incelendiği zaman etkili ve etkisiz suşlar arasındaki benzerliğin oldukça yakın olduğu görülmektedir. Meselâ, 1 ve 7 nolu. etkili suşlar ile, 5 ve 14 nolu. etkisiz suşlar arasında, 55 özelliğin 52 si benzemektedir. Diğer taraftan, etkenlik dereceleri yüksek olan suşlar arasında da çok yakın bir benzerlik mevcut değildir. Çok etkili ve etkili olarak nitelendirdiğimiz



zonu yalnız *R.lupini* ve *R.japonicum* türlerinde teşekkül etmez. Oysa bu çalışmada suşların % 47'sinde asit reaksiyon, % 11'inde de serum zonu teşekkülü görülmedi. (Tablo: 11). Bu suşların yonca üzerinde nodozite yapabilme yeteneğinde oldukları gözönüne alınırsa, litmuslu süt reaksiyonlarının her zaman kesin bir ayırım yapma imkanını vermediği düşünülür. Nitekim, yapılan bazı çalışmalarda da litmuslu süt reaksiyonlarının türlere özgül olmadığı bildirilmektedir (73,87,88).

Graham ve Parker (73), *Rhizobium* türleri arasında bazı özelliklerin farklı olduğunu tesbit etmişlerdir. Araştırmacılar, tür ayırımında bazı testlerden faydalanmanın mümkün olduğunu belirtmektedirler. Bu çalışmaya göre, *R.meliloti* suşları başlıca şu özelliklerle diğer türlerden ayrılmaktadır: pH 4,5 da üremenin olmaması, 39°C de üreme, % 2 NaCl ye tolerans, nitrat redüksiyonu, rafinozu kullanma ve koloni büyüklüğünün 1 mm den büyük olması.

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da bizmut sülfitte  $H_2S$ , 39°C de üreme, % 2 NaCl ye tolerans ve nitrat redüksiyonu testleri suşların hepsinde pozitif olarak bulundu. Bir haftalık (YMA) plâklarında 1,8 - 4 mm çapında koloniler teşekkül etti. Suşların pH 9,5 da % 89'u üreyebildiği halde, pH 4,5 da ancak % 26'sı üredi. Rafinozu ise suşların % 89'u kullandı. (Tablo: 11).

Her iki çalışmadan elde edilen bulguların birbirine uygun olması, *R.meliloti* suşlarının yukarıda saydığımız özellikler yönünden oldukça sabit karakterler taşıdıklarını göstermektedir. Bu durum Graham ve Parker'in (38) tür ayırımında bazı testlerden faydalanılması için ileri sürdükleri fikri desteklemektedir.

*Rhizobium* bakterilerinin havadaki serbest azotu tesbit edebilme yeteneği  $E_{ff}^+$  veya  $E_{ff}^-$  genleri tarafından belirtilen genetik bir özelliktir (25). Bu özelliğin bitki gelişmesini önemli derecede etkilediği yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Scherrer ve Danarie'nin (89) yaptıkları bir çalışmada, çeşitli

suşlarla aşılanan yoncaların kuru madde ağırlıkları 45 mg. ile 4,6 mg. arasında değişmiştir. Lowe ve Holding'in (90) çalışmalarında da aşılanan üçgül bitkilerinin yaş ağırlıklarının 661 mg. ile 79 mg. arasında değiştiği bildirilmektedir. Suşların etkili veya etkisiz oluşu alınan bitki ağırlıklarını ortalama olarak birinci çalışmada 10 misli, ikinci çalışmada ise 8 misli etkilemiştir. Bell ve Nutman'ın (91) yapmış oldukları tarla denemeleri de, suşların alınan mahsul miktarını önemli derecede etkilediğini göstermektedir. Bu çalışmada etkili suşla aşılanan parselden hektara 5,30 ton yonca elde edildiği halde, etkisiz suşla aşılanan parselden ancak 1,03 ton yonca elde edilmiştir.

Bizim yapmış olduğumuz sera çalışmalarında da suşlar kuru madde ağırlıklarını önemli derecede etkilemişlerdir. Aşılı kavanozlardan alınan yoncaların ortalama kuru madde ağırlıkları 401 mg. ile 45 mg. arasında değişmektedir. Etkili ve etkisiz suşlardan alınan kuru madde ağırlıklarının, ortalama olarak 9 misli farklı olduğu görülmektedir. (Tablo: 10).

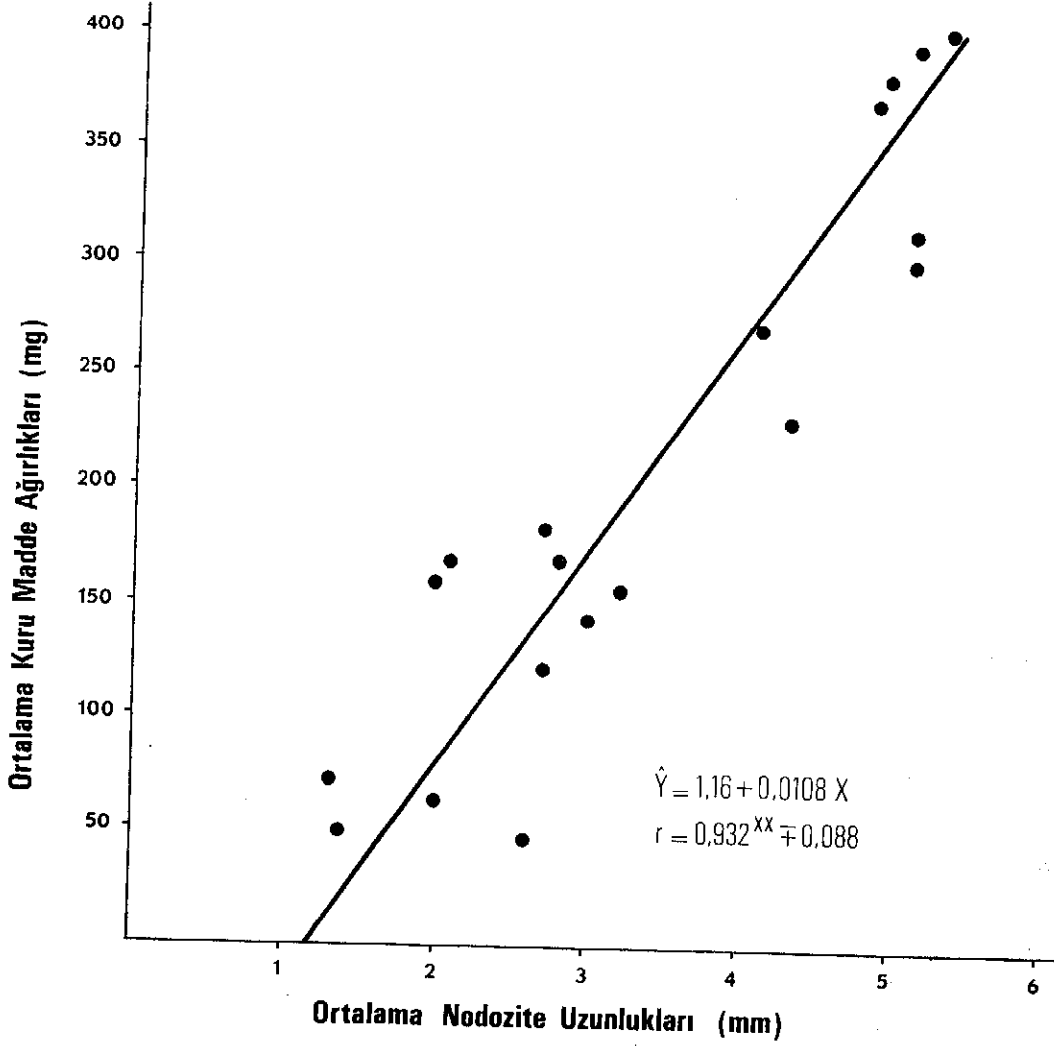
Etkili ve etkisiz suşların teşekkül ettirdikleri nodozitelerin renk, sayı, büyüklük ve kök sistemi üzerindeki dağılımlarının farklı olduğu yapılan çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Etkili suşların ana kök üzerinde pembe renkli iri nodoziteler, etkisiz suşların ise kök sistemi üzerine dağılmış ufak ve beyaz renkli nodoziteler verdiği bildirilmektedir (30,77,91). Nodozite renginin hemoglobin maddesiyle ilgili olduğu Schiffmann ve Löbel'in (43) çalışmalarıyla açıkça gösterilmiştir. Bu çalışmada, yer fıstığı kuru madde ağırlıkları ile nodozitelerdeki hemoglobin maddesi arasında % 1 seviyesinde önemlilik gösteren yüksek bir korelasyon tesbit edilmiştir. Mytton ve Jones'in (92) üçgül ile yapmış oldukları bir çalışmada, kuru madde ağırlıkları ile nodozite uzunlukları arasındaki korelasyonun % 5 seviyesinde önemli olduğu bildirilmektedir. Diğer taraftan, Nichols'un (5) bezelye ile yapmış olduğu bir çalışmada, kuru madde ağırlıkları ile nodozite uzunlukları

arasındaki korelasyon önemsiz olarak bulunmuştur. Bu çalışmada nodozite sayıları ile kuru madde ağırlıkları arasında % 1 seviyesinde önemli olan bir korelasyonun mevcut olduğu bildirilmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada etkenlik derecelerini çok etkili ve etkili olarak saptadığımız 6 suşun nodozite özelliklerinin diğer suşlardan farklı olduğu görülmüştür. Bu suşlar ana kök üzerinde pembe renkli ve eldiven şeklinde nodoziteler teşekkül ettirmişlerdir. Etkenlik derecelerini, orta, etkisiz ve çok etkisiz olarak saptadığımız diğer 13 suş ise, kök sistemi üzerinde dağılmış açık pembe, beyaz ve sarı renklerde, uzun veya yuvarlak nodoziteler vermişlerdir. (Tablo: 9). Kuru madde ağırlıkları ile nodozite sayıları arasındaki korelasyon önemsiz olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, kuru madde ağırlıkları ile nodozite uzunlukları arasında % 1 seviyesinde önemli olan yüksek bir korelasyon tesbit edilmiştir. (Tablo: 13, Şekil: 4).

TABLO: 13 Ortalama Kuru Madde Ağırlıkları ile Ortalama Nodozite Uzunlukları ve Sayıları Arasındaki İlişkilere Ait Regrasyon Denklemleri ve Korelasyon Katsayıları

Konular	Regrasyon denklemleri	Korelasyon katsayıları
Ort.kuru mad.ağırlıkları ile ort.nodozite uzunlukları arasındaki ilişki	$Y=1,1624 + 0,0108 X$	$r=0,932^{xx}$
Ort.kuru mad.ağırlıkları ile ort.nodozite sayıları arasındaki ilişki	$Y=19,4180 + 0,0154 X$	$r=0,205^{n.s}$



Şekil: 4 Ortalama kuru madde ağırlıkları ile ortalama nodozite uzunlukları arasındaki ilişki

Elde etmiş olduğumuz bulgular, suşların etkinlik derecelerinin nodozite rengi, şekli, büyüklüğü ve dağılımı ile ilgili olduğunu göstermektedir.

Baklagil ekilen ve tabii olarak Rhizobium popülasyonuna sahip olan alanlarda, etkili suşların oldukça az bulunuşu dikkati çekmektedir. Erdman'ın (1) Kansas'da yapmış olduğu bir çalışmada, yonca üzerinde nodozite yapabilen suşların % 25'inin etkili, % 50'sinin orta derecede etkili, % 25'in de etkisiz olduğu bildirilmektedir. Weber'in (93) Washington civarında yapmış olduğu bir çalış-

mada ise, R.meliloti suşlarının % 16'sının etkili, % 53'ünün de etkisiz olduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada izole ettiğimiz R.meliloti suşları, etkenlik derecelerine göre ayrılarak % de bulunma oranları tesbit edilmiştir. Ancak 145, 161 nolu. etkili ve 148 nolu. orta derecede etkili suşların Hollanda'dan temin edildikleri düşünülerek değerlendirilmeye alınmamıştır. Tablo: 14 de görüldüğü gibi İç Anadolu bölgesinden izole edilen suşların % 25'i etkili, % 6'sı orta derecede etkili, % 69'u ise etkisizdir. Etkili suşların bulunuş oranı Erdman'ın (1) bulgularıyla paralellik göstermektedir. Etkisiz suşların bulunuş oranı ise Weber'in (93) çalışmalarındaki bulgulara yakındır. Ancak orta derecede etkili suşların bulunuş oranı her iki çalışmadan elde edilen sonuçlardan çok daha düşük bir değerdir.

TABLO:14 İç Anadolu Bölgesinden İzole Edilen Suşların  
Etkenlik Derecelerine Göre Bulunma Oranları (%)

Derece	Çok etkili	Etkili	Orta derecede etkili	Etkisiz	Çok etkisiz
Toplam	2	2	1	7	4
%	12,5	12,5	6	44	25

Elde etmiş olduğumuz verilerin ışığı altında, yoncalıklarımızda tabii olarak bulunan Rhizobium populasyonunun büyük bir kısmının etkisiz olduğunu söyleyebiliriz. Kanımıza göre, bu sebeple yoncalıklarımızda düşük seviyelerde azot tesbit edilmede veya bu yoldan bir azot kazancı olmamaktadır. Elde etmiş olduğumuz sonuçlar, İç Anadolu bölgesindeki yoncalıkların % 75'inin etkili suşlarla aşılması gerektiğini göstermektedir.

Memleketimizde bu gün 100.000 hektar civarında yoncalık bulunmaktadır. Şahinkaya'nın (94) gözlemlerine göre, yoncalıklarımızın % 25'inde nodozite mevcut dağılıdır. Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular ise nodozite teşekkülü görülen yoncalıklarımızın % 75'inde etkili suşların bulunmadığını göstermektedir. Bu verilere göre, ortalama olarak 80.000 hektar yoncalığın etkili suşlarla aşılması gerekmektedir.

Yonca ile tesbit edilen azot miktarı çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalarda hektara tesbit edilen azot miktarının 820 kg. ile 300 kg. arasında değiştiği bildirilmektedir(5,63,91). Memleketimiz şartlarında yılda hektara 300 kg. azot tesbit edilebileceği düşünülürse, 80.000 hektarda 24.000 ton azot kazancının mümkün olabileceği hesaplanır. Bu miktardaki azot 120.000 ton amonyum sulfat gübresine eşdeğer olup, değeri 72 milyon TL.sını bulmaktadır. Bu rakam, aşılama işlemlerinin yurt ekonomisinde büyük bir kazanç sağlayacağını ifade etmektedir.

Kültüre alınan toprakların azotça fakirleşmesi, bütün dünya memleketleri için ortak bir problem yaratmaktadır. Azotlu kimyasal gübrelerin temininin sınırlı olması, araştırmacıları biyolojik azot tesbitinin artırılması için gerekli tedbirleri almaya zorlamaktadır. Bizim kanımıza göre, yoncalıklarımızı etkili suşlarla aşılama, tesbit edilen azot miktarını artırmak yönünden büyük faydalar sağlayacaktır.



### ÖZET

Rhizobium meliloti suşlarının çeşitli özelliklerini ve etkenlik derecelerini saptamak amacı ile İç Anadolu bölgesinden 16 R.meliloti suşu izole edilmiş, ayrıca Hollanda'dan temin edilen 3 suş da araştırmaya alınmıştır.

Suşların morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özelliklerini kapsayan 55 özellik araştırılmış ve 29 özelliğin sabit, 26 özelliğin ise değişebilir karakterler gösterdiği saptanmıştır. Suşların çeşitli özellikleri ile ilgili testlerden elde edilen sonuçlar Tablo: 11 de özetlenmiştir.

Suşların etkenlik dereceleri yonca kuru madde ağırlıkları ile saptanmış ve aşağıda görüldüğü gibi 5 grup altında toplanmıştır.

- 1- Çok etkili
- 2- Etkili
- 3- Orta derecede etkili
- 4- Etkisiz
- 5- Çok etkisiz

Suşların etkenlik derecelerine göre girmiş oldukları gruplara ait sonuçlar Tablo: 10 da verilmiştir.

Suşlar arasında benzer özellik sayılarının % 94-74 arasında değiştiği tesbit edilmiştir. Elde etmiş olduğumuz bulgulara göre, etkenlik dereceleri ile benzer özellik sayıları arasında bir ilgilinin mevcut olduğu kanısı uyanmaktadır.

Etkili ve etkisiz suşların teşekkül ettirmiş oldukları nodozitelerin renk, şekil, büyüklük ve dağılımlarının farklı olduğu tesbit edilmiştir. Kuru madde ağırlıkları ile nodozite uzunlukları arasında % 1 seviyesinde önemli olan bir korelasyon tesbit edilmiştir. Diğer taraftan kuru madde ağırlıkları ile nodozite sayıları arasındaki korelasyonun önemsiz olduğu saptanmıştır.

İç Anadolu bölgesinden izole edilen suşların % 25'inin etkili, % 6'sının orta derecede etkili ve % 69'unun da etkisiz olduğu saptanmıştır. Elde etmiş olduğumuz bulgular, İç Anadolu bölgesindeki yoncaların % 75'inin etkili suşlarla aşılmasının gerektiğini ortaya koymaktadır.

Tartışma bölümünde irdelenen bulgular diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmış ve yoncalıklarımızın aşılmasının yurt ekonomisi açısından önemi belirtilmiştir. Kanımıza göre, İç Anadolu bölgesine ait yoncalıkların etkili suşlarla aşılması, bitki-Rhizobium sistemi ile tesbit edilen azot miktarının artırılmasını geniş ölçüde etkileyecektir.

KAYNAKLAR

1. Erdman, L.W. : Legume inoculation. What it is, what it does. Farmer Bulletin no.2003 U.S.A. Dep.of Agriculture.1959.
2. Mulder, F.G. : Biology and Soil Fertility. Reviews of research unesco, Paris. 166-181, 1969.
3. Mishustin, F.N. ; The importance of non symbiotic nitrogen fixing micro-organisms in agriculture, Plant and Soil, 32: 545-554, 1970,
4. Gray, T.R.G., Williams, S.T. ; Soil Micro-organisms. Oliver and Boyd. Edinburg. 120-139, 1971.
5. Hanzell, F.F., Norris, D.O. : Processes by which nitrogen is added to the soil plant system. Review of Nitrogen in Tropics whit Particular Reference to Pastures. Commonwealth Agr.Bur.Bull. 46: 1-18, 1962.
6. Stewart, W.D.P. : Algal fixation of atmospheric nitrogen. Plant and Soil. 32: 555-588, 1970.
7. Bear, F.F. : Soil and Fertilizers. John Wiley and Sons. New York, London. 70-73, 1965.
8. Backing, J.H. : Plant endophyte simbiosis in non leguminous plants. Plant and Soil. 32: 611-654, 1970.
9. Allen, O.N., Baldwin, I.L. : Rhizobia-legume relationships. Soil Sci. 78; 415-425, 1954.
10. Clifton, C.F. : Introduction to the Bacteria. Mc Graw Hill Book Company. New York, Toronto,London. 342-348, 1958.
11. Rangaswami, G. : Agricultural Microbiylogy. Asia Publishing Hause, London. 212-216, 1966.
12. Bread, R.S., Murray, F.G.D., Smith, N.R. : Bergay's Manuel of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Company, Baltimor. 285-288, 1957.

13. Vilenskii, D.G. : Bacteria fixing atmospheric nitrogen. Soil Science Translated from Russian Jerusalem 64-66, 1963.
14. Gibbs, B.M., Shapton, D.A. : Identification Methods for Microbiologists. Academic Press. London, New York. 51-62, 1968.
15. Graham, P.H. : Extracellular polysaccharides of Rhizobium. Antonie v. Leeuwenhoek. 31: 349-354, 1965.
16. Pelczar, M.J., Reid, R.D. : Microbiology. Mc.Graw Hill Book Company, Inc. Toronto, London. 533-534, 1958.
17. Bartholomew, W.V., Clark, F.F. : Soil Nitrogen. Am. Soc. of Agr. Inc, Publisher. Madison, Wisconsin. U.S.A. 363-373, 1965.
18. Elkan, G.H., Gwati, I.K. : The energy, nitrogen and vitamin nutrition of thirty-six strains of Rhizobium japonicum. Bact. Proc. 4, 1967.
19. Ghaffar, A.S., Jensen, H.L. : Growth inhibition by nicotinic acid in certain root nodule bacteria (Rhizobium spp). IX. International Congress for Microbiology. Moscow U.S.S.R. 87-96, 1966.
20. Şahinkaya, H. : Azotobacter ve Rhizobium bakterileri üzerine metal iyonlarının etkileri. Toprak ve Gübre Arş. Ens. 1962-1963 yılları araştırma raporu. 440-449, 1967.
21. Wilson, D.O., Reisenaur, H.M. : Effect of some heavy metals on the cobalt nutrition of Rhizobium meliloti. Plant and Soil. 32: 81-89, 1970.
22. Noris, D.O. : The biology of nitrogen fixation. A Review of Nitrogen in the Tropics with Particular Reference to Pastures. Bulletin 46. Commonwealth Agricultural Bureaux. England. 113-127, 1962.
23. Waksman, S.A. : Soil Microbiology. John Wiley and Sons, Inc. New York, London. 208-229, 1965.

24. Date, R.A. : Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legume. *Plant and Soil*. 32: 703-725, 1970.
25. Dunican, L.K., Cannon, F.C. : The genetic control of symbiotic properties in *Rhizobium* evidence for plasmid control. *Plant and Soil*, Special Volume. 73-79, 1971.
26. Whyte, F.O., ve ark. : Legumes in Agriculture. *Agricultural studies* 21, R.A.O. Rome. 175-189, 1953.
27. Alexander, M. : Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, Inc. New York, London. 309-326, 1960.
28. Mulder, F.G. : Nitrogen Fixation and Nitrogen Fixers. Menorca, Madrid. 1-14, 1966.
29. Kroulik, T.G., Gainey, P.L. : Relative nodulation of varieties of *Medicago sativa* varying in susceptibility to alfalfa wilt. *Soil Sci*. 50: 135-140, 1940.
30. Bjalve, G. : The effectiveness of nodule bacteria. *Plant and Soil*. 18: 70-76, 1963.
31. Kleczkowska, J. : Genetical changes in *Rhizobium* bacteria and in their bacteriophages during coexistence. *Plant and Soil*, Special Volume. 47-56, 1971.
32. Dareny, J.T., Alexander, M. : Physiological differences between effective and ineffective strains of *Rhizobium*. *Soil Sci*. 108: 209-216, 1969.
33. Kowalska, I.Z. : Correlation between streptomycin resistance and ineffectiveness in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, Special Volume. 67-71, 1971.
34. Fahraeus, G., Ljunggren, H. : Pre infection phases of legume symbiosis. *The Ecology of Soil Bacteria*. An international symposium. Liverpool University. 396-421, 1968.

35. Brown, M.F., Jackson, R.M., Burlingham, S.K. ; Growth and effects of bacteria introduced into soil. The Ecology of Soil Bacteria. An international symposium. Liverpool University. 531-551, 1968.
36. Peters, R.J., Alexander, M. ; Effect of legume exudates on the root nodule bacteria. Soil Sci. 102: 380-387, 1966.
37. Stewart, W.D.P. : Nitrogen Fixation in Plants. University of London. The Athone Press. 1965.
38. Salman, K., Fahraeus, G. : An electron microscope study of root hair infection by Rhizobium. J. Gen. Microbiol. 33: 425-427, 1963.
39. Stewart, F.C. : Plant Physiology. Academic Press. New York, London. 539-645, 1963.
40. Jordan, D.C. : The bacteroids of the genus Rhizobium. Bact. Reviews. 26: 119-141, 1962.
41. Jordan, D.C., Coulter, W.H. : On the cytology and synthetic capacities of natural and artificially produced bacteroids of Rhizobium leguminosarum. Can. J. Microbiol. 11: 709-720, 1965.
42. Burris, R.H. : Biological nitrogen fixation. Annual Review of Plant Physiology. 17: 155-185, 1966.
43. Schiffmann, J., Löbel, R. : Haemoglobin determination and its value as an early indication of peanut Rhizobium efficiency. Plant and Soil. 33: 501-512, 1970.
44. Bergersen, F.J. : Nitrogen fixation in the legume root nodule. IX. International Congress for Microbiology. Moscow. U.S.S.R. 97-101, 1966.

45. Wieringa, K.T., Bakhuis, J.A. : Chromatography as a means of selecting effective strains of Rhizobia. *Plant and Soil*. 8: 254-262, 1957.
46. Mulder, F.G., Lie, T.A., Hauwers, A. : Effect of pH on symbiotic nitrogen fixation of some leguminous plants. XI. International Congress for Microbiology. Moscow. U.S.S.R. 133-151, 1966.
47. Dilz, K., Mulder, F.G. : The effect of soil pH, stable manure and fertilizers on the growth of clover and of red clover associations with perennial ryegrass. *Neth. J. Agric. Sci.* 10: 1-22, 1962.
48. Mulder, F.G. : Effect of pH and organic compounds on nitrogen fixation by red clover. *Plant and Soil*, 13:91-113, 1961.
49. Iswaran, V., Sen, A., Singh, N.P. : Influence of sucrose spraying on nodulation. *Plant and Soil*. 36: 717-718, 1972.
50. Hallsworth, F.G. : Nutrition of the Legumes. Butterworths Scientific Publications. London. 147-156, 1958.
51. Allons, H.F., Bartholomew, W.V. : Effect of available nitrogen on symbiotic fixation. *Soc. of Am. Proc.* 19:182-184, 1955.
52. Pate, S.S., Dart, P.S. : Nodulation studies in legumes. IV. The influence of inoculum strains and time of application of amonyum nitrate on symbiotic response. *Plant and Soil*. 15: 329-346, 1961.
53. Nichols, R. : Studies on the major element deficiencies on the pigeon pea (*Cajanus cajan*) in sand culture. *Plant and Soil*. 22: 112-126, 1965.
54. Munns, D.N. : Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I Asit sensitive step. *Plant and Soil*. 28: 129-146, 1968.

55. Norris, D. : Rhizobium needs magnesium, not calcium. Soils and Fertilizers. 21: (2225), 1958.
56. Greenwood, F.A.N., Hallsworth, F.G. : Some interactions of calcium, phosphorus, copper and molybdenum on the growth and chemical composition of *Trifolium subterraneum* L. Plant and Soil. 12: 97-127, 1960.
57. Andrew, C.S. : Influence of nutrition on nitrogen fixation and growth of legumes. A Review of Nitrogen in the Tropics with Partucular Rafference to Pastures. Bulletin 46. Commonwealth Agricultural Bureaux, England. 130-146, 1962.
58. Mulder, F.G. : Importance of molybdenum in the nitrogen metabolism of micro-organisms and higher plants. Plant and Soil. 1: 94-119, 1948.
59. Mulder, F.G., ve ark.: Molybdenum in symbiotic nitrogen fixation and nitrate assimilation. Soils and Fertilizers. 22:(1721), 1959.
60. Lowe, R.H., Evans, H.J. : Cobalt requirement for the growth of rhizobia. Soils and Fertilizers. 25:(2180), 1962.
61. Ahmed, S., Evans, H.S. : Cobalt a micronutrient element for the growth of soybean plants under symbiotic conditions. Soil Sci. 90: 205-215, 1960.
62. Delwiche, C.C. : The nitrogen cycle. Scientific Am. 233: 136-145, 1970.
63. Meyer, B.S., Anderson, D.B. : Plant Physiology. D.Van Nostrand Company Inc. New Jersey. 517-520, 1953.
64. Buckmann, H.O., Brady, N.C. : The Nature and Properties of Soils. The Mac Millan Company. New York. 420-426, 1960.
65. Thompson, L.M. : Soil and Soil Fertility. Mc Graw Hill Book Company, Inc. New York, Toronto, London. 233-239, 1957.
66. Dawson, R.C. Potential for increasing protein production by legume inoculation. Plant and Soil. 32: 655-673, 1970.



67. Dilz, K., Mulder, E.G. : Effect of associated growth on yield and nitrogen content of legume and grass plants. Plant and Soil. 16: 229-237, 1962.
68. Allen, O.N. : Experiments in soil bacteriology. Burgess Publishing Co. Minneapolis 15. Minnesota. 69-77, 1951.
69. Vincent, J.M. : A. manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Burgess and Son. Abigton. 17-20, 1970.
70. Salle, A.J. : Fundamental Principle of Bacteriology. Mc Graw-Hill-Book Com. Inc. New York, Toronto, London. 75-76, 1961.
71. Pramer, D., Schmidt, F.L. : Experimental Soil Microbiology. Burgess publishing Co. Minneapolis 15. Minnesota. 63-65, 1965.
72. Darby, K.G., Çatinkaya, Ş. : Pratik Mikrobiyoloji el Kitabı, Hacettepe Üniversitesi. Ankara. 91-101, 1968.
73. Graham, P.H., Parker, C.A. ; Diagnostic features in the characterisation of the root nodule bacteria of legumes. Plant and Soil. 20: 383-396, 1964.
74. Society of American Bacteriologists. Manual of Microbiological Methods. Mac. Graw-Hill-Book Com. New York, Toronto, London. 153-154, 1957.
75. Pelczar, M.J., Reid, R.D. : Laboratory Exercises in Microbiology. Mc Graw-Hill-Book Com. New York, Toronto, London. 77-78, 1958.
76. APHA, AWWA, WPCF. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association Inc. Brodway, New York, 622-625, 1969.
77. Holland, A.A. : Comptition between soil and seed borne Rhizobium trifolii in nodulation of introduced Trifolium subterraneum. Plant and Soil. 32: 293-302, 1970.

78. Lange, T.R., Parker, C.A. : Effective nodulation of *Lupinus digitatus* by native *Rhizobia* in South-Western Australia, *Plant and Soil*. 15: 193-198, 1961.
79. Bergersen, F.J., ve ark. : Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. *Plant and Soil*. Special Volume. 3-16, 1960.
80. Holding, A.J., Kong, J. : The effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium trifolii* in relation to soil factors. *Plant and Soil*. 18: 191-198, 1963.
81. Wilson, J.K. : Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of the legumes. *Soil Sci*. 58: 61-69, 1958.
82. Doku, F.V. : Host specificity among five species in the cowpea cross inoculation group. *Plant and Soil*. 30: 126-128, 1969.
83. Koontz, F.P., Gaber, J.D. : Somatic antigens of *Rhizobium japonicum*. *Soil Sci*. 91: 228-232, 1961.
84. Purchase, H.F., Vincent, J.M. : A detailed study of the field distribution of strains of clover nodule bacteria. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 74: 227-236, 1949.
85. Graham, P.H. : The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* 35: 511-517, 1964.
86. Norris, D.O. : Acid production by *Rhizobium*-A unifying concept. *Plant and Soil*. 22: 143-166, 1965.
87. Elkan, G.H. : Biochemical and genetical aspects of the taxonomy of *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, Special Volume. 85-104, 1971.
88. Ishizawa, S. : Studies on root nodule bacteria of leguminous plants. Changes in litmus milk, nitrate reduction and gelatine liquefaction. *Soils and Fertilizers*. 17: (1500), 1954.

89. Scherrer, A., Denarie, J. : Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* and their prototrophic revertants. *Plant and Soil*, Special Volume. 39-45, 1971.
90. Holding, A.J., Lowe, F.J. : Some effects of acidity and heavy metals on the *Rhizobium*-leguminos plant association. *Plant and Soil*, Special Volume. 153-166, 1971.
91. Bell, F., Nutman, P.S. ; Experiments on nitrogen fixation by nodulated lucerne. *Plant and Soil*, Special Volume. 231-264, 1971.
92. Mytton, R.L., Jones, D.G. ; The response to selection for increased nodule tissue in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant and Soil*, Special Volume. 17-25, 1971.
93. Weber, D.F., Caldwell, B.F., Sloger, C., Vest, H.G. : Some USDA studies on the soybean *Rhizobium* symbiosis. *Plant and Soil*, Special Volume. 293-304, 1971.
94. Şahinkaya, H. ve ark. : Orta Anadolu bölgesinden yonca nodulite bakterisi (*Rhizobium meliloti*) izolasyonu. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü 1962-1963 yılları araştırma raporu. 450-458, 1967.