

**TC  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BAZI ORKİDELERİN RİZOSFERİNDEN BİTKİ GELİŞİMİNİ ARTTIRICI  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

**HİLAL ALTINKAYNAK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SAMSUN  
2016**

**Her hakkı saklıdır.**

## TEZ ONAYI

Hilal Altınkaynak tarafından hazırlanan “Bazı Orkidelerin Rizosferinden Bitki Gelişimini Arttırıcı Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması 02/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** Prof. Dr. İbrahim Özkoç  
Biyoloji Anabilim Dalı

### Jüri Üyeleri

**Başkan** Prof. Dr. Fazıl Özen  
Kocaeli Üniversitesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** Doç. Dr. Yasemin Özdener Kömpe  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** Doç. Dr. Zeynep Kolören  
Ordu Üniversitesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** Yrd. Doç. Dr. Cem Tolga Gürkanlı  
Ordu Üniversitesi  
Deniz Ekolojisi Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım. .../.../20..**

**Prof. Dr.**  
**Enstitü Müdürü**

## ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

02.12.2016

Hilal Altınkaynak

## ÖZET

Doktora Tezi

### BAZI ORKİDELERİN RİZOSFERİNDEN BİTKİ GELİŞİMİNİ ARTTIRICI BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Hilal Altınkaynak

Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim Özkoç

Samsun ve civarından *Anacamptis pyramidalis*, *Himantoglossum caprinum*, *Limodorum abortivum*, *Platanthera bifolia*, *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora*, *Spiranthes spiralis*, *Ophrys apifera*, *Ophrys sphegodes*, *Orchis coriophora*, *Orchis laxiflora*, *Orchis provincialis*, *Orchis tridentata* türlerine ait örnekler toplanmıştır.

Orkidelerin rizosferinden izole edilen bakteriler ACC deaminaz aktivitesi, indol-3-asetik asit üretme, fosfatı çözünebilir hale getirme ve siderofor oluşumu özelliklerine göre değerlendirilmiştir.

Yapılan testler sonucunda 111 bakteri izolatından 65'inin fosfatı çözdüğü, 32'sinin ACC deaminaz aktivitesi gösterdiği, 83'ünün indol asetik asit ürettiği, 17 izolattan 10'unun siderofor oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu özellikleri gösteren 17 bakteri izolatı PGPR (Bitki Gelişimini Arttırıcı Rizobakteri) adayı olarak kabul edilmiştir. 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre bu 17 bakterinin *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* (*Rhizobium*) ve *Stenotrophomonas* cinslerine ait olabileceği belirlenmiştir.

Orkidelerden izole edilen bakterilerin PGPR özelliklerinin belirlendiği ve karakterizasyonlarının moleküler yöntemlerle yapıldığı bu çalışma hem ülkemiz hem de dünya için ilk olma özelliği taşımaktadır.

Aralık 2016, 113 sayfa

Anahtar Kelimeler: Orkide, Rizosfer, PGPR, ACC-deaminaz, IAA, Siderofor, Fosfat çözünebilirliği

## ABSTRACT

Doctoral Dissertation

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA FROM THE RHIZOSPHERE OF SOME ORCHIDS

Hilal Altinkaynak

Ondokuz Mayıs University  
Graduate School of Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim Özkoç

Orchid plants belonging to the species of *Anacamptis pyramidalis*, *Himantoglossum caprinum*, *Limodorum abortivum*, *Platanthera bifolia*, *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora*, *Spiranthes spiralis*, *Ophrys apifera*, *Ophrys sphegodes*, *Orchis coriophora*, *Orchis laxiflora*, *Orchis provincialis*, *Orchis tridentata* species were collected from the Samsun regions. Bacteria isolated from the rhizosphere of orchids were tested for phosphate solubilisation efficiency, indole-3-acetic acid production, ACC deaminase activity and siderophore production traits.

As a result of the tests, 65 of 111 bacterial isolates were able to solubilize phosphate, 32 isolates having ACC deaminase activity, 83 isolates producing indole acetic acid and 10 isolates produced siderophores. 17 bacterial isolates indicating these properties was accepted as candidate for PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). According to 16S rDNA sequencing analysis, 17 isolates were identified as belonging to the genera *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* (*Rhizobium*) and *Stenotrophomonas*.

This study in which PGPR properties of bacteria isolated from orchids are determined and their characterization is done by molecular methods, is the first for both Turkey and the world.

December 2016, 113 pages

Key Words: Orchid, Rhizosphere, PGPR, ACC-deaminase, IAA, Siderophore, Phosphate solubilization

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi birikimiyle yol gösteren, hem bilimsel anlamda hem de hayata dair paylaşımları ile farklı bakış açıları sunan danışman hocam Prof. Dr. İbrahim Özkoç'a,

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Doç. Dr. Yasemin Özdener Kömpe ve Yrd. Doç. Dr. Cem Tolga Gürkanlı'ya,

Destekleri ve yardımları için Dr. Emine Banu Aydın, Araş. Gör. Dr. Özgür Baytut, Araş. Gör. Dr. Arzu Gürsoy, Sevin Şen Şekerli, Havva Kocakaya, Yasemin Ekinci, Okan Kadir Nohut, Gamze Özbeden, Dr. Duygu Dener, Araş. Gör. Dr. Sevcan Mercan, Serhat Bozkurt ve Beyza Bahadır'a,

Her zaman yanımda olan aileme,

Sonsuz teşekkürler...

Bu tez çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.FEN.1904.12.017 nolu proje ile desteklenmiştir.

Aralık 2016, Samsun

Hilal Altınkaynak

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Rizosfer.....	5
2.2. Rizosfer Organizmaları.....	6
2.3. Bitki Gelişimini Arttırıcı Rizobakteriler (PGPR).....	8
2.4. PGPR'lerin Bitki Gelişimindeki Direkt Etki Mekanizmaları.....	13
2.4.1. Fitohormonlar.....	13
2.4.2. Azot fiksasyonu.....	19
2.4.3. Fosfat çözünürlüğü.....	20
2.4.4. Siderofor üretimi.....	21
2.5. PGPR'lerin Bitki Gelişimindeki İndirekt Etki Mekanizmaları.....	23
2.5.1. Uyarılmış sistemik dayanıklılık.....	23
2.5.2. Antibiyoz.....	25
2.5.3. Parazitizm/Predasyon.....	26
2.5.4. Rekabet.....	27
2.6. Biyoremediasyonda PGPR'ler.....	28
2.7. Biyogübre Olarak PGPR'ler.....	28
2.8. Orkideler.....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Test bitkisinin seçimi ve alan çalışması.....	33
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Rizosfer toprağından (ektorizosfer) bakterilerin izolasyonu.....	34
3.2.2. Kökten (endorizosfer ve rhizoplaneden) bakterilerin izolasyonu.....	35
3.2.3. Fosfatı çözünür hale getirme.....	35
3.2.4. ACC deaminaz aktivitesi.....	35
3.2.5. IAA üretimi.....	36
3.2.6. Siderofor üretimi.....	36
3.2.7. Seçilen PGPR Adaylarından DNA İzolasyonu.....	37
3.2.8. PGPR Adaylarının Dizi Analizlerinin Yapılarak Tanımlanması.....	38
3.2.9. Filogenetik Analizlerin Yapılması.....	38
3.2.10. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler.....	41
4. BULGULAR.....	48
4.1. Orkide Örneklerinden Bakteri İzolasyonu.....	48
4.2. Aday PGPR İzolatlarının Seçimi.....	49
4.2.1. Fosfatı çözünür hale getirme.....	49
4.2.2. ACC deaminaz aktivitesi.....	52

4.2.3. İndol-3-Asetik Asit (IAA) üretimi .....	56
4.2.4. Siderofor üretimi .....	59
4.3. Seçilen PGPR Adayı Bakterilerin Dizi Analizi Sonuçları .....	60
4.4. Filogenetik Analizler .....	61
4.4.1. <i>Agrobacterium (Rhizobium)</i> izolatının filogenetik analizi .....	62
4.4.2. <i>Acinetobacter</i> izolatının filogenetik analizi .....	63
4.4.3. <i>Paenibacillus</i> izolatının filogenetik analizi.....	64
4.4.4. <i>Lysinibacillus</i> izolatının filogenetik analizi .....	65
4.4.5. <i>Pseudomonas</i> izolatlarının filogenetik analizi.....	66
4.4.6. <i>Bacillus</i> izolatlarının filogenetik analizi .....	67
4.4.7. <i>Stenotrophomonas</i> izolatının filogenetik analizi.....	68
5. TARTIŞMA .....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	78
KAYNAKLAR .....	80





## SİMGELER VE KISALTMALAR

### SİMGELER

°C	Santigrat
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Kalsiyum fosfat
H <sub>2</sub> O	Hidrojen dioksit
HCl	Hidrojen klorür
HClO <sub>4</sub>	Perklorik asit
FeCl <sub>3</sub>	Demir 3 klorür
FeSO <sub>4</sub>	Demir sülfat
KCl	Potasyum klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyum hidrojen fosfat
KNO <sub>3</sub>	Potasyum nitrat
l	Litre
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
MnSO <sub>4</sub>	Mangan sülfat
NaCl	Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyumfosfat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum sülfat
NH <sub>4</sub> Cl	Amonyum klorür
rpm	Dakikada devir

### KISALTMALAR

ACC	1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit
AHL	N-açıl homoserin lakton
AMF	Arbuskular mikorizal fungus
BD	Brown & Dilworth Minimal Besiyeri
CAS	Chrome azurol S
DAPG	2,4-diasetilfloroglusinol
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ePGPR	Ekstrasellüler bitki gelişimini arttırıcı rizobakteri
FAME	Yağ asidi metil esterleri
HDTMA	Hekzadesiltrimetil amonyum bromür
IAA	İndol-3-asetik asit
ISR	Uyarılmış sistemik dayanıklılık (Induced Systemic Resistance)
iPGPR	İntrasellüler bitki gelişimini arttırıcı rizobakteri
KB	King B Besiyeri
LB	Luria Bertani Besiyeri
MM9	Minimal Media 9 Besiyeri

NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Fosfat tamponlu salin (Phosphate-Buffered Saline)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PGPR	Bitki Gelişimini Arttırıcı Rizobakteri (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)
PIPES	Piperazin-N, N'-bis 2-etansülfonik asit
QS	Quorum sensing
rDNA	Ribozomal deoksiribonükleik asit
SAR	Kazanılmış sistemik dayanıklılık (Systemic Acquired Resistance)
TSA	Triptik soy agar
TBE	Tris Borat EDTA



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Rizosferin yapısı .....	5
Şekil 2.2. Rizosferde oluşan etkileşimler .....	6
Şekil 2.3. Rizosferdeki AMF .....	7
Şekil 2.4. Rizobakterilerin yan köklerin açığa çıktığı kısımlarda gelişimi .....	9
Şekil 2.5. PGPR besin alınımı ve kök fonksiyonunu uyarıcı etkisi .....	9
Şekil 2.6. Direkt ve indirekt PGPR mekanizmaları .....	13
Şekil 2.7. Bakteriyel IAA üretiminin patojenik ve yararlı mikroorganizma-bitki ilişkilerindeki rolü .....	15
Şekil 2.8. Bakteride IAA sentezinin biyosentetik yolları.....	16
Şekil 2.9. ACC deaminaz aktivitesi .....	17
Şekil 2.10. PGPR tarafından toprak fosforunun çözünmesi .....	20
Şekil 2.11. (A) Gram negatif ve (B) Gram pozitif bakteride siderofor aracılı demir alınımı.....	21
Şekil 2.12. ISR için sinyal yolları (Akhtar & Siddiqui, 2010).....	24
Şekil 2.13. <i>Bacillus pumilus</i> SE34'ün tütünde <i>Cucumber mosaic virus</i> 'e karşı ISR etkisi .....	24
Şekil 2.14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BHUPSB01'in <i>Fusarium oxysporum</i> 'a karşı antogonistik aktivitesi (solda), <i>Pseudomonas putida</i> BHUPSB04'ün <i>Rhizoctonia solani</i> 'ye karşı antogonistik aktivitesi (sağda) .....	26
Şekil 2.15. <i>Sorghum</i> fidelerinde <i>Pythium ultimum</i> 'un baskılanması .....	27
Şekil 2.16. <i>Fusarium oxysporum</i> 'a karşı uygulanan <i>Bacillus</i> izolatları.....	27
Şekil 2.17. PGPR'lerin biyoremediyal mekanizmaları .....	28
Şekil 4.1. İzole edilen bakteriler .....	48
Şekil 4.2. Pikovskaya besiyerinde fosfat çözünürlüğü gösteren bakteriler.....	49
Şekil 4.3. BD besiyerinde ACC deaminaz aktivitesi .....	52
Şekil 4.4. LB sıvı besiyerinde üreyen bakteri örnekleri.....	56
Şekil 4.5. Siderofor üreten bakteri izolatları .....	59
Şekil 4.6. HA-59 izolatı ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	62
Şekil 4.7. HA-37 ve HA-38 izolatlarının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	63
Şekil 4.8. HA-86 izolatının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	64
Şekil 4.9. HA-121 izolatının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	65
Şekil 4.10. HA-25, HA-53, HA-55, HA-82 izolatlarının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	66
Şekil 4.11. HA-13, HA-17, HA-50, HA-62, HA-67, HA-104 ve HA-112 izolatlarının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı .....	67
Şekil 4.12. HA-64 izolatının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Rizobakterilerin bitki gelişimini arttırıcı etkileri .....	11
Çizelge 2.2. PGPR'lerin ürettiği fitohormonlar .....	14
Çizelge 2.3. ACC deaminaz aktivitesi gösteren PGPR'ler .....	18
Çizelge 2.4. Bazı bakteri ve fungusların ürettiği sideroforlar .....	22
Çizelge 2.5. Bitkide viral hastalıklar üzerinde PGPR'lerin etkileri .....	25
Çizelge 2.6. Farklı bitki türlerinde PGPR'lerin inokülant ya da bakteriyel kültür olarak kullanıldığı toprak deneylerine örnekler.....	29
Çizelge 3.1. Toplandığı yer ve tarihe göre orkideler .....	33
Çizelge 3.2. PCR karışımı bileşenleri .....	38
Çizelge 3.3. Veri setindeki kısmi 16S rDNA dizilerinin NCBI erişim numaraları....	39
Çizelge 4.1. Orkide türlerden elde edilen bakteriler .....	48
Çizelge 4.2. Fosfat çözünürlüğü sonuçları.....	49
Çizelge 4.3. ACC-deaminaz aktivitesi sonuçları .....	53
Çizelge 4.4. Ölçülen IAA değerleri .....	56
Çizelge 4.5. PGPR adayı bakterilerin siderofor üretimi .....	60
Çizelge 4.6. Dizi analizi sonuçları .....	60

## 1. GİRİŞ

Rizosfer, bitki, toprak ve mikrofauna arasında yoğun ilişkilerin meydana geldiği mikroorganizmalar için besince zengin bir habitatır. Bitki gelişiminde yararlı, zararlı ve nötr etkilere sahip bakteri, fungus, protozoa, alg gibi farklı tipte birçok mikroorganizma rizosferdeki komüniteyi oluşturur (Barriuso vd, 2008; Prathap & Kumari, 2015; Kaur vd, 2016).

Bakteriler rizosferde yer alan mikroorganizmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Tarkka vd, 2008). Çoğu bitkinin salgıladığı besin elemanı seviyesinin yüksek olması bakteriyel gelişimi ve metabolizmayı desteklediğinden, bu durum rizosferde köklerin etrafındaki bakteri konsantrasyonunun da yüksek olmasını sağlamaktadır (Han vd, 2005; Ramadan vd, 2016). Bitkiler köklerinden aminoasit, yağ asitleri, nükleotitler, organik asitler, fenolikler, bitki gelişim düzenleyicileri, putreskin, steroller, şekerler ve vitaminler gibi (rizodepozit) organik bileşikler salgılayarak kendileri için en fazla katkıda bulunan bakteriyi seçerler (Barriuso vd, 2008; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Kang vd, 2010; Kaur vd, 2016). Mikrobiyal gelişim en fazla kök salgıları ve diğer kök-türevli organik maddelerin yoğun olduğu alanlarda olmaktadır (Podile & Kishore, 2006).

Rizobakteri terimi kök çevresinde kolonize olabilen rizosfer bakterisini tanımlamak için kullanılmaktadır (Kloepper vd, 1991; Kloepper, 1994). Rizobakteriler rizosferde, kök yüzeyinde (rizoplane) ve kök içindeki (endorizal bakteri veya endofitler) bakterilerdir ve serbest yaşayan, parazitik ya da saprofitik olabilirler (Kaymak, 2010). Rizosferde bakteri gelişiminin artması toprak nemi, sıcaklık, substrat kullanılabilirliği gibi çevresel koşullardan etkilenir ve kök yüzeyinden 2 mm ya da daha yaygın olabilirler (Podile & Kishore, 2006). Antoun ve Prevost (2006) rizobakterileri yararlı, zararlı ve etkisiz (nötr) olarak sınıflandırmıştır. Etkisiz grubun varlığı bitkide önemsiz olabilir ancak zararlı rizobakterilerin ürettiği metabolitler bitki sağlığını olumsuz etkiler (Ramadan vd, 2016). Yararlı rizobakteriler serbest yaşar ya da konukçu bitkiyle simbiyotik etkileşim içinde olarak bitki büyümesini ve gelişimini arttırabilirler (Glick vd, 1999; Ramadan vd, 2016).

Bitki gelişimini arttıran rizobakteriler (PGPR) ilk olarak Kloepper ve Schroth (1978) tarafından, bitkilerin köklerinde kolonize olan, gelişimleri ve büyümelerine yardım eden bakteriler olarak tanımlanmıştır (Kloepper vd, 1980; Pandey vd, 2010).

PGPR çeşitliliği bitki tipi, toprak tipi ve mevcut besin durumuna göre büyük ölçüde değişir (Tilak vd, 2005; Podile & Kishore, 2006). Tanımlanan PGPR'ler arasında *Pseudomonas* ve *Bacillus* spp. en sık çalışılan rizobakterilerdir. *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Allorhizobium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* (*Agrobacterium*), *Rhodococcus*, *Serratia* ve *Stenotrophomonas* gibi cinslerin suşları PGPR olarak tanımlanmıştır (Podile & Kishore, 2006; Solano vd, 2008; Babalola, 2010; Saharan & Nehra, 2011; Bhattacharyya & Jha, 2012; Ahemad & Kibret, 2014; Yadav vd, 2015; Jha & Saraf, 2015; Shaikh vd, 2016).

PGPR toprak verimliliği, bitki gelişimini artırma ve fitopatogenlerin baskılanması ve çevre dostu sürdürülebilir tarımın geliştirilmesi için önemli rol oynamaktadır (Gupta vd, 2015). PGPR'lerin bitki gelişiminde biyolojik azot fiksasyonu, oksin, sitokin ve gibberellin gibi fitohormonların üretimi, fosfor ve demir gibi minerallerin çözünürlüğü, siderofor ve 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminaz gibi enzimlerin üretimi, uyarılmış sistemik dayanıklılık, antibiyotik üretimi, rizosferdeki mevcut demirin şelatlanması, fungal hücre duvarını hidrolize eden ekstrasellüler enzimlerin sentezini içeren biyokontrol mekanizmaları ve rizosfer içinde niş ve besin için rekabet, biyoremediasyon, kuraklık, tuzluluk ve ağır metallerin oluşturduğu stres koşullarında biyo-inokulant olarak kullanılması gibi direkt ve indirekt birçok etkisi vardır (Mayak vd, 2004; Zahir vd, 2004; Van Loon 2007; Wani & Khan, 2010; Ramadan vd, 2016).

PGPR'ler ile ilk çalışmalar 1950'lerde SSCB'de azot tespit eden bakteriler ile yapılmıştır. Çin'de, ABD ve Hindistan'da yapılan PGPR araştırmalarında farklı ürünlerde verim artışları elde edilmiştir (Chen vd, 1996; Kloepper vd, 1991; Reddy vd, 2003). Ülkemizdeki PGPR uygulamalarına arpa (Canpolat vd, 2006), nane (Kaymak vd, 2008), çilek (Esitken vd, 2010), kiraz (Karakurt vd, 2011), çay

(Çakmakçı vd, 2011) ve lahanada (Samancıoğlu vd, 2016) yapılan çalışmalar örnek verilebilir.

PGPR'lerin bitki gelişimini arttırmalarına yönelik ilk çalışma *Pseudomonas putida* GR-12-2'de yapılmıştır. Bakterinin gnotobiyotik koşullarda kolzayla inokülasyonu sonucu kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, fosfor alımını arttırdıklarını kaydetmişlerdir (Lifshitz vd, 1987). İlk ticari PGPR olan *Bacillus subtilis* A-13 Gustafson Firması tarafından 1985 yılında üretilmiştir. Bu ürünlerin tohuma uygulanan fungusitler ile birlikte kullanıldığında toprak patojenlerine karşı tohumları koruyabildiği rapor edilmiştir (Nakkeeran vd, 2005).

Orkidelerle ilgili araştırmalar 1971'de Almanya ve Hollanda'dan ülkemize gelen botanikçilerle başlamıştır. Ülkemizde bu konuda çalışmalar 1967'de Prof. Dr. Ekrem Sezik ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla (Özkoç & Dalcı, 1992; Özkoç, 1994; Özdenler & Özkoç, 1994) devam ettirilmiştir. Ülkemiz coğrafyasındaki yaygınlığı ve tür zenginliğine rağmen orkide türleri ile ilgili çalışmalar çok sayıda değildir. Yapılan çalışmalar genellikle bölgesel olan orkide türlerinin tanımlanması, salep yapımı ve doku kültürü ile çoğaltıma yöneliktir (Sandal & Söğüt, 2010). Orkidelerin mikorizal funguslarla ilişkilerinin tohum çimlenmesi için esasi olması uzun zamandır araştırılan bir konudur (Özkoç, 1994). Buna karşılık orkidelerle ilişkili bakterilerin kompozisyonu ve yapısal aktiviteleri hakkında bilinenler daha azdır (Tsavkelova vd, 2007a).

Şu an 7 milyarı bulan dünya nüfusunun gelecek 50 yılda 10 milyara ulaşması beklenmektedir. Nüfus artışıyla birlikte küresel yiyecek üretim talebinin de artması, bu nüfusun beslenmesinde geliştirilecek tarımsal stratejiler ve aynı zamanda çevresel zarar oluşturan tarımsal uygulamalar 21. yüzyılda çözülmesi gereken başlıca sorunlar haline gelmiştir. Bu küresel sorunla başetmek için tarımsal verimliliğin gelecek birkaç on yıl içinde önemli oranda artırılması ve çevreyle dost yeni uygulamalar sunulması kaçınılmazdır (Ladeiro, 2012; Glick, 2014; Goswami vd, 2016). PGPR'lerin kullanımı çevresel kirlenme yaratan kimyasal gübre kullanımını azaltacak cazip bir alternatiftir ve sürdürülebilir tarım uygulamalarında PGPR uygulamaları umut vaat eden bir potansiyel göstermektedir (Rawat & Mushtaq, 2015; Goswami vd, 2016).

Yapılan bu çalışmada doğal ortamda yetişen yabancı orkidelerin rizosferinde yer alan olası PGPR özelliği taşıyan bakterilerin tanımlanması, genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi ve hangi mekanizmalarla bitki gelişimini desteklediklerinin araştırılması amaçlanmıştır. PGPR araştırmalarında çoğunlukla ticari öneme sahip bitkiler seçilmektedir. Yabancı orkide rizosferinden bitki gelişimini arttırıcı rizobakterilerin belirlenmesine yönelik yapılan bu çalışma ile henüz belirlenmemiş orkide-rizobakteri ilişkileri ve özellikleri ortaya çıkarılmaktadır. Elde edilen veriler orkidelerin doğada ayakta kalma gücüne katkısı olan ve PGPR olma potansiyeli olan bakterilerin tarımsal öneme sahip bitkilerde ve kültür bitkilerinde inokülant olarak kullanılabilmesi yönündeki araştırmalar için önem taşımaktadır.

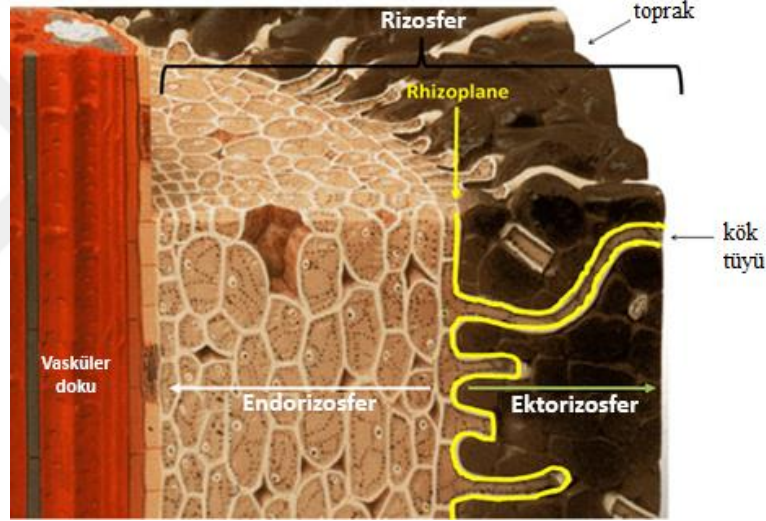




## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Rizosfer

Rizosfer terimi Yunancada kök anlamına gelen 'rhiza' kelimesinden gelir ve ilk kez Hiltner (1904) tarafından tanımlanmıştır (Parray vd, 2016; Kaur vd, 2016). Bitki köklerini çevreleyen ince toprak katmanı olan rizosfer, kök aktivitesi ve metabolizması için son derece önemlidir (Saharan & Nehra, 2011; Yadav vd, 2015) (Şekil 2.1). Bitki rizosferinde besinlerin birikimi toprak çevresindeki mikrobiyal gelişimin yüksek olmasını destekler, bu kavram 'rizosfer etkisi' olarak ifade edilir (Rovira, 1965; Dunfield & Germida, 2003; Mougel vd, 2006; Souza vd, 2015).



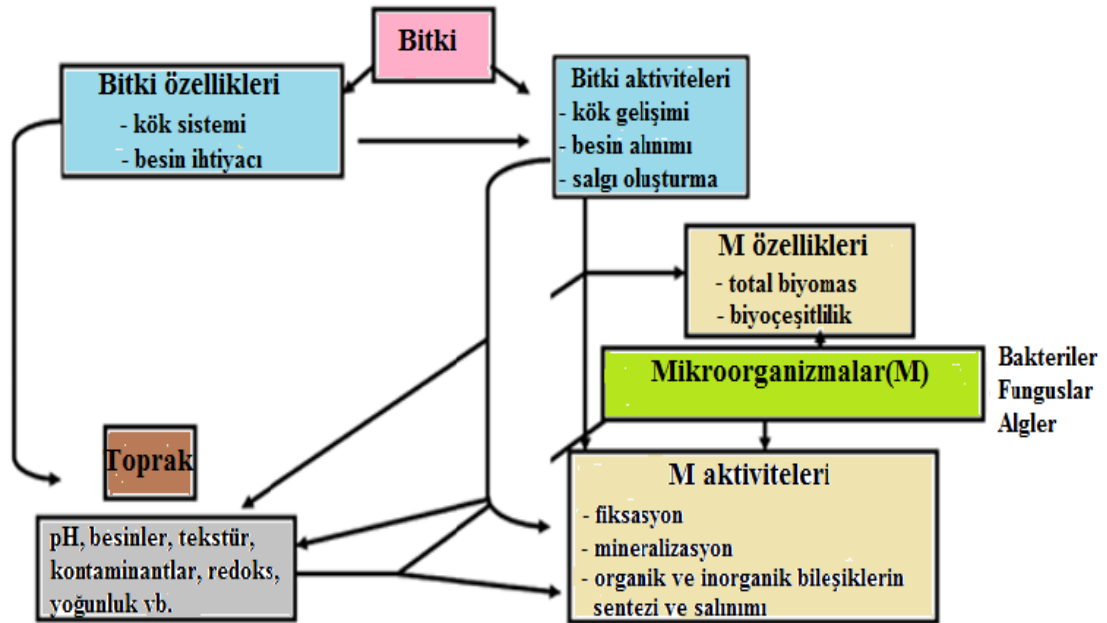
Şekil 2.1. Rizosferin yapısı (McNear Jr, 2013)

Bitki kökleri ile ilişkili mikroorganizma çeşitliliği muazzam olup onbinlerce türle uyumluluk gösterir (Berendsen vd, 2012). Bitki-mikroorganizma arasında negatif (patojenik) ilişkiler, pozitif ilişkiler (simbiyoz, her iki taraf da ilişkiden yarar sağlar ya da sadece bir taraf diğerine zararı olmadan yarar sağlar) ve nötral ilişkiler (iki taraf da ilişkiden direkt olarak ne yarar ne de zarar görür) olmak üzere üç tip etkileşim meydana gelir (Singh vd, 2004; Sekar & Kandavel, 2010). Pozitif ilişkiler bitki gelişiminin artmasına ve bitki hastalıklarının biyolojik kontrolüne katkı sağlayan epifitik mikroorganizmalar, mikorizal fungus ve biyokontrol ajanların kök kolonizasyonunu içeren ilişkilerdir. Negatif ilişkiler rekabet, parazitizm ve antogonizmi içerir (Bais vd, 2006; Pliego vd, 2011).

Rizosferdeki bu çok taraflı ilişkiler organizmaların karşılıklı kimyasal etkileşimleriyle şekillenmektedir (Saraçlı, 2006). Mikroorganizmalar, quorum sensing (QS) adı verilen iletişim yolu ile kök kolonizasyonunu ve biyokontrolü düzenler (Danhorn & Fuqua, 2007). QS bakteriyel davranışı, konak kolonizasyonunu kontrol eden, stres koşullarında popülasyon yoğunluğunu denetleyen hücre içi sinyal mekanizmalarını içerir (Danhorn & Fuqua, 2007; Schenk vd, 2012; He & Bauer, 2014). Bitki ilişkili bakteriler çoğunlukla Gram(+)'lerde oligopeptitler, Proteobacteria'da N-açil homoserin lakton (AHL) içeren bu sinyal mekanizmasını bitkilerle etkileşimi koordine etmek ve ayarlamak için kullanırlar (Souza vd, 2015).

## 2.2. Rizosfer Organizmaları

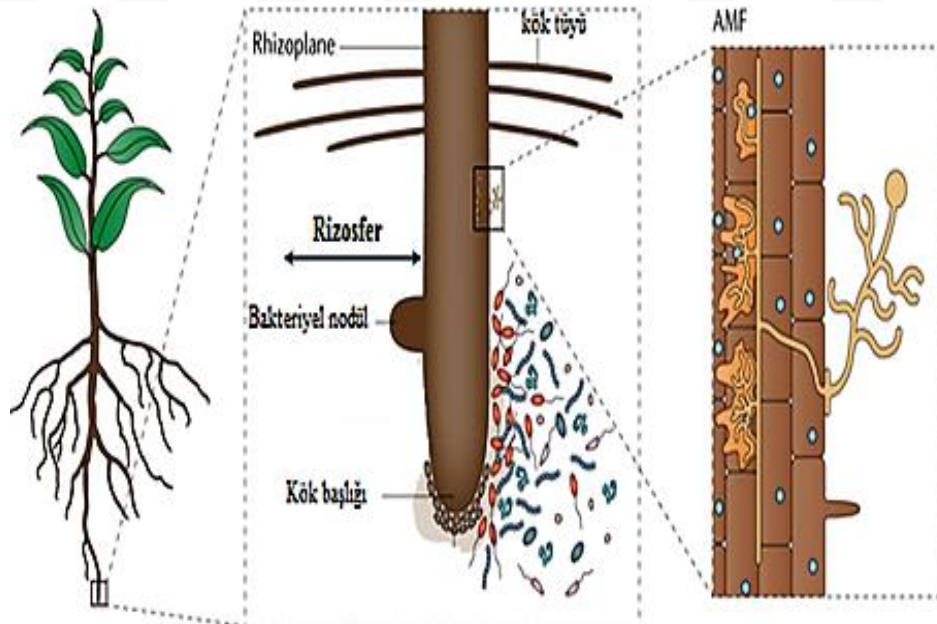
Rizosfer, genellikle mikroorganizma yoğunluğu ve mikrobiyal aktivite bakımından en aktif kısımdır. Çok sayıda makroskobik organizma ve bakteri, fungus, protozoa, alg gibi mikroorganizmalar rizosferde birlikte yaşamaktadır (Barriuso vd, 2008). Rizosferde bitki, toprak, mikroorganizmalar ve toprak mikrofaunası arasında çok önemli ve hassas etkileşimler oluşur (Şekil 2.2). Bitki gelişimi ve verimlilik bu ilişkilerden büyük oranda etkilenir (Antoun & Prevost, 2005; Kaymak, 2010; Kaur vd, 2016).



Şekil 2.2. Rizosferde oluşan etkileşimler (Gianfreda, 2015)

Rizosferde bitki gelişimini arttıran iki büyük organizma grubu funguslar ve bakterilerdir. Birçok karasal bitki ile toprak fungusları arasında mikoriza olarak adlandırılan simbiyotik yapılar meydana gelir. Bu ilişkide fungus hifal yapıları sayesinde bitkinin topraktaki su ve besin elemanlarının alınımını artırır, bitki de fungusu gelişimi için gerekli karbonhidratları sağlar (Tarkka vd, 2008).

Arbuskular mikoriza gibi rizosferik funguslar ve *Penicillium bilaii*'nin bitkinin besin durumunu arttırmak suretiyle bitki gelişimini arttıran etkiler gösterdikleri uzun süredir bilinmektedir (Şekil 2.3). *Fusarium*, *Penicillium bilaii*, *Penicillium simplicissimum*, *Phoma* spp. ve *Trichoderma* bitki gelişimini arttırıcı funguslardandır. *Trichoderma* ve benzeri organizmalar hastalıklara karşı direnç sağlarken, köklerle simbiyotik ilişkiler içinde bulunan arbuskular mikorizal fungus (AMF) grubu organizmalar, konak bitkide besin elemanı seviyesini arttırlar ve bitkinin sağlıklı bir şekilde büyümesine önemli katkılar sağlarlar (Vessey, 2003; Chandanie vd, 2005; Chandanie vd, 2006; Saldajeno vd, 2012). Bitki gelişimini arttıran fungusların kültür bitkilerine olan yararı sadece bitki gelişimini attırmakla sınırlı olmayıp onları fungal ve bakteriyel hastalıklara karşı da korumaktadırlar (Özkoç vd, 2002; Erper vd, 2013).



Şekil 2.3. Rizosferdeki AMF (Philippot vd, 2013)

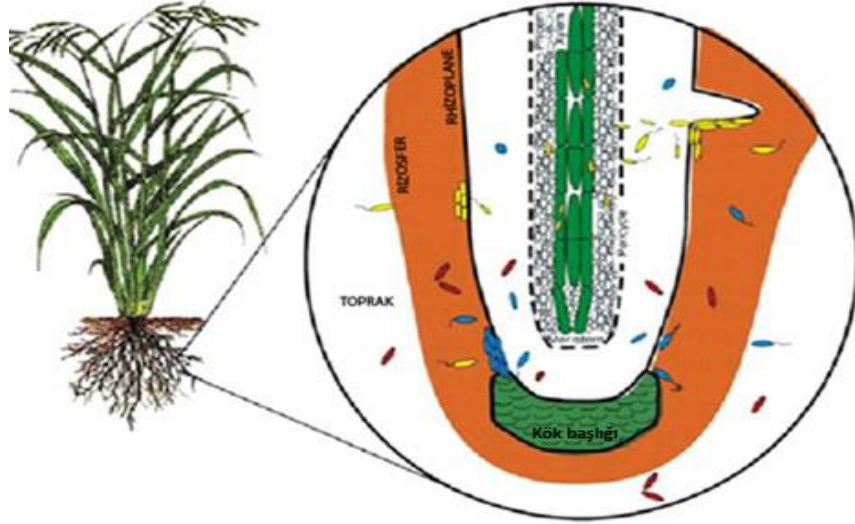
Bitki köklerinin yüzey alanı arbuskular mikorizal funguslarının hipleri sayesinde genişleyerek bitkinin bulunduğu topraktan daha fazla yararlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca AMF bitkinin tuzluluk, kuraklık ve ağır metal stresine karşı direncini artırır, kök patojenlerine karşı bitkiyi koruyup bitkinin büyümesini sağlayan hormonları uyarmaktadır (Vessey, 2003; Chandanie vd, 2005; Saldajeno vd, 2012).

Bitki gelişimini artırıcı funguslar hiperparazitizm, antibiyotik üretimi, rekabet ve uyarılmış sistemik dayanıklılık ve fosfor kazanımı gibi etki mekanizmaları ile bitki patojenlerini kontrol etmektedirler. Bunlardan özellikle mikorizalar sayesinde bitki tarafından kolay bir şekilde kullanılmayan fosforu kullanılabilir hale getirmeleri oldukça önemlidir (Saldajeno vd, 2012; Özkoç vd, 2014; Prathap & Kumari, 2015).

Bakteriler rizosferde yer alan mikroorganizmaların önemli bir kısmını oluştururlar (Tarkka vd, 2008). Rizobakteriler rizosferde, rizoplanede (kök yüzeyi) ve endorizosferde (köklerin iç kısmı) kolonize olabilirler (Czaban vd, 2007; Cummings, 2009; Yang vd, 2009; Beneduzi vd, 2012; Sallam vd, 2013; Przemieniecki vd, 2014) ve rizosfer bakterilerinin yaklaşık % 2-5'i bitki gelişimini artırıcı rizobakteridir (Klopper & Schroth, 1978).

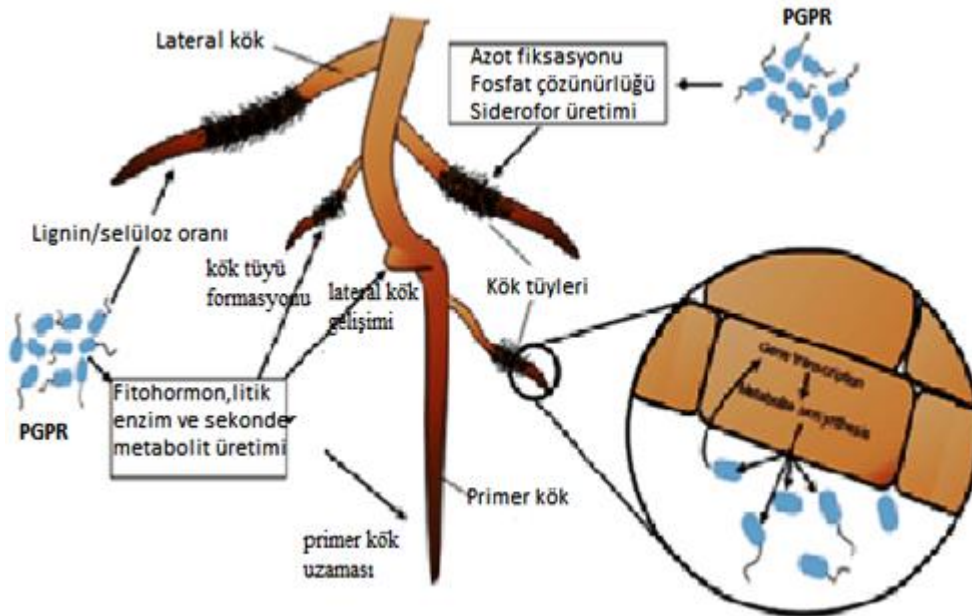
### **2.3. Bitki Gelişimini Arttırıcı Rizobakteriler (PGPR)**

Bitki gelişimini arttırıcı rizobakteriler bitki kökleri ile aynı alanda yaşarlar ve direkt etki mekanizmalarından indirekt etkilere kadar değişen pozitif etkiler gösterirler. Bu fonksiyonları gerçekleştirmek için kök çevresinde, kök yüzeyinde ve kök dokusu içinde kolonize olabilmeli ve yeterli miktarlara ulaşabilmelidirler (Barriuso vd, 2008; Verma vd, 2010; Saharan & Nehra, 2011). Bakteri gelişiminin en yaygın olduğu bölgeler, yan köklerin açığa çıktığı kısımlar olan epidermal hücreler arasındaki bağlantılardır (Lugtenberg & Kamilova, 2009) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Rizobakterilerin yan köklerin açığa çıktığı kısımlarda gelişimi (Santos vd, 2010)

Bitki gelişimini arttıran rizobakteriler ürettikleri fitohormonlar, sekonder metabolitler ve enzimler sayesinde kök gelişimini değiştirebilirler. Bu en yaygın olarak primer köklerin gelişim hızını kısıltma ve lateral köklerin ve kök tüylerinin uzunluğu ve sayısında artış şeklinde gözlenir (Şekil 2.5). PGPR'ler bitki hücrelerinde gen transkripsiyonu değişimi ve metabolit biyosentezi sayesinde kök fizyolojisini de modifiye edebilirler (Vacheron vd, 2013).



Şekil 2.5. PGPR besin alınımı ve kök fonksiyonunu uyarıcı etkisi (Vacheron vd, 2013)

PGPR'ler kendi içinde ekstrasellüler (ePGPR) ve intrasellüler (iPGPR) olarak iki sınıftır. ePGPR'ler rizosferde, kök yüzeyinde ya da kök korteksinin hücreleri arasında yer alırken, iPGPR'ler çoğunlukla kök hücrelerinin özelleşmiş nodüler yapılarında bulunurlar. *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* ve *Serratia* gibi bakteri cinsleri ePGPR'ye aittir. iPGPR'ye ait Rhizobiaceae familyaları *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* ve *Rhizobium*'dur (Gupta vd, 2015; Yadav vd, 2015; Kaur vd, 2016).

Bitki-bakteri ilişkileri için rekabetçi rizosfer kolonizasyonu çok önemlidir. Başlıca *Pseudomonas* spp. gibi Gram (-) PGPR'lerle karşılaştırıldığında, pratik uygulamalarda ısı ve kuruluğa dirençli endospor oluşturma avantajlarına rağmen, Gram (+) suş üyelerinin kolonizasyonu hakkında bilinenler nispeten azdır (Fan vd, 2011). Farklı bitki türlerinde PGPR ile inokülasyon bakterisi, virüs ve fungus patojenlerine karşı direnç sağlamaktadır ve bitkide morfolojik değişikliklerin yanında, fenoliklerin birikiminde ve bazı enzimlerin seviyelerinde artış oluşturmaktadır (Akhtar & Siddiqui, 2010).

Bakteri hücreleri hücreden hücreye haberleşme sistemi aracılığıyla popülasyonlarını algılar ve bakterinin yoğunluğu eşik değerine ulaştıkça belirli genlerin ekspresyonunu harekete geçirirler. Gram (+) organizmalarda peptid-temelli sinyaller ve birçok Gram (-) bakteride bulunan N-açil homoserin lakton (AHL) tanımlanmış sinyal moleküllerine örnektir (Braeken vd, 2008). Bazı PGPR üyeleri otoindükleyici sinyalleri parçalayarak ve bu şekilde birkaç virülans genin ekspresyonunu bloke ederek çevrelerindeki bakterilerin QS kapasitelerini kontrol edebilirler (Tarkka vd, 2008).

PGPR'lerin pozitif etkisi farklı mekanizmalarla gerçekleşir (Çizelge 2.1). Bu rol sadece tek bir bakteri suşunun değil aynı zamanda toprak mikroorganizmaları ve bitkiler arasında, quorum sensing gibi mekanizmaları içeren, moleküler iletişim kurulmasıyla gerçekleşir (Barriuso vd, 2008). Etki mekanizmalarına göre PGPR'ler indirekt olarak bitki gelişimine yararı olan biyokontrol PGPR'ler ve bitki gelişimi, tohum oluşumu ya da ürün verimine direkt etkisi olan PGPR'ler olarak iki gruptur (Podile & Kishore, 2006).

Çizelge 2.1. Rizobakterilerin bitki gelişimini arttırıcı etkileri (Garcia-Fraile vd, 2015)

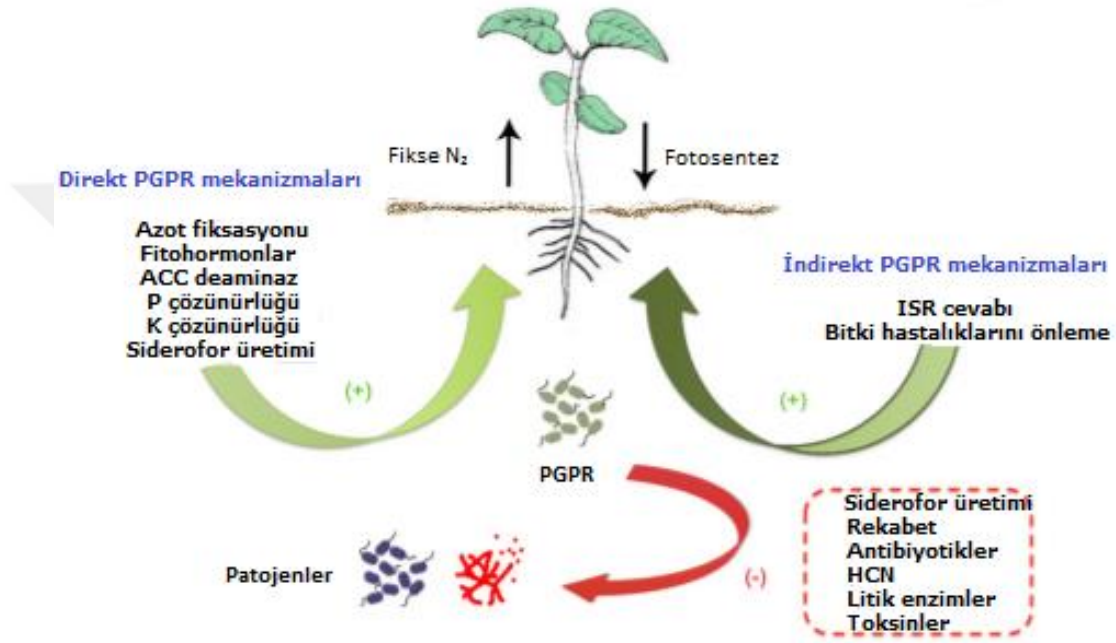
PGPR	Bitki gelişimini arttırıcı etkisi	Ürün	Kaynak
<i>Azoarcus</i>	Azot fiksasyonu	Pirinç	(Reinhold-Hurek & Hurek 1998)
<i>Azobacter</i>	Sitokinin sentezi	Salatalık	(Aloni vd, 2006)
<i>Azorhizobium</i>	Azot fiksasyonu	Buğday	(Sabry vd, 1997)
<i>Azospirillum</i>	Azot fiksasyonu	Hububat, pirinç şeker kamışı	(Tejera vd, 2005; Sahoo vd, 2014; Berg vd, 1980)
<i>Azotobacter</i>	Azot fiksasyonu	Buğday, arpa, yulaf, pirinç, ayçiçeği, mısır hindistan cevizi, kırmızı pancar, tütün, çay, kahve	(Wani vd, 2013)
<i>Bacillus</i>	İndol asetik asit sentezi	Patates	(Ahmed & Hasnain, 2010)
<i>Bacillus</i>	Sitokinin sentezi	Salatalık, doğu mazısı	(Sokolova vd, 2011; Liu vd, 2013)
<i>Bacillus</i>	Giberellin sentezi	Biber	(Joo vd, 2005)
<i>Bacillus</i>	Potasyum çözünürlüğü	Buğday, biber, salatalık	(Sheng & He, 2006; Han vd, 2006; Basak & Biswas, 2009)
<i>Bacillus</i>	Bitki stres direncini uyarma	Mısır, yerfıstığı	(Egamberdiyeva, 2007; El-Akhal vd, 2013)
<i>Bacillus</i>	Antibiyotik üretimi	Alfalfa	(Silo-Suh vd, 1994)
<i>Bacillus</i>	Siderofor üretimi	Mısır, biber	(Beneduzi vd, 2012)
<i>Beijerinckia</i>	Azot fiksasyonu	Şeker kamışı	(Dobereiner, 1961)
<i>Burkholderia</i>	Azot fiksasyonu	Pirinç	(Govindarajan vd, 2007; Kao vd, 2003)
<i>Chryseobacterium</i>	Siderofor üretimi	Domates	(Radzki vd, 2013)
<i>Frankia</i>	Azot fiksasyonu	Alnus	(Simonet vd, 1990)
<i>Gluconacetobacter</i>	Azot fiksasyonu	Şeker kamışı	(Munoz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003)
<i>Herbaspirillum</i>	Azot fiksasyonu	Şeker kamışı, fasulye, pirinç, sorghum	(Elbeltagy, 2001; Pereira vd, 1988; Hurek & Reinhold-Hurek, 2003)
<i>Mycobacterium</i>	Bitki stres direncini uyarma	Mısır	(Egamberdiyeva, 2007)
<i>Paenibacillus</i>	İndol asetik asit sentezi	Bodur kıyı çamı	(Bent vd, 2001)
<i>Paenibacillus</i>	Potasyum çözünürlüğü	Karabiber	(Sangeeth vd, 2012)
<i>Phyllobacterium</i>	Fosfat çözünürlüğü, siderofor üretimi	Çilek	(Flores-Felix vd, 2015)

Çizelge 2.1. Rizobakterilerin bitki gelişimini arttırıcı etkileri (devam)

<b>PGPR</b>	<b>Bitki gelişimini arttırıcı etkisi</b>	<b>Ürün</b>	<b>Kaynak</b>
<i>Pseudomonas</i>	Kitinaz ve $\beta$ -glukanaz üretimi	Birçok mahsül	(Arora vd, 2008)
<i>Pseudomonas</i>	ACC deaminaz sentezi	Sarı fasulye, buğday	(Ahmad vd, 2013; Shaharoon vd, 2008)
<i>Pseudomonas</i>	Bitki stres direncini uyarma	Pamuk, Mısır	(Yao vd, 2010; Egamberdiyeva, 2007)
<i>Pseudomonas</i>	Antibiyotik üretimi	Buğday	(Mazzola vd, 1995)
<i>Pseudomonas</i>	Kitinaz ve $\beta$ -glukanaz üretimi	Güvercin bezelye	(Kumar vd, 2010)
<i>Pseudomonas</i>	Siderofor üretimi	Patates, mısır	(Beneduzi vd, 2012)
<i>Rhizobia</i>	Azot fiksasyonu	Baklagiller	(Young & Haukka, 1996; Bedmar vd, 2006; Kaneko vd, 2000)
<i>Rhizobia</i>	Bitki stres direncini uyarma	Yerfıstığı	(El-Akhal vd, 2013)
<i>Rhizobia</i>	Hidrojen siyanür üretimi	Baklagiller	(Thamer vd, 2011)
<i>Rhizobium</i>	Azot fiksasyonu	Pirinç	(Yanni vd, 2001)
<i>Rhizobium</i>	İndol asetik asit sentezi	Biber, domates, marul, havuç	(Garcia-Fraile vd, 2012; Flores-Felix vd, 2013)
<i>Rhizobium</i>	ACC deaminaz sentezi	Biber, domates, Sarı fasulye	(Garcia-Fraile vd, 2012; Ahmad vd, 2013)
<i>Rhizobium</i>	Fosfat çözünürlüğü	Biber, domates, marul, havuç	(Garcia-Fraile vd, 2012; Flores-Felix vd, 2013)
<i>Rhizobium</i>	Siderofor üretimi	Biber, domates, marul, havuç	(Garcia-Fraile vd, 2012; Flores-Felix vd, 2013)
<i>Sinorhizobium</i>	Kitinaz ve $\beta$ -glukanaz üretimi	Güvercin bezelye	(Kumar vd, 2010)
<i>Sphingomonas</i>	Giberellin sentezi	Domates	(Khan vd, 2014)
<i>Streptomyces</i>	İndol asetik asit sentezi	Hint leylağı	(Verma vd, 2011)
<i>Streptomyces</i>	Siderofor üretimi	Hint leylağı	(Verma vd, 2011)



PGPR'ler bitki gelişimi üzerinde azot fiksasyonu, hormon üretimi, fosfatı çözünür hale getirme, potasyum çözünürlüğü, siderofor üretimi gibi direkt etkilere sahiptir. Uyarılmış sistemik dayanıklılık (ISR), antibiyoz, parazitizm/predasyon, besin ve yer için rekabet, zararlı rizobakterileri baskılayan metabolitlerin üretimi (HCN, siderofor, litik enzim) gibi mekanizmalarla ise bitki gelişimine indirekt etki göstermektedirler (Şekil 2.6). Ayrıca biyoremediasyonda ve biyogübre olarak kullanılmaktadırlar (Akhtar & Siddiqui, 2010; Jha & Saraf, 2015; Gupta vd, 2015).



Şekil 2.6. Direkt ve indirekt PGPR mekanizmaları (Garcia-Fraile vd, 2015)

## 2.4. PGPR'lerin Bitki Gelişimindeki Direkt Etki Mekanizmaları

### 2.4.1. Fitohormonlar

Bitki hormonları bitkinin çevresine yanıt verme yeteneğini etkileyen kimyasal habercilerdir. Hormonlar çok düşük konsantrasyonlarda etkili organik bileşiklerdir, genellikle bitkinin bir kısmında sentezlenir ve başka bir bölgeye gönderilir. Örneğin büyüme ya da meyve oluşumu gibi fizyolojik yanıtlar oluşturan spesifik hedef dokular ile bağlantılıdır. Her yanıt sık sık iki ya da daha fazla hormonun birlikte görev almasıyla oluşur. Hormonlar bitki gelişimini stimüle veya inhibe ettiklerinden, birçok botanikçi onları bitki gelişim düzenleyicileri olarak tanımlar (Saharan & Nehra, 2011).

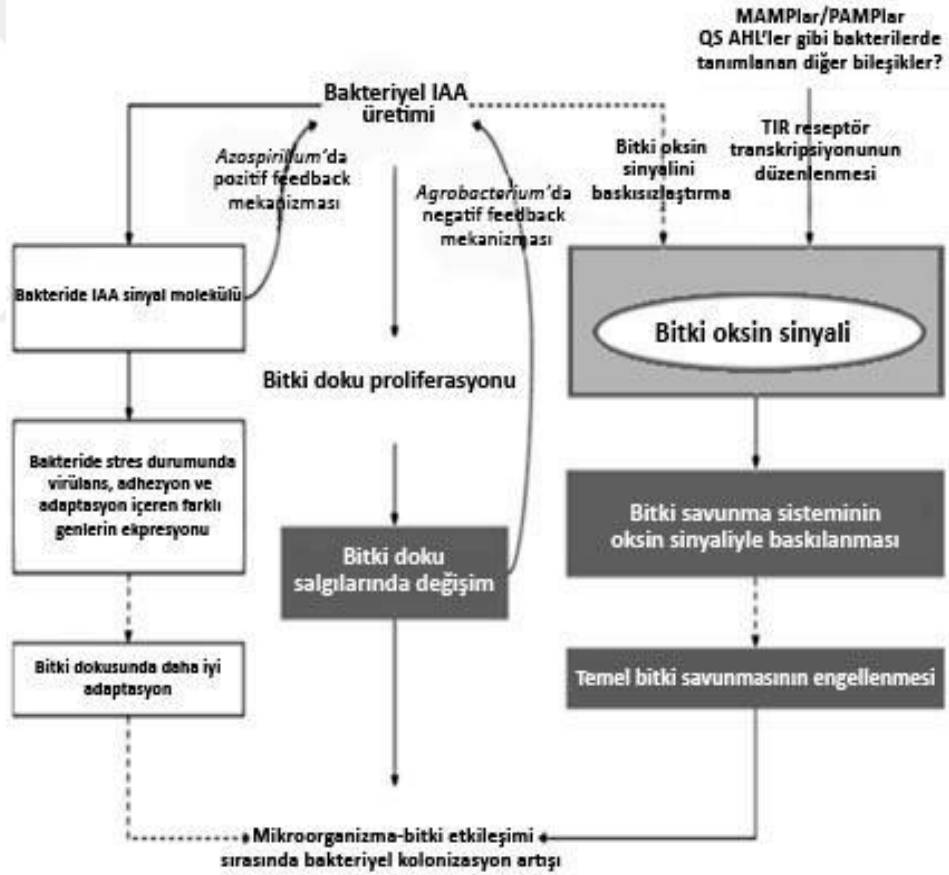
Çizelge 2.2. PGPR'lerin ürettiği fitohormonlar (Vessey, 2003; Verma vd, 2010)

<b>PGPR</b>	<b>Fitohormon</b>	<b>Kaynaklar</b>
<i>Arthrobacter mysorens</i> 7, <i>Klebsiella</i> CIAM 880	İndol-3-asetik asit, Etilen	(Pishchik vd, 2002)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	İndol-3-asetik asit	(Verma vd, 2010)
<i>Azospirillum</i> sp.	İndol-3-asetik asit	(Dobbelaere vd, 2001)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Etilen	(Fukudah vd, 1989)
<i>Bacillus subtilis</i>	Etilen	(Mansouri & Bunch, 1989)
<i>Bacillus megaterium</i> BHUPSB14	İndol-3-asetik asit	(Verma vd, 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Etilen	Mansouri & Buncli, 1989)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Etilen	(Swanson vd, 1979)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BHUPSB06	İndol-3-asetik asit	(Verma vd, 2010)
<i>Pseudomonas putida</i>	Etilen	(Pazout vd, 1981)
<i>Pseudomonas syringae</i>	Etilen	(Sato vd, 1997)
<i>Pseudomonas tabaci</i>	Etilen	(Swanson vd, 1979)
<i>R. leguminosarum</i>	İndol-3-asetik asit	(Badnoch-Jones vd, 1982)
<i>R. leguminosarum</i>	İndol-3-asetik asit	(Wang vd, 1993)
<i>Rhizobium</i> sp.	İndol-3-asetik asit	(Verma vd, 2010)
<i>Aeromonas veronii</i>	İndol-3-asetik asit	(Mehnaz vd, 2001)
<i>Agrobacterium</i> sp.	İndol-3-asetik asit	(Barazani & Friedman, 1999)
<i>Alcaligenes piechaudii</i>	İndol-3-asetik asit	(Barazani & Friedman, 1999)
<i>Azospirillum brasilense</i>	İndol-3-asetik asit	(Kaushik vd, 2000)
<i>Enterobacter</i> sp.	İndol-3-asetik asit	(Antoun vd, 1998)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Sitokinin	(Timmusk vd, 1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sitokinin	(de Salamone vd, 2001)
<i>Bacillus</i> sp.	Giberellin	(Gutierrez-Manero vd, 2001)
<i>Alcaligenes</i> sp.	ACC deaminaz	(Belimov vd, 2001)
<i>Pseudomonas putida</i>	ACC deaminaz	(Mayak vd, 1999)
<i>Variovorax paradoxus</i>	ACC deaminaz	(Belimov vd, 2001)

PGPR'ler ürettikleri indol-3-asetik asit, sitokinin, giberellin ve etilen gibi bitki hormonları ile özellikle kök yapılanmasında, hücre proliferasyonunda (tomurcuklanma) ve kök tüylerinin besin ve su alımını arttırmada etkilidir (Podile & Kishore, 2006; Sekar & Kandavel, 2010; Gupta, 2015).

## İndol-3-asetik asit (IAA)

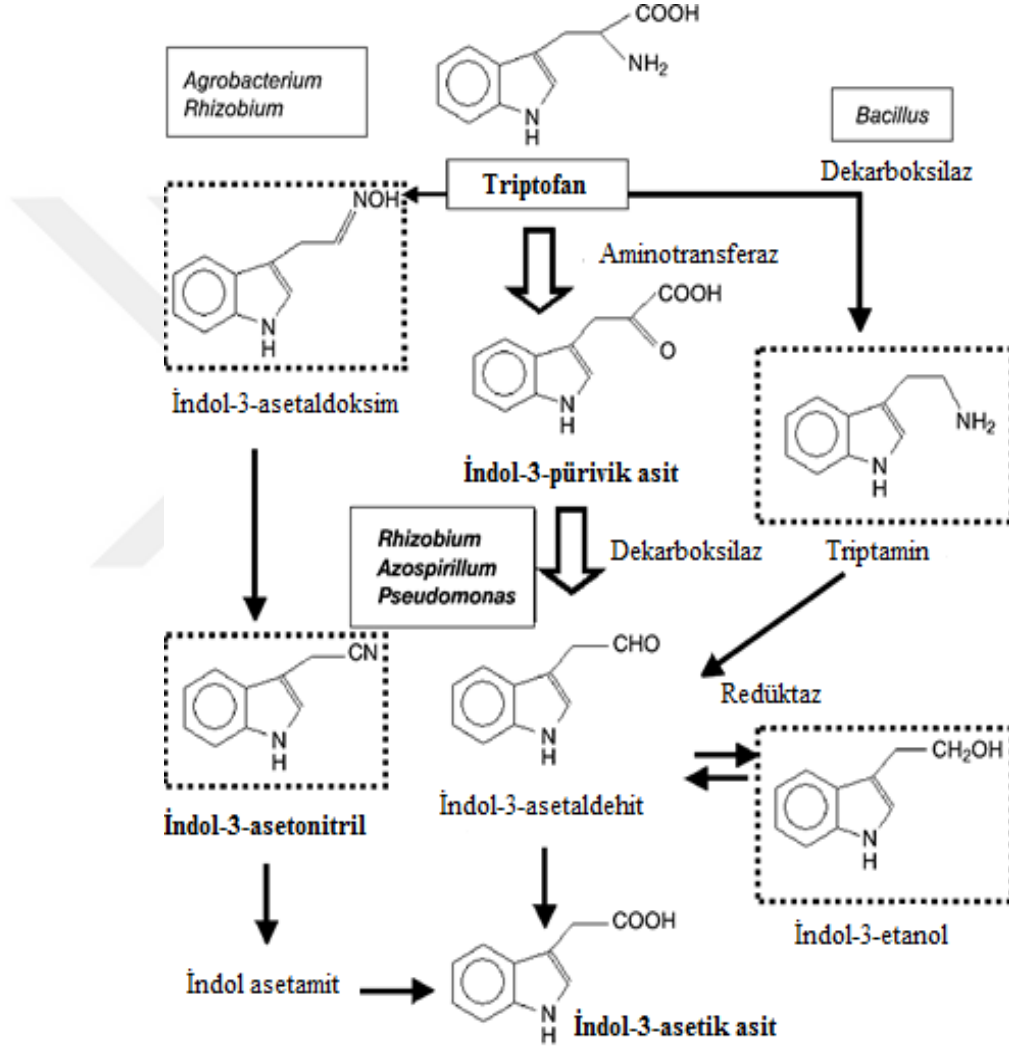
İndol-3-asetik asit hem en yaygın hem de en çok çalışılan oksinlerden biridir ve bilimsel literatürün çoğunda oksin ve IAA birbirinin yerine kullanılır (Kundan, 2015). İndol-3-asetik asit birçok PGPR üyesi tarafından üretilen önemli bir fitohormondur (Şekil 2.7). IAA bitki hücrelerinin bölünme, büyüme ve farklılaşmasından sorumludur, ayrıca tohum uyarımı ve yumru çimlenmesi; ksilem oranında artış ve kök gelişimi; vejetatif gelişim sürecinin kontrolü, lateral ve sonradan kök oluşumunu başlatma; ışık, yerçekimi ve çiçek açma cevabına aracılık etme; fotosentez, pigment oluşumu, çeşitli metabolitlerin biyosentezi ve stres koşullarına dayanıklılık gibi etkileri vardır (Martinez-Viveros vd, 2010; Saharan & Nehra, 2011; Goswami vd, 2016; Gupta, 2015).



Şekil 2.7. Bakteriye IAA üretiminin patojenik ve yararlı mikroorganizma-bitki ilişkilerindeki rolü (Spaepen vd, 2007)

Rizobakteriler indol-3-asetik asiti triptofan-bağımlı yollar sayesinde triptofandan sentezlenmektedir. Triptofan, kök salgılarında yaygın olarak bulunan bir aminoasittir, bakteride IAA'nın biyosentezi için ana öncül molekül olarak

tanımlanmıştır. PGPR tarafından IAA'nın biyosentezi, İndol-3-pürivik asit ve indol-3-asetik aldehit yoluyla gerçekleşir (Gupta, 2015). *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Azospirillum* gibi çoğu yararlı bakteri indole-3-pürivik asit (IPyA) yolağı ile IAA sentezler (Patten & Glick, 1996; Kaymak, 2010) (Şekil 2.8). *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* ve *Rhizobium tumefaciens* gibi bazı fitopatojenik bakteriler ise IAA sentezi için çoğunlukla indol asetamit (IAM) yolağını kullanmaktadır (Dobbelaere vd, 2003; Martinez-Viveros vd, 2010; Kaymak, 2010; Gupta vd, 2015).



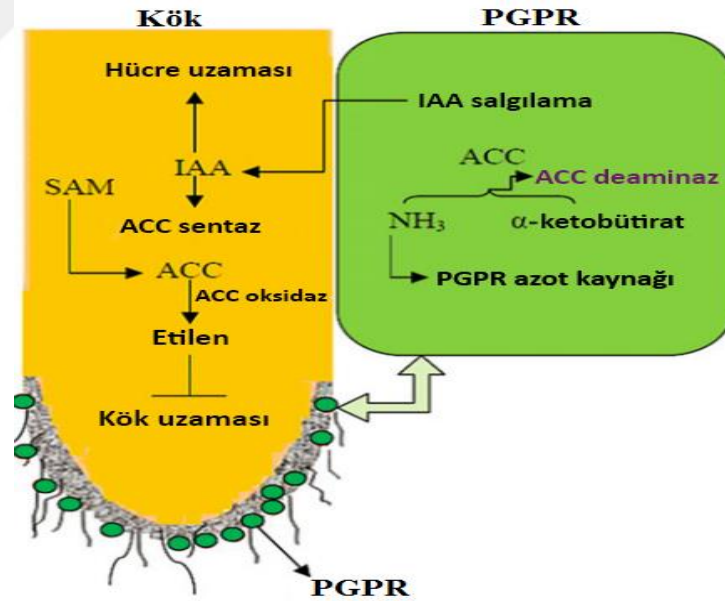
Şekil 2.8. Bakteride IAA sentezinin biyosentetik yolları (Patten & Glick,1996; Solano vd, 2008)

#### Etilen ve ACC deaminaz aktivitesi

Etilen, çeşitli biyotik ve abiyotik mekanizmalar yolu ile üretilir ve bitkilerde çok yönlü fizyolojik değişikliklerin meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır. Etilenin düşük düzeyde olması kök gelişmesini arttırırken, yüksek miktarda etilen

üretimi kök gelişimini engellemekte ve anormal gelişmeye neden olmaktadır. Etilen bitkilerde stres hormonu olarak da bilinir ve stres koşulları altında, bitki gelişiminde negatif etkiler oluşturan etilen seviyesi önemli ölçüde artar. Örneğin, yüksek etilen konsantrasyonu yaprak dökülmesi, yaprak yaşlanması, kloroz, çiçek solgunluğu gibi zarar verici etkilere sebep olur ve diğer hücresel süreçlerde ürün azalmasına yol açabilir (Saleem vd, 2007; Çakmakçı, 2009; Kardaş & Ökmen, 2014; Goswami vd, 2016).

1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) bileşiği bitkilerde etilen fitohormonunun öncülüdür. Bazı PGPR'ler etilenin dönüşümünde ACC inhibisyonunu azaltan ACC deaminaz (EC 4.1.99.4) enzimi üretme yeteneğine sahiptir. Abiyotik stres altında çok miktarda üretilen ACC, bakteriyel ACC deaminaz tarafından amonyum ve alfa-ketobütirata parçalanır, etilenin üretimi engellenir ve bitki hayatta kalır (Şekil 2.9). Bu yolla, ACC deminaz üreten PGPR bitkiyi tuzluluk, kuraklık, toprağın suyu emmesi, ağır metaller ve patojenite gibi stres koşulları altında etilenin zararlı etkilerinden korur (Goswami, 2016; Yadav vd, 2015).



Şekil 2.9. ACC deaminaz aktivitesi (Ghorbanpour & Hatami, 2014)

*Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* ve *Rhizobium* gibi cinslerde ACC deaminaz aktivitesi gösteren birçok bakteriyel suş tanımlanmıştır (Kang vd, 2010; Ahemad & Kibret, 2014; Yadav vd, 2015).

Ağır metaller, fitopatojenler, kuraklık, yüksek tuz ve etilen gibi bitkilerde stres yaratan faktörlere karşı, bitkide ACC deaminaz aktivitesi gösteren PGPR'lerle muamele ile kök ağırlığında artış, dayanıklılık, kök uzunluğunda artış gibi sonuçlar meydana gelmektedir (izelge 2.3) (Kang vd, 2010).

Çizelge 2.3. ACC deaminaz aktivitesi gösteren PGPR'ler (akmakı, 2009)

Bitki Türü	PGPR	Etkileri	Kaynaklar
<i>Brassica campestris</i>	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	Bakteri kök uzamasını teşvik eder	(Madhaiyan vd, 2006)
<i>Brassica campestris</i>	<i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus firmus</i>	Aşılama kök ve gövde gelişimini arttırmış	(Ghosh vd, 2003)
<i>Brassica napus</i>	<i>Algaligenes</i> spp. <i>Bacillus pumilus</i>	Aşılanan bitki daha kuvvetli gelişmiş	(Belimov vd, 2001)
<i>Brassica napus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Kk ve gvde uzunluğunda artış	(Saleh & Glick, 2001)
<i>Brassica napus</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	Kk uzunluğunda % 35-41 oranında artış	(Indiragandhi vd, 2008)
<i>Chamaecytisus proliferus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kk uzaması ve nodl sayısında artış	(Donate-Corea vd, 2004)
<i>Dianthus caryophyllus</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kk uzamasında artış	(Li vd, 2005)
<i>Glycine max</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Erken gelişimin teşviki	(Cattelana vd, 1999)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Trichoderma atroviride</i>	Kk, kk-gvde ağırlığı ve meyvede artış	(Gravel vd, 2007)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Nodl gelişimin teşviki	(Ma vd, 2003)
<i>Zea mays</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Kök uzunluğunda ve nodlasyonda artış	(Shaharoon vd, 2006 a, b)
<i>Vigna radiata</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Etilen retiminde azalış	(Mayak vd, 1999)
<i>Zea mays</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Pseudomonas</i> spp.	Agromik parametrelerde artış	(Babalola vd, 2003)

## 2.4.2. Azot fiksasyonu

Azot en önemli bitki besin elemanlarından ve toprakta düşük miktarda bulunması nedeniyle (emiyon ve yıkanma gibi nedenlerle) tarımsal ekosistemde sınırlayıcı bir faktördür (Martinez-Viveros vd, 2010). Atmosferik azot, biyolojik azot fiksasyonu ile azot fikse eden organizmalar tarafından, nitrojenaz olarak bilinen kompleks enzim sistemini kullanarak bitkinin kullanabileceği forma, azottan amonyuma, dönüştürülür. Nif geni olarak adlandırılan azot fiksasyon geni, hem simbiyotik hem de serbest yaşayan sistemlerde bulunur (Gupta vd, 2015).

Simbiyotik ve simbiyotik olmayan iki tip biyolojik azot fiksasyonu vardır. Azot fikse eden bakteriler kök salgılarını (karbonhidrat) metabolize eder ve buna karşılık aminoasit sentezi için bitkiye azot kazandırır (Berg, 2009). Simbiyotik azot fiksasyonu yapan bakterilere baklagil bitkilerinde zorunlu simbiyont *Rhizobium* ve baklagil olmayan ağaçlarda *Frankia* örnek verilebilir (Verma vd, 2010; Saharan & Nehra, 2011).

*Rhizobium*'ların baklagil bitkileri ile simbiyozu, dünya çapında yıllık toplam biyolojik azot fiksasyonunun 175 milyon tonunun % 50'sini ürettikleri için, oldukça önemlidir (Verma vd, 2010). Azot fiksasyonu *Rhizobium*'un kökte oluşturduğu nodüllerde gerçekleşir, bakteri bitkiye azot kazandırırken, bitki de bakteriyeye karbonhidrat sağlamaktadır.

*Frankia*, 8 farklı familyaya ait 280'den fazla odunlu bitki türünde kök nodülü oluşturur. Bununla birlikte simbiyotik ilişkileri iyi anlaşılamamıştır. *Frankia*'nın *Alnus* ve *Casuarina* türlerinde etkili simbiyozlar oluşturduğu bilinmektedir. Birkaç türü bitki büyüme düzenleyicileri, siderofor ve hidrojen siyanür salgılayarak ya da fosfatı kullanışlı hale getirerek bitki beslenmesine katkıda bulunmaktadır (Saharan & Nehra, 2011).

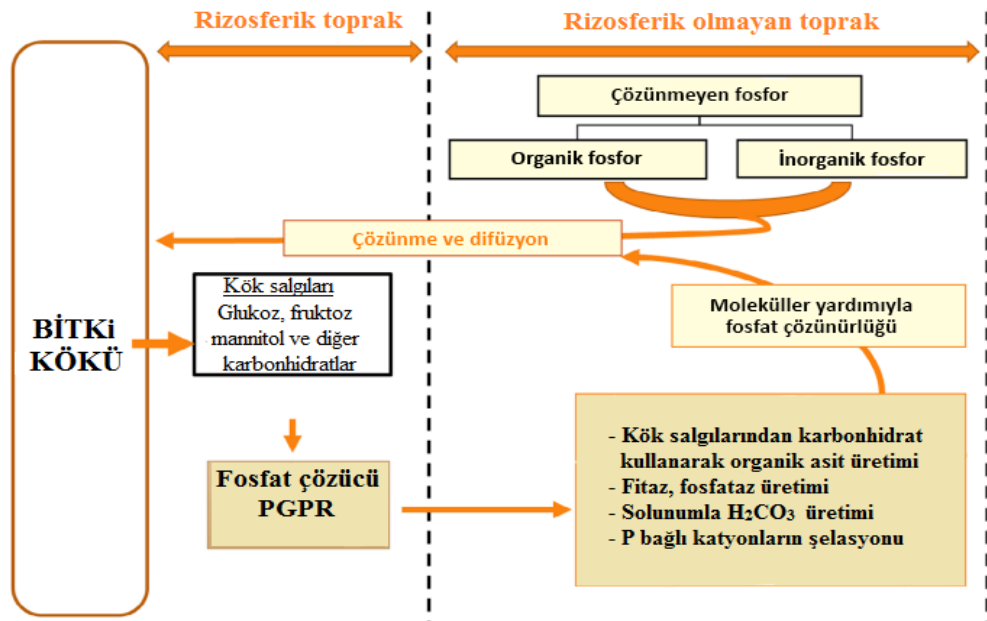
Azot fikse etme yetenekleri nedeniyle *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* ve *Sinorhizobium* gibi bakteriler en fazla çalışılan PGPR'ler arasındadır (Verma vd, 2010). Simbiyotik olmayan azot fikse eden bazı rizosferik bakteriler *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* ve *Stenotrophomonas* cinslerine aittir (Solano vd, 2008; Berg, 2009; Gupta vd, 2015). *Azotobacter* ve *Azospirillum* hem azot fikse ederek hem de IAA,

giberellik asit, sitokinin gibi hormonları üreterek bitkiye pozitif etkiler sağlamaktadır. *Azotobacter chroococcum* ve *Azospirillum brasillense* ürün veriminin artırılmasında etkilidir (Solano vd, 2008). *Delftia tsuruhatensis* HR4'ün hem azot fikse ettiği hem de biyokontrol aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Han vd, 2005).

Bazı bitkilerde azot fikse eden PGPR'ler arasında, mısırdaki *Azospirillum* sp. (de Salamone vd, 1996) ve *Azotobacter* sp. (Pandey vd, 1998); kallar otu (Hurek vd, 2002) ve sorghumda (Stein vd, 1997) *Azoarcus* sp.; pirinçte *Burkholderia* sp. (Baldani vd, 2000) ve *Herbaspirillum* sp. (James vd, 2002); buğdayda *Bacillus polymyxa* (Omar vd, 1996); şeker kamışında *Glucanacetobacter diazotrophicus* (Boddey vd, 2001) ve *Acetobacter* sp. (Muthukumarasamy vd, 2000) sayılabilir (Vessey, 2003; Kundan vd, 2015).

### 2.4.3. Fosfat çözünürlüğü

Fosfor azottan sonra bitkiler için en önemli anahtar elementtir. Fotosentez, enerji transferi, sinyal dönüşümü, makromolekül biyosentezi ve solunum gibi bitkide hayati olan tüm önemli metabolik süreçlerde önemli rol oynar. Fosfor toprakta hem organik hem de inorganik formda bolca mevcuttur. Tahminen toprak fosforunun %30-50'si organik formda fosfordur. Bitkiler sadece fosfatın çözülebilir formu olan monobazik ( $H_2PO_4$ ) ve dibazik ( $HPO_4$ ) formunu absorblayabilir (Şekil 2.10). (Saharan & Nehra, 2011; Gupta vd, 2015).



Şekil 2.10. PGPR tarafından toprak fosforunun çözünmesi (Goswami vd, 2016)

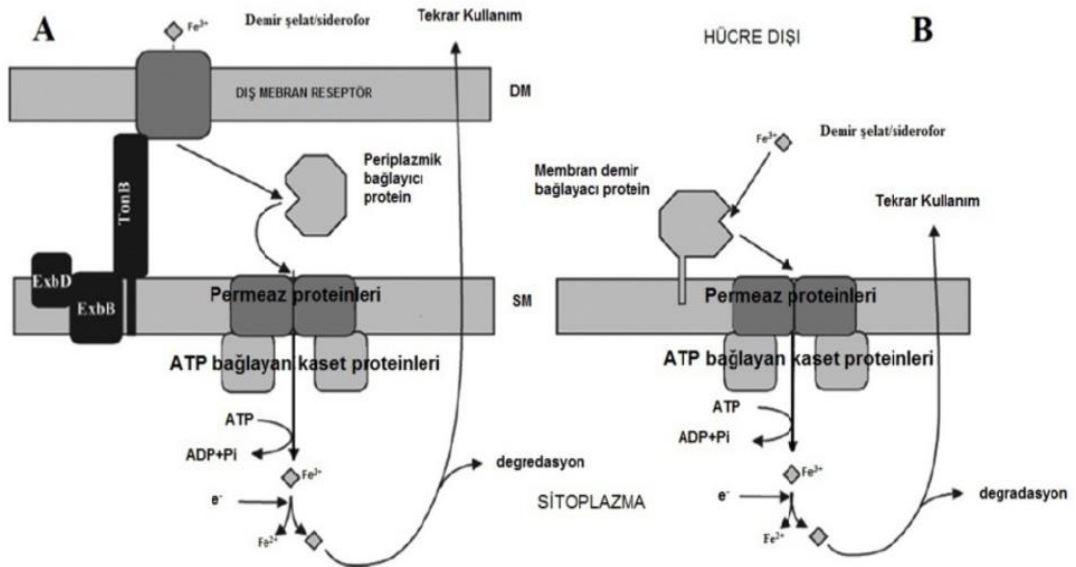


Toprak mikroorganizmalarının %20-40'ının fosfatı çözebildiği tahmin edilmektedir ve bunların önemli bir kısmı rizosfer toprağından izole edilen bakterilerdir (Goswami vd, 2016). *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Cryseobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* ve *Serratia* gibi cinsler fosfatı bitkiler için çözünür hale getirirler (Solano vd, 2008; Gupta vd, 2015).

Topraktaki mevcut PGPR, fosforun kullanılmayan formunun bitkinin absorblayacağı forma dönüştürmek için farklı stratejiler kullanırlar. PGPR fosfatı, kompleks olan ya da organik asit anyonları, protonlar, hidroksil iyonları, CO<sub>2</sub> gibi mineral çözen bileşikler salgılayarak; ekstrasellüler enzimlerin serbest bırakılması (biyokimyasal fosfat mineralizasyonu) ile ve substratın bozulması sırasında fosfatı serbest bırakarak (biyolojik fosfat mineralizasyonu) çözmektedir (Gupta vd, 2015).

#### 2.4.4. Siderofor üretimi

Demir bitkiler için esasi bir elementtir. Demir solunum, fotosentez ve nitrojen fiksasyonu gibi önemli fizyolojik olaylarda kofaktör olmasından dolayı, eksikliğinde metabolik olumsuzluklar oluşur (Solano vd, 2007). Demirin sınırlı olduğu koşullar altında PGPR'ler siderofor denilen düşük moleküler ağırlıklı bileşikler üretir (Compant vd, 2005) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. (A) Gram negatif ve (B) Gram pozitif bakteride siderofor aracılı demir alınımı (Andrews vd, 2003; Erdem, 2013)

Sideroforlar karakteristik fonksiyonel gruplarına göre hidrosomatlar, katekolatlar ve karboksilatlar olarak 3 ana aileye ayrılmaktadır. Şu an sideroforların 500'den fazla farklı tipi bilinmektedir ve 270'i yapısal olarak karakterize edilmiştir (Çizelge 2.4) (Boukhalfa vd, 2003; Ahmed & Holmström, 2014; Gupta vd, 2015). Bakteriyel sideroforların çoğu katekolatlar grubundandır (örneğin enterobaktin), bir kısmı karboksilat (örneğin rizobaktin) ve bir kısmı da hidrosomat (örneğin ferrioksamin B) grubu üyesidir (Matzanke, 1991; Ahmed & Holmström, 2014). Bakteriyel sideroforlardan ana fonksiyonel grupları karışık olan bazı örnekler de (örneğin piyoverdin) mevcuttur (Cornelis, 2010; Ahmed & Holmström, 2014).

Sideroforlar PGPR tarafından bitki gelişiminin artışında hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkilidir. Bakteriyel sideroforların bitki gelişimine direkt yararı, işaretli ferrik-sideroforların kullanımı ile (bitkide *Aeromonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* ve *Streptomyces* sp. gibi çok sayıda PGPR tarafından tek demir kaynağı olarak işaretli demirin alındığı ve aşıllı bitki ile karşılaştırıldığında klorofil seviyesinde artış) gösterilmiştir (Gupta, 2015).

Çizelge 2.4. Bazı bakteri ve fungusların ürettiği sideroforlar (Khan vd, 2014)

S.No	Sideroforlar	Üreten organizmalar
<b>1</b>	<b>Hidrosomat</b>	
A	Ferrikrom	<i>Ustilago sphaerogena</i>
B	Desferrioksamin B (deferoksamin)	
C	Desferrioksamin E	<i>Streptomyces coelicor</i>
D	Fusarinin C	<i>Fusarium roseum</i>
E	Ornibaktin	<i>Burkholderia cepacia</i>
<b>2</b>	<b>Katekolat</b>	
A	Enterobaktin	<i>Echerichia coli</i>
B	Basillibaktin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus anthracis</i>
C	Vibrioaktin	<i>Vibrio cholera</i>
<b>3</b>	<b>Karışık ligandlar</b>	
A	Azotobaktin	<i>Azotobacter vinelandii</i>
B	Piyoverdin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C	Yersiniabaktin	<i>Yersinia pestis</i>

Siderofor üreten rizobakteriler demir alınımını arttırmaları, antibiyotik moleküller salgılayarak diğer mikroorganizmaların gelişimini engellerler ve patojenler için mevcut demiri kısıtlayarak gelişimlerini engellerler. Örneğin funguslar genellikle demir-siderofor kompleksini absorblayamaz (Solano vd, 2008).

Sideroforların etkileri arasında nodülasyon, molibden ve vanadyum alımı sayesinde azot fiksasyonu, antibakteriyel potansiyel, asimilasyon, ağır metallerin alımı ve mobilizasyonu, biyo-kontrol ajanlar, biyopestisidler ve hayatta kalma becerisi sayılabilir (Ahemad & Khan, 2011).

Rizosfer bakterileri antibiyotik aktivitesi ve demir alımını arttıran bu bileşenleri bitkilerin rekabet güçlerini arttırmak için oluştururlar. Siderofor üreten bakteriler çoğunlukla *Pseudomonas* cinsine aittir, en yaygını piyoselin ve piyoverdin üreten *Pseudomonas fluorescens*'tir (Solano vd, 2008). Birçok çalışmada *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* ve *Streptomyces* cinslerine ait siderofor üreten bakteriler gösterilmiştir (Gupta vd, 2015).

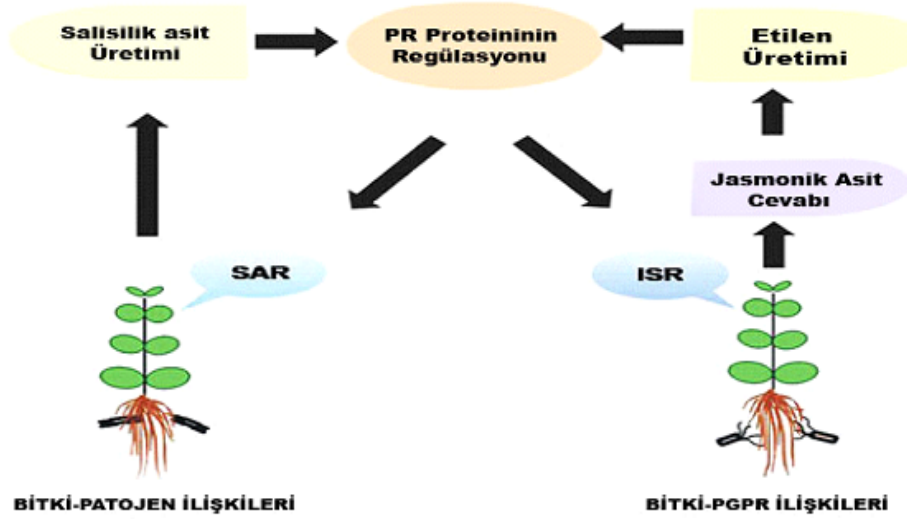
## **2.5. PGPR'lerin Bitki Gelişimindeki İndirekt Etki Mekanizmaları**

### **2.5.1. Uyarılmış sistemik dayanıklılık**

Uyarılmış sistemik dayanıklılık (ISR) denilen mekanizma sayesinde bazı bitki gelişimini arttırıcı rizobakteriler bitkide patojenlerin oluşturduğu hastalıkları azaltabilmektedirler (Van Loon vd, 1998).

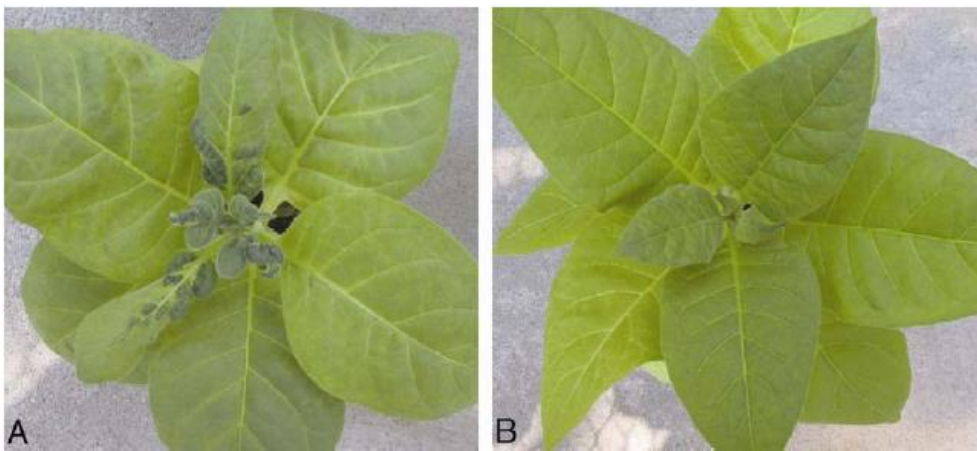
ISR, sistemik dayanıklılık kazanma (SAR) gibi farklı tipteki patojenlere karşı etkilidir, fakat uyarıcı PGPR'nin konak bitkide görülür semptomlara yol açmaması bakımından SAR'dan farklıdır (Compant vd, 2005). Bazı bakterilerin bitki kökleri ile ilişkisi sonucu bazı patojenik bakteri, fungus ve virüslere karşı direnç oluşur (Lugtenberg & Kamilova, 2009). PGPR ile tetiklenen ISR, bitki hücre duvarı dayanıklılığını arttırır ve bitkinin patojen ve/veya abiyotik stres faktörlerine karşı bitki savunma kimyasallarının sentezinin artmasına yol açarak bitkinin fizyolojik ve metabolik yanıtını değiştirir (Compant vd, 2005).

Patojen, bitkinin hormon (salisilik asit ve jasmonik asit) ve PR proteini üretmesini sağlamaktadır. Uyarılmış sistemik dayanıklılıkta patojen olmayan bir uyarıcı (PGPR) patojenleri etkisiz hale getirmek için bitkiyi uyarmaktadır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. ISR için sinyal yolları (Akhtar & Siddiqui, 2010)

Seçilmiş yararlı PGPR suşları birçok bitki patojenine karşı etkili olan bitki destekli ISR direncini harekete geçirir. Bu direnç önceden patojenle infekte olmuş bitkilerin infekte olmayan kısımlarının daha sonraki infeksiyona daha dirençli olduğu klasik patojen teşvikli dirence benzeyen bitki destekli bir mekanizmadır (Saharan & Nehra, 2011). ISR, ölümcül olabilen bakteriyel ön-inokulasyon olmadan bitkide patojen saldırılarına karşı dayanıklılık sağlar. Bugüne kadar, *Pseudomonas*, *Burkholderia* ve *Bacillus* spp.'nin ISR (uyarılmış sistemik dayanıklılık) sağladıkları gösterilmiştir (Şekil 2.13) (Kloepper vd, 2004). *Phaseolus vulgaris* ile *Pseudomonas putida* BTP1'in kök tedavisi, yapraklarda patojen *Botrytis cinerea*'nın neden olduğu hastalığın önemli ölçüde azalmasına yol açmaktadır (Tarkka vd, 2008).



Şekil 2.13. *Bacillus pumilus* SE34'ün tütünde *Cucumber mosaic virus*'e karşı ISR etkisi

Bazı PGPR üyelerinin parazitleri doğrudan öldürerek bitkinin patojen tarafından kolonize edilmesini önlediği bulunmuştur ve bu tip PGPR'lerin HCN, fenazinler, piyoluteorin ve pirolnitrin gibi antibiyotikleri ürettiği gösterilmiştir (Kang vd, 2010). PGPR'ler ayrıca ISR ile viral hastalıklara karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Çizelge 2.5) (Akhtar & Siddiqui, 2010).

Çizelge 2.5. Bitkide viral hastalıklar üzerinde PGPR'lerin etkileri

Virüsler	PGPR	Bitkide Etkisi	Kaynaklar
Tütün mozaik virüsü (TMV)	<i>Bacillus uniflagellatus</i>	Kültürlerdeki lezyonların azalması	(Mann, 1969)
Tütün nekroz virüsü (TNV)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	Tütündeki nekrozun azaltılması	(Maurhofer vd, 1994)
Hıyar mozaik virüsü (CMV)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Serratia marcescens</i>	CMV'ye karşı sistemik direncin teşvik edilmesi	(Raupach vd, 1996)
Domates beneklenme virüsü (ToMoV)	<i>B.subtilis</i> , <i>B.pumilus</i> , <i>B.amyloliquefaciens</i>	PGPR'lerle muamele ile hastalıkta azalma	(Murphy & Zehnder, 2000)
Hıyar mozaik cucumo virüsü (CCMV)	<i>B.subtilis</i> , <i>B.pumilus</i> , <i>B.amyloliquefaciens</i>	CCMV'ye karşı ISR oluşumu	(Zehnder vd, 2000)
Biber hafif leke virüsü (PMMoV)	<i>B.amyloliquefaciens</i>	Tütünde sistemik direncin teşvik edilmesi	(Ahn vd, 2002)

### 2.5.2. Antibiyoz

Antibiyoz 'antibiyotik ve benzeri metabolitler salgılayarak patojeni engellemek' şeklinde tanımlanabilir. PGPR'nin fitopatojenlere karşı en güçlü biyokontrol mekanizmalarından biri olduğu düşünülen antibiyoz, son yirmi yılda daha anlaşılır hale gelmiştir. Laboratuvar koşulları altında PGPR tarafından üretilen farklı tipte birçok antibiyotikğin bitki patojeni ajanlara karşı etkili olduğu gösterilmiştir. *Bacillus*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* spp. ve *Pseudomonas* tarafından üretilen bazı antibiyotiklere örnek olarak amfisin, 2,4-diasetilfloroglusinol (DAPG), hidrojen siyanür, oomisin A, fenazin, piyoluteorin, pirolnitrin, tensin, tropolon, oligomisin A, kanomisin, zwittermicin A, xanthobaccin verilebilir (Fernando vd, 2005; Compant

vd, 2005; Lugtenberg & Kamilova, 2009; Martinez-Viveros vd, 2010; Gupta vd, 2015; Parray vd, 2016).

### 2.5.3. Parazitizm/Predasyon

PGPR'ler patojenik fungusların hücre duvarını parçalayan hidrolitik enzimler üreterek oluşturdukları parazitizmi engellemeye çalışırlar. Bu enzimler arasında en önemlileri kitinaz ve glukanazdır. *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Streptomyces* spp. gibi birçok biyokontrol PGPR kitinaz sayesinde fungal hücre duvarını parçalayabilir. Şekil 2.14'de *Pseudomonas aeruginosa* BHUPSB01'in *Fusarium oxysporum*'a karşı ve *Pseudomonas putida* BHUPSB04'ün *Rhizoctonia solani*'ye karşı antogonistik aktivitesi görülmektedir (Verma vd, 2010). Bazı bakteri suşları kitinaz ve glukanaza ek olarak proteaz üretirler. *Pseudomonas fluorescens* fitopatojenik fungusların gelişimini önleyen 2,4-diaçil floroglusinol üretmektedir. *Pseudomonas stutzei*, *Fusarium solani*'nin miselyumlarını parçalayan kitinaz ve laminarinaz üretir. Bazı PGPR'ler de çiçeklerin solmasına (wilt) neden olan *Fusarium* spp. tarafından üretilen fusarik asiti parçalayarak hastalık gelişimini önlerler. *Bacillus subtilis* AF1, *Serratia marcescens* ve *Serratia plymuthica* kitinaz üreterek yüksek antifungal etki gösterirler. Glukanaz üreten *Burkholderia cepacia*suşu *Rhizoctonia solani*, *Serratia rolfsii* ve *Pythium ultimum* gibi funguslara karşı etkilidir (Compant vd, 2005; Lugtenberg & Kamilova; Martinez-Viveros vd, 2010; Verma vd, 2010; Quan vd, 2010).



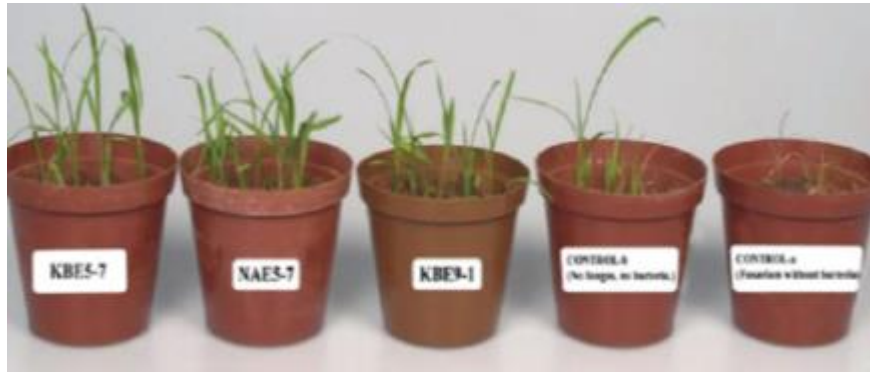
Şekil 2.14. *Pseudomonas aeruginosa* BHUPSB01'in *Fusarium oxysporum*'a karşı antogonistik aktivitesi (solda), *Pseudomonas putida* BHUPSB04'ün *Rhizoctonia solani*'ye karşı antogonistik aktivitesi (sağda)

#### 2.5.4. Rekabet

PGPR kök salgılarında mevcut sınırlı besin için ve uygun kolanizasyon için zararlı mikroorganizmalar ve patojenlerle rekabet eder. Bu mekanizma beslenmeye ilişkin yetenekleri ve rizosferdeki yüksek gelişme oranları nedeniyle daha çok floresan pseudomonadlar tarafından kullanılır. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*'nın hastalık oluşturan suşların gelişimini engellediği bulunmuştur. *Pseudomonas* WCS358 tarafından demir için siderofor-aracılı rekabet sayesinde turpta *Fusarium*'un neden olduğu solgunluğu baskılamaktadır. Bazı PGPR üyeleri parazitleri doğrudan öldürerek bitkinin patojen tarafından kolonize edilmesini önlerler. Bu tip PGPR'lerin HCN, fenazinler, piyoluteorin ve pirolnitrin gibi antibiyotikleri ürettiği gösterilmiştir. *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis*'in farklı suşları da biyokontrol ajan olarak kullanılmaktadır (Sindhu vd, 2010). Şekil 2.15'de *Sorghum* fidelerinde rizobakterilerle *Pythium ultimum*'un baskılanması, Şekil 2.16'de *Fusarium oxysporum*'a karşı *Bacillus* izolatları uygulanması ile gelişimin arttığı görülmektedir (Labuschagne vd, 2010).



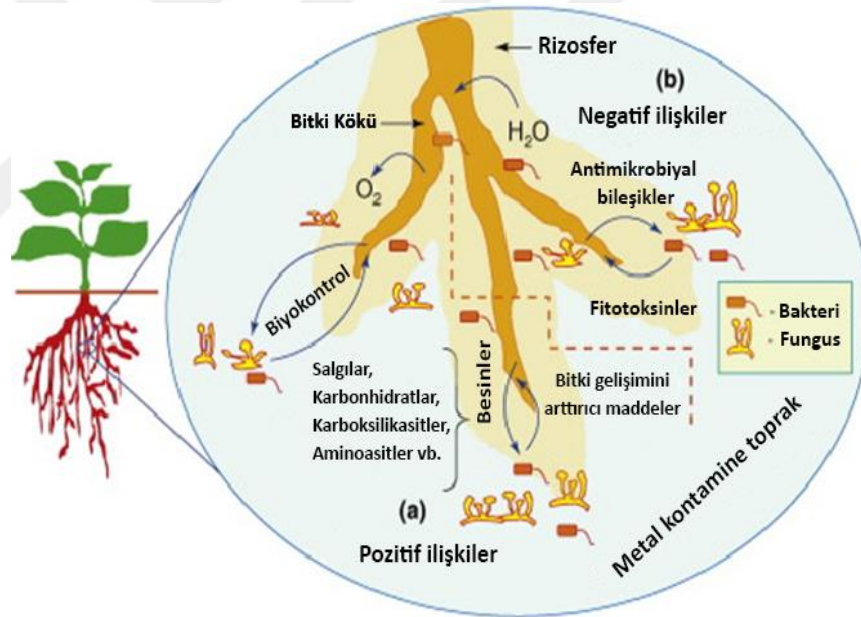
Şekil 2.15. *Sorghum* fidelerinde *Pythium ultimum*'un baskılanması



Şekil 2.16. *Fusarium oxysporum*'a karşı uygulanan *Bacillus* izolatları

## 2.6. Biyoremediasyonda PGPR'ler

Bitki gelişimini arttırıcı rizobakteriler organik kirleticilerin ya da ağır metallerin oluşturduğu etkilerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olmak için de kullanılabilirler (Şekil 2.17). Biyoremediasyon, çevreden kirleticilerin uzaklaştırılması ya da zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması için bakteri ve fungus gibi mikroorganizmaların kullanılmasıdır (Zhuang vd, 2007). Saksı ve sera denemelerinde *Arthrobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Rhodococcus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Variovorax paradoxus* (Belimov vd, 2005); *Pseudomonas fluorescens* (Gupta vd, 2005); *Bacillus* sp. ve *Pseudomonas* sp. (Rajkumar vd, 2006); *Azomonas* sp. RJ4, *Bacillus* sp. RJ31, *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp. RJ3RJ10 (Sheng & Xia, 2006) ve *Bacillus subtilis* SJ-101 (Zaidi vd, 2006) bakterilerinin kullanımının Pb-Zn, Ni, Cd, Hg gibi ağır metallerin bitkide oluşturdukları olumsuzlukları azalttıkları gözlemlenmiştir.



Şekil 2.17. PGPR'lerin biyoremediyal mekanizmaları (Ramprasad vd, 2014)

## 2.7. Biyogübre Olarak PGPR'ler

PGPR bitkinin N ve P alınımını arttırılmasında ve ürünlerin biyofertilizasyonunda önemli rol oynarlar. Bakteriyel inokulantlar tohum oluşumunu hızlandırarak, fide gelişiminde, stres faktörlerine karşı yanıt oluşturmada, bitkileri hastalıklardan korumada ve kök gelişiminde etkili olarak bitki gelişimini arttırırlar (Egamberdiyeva, 2007) (Çizelge 2.6).



Çizelge 2.6. Farklı bitki türlerinde PGPR'lerin inokülant ya da bakteriyel kültür olarak kullanıldığı toprak deneylerine örnekler (Souza vd, 2015)

Bitki	Deney koşulları	Mikroorganizma	PGP özelliği	Sonuçlar	Kaynaklar
Nohut <sup>1</sup>	Tarla: tohuma sıvı kültür uygulaması	<i>Pseudomonas jessenii</i> PS06, <i>Mesorhizobium ciceri</i> C-2/2	Azot fiksasyonu (C-2/2), fosfat çözme (PS06)	C-2/2' nin tekli ya da ikili inokülasyonunda, nodül sayısında ve azot salınımında artış olurken, PS06'ın bitki gelişimine önemli etkisi olmamıştır.	(Valverde vd, 2006)
Mısır	saksı ve tarla: tohuma sıvı kültür uygulaması	<i>Rhizobium</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> OSU-142, <i>B.megaterium</i> M-3	Azot fiksasyonu ( <i>Rhizobium</i> , OSU-142), biyokontrol aktivitesi (OSU-142, M-3), P-çözme (M-3)	Tarlada, <i>Rhizobium</i> içeren tüm karma uygulamalarda, <i>Rhizobium</i> ' un tek kullanımına göre daha iyi nodülasyon	(Elkoca vd, 2008)
	saksı: tohum ya da toprağa sıvı kültür uygulaması	<i>Burkholderia ambifaria</i> MCI7	Siderofor, antifungal aktivite	Tohum uygulamasında kontrole göre yeni sürgün artışı, toprakta sıvı kültür uygulaması ile bitki gelişiminde önemli ölçüde azalma	(Ciccillo vd, 2002)
	saksı: tohuma sıvı kültür uygulaması	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> PsA15, <i>Bacillus polymyxa</i> BcP26, <i>Mycobacterium phlei</i> MbP18	Azot fiksasyonu, antifungal aktivite (BcP26 ve MbP18), IAA (BcP26 ve MbP18)	Kök gelişimi ve köklerden N, K alınımını teşvik etme	(Egamberdiyeva, 2007)
Bezelye	saksı ve tarla: tohuma sıvı inokülant uygulaması	<i>A.brasilense</i> Ab-V5	Azot fiksasyonu, IAA	Killi toprakta saksı denemelerinde, Ab-V5 tam doz uygulandığında bitki gelişiminde artış. Tarlada, Ab-V5 ve N eklendiğinde sadece N eklenmesi ile karşılaştırıldığında, tahıl üretiminde artış	(Ferreira vd, 2013)
	Tarla: tohum ya da toprağa inokülant uygulaması	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Azot fiksasyonu	Toprağa uygulanan inokülant tohuma uygulanan inokülasyonla karşılaştırıldığında, üre-N ile ya da üre-N'siz, field pea'de N besin artışı	(Clayton vd, 2004)
	Saksı: tohuma sıvı kültür uygulaması	<i>P.fluorescens</i> ACC-5 (biyotip G) ve ACC-14, <i>P.putida</i> Q-7 (biyotip A)	ACC-deaminaz	ACC-5 suşu toprak neminin çok düşük seviyelerinde su kullanım etkinliğini büyük ölçüde artırır	(Zahir vd, 2008)
Yer fıstığı <sup>2</sup>	saksı ve tarla: tohuma sıvı kültür	<i>P.fluorescens</i> PGPR1, PGPR2 ve PGPR4	ACC-deaminaz, IAA, siderofor, antifungal aktivite	3 yıllık tarla denemelerinde kontrole karşılaştırıldığında	(Dey vd, 2004)

Çizelge 2.6. Farklı bitki türlerinde PGPR'lerin inokülant ya da bakteriyel kültür olarak kullanıldığı toprak deneylerine örnekler (devam)

Bitki	Deney koşulları	Mikroorganizma	PGP özelliği	Elde Edilen Sonuç	Kaynaklar
Pirinç	saksı ve tarla: fideye sıvı kültür uygulaması	<i>Azospirillum</i> sp. B510	Azot fiksasyonu, IAA	Tarla denemelerinde B510 ile inokülasyon filiz sayısında artış	(Isawa vd, 2010)
	Tarla: tohuma ve in-furrow'a sıvı inokülant uygulaması	<i>B.japonicum</i> SEMIA 5079 ve SEMIA 5080, <i>A.brasilense</i> Ab-V5 Ab-V6	Azot fiksasyonu, IAA	Tohumun rhizobia ile inokülasyonu %8,4, <i>A.brasilense</i> ile birlikte inokülasyonu in-furrow ortalama %16.1 ürün artışı	(Hungria vd, 2013)
	saksı: tohuma sıvı kültür uygulaması	<i>B.amyloliquefaciens</i> sks_bnj_1	Siderofor, ACC-deaminaz, IAA, antifungal aktivite, fitaz	Kontrolle karşılaştırıldığında rizosfer toprak özelliklerinde(enzim aktivitesi, IAA üretimi, mikrobiyal yanıt, mikrobiyal biomas-C) ve yer fıstığı tohumları ve samanda (straw) besin içeriğinde önemli oranda artış	(Sharma vd, 2013)
Şeker kamışı	saksı ve tarla: fideye sıvı kültür uygulaması	<i>B.vietnamiensis</i> MG43, <i>G.dizaotrophicus</i> LMG7603, <i>H.seropedicae</i> LMG6513	Azot fiksasyonu	MG43 inokülasyonu ile biyomas artışı tarlada %20'ye ulaşmış. 3 suşun inokülasyonu tek başına MG43'e göre daha az etkili olmuştur	(Govindarajan vd, 2006)
	tarla: gövde kesitine sıvı kültür uygulaması	<i>G.diazotrophicus</i> VI27	Azot fiksasyonu, IAA, siderofor, P-çözme	Bu suş kontrolle karşılaştırıldığında şeker kamışı sıvısında, çözünme miktarında ve çimlenmede önemli artış göstermiştir	(Beneduzi vd, 2013)
Buğday	Tarla: tohuma sıvı inokülant uygulaması	<i>A.brasilense</i> INTA Az-39	Azot fiksasyonu, IAA	Hem sürgün oluşumunda hem de kuru kök ağırlığında artış	(Diaz-Zorita & Fernandez-Canigia, 2009)
	Saksı: toprağa sıvı kültür	<i>B.subtilis</i> SU47, <i>Arthrobacter</i> sp. SU18	IAA, P-çözme	Farklı tuzluluk koşullarında PGPR ile inokülasyon ile kuru biyomasta ve çözünen şeker, prolin içeriğinde artış	(Upadhyay vd, 2012)
Buğday ve mısır	Tarla: tohuma sıvı inokülant uygulaması	<i>A.brasilense</i> Ab-V5 ve Ab-V6	Azot fiksasyonu, IAA	İnokülant uygulaması sonucu buğday ve mısırdaki ürün artışı	(Hungria vd, 2010)

<sup>1</sup>*Cicer arietinum* L.

<sup>2</sup>*Arachis hypogaea* L

## 2.8. Orkideler

*Orchidaceae* ailesi *Magnoliophyta* (*Angiospermae*) şubesine, *Liliopsida* sınıfına ve *Asparagales* takımına ait tek çenekli bitkilerdir. *Apostasioideae*, *Cypripoideae*, *Epidendroideae*, *Orchidoideae* ve *Vanillioideae* olmak üzere beş alt aile içerir (Haider vd, 2012). Orkideler -*Orchidaceae* Juss.- dünyada yayılış gösteren 26500'den fazla türüyle, angiospermlerin en büyük ailesidir (Silva vd, 2015).

Orkideler çok yıllık otsu bitkilerdir. Kuzeyde Alaska ve İsveç'ten güneyde Tierra del Fuego ve Macquarie Adaları'na kadar, soğuk veya kurak iklimler hariç, dünyanın her yerinde orkidelere rastlanabilmektedir Doğada yaşayan bu orkideler epifitik, terrestrial, litofitik, semiakuatik ve subterranean olabilirler. Ancak en yaygın olanları bir başka bitkinin üzerinde yani epifit olarak yaşayanlar ile terrestrial yani toprakta yaşayan orkidelerdir (Arı, 2000). *Cephalanthera* gibi bazı orkideler genellikle orman bitkileridir. *Himantoglossum* gibi bazı türler orman ve çalılıkların kenarlarında, ışığı bol olan arazilerde yaşarlar. Nemli çayırlarda *Orchis laxiflora*, *Serapias* gibi türler, kuru çayırlarda ise *Anacamptis pyramidalis* gibi türler yayılış gösterirler (Sezik, 1984).

Orkidelerin merak uyandıran uyum stratejileri arasında yüksek seviyede tozlaşma özelliği, çok küçük tohumlar ve çimlenmenin mikorizal funguslarla ilişkilerine bağlı olması sayılabilir. Orkideler (0.05-6mm) boyutunda ve (0.31-24 µg) ağırlığında olan, her bir tohum kapsülünde binlerce tohum bulunan, çok küçük tohumlar üretir (Tsavkelova, 2011). Orkidelerin diğer bitkilere göre özellikle tohumdan gelişmesi daha zordur. Söz konusu zorlukları çözmek üzere yapılan çalışmalar, orkidelerin neslini devam ettirebilmesi için çeşitli mikroorganizmalara (fungal ve bakteriyel organizmalar) ihtiyaç duyduğunu göstermiştir (Özkoç vd, 2014). Başarılı çimlenme ve tohum oluşturmaları tamamıyla mikorizalara bağlıdır (Özkoç, 1994). Küçük orkide tohumları endosperm oluşturmaz ve enerji ile besin desteğini simbiyotik fungustan sağlar (Tsavkelova, 2011).

Orkide-mikroorganizma ilişkileri, bitki dokusu içinde ve yüzeyde kolonize olan farklı fungal ve bakteriyel suşlar arasındaki etkileşimleri içermektedir. Bu ilişki besin desteğini garantileyen ve çevresel koşullara en iyi adapte olan en yararlı komüniteyi seçen bir mekanizmaya dayanmaktadır (Tsavkelova, 2011). Seçici faktörlerden biri, orkideler tarafından üretilen, patojenik fungus ve bakterinin

gelişimini engelleyen çeşitli antimikrobiyaller olabilmektedir (Stoessl & Arditti, 1984). Orkidelerin flavonoidler, alkaloidler, fenolik bileşenler ve metabolitler üreterek geleneksel farmakolojide antitümör, antikanser, antimikrobiyal, antiviral ve antifungal ilaç gibi kullandığı açıklanmıştır (Stoessl & Arditti, 1984; Singh & Duggal; 2009; Pant; 2013).

Orkide rizosferinden bitki gelişimini arttırıcı bakteri belirlenmesine yönelik çalışma yok denecek kadar azdır. Mevcut çalışmalarda orkidelerin köklerinden izole edilen bakterilerden bazıları *Acinetobacter*, *Aquaspirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Xanthomonas*, *Nocardia*, *Cellulomonas*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas* ve *Stenotrophomonas* cinslerine ait bulunmuştur (Tsavkelova vd, 2004; Tsavkelova vd, 2007a; Tsavkelova vd, 2007b; Galdiano Junior vd, 2011; Silva vd, 2015). Bu çalışmada yabancı orkidelerin kök ve rizosferinden bitki gelişimini arttırıcı yeni aday bakterilerin belirlenerek literatüre kazandırılması ve daha sonra yapılacak çalışmalara altyapı oluşturulması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Test bitkisinin seçimi ve alan çalışması

Test bitkisi olarak seçilen yabancı orkidelerin rizosferinden bitki gelişimini arttırıcı bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu için Samsun'un Ondokuzmayıs-Engiz, İncesu, Atakum-Kurupelit-OMÜ kampüsü, Bafra-Kızılırmak Deltası ile Ordu'nun Ünye İlçesi Cevizdere Köyü'nden 2013 ve 2014 yıllarında orkidelerin çiçeklenme zamanı olan Nisan-Haziran ayları arası ve Eylül-Ekim aylarında örnekleme yapıldı (Çizelge 3.1). *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich., *Himantoglossum caprinum* (M.Bieb.) Spreng., *Limodorum abortivum* L. Swartz, *Platanthera bifolia* (L.) L.C.Rich., *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* (Soó) Gözl & Reinhard, *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall., *Ophrys apifera* Huds., *Ophrys sphegodes* Mill., *Orchis coriophora* L., *Orchis laxiflora* LAM, *Orchis provincialis* Balb. ex Lam.& DC., *Orchis tridentata* Scop. orkide türlerine ait örnekler toplandı. Bitkilerin teşhisleri Flora of Turkey'e göre (Davis, 1965-1988) yapıldı.

Çizelge 3.1. Toplandığı yer ve tarihe göre orkideler

Orkide Adı	Toplandığı Yer	Tarih
<i>Orchis laxiflora</i>	Samsun-Ondokuzmayıs-Engiz	30.04.2013
<i>Orchis tridentata</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	03.05.2013
<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	10.05.2013
<i>Limodorum abortivum</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	10.05.2013
<i>Orchis provincialis</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	10.05.2013
<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	10.05.2013
<i>Spiranthes spiralis</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	13.05.2013
<i>Orchis laxiflora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	18.05.2013
<i>Orchis coriophora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	18.05.2013
<i>Orchis coriophora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	18.05.2013
<i>Orchis coriophora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	18.05.2013
<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	07.06.2013
<i>Ophrys sphegodes</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	10.06.2013
<i>Platanthera bifolia</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	10.06.2013
<i>Himantoglossum caprinum</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	14.06.2013
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	14.06.2013
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	14.06.2013
<i>Orchis coriophora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	24.06.2013

Çizelge 3.1. Toplandığı yer ve tarihe göre orkideler (devam)

Orkide Adı	Toplandığı Yer	Tarih
<i>Orchis coriophora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	24.06.2013
<i>Spiranthes spiralis</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	28.10.2013
<i>Spiranthes spiralis</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	28.10.2013
<i>Orchis tridentata</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	20.05.2014
<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	22.05.2014
<i>Limodorum abortivum</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	22.05.2014
<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Ordu-Ünye- Cevizdere Köyü	25.05.2014
<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Ordu-Ünye- Cevizdere Köyü	25.05.2014
<i>Himantoglossum caprinum</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	04.06.2014
<i>Platanthera bifolia</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	04.06.2014
<i>Ophrys apifera</i>	Samsun-Kurupelit-OMÜ Kampüs	04.06.2014
<i>Himantoglossum caprinum</i>	Samsun-Atakum-İncesu	09.06.2014
<i>Himantoglossum caprinum</i>	Samsun-Atakum-İncesu	09.06.2014
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Samsun-Atakum-İncesu	09.06.2014
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Samsun-Atakum-İncesu	09.06.2014
<i>Orchis coriophora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	18.06.2014
<i>Orchis coriophora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	18.06.2014
<i>Orchis coriophora</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	18.06.2014
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Samsun-Bafra-Kızılırmak Deltası	18.06.2014

Kök çevresindeki toprakla beraber toplanan orkideler plastik poşetlere konularak laboratuvara getirildi ve en geç 24 saat içinde izolasyonları yapıldı.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Rizosfer toprağından (ektorizosfer) bakterilerin izolasyonu

- Kök çevresindeki rizosfer toprağı laboratuvar koşullarında iyice kurutuldu ve daha sonra 0,2 mm delik çapına sahip elekten geçirildi.
- Elenmiş 10 gram toprak örneğı 90 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içinde oda sıcaklığında 2 saat çalkalandı.
- İçinde 9 ml %0.85 NaCl (serum fizyolojik) bulunan tüplere çalkalanan süspansiyondan 1 mL eklenerek seyreltme serileri hazırlandı.
- $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$  seyreltmelerden 100 µl alınıp 3 tekrarlı olarak seçici besiyerlerine ekimler yapıldı. Bakterilerin izolasyonu için King B, Nutrient agar, Triptik soy agar (TSA) ve M9 minimal besiyeri ortamları kullanıldı.

- Petriler 28°C'de 3 gün inkübe edildi. Farklı morfolojik gelişme gösteren kolonilerden saflaştırma yapıldı (Bashan vd, 1993; De Freitas vd, 1997; Mirik, 2005; Bafana, 2012).
- Saflaştırılan bakteri örnekleri % 20'lik gliserollü stoğa alınarak -20°C'de saklandı.

### 3.2.2. Kökten (endorizosfer ve rhizoplaneden) bakterilerin izolasyonu

- Bitki kökleri akan musluk suyunda yıkandı.
- Sırasıyla %70'lik etanolde 1 dakika, sodyum hipoklorit solüsyonunda (%2 Cl olan) 5 dakika, %70'lik etanolde 30 saniye bekletildi.
- Steril distile su ile 2 kez yıkama yapılarak havanda homojenize edildi.
- Homojenattan bir öze dolusu alınıp seçici besiyeri petrisine (King B, Nutrient agar, M9 minimal besiyeri, TSA) aşılandı.
- Sterilizasyon yönteminin başarılı olduğunu doğrulamak için yıkama yapılan son distile sudan da besiyerine aşılama yapıldı.
- Petriler 28°C'de 3 gün inkübe edilerek gelişme takip edildi ve morfolojik olarak farklı olan koloniler seçildi. Aynı besiyerine tekrarlı ekilerek saf kültür elde edildi (Bashan vd, 1993; Araujo vd, 2002; Bafana, 2012).
- Saflaştırılan bakteri örnekleri % 20'lik gliserollü stoğa alınarak -20°C'de saklandı.

### 3.2.3. Fosfatı çözünür hale getirme

Fosfat çözme yeteneklerinin belirlenmesi için bakteriler % 0.5 trikalsiyum fosfatlı Pikovskaya (PVK) agar besiyerine (Pikovskaya, 1948) ekildi. 28°C'de 5 gün inkübasyon sonucunda bakterilerin petrilerdeki gelişimleri değerlendirildi. Bakteri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf zon varlığı fosfat çözünürlüğü aktivitesini göstermektedir (Fürnkranz vd, 2009; Faria vd, 2012; Jarak vd, 2012; Rathaur vd, 2012).

### 3.2.4. ACC deaminaz aktivitesi

ACC (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit) deaminaz enzimi aktivitesini belirlemek için Brown & Dilworth (BD) Minimal Besiyeri (Brown ve Dilworth, 1975) kullanıldı. Besiyeri otoklavlanıp 50°C'ye soğutulduğunda ACC (0.3033 g L<sup>-1</sup>;

Husen vd, 2009) ve vitamin solüsyonu (1 ml L<sup>-1</sup>) filtreden geçirilerek eklendi. Tüm izolatlar ACC eklenmiş ve ACC eklenmemiş Brown & Dilworth minimal besiyerine ekildi. 5 gün oda sıcaklığında geliştirildi ve 5 gün sonunda gelişimleri değerlendirildi. ACC eklenmeyen besiyerleri ile karşılaştırıldığında, ACC eklenmiş BD ortamında yüksek oranda gelişim gösterenler ACC deaminaz üreten bakteri olarak belirlendi (Kuffner vd, 2008; Fürnkranz vd, 2009; Husen vd, 2009; Gasser vd, 2011).

### 3.2.5. IAA üretimi

İndol-3-asetik asit (IAA) üreten bakteriler (Brick vd, 1991)'de tanımlanan kolorimetrik metot kullanılarak test edildi. Bakteri izolatları, indol asetik asitin öncülü L-Triptofan (1 g L<sup>-1</sup>) eklenmiş, 5 ml Luria Bertani Broth (LB) kültür ortamı içeren test tüplerine ekildi. 28°C'de 3 gün boyunca 150 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. 1,5 ml homojenize kültür mikrotüplere transfer edilip 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanttan ve saf IAA ile 10-100 µg/ml arasında (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/ml) oluşturulan standartlar ve kör (blank) olarak salkowski ayracından 90 µl alınıp mikropate'lere aktarıldı ve üzerine 60 µl Salkowski ayracı (1 ml 0,5 M FeCl<sub>3</sub> ve 50 ml %35 HClO<sub>4</sub>) eklendi. Mikropate 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Kırmızı-pembe renk oluşumu IAA üretimini göstermektedir. 492-630 nm arasında mikropate okuyucuda (ChroMate Microplate Reader) absorbansları ve konsantrasyonları ölçüldü. Kör ve standartlara göre ölçülen konsantrasyon değerleri, IAA ürettiği bilinen ve test edilen örneklerle aynı işlemlere tabi tutulan *Serratia plymuthica* HRO-C48 (e-nema GmbH, Almanya) suşunun konsantrasyon değerleri ile de karşılaştırılarak değerlendirildi (Tsavkelova vd, 2007a; Fürnkranz vd, 2009; Silva vd, 2012).

### 3.2.6. Siderofor üretimi

Elde edilen bakterilerin siderofor üretimini test etmek için 'CAS (Chrome azurol Sulfonate) agar plate' yöntemi kullanıldı (Schwyn & Neilands, 1987). Bakteri örnekleri Luria Bertani Broth besiyerinde 180 rpm'de 1 gün üretildi. 10 µl bakteri kültürü CAS agar besiyerine nokta ekimi ile ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Mavi-yeşil renkteki CAS agar besiyerinde bakteri kolonilerin etrafında sarı veya



turuncu renk oluşması siderofor üretimi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Shin vd, 2001; Demir vd, 2008; Louden vd, 2011; Garcia vd, 2012; Sreedevi vd, 2014).

### 3.2.7. Seçilen PGPR Adaylarından DNA İzolasyonu

Aday PGPR olarak seçilen bakterilerden DNA izolasyonu yapmak için High Pure Template Preparation Kit (Roche) kullanıldı. Kit kılavuzunda belirtilen aşamalar uygulanarak bakteri DNA'ları elde edildi.

- Sıvı besiyerinde üretilmiş bakteri kültüründen 1000 µl alınıp 1,5 ml'lik nükleaz-içermeyen mikrotüplere aktarıldı. 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı döküldü, dipteki bakteri peletleri üzerine 200 µl PBS ilave edilerek çözümleri sağlandı.
- Üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K ilave edilip karıştırıldı. (Eğer Gram (+) bakteri ise bu işlemde önce hücre duvarını lizis etmek için 15 µl lizozim eklendi (Tris-HCl içinde 10 mg/ml, pH 8.0) ve 15 dakika 37°C'de inkübe edildi).
- 70°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 100 µl izopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
- Oluşan karışım filtreli tüplere aktarılıp 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpü atılarak filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne konuldu.
- Üzerine 500 µl İnhibitör Removal Buffer eklenerek 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Filtreli tüp yeni toplama tüpüne konuldu ve 500 µl Wash buffer eklenerek 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler temiz 1,5 ml'lik tüplere konuldu, 200 µl Elution Buffer eklenerek 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Aynı gün çalışılan örnekler +4°C'de, daha sonra çalışılanlar ise -20°C'de saklandı.

PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) işlemi öncesinde agaroz jel elektroforeziyle DNA varlığı kontrol edildi. Bunun için hazırlanan % 1'lik agaroz jel dondurulduktan sonra, içinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. İzole edilmiş DNA ürünleri jeldeki kuyucuklara yüklendi (1,7 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl 6X DNA yükleme tamponu, 0,3 µl GelRed ve 3 µl DNA) ve 80 voltta yürütülerek UV translüminatörde görüntülendi.

### 3.2.8. PGPR Adaylarının Dizi Analizlerinin Yapılarak Tanımlanması

ThermoScientific marka kit bileşenleri ile fd1(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') ve rd2(5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') 16S rDNA primerleri (İnvitrogen) kullanılarak PCR karışımı hazırlandı (Çizelge 3.2). Elde edilen DNA'lar bu karışıma eklendi ve 16S rDNA kodlayan bölge MGW-Biotech (Almanya) termal cyler cihazında çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi için uygulanan PCR protokolü basamakları: 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye primerlerin bağlanması, 72°C'de 1 dakika primerlerin uzaması olacak şekilde 35 döngü ve 72°C'de 5 dakika son uzama basamağı olarak uygulandı.

Çizelge 3.2. PCR karışımı bileşenleri

PCR Karışımı	1 örnek (µl)
H <sub>2</sub> O	36,75
PCR Buffer (10x)	5
Mg <sup>+2</sup> (25)	3
dNTP	1
Forward Primer (fd1)	1,5
Reverse Primer (rd2)	1,5
Taq Polimeraz	0,25
DNA	1
Toplam	50

Çoğaltılan PCR ürünleri saflaştırılma ve DNA dizileme işlemi için Macrogen Inc. (Hollanda) firmasına gönderildi. Macrogen Inc.'den gelen diziler Chromas Lite 2.1 programında kontrol edilip BioEdit Sequence Alignment Editor programında birleştirildi. Birleştirilen diziler BLAST programı ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanındaki dizilerle karşılaştırılarak analiz edildi ve % benzerlikler belirlendi.

### 3.2.9. Filogenetik Analizlerin Yapılması

Aday PGPR seçilen örneklerin 16S rDNA gen dizilerine yakın benzerlik gösteren diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından indirilerek filogenetik analizler için veri seti oluşturuldu (Çizelge 3.3). Veri seti oluşturulduktan sonra diziler ClustalX 2.0.12 (Thompson vd, 1997) programı ile hizalandı. Filogenetik ağaçlar, MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 6.06 programında (Tamura vd, 2013) Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987)

algoritması ile Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980) kullanılarak oluşturuldu. Oluşturulan filogenetik ağaçların güvenilirliklerini belirlemek için 10000 tekrarlı bootstrap analizleri yapıldı, % 50'nin üzerinde desteklenen düğümler ağaçlarda belirtildi.

Çizelge 3.3. Veri setindeki kısmi 16S rDNA dizilerinin NCBI erişim numaraları

İzolat	İlişkili Olduğu Bakteri	Accession No
HA-59	<i>Agrobacterium</i> sp.	KR081269
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AF114	LC015594
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LM6-1	KM884893
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Y36	KF730752
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AB749228
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	JN628031
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NGB-SR 7	AB571230
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> XjGEB-58	JQ320093
HA-59	<i>Rhizobium</i> sp. XjGEN-53	JQ320092
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> PR12	KJ870024
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NGB-SR19	AB825999
HA-59	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KK5	KF975413
HA-59	<i>Rhizobium</i> sp. LS-079	KF870446
HA-37	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	LN995703
HA-37	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	KP762556
HA-37	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	KJ767372
HA-37	<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	FN600413
HA-37	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	KP762560
HA-37	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	KJ767370
HA-37	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	KJ870042
HA-38	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	KP762558
HA-38	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IHB	KP762557
HA-38	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	HQ242742
HA-38	<i>Acinetobacter</i> sp. YP11	KF719294
HA-38	<i>Acinetobacter</i> sp. CT3-6	KC355337
HA-38	<i>Acinetobacter</i> sp. B2	KP137409
HA-38	<i>Acinetobacter</i> sp. D59	KM488466
HA-13	<i>Bacillus</i> sp.	KF740308
HA-13	<i>Bacillus</i> sp.	JN695705
HA-13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	LN890196
HA-13	<i>Bacillus toyonensis</i>	KJ870041
HA-17	<i>Bacillus</i> sp.	KT318615
HA-17	<i>Bacillus cereus</i>	KT922033
HA-17	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KJ767310
HA-50	<i>Bacillus simplex</i>	KU170605
HA-50	<i>Bacillus</i> sp.	KP267844
HA-62	<i>Bacillus cereus</i>	GU568201

Çizelge 3.3. Veri setindeki kısmi 16S rDNA dizilerinin NCBI erişim numaraları (devam)

İzolat	İlişkili Olduğu Bakteri	Accession No
HA-62	<i>Bacillus</i> sp.	LN680102
HA-62	<i>Bacillus cereus</i>	GU568207
HA-67	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KU983835
HA-67	<i>Bacillus</i> sp.	KJ789110
HA-104	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KU242746
HA-104	<i>Bacillus anthracis</i>	KM888109
HA-112	<i>Bacillus</i> sp.	KM887993
HA-112	<i>Bacillus</i> sp.	JF738144
HA-112	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KT895835
HA-25	<i>Pseudomonas</i> sp.	FN547413
HA-25	<i>Pseudomonas</i> sp.	JN228314
HA-25	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KR054991
HA-25	<i>Pseudomonas</i> sp.	JX458422
HA-53	<i>Pseudomonas fluorescens</i> MFAF6a	KT350501
HA-53	<i>Pseudomonas baetica</i>	KF580860
HA-53	<i>Pseudomonas</i> sp. YP9	KP326358
HA-53	<i>Pseudomonas baetica</i>	KC139413
HA-53	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC884675
HA-53	<i>Pseudomonas</i> sp.	KJ781911
HA-53	<i>Pseudomonas</i> sp.	KM186980
HA-55	<i>Pseudomonas jessenii</i>	HM068366
HA-55	<i>Pseudomonas</i> sp. YP9	KP326358
HA-55	<i>Pseudomonas fluorescens</i> MFAF6a	KT350501
HA-82	<i>Pseudomonas putida</i>	KJ586275
HA-82	<i>Pseudomonas</i> sp.	KR088654
HA-64	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SM59	KU693283
HA-64	<i>Xanthomonas retroflexus</i> K-3	JQ890537
HA-64	<i>Pseudomonas geniculata</i> IARI-HHS1-19	KF054771
HA-64	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 2NR15	AB908113
HA-64	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 262XG3	KF818622
HA-64	<i>Stenotrophomonas</i> sp. PP3	KC997228
HA-64	<i>Pseudomonas geniculata</i> RTAE39	KX530780
HA-64	<i>Stenotrophomonas</i> sp. D12B	KX527653
HA-64	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SM59	KU693283
HA-64	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D13	KM488438
HA-64	<i>Pseudomonas geniculata</i> MD 05	KC247683
HA-64	<i>Pseudomonas geniculata</i> JS19	HQ857772
HA-64	<i>Xanthomonas</i> sp. HNR04	EU373342
HA-64	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CanL-48	KT580575
HA-64	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LWJ3	KT932956
HA-86	<i>Paenibacillus</i> sp.	KT461879
HA-86	<i>Paenibacillus</i> sp.	FR727721

Çizelge 3.3. Veri setindeki kısmi 16S rDNA dizilerinin NCBI erişim numaraları (devam)

İzolat	İlişkili Olduğu Bakteri	Accession No
HA-86	<i>Paenibacillus</i> sp.	FR874235
HA-86	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	KM272757
HA-86	<i>Paenibacillus</i> sp.	JF768728
HA-86	<i>Paenibacillus pabuli</i>	KM378614
HA-86	<i>Paenibacillus</i> sp.	JQ513855
HA-121	<i>Lysinibacillus</i> sp.	KR493009
HA-121	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	NR112628
HA-121	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	LK391674
HA-121	<i>Bacillus</i> sp.	KJ733983
HA-121	<i>Lysinibacillus</i> sp.	KR072668
HA-121	<i>Bacillus muralis</i>	JN082264
HA-121	<i>Bacillus simplex</i>	KM888120
HA-121	<i>Bacillus simplex</i>	KM817245

### 3.2.10. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

#### 1X PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g

Belirtilen kimyasallar tartılarak içinde 800 ml distile su bulunan behere eklendi. Manyetik karıştırıcı ile çözdürüldü, ortam pH'sı 7,4'e ayarlanıp 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı (Sambrook & Russell, 2001).

#### Nutrient Agar Besiyeri

Glukoz	1 g
Pepton	15 g
NaCl	6 g
Maya ekstraktı	3 g
Agar	15 g

Tartılan kimyasallar 800 ml distile su içinde çözdürüldü. Ortam pH'sı 7,5'e ayarlanıp karışım 1000 ml'ye tamamlandı ve 121°C'de, 1 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlandı (Sigma-Aldrich). Otoklavlanan besiyerinin steril petrilere dökülerek donması sağlandı.

#### KB Besiyeri

Pepton	20 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
Gliserol	10 g
Agar	15 g

Kimyasal maddeler yukarıda belirtilen ölçülerde tartıldı. 800 ml distile su içinde çözümleri sağlandı ve pH 7,1'e ayarlandıktan sonra ortam 1000 ml'ye tamamlandı. Karışım 121°C'de, 1 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlandı. Steril petrilere dökülerek besiyeri donduruldu (King vd, 1954).

#### 5X M9 Minimal Besiyeri

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	0,6 g
NH <sub>4</sub> Cl	20 g
Glukoz	5 g
Agar	15 g

800 ml distile su içeren beher içinde kimyasallar çözdürülerek pH 7,4'e ayarlandı. 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra 121°C'de, 1 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlandı. Steril petrilere dökülerek besiyeri donduruldu (Sambrook vd, 1989).

#### Salkowski Ayracı

0,5 M FeCl <sub>3</sub>	1 ml
% 35 HClO <sub>4</sub>	50 ml

0,5 M FeCl<sub>3</sub> elde etmek için 1,35 g FeCl<sub>3</sub> 10 ml suda çözdürüldü ve hazırlanan 0,5 M FeCl<sub>3</sub> solüsyonundan 1 ml alınıp 50 ml % 35'lik HClO<sub>4</sub> içine yavaşça eklendi (Gordon & Weber, 1951).

#### EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)

0,5 M EDTA çözeltisi hazırlamak için 18,61 g EDTA 80 ml distile suda çözdürüldü ve NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı. Karışım 100 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı (Sambrook & Russell, 2001).

#### Brown&Dilworth (BD) Minimal Besiyeri

Nikotine acid	10 mg
Thiamine-HCl	10 mg
Biotin	10 mg
Ca-panthotenate	10 mg
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

Vitamin solüsyonu hazırlamak için yukarıda yazılı kimyasal maddeler tartılıp 100 ml distile su içinde karıştırıldı. 2 ml'lik mikrotüplere 1 ml alikotlanarak -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

KNO <sub>3</sub>	0,7 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
NaCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,36 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4 g
FeCl <sub>3</sub>	6,6 mg
EDTA	0,15 mg
Agar	15 g
Vitamin solüsyonu	1 ml
ACC	0,30 g

Belirtilen kimyasal maddeler 800 ml distile su içinde çözdürüldü. pH 7.0'a ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de, 1 atmosfer basınçta 20

1 dakika otoklavlandı. 50 °C'ye soğuduğunda vitamin solüsyonu filtreden geçirilerek besiyerine eklendi. ACC deaminaz aktivitesini test etmek için, ACC eklenmiş BD besiyeri hazırlanırken yukarıda yazılı kimyasallar 1000 ml distile suda hazırlanıp otoklavlandıktan sonra besiyeri 50 °C'ye soğuduğunda 1 ml vitamin solüsyonu ve 0,3033 g ACC filtreden geçirilerek eklendi (Brown & Dilworth, 1975). Steril petrilere dökülerek donduruldu.

### GelRed

Stok GelRed (Biotium) distile su ile 1/20 oranında sulandırılarak kullanıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

### 10X TBE (Tris Borat EDTA) Tamponu

Borik asit	55 g
Trizma base	108 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	40 ml

1000 ml distile su içinde borik asit, trizma base ve 0,5 M EDTA (pH 8.0) yukarıda belirtilen miktarlarda eklenip çözdürülüp 20 dakika otoklavlandı (Maniatis vd, 1982). Solüsyon oda sıcaklığında saklandı. 1X TBE elde etmek için karışım 1/10 oranında sulandırılarak kullanıldı.

### Luria Bertani Broth (LB) Lennox Besiyeri

Tripton	10 g
NaCl	5 g
Maya ekstraktı	5 g
L-Triptofan	1 g

800 ml içinde kimyasallar belirtilen oranlarda eklenerek çözdürüldü. pH 7.2'ye ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan karışım kapaklı tüplere 5 ml olarak eklendi ve 20 dakika otoklavlandı (Bertani, 1951).

### Pikovskaya Agar Besiyeri

Glukoz	10 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g



$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
NaCl	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
KCl	0,2 g
Maya ekstraktı	0,5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0001 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0001 g

Kimyasal maddeler belirtilen miktarda tartılıp 800 ml distile su içinde çözdürüldü, pH 7.0'a ayarlandı. 1000 ml'ye tamamlanıp 20 dakika otoklavlandı ve petrilere döküldü (Pikovskaya, 1948).

#### CAS (Chrome Azurol S) Agar Besiyeri

CAS	0,06 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0027g
HDTMA	0,073 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15 g
NaCl	25 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	50 g
Glukoz	20 g
NaOH	25 g
Casamino acid	3 g
PIPES	32,24 g

Mavi Boya Solüsyonu hazırlamak için:

Solüsyon 1: 0,06 g CAS 50 ml ddH<sub>2</sub>O içinde çözdürüldü.

Solüsyon 2: 0,0027 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 ml 10 mM HCl içinde çözdürüldü.

Solüsyon 3: 0,073 g HDTMA 40 ml ddH<sub>2</sub>O içinde çözdürüldü.

Solüsyon 1 ile 9 ml Solüsyon 2 karıştırıldı, sonra Solüsyon 3 eklendi. 15 dakika otoklavlandı. Oluşan karışım mavi renkte olmalıdır.

MM9 (Minimal Media 9) Tuz Solüsyon Stok: 15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 g NaCl ve 50 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  500 ml distile su içinde çözdürüldü. pH 6.8'e ayarlandı.

% 20 Glukoz Stok: 20 g glukoz tartılıp 100 ml distile suda çözdürüldü. Filtre ile steril edildi.

NaOH Stok: 25 g NaOH tartılıp 150 ml distile su içinde çözdürüldü. pH 12 civarında olmalıdır.

Casamino Asit Solüsyonu: 3 g casamino asit tartılıp 27 ml distile su içinde çözdürüldü. Filtre ile steril edildi.

750 ml su içine 100 ml MM9 solüsyonu eklendi. 32,24 g PIPES (piperazine-N,N'-bis 2- ethanesulfonic acid) pH 6,8'e ayarlanarak çözdürüldü ve üzerine eklendi. 15 g Bacto agar eklenip otoklavlandı ve 50 °C'ye soğutuldu. 30 ml steril casamino asit ve 10 ml steril % 20 glukoz solüsyonu, MM9/PIPES karışımına eklendi. 100 ml 'Mavi Boya solüsyonu' yavaşça hazırlanan karışıma eklendi (Schwyn & Neilands, 1987; Shin vd, 2001; Demir vd, 2008; Louden vd, 2011; Garcia vd, 2012; Sreedevi vd, 2014).

#### TSA Besiyeri

Kazein pepton	15 g
Soy pepton	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

Kimyasal maddeler tartıldı ve 800 ml içinde çözdürüldü. pH 7.3'e ayarlanıp 1000 ml'ye tamamlandı (Thermo Sicientific). Otoklavlanıp petrilere döküldü.

#### %70'lik Etanol

100 ml % 70'lik etanol hazırlamak için, 70 ml saf etanol ve 30 ml distile su karıştırıldı.

#### Gliserol stok (% 20)

%80'lik gliserol	250 µl
Bakteri kültürü	750 µl

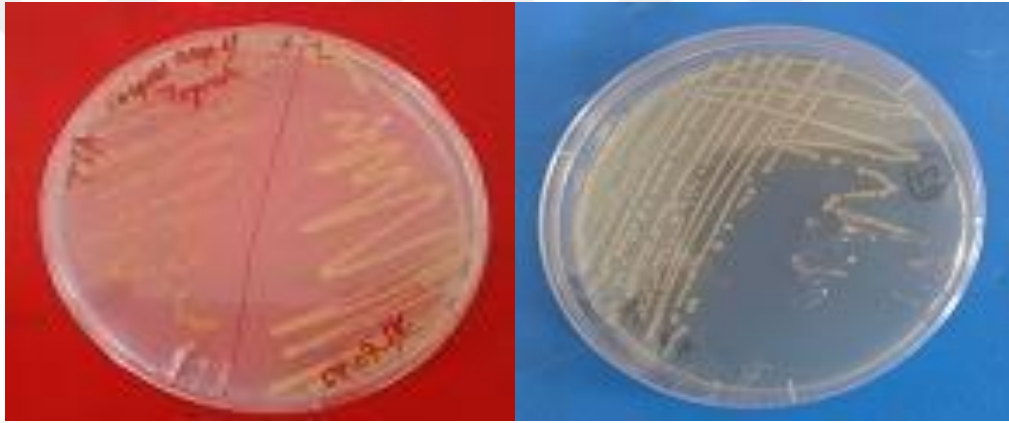
250 ml %80'lik gliserol ve sıvı besiyerinde üretilmiş 750 ml bakteri kültürü karıştırılıp steril vidalı kapaklı tüplere eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat bekletilen gliserol stok -20°C'de derin dondurucuda saklandı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Orkide Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

2013 ve 2014 yıllarında örnekleme yapılan *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich., *Himantoglossum caprinum* (M.Bieb.) Spreng., *Limodorum abortivum* L. Swartz, *Platanthera bifolia* (L.) L.C.Rich., *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* (Soó) Gözl & Reinhard, *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall., *Ophrys apifera* Huds., *Ophrys sphegodes* Mill., *Orchis coriophora* L., *Orchis laxiflora* LAM, *Orchis provincialis* Balb. ex Lam. & DC. ve *Orchis tridentata* Scop. türlerinden (Çizelge 4.1) toplam 111 bakteri izole edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İzole edilen bakteriler

Çizelge 4.1. Orkide türlerden elde edilen bakteriler

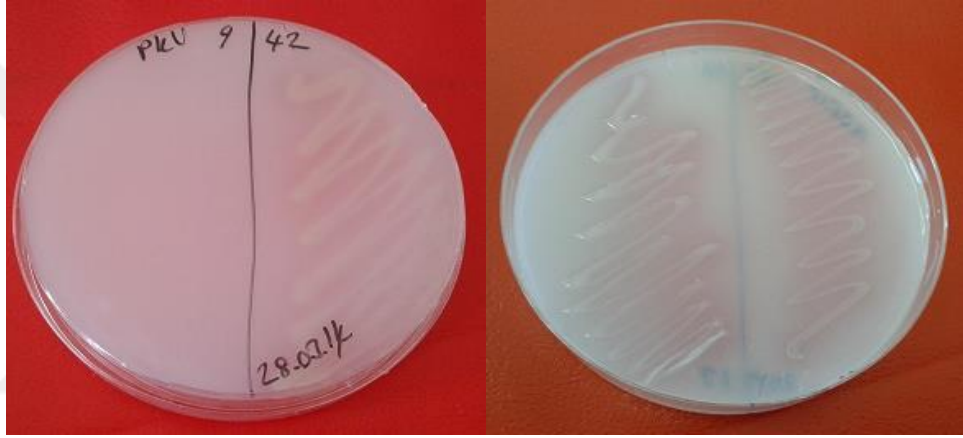
Orkide Adı	Örnek Sayısı	İzole Edilen Bakteri
<i>Orchis laxiflora</i>	2	8
<i>Orchis tridentata</i>	2	7
<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	6	16
<i>Limodorum abortivum</i>	2	6
<i>Orchis provincialis</i>	1	1
<i>Ophrys apifera</i>	1	3
<i>Orchis coriophora</i>	8	22
<i>Ophrys sphegodes</i>	1	5
<i>Platanthera bifolia</i>	2	5
<i>Himantoglossum caprinum</i>	4	19
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	5	15
<i>Spiranthes spiralis</i>	3	4
TOPLAM	37	111

## 4.2. Aday PGPR İzolatlarının Seçimi

### 4.2.1. Fosfatı çözümlü hale getirme

Fosfatı çözme özelliğini test etmek için Pikovskaya agar (%0.5 trikalsiyum fosfatlı) besiyerine ekilen 111 bakteriden 65'inin fosfatı çözdüğü gözlemlendi (Çizelge 4.2). Fosfatı çözdüğü belirlenen 65 izolattan 28'si rizosfer toprağından izole edildi.

Petride şeffaf zon oluşması bakterinin fosfatı çözdüğünü göstermektedir. Şekil 4.2'te görüldüğü gibi PKV besiyerinde *Platanthera bifolia*'dan izole edilen HA-42 bakterisi fosfatı çözme özelliği gösterirken, *Orchis tridentata*'dan izole edilen HA-9 örneğinin fosfatı çözümlü hale getirme özelliği negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.2. Pikovskaya besiyerinde fosfat çözümlülüğü gösteren bakteriler

Çizelge 4.2. Fosfat çözümlülüğü sonuçları

	İzolat	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	Fosfatı Çözme
1	HA-1	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	-
2	HA-3	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	-
3	HA-4	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	+
4	HA-5	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	++
5	HA-6	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	+
6	HA-7	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	++
7	HA-8	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	-
8	HA-10	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	+
9	HA-11	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
10	HA-12	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	-
11	HA-13	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	+
12	HA-14	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	-
13	HA-15	<i>Orchis provincialis</i>	Kök	-
14	HA-16	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	+

Çizelge 4.2. Fosfat çözünürlülüğü sonuçları (devam)

	<b>İzolat</b>	<b>Orkide Adı</b>	<b>İzole Edildiği Yer</b>	<b>Fosfatı Çözme</b>
15	<b>HA-17</b>	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	++
16	<b>HA-18</b>	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	++
17	<b>HA-19</b>	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	+
18	<b>HA-20</b>	<i>Orchis laxiflora</i>	Toprak	-
19	<b>HA-21</b>	<i>Orchis laxiflora</i>	Toprak	+
20	<b>HA-22</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
21	<b>HA-23</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
22	<b>HA-24</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
23	<b>HA-25</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
24	<b>HA-26</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
25	<b>HA-27</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
26	<b>HA-28</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
27	<b>HA-29</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
28	<b>HA-30</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
29	<b>HA-31</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
30	<b>HA-33</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
31	<b>HA-34</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	+
32	<b>HA-35</b>	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	-
33	<b>HA-36</b>	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	-
34	<b>HA-37</b>	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	+
35	<b>HA-38</b>	<i>Ophrys sphegodes</i>	Toprak	+
36	<b>HA-39</b>	<i>Ophrys sphegodes</i>	Toprak	-
37	<b>HA-43</b>	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	+
38	<b>HA-44</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
39	<b>HA-45</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
40	<b>HA-46</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
41	<b>HA-47</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	++
42	<b>HA-48</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
43	<b>HA-49</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
44	<b>HA-50</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	+
45	<b>HA-51</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
46	<b>HA-52</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
47	<b>HA-53</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
48	<b>HA-55</b>	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
49	<b>HA-57</b>	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	+
50	<b>HA-59</b>	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	++
51	<b>HA-62</b>	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	+
52	<b>HA-63</b>	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	-
53	<b>HA-64</b>	<i>Orchis tridentata</i>	Toprak	+
54	<b>HA-65</b>	<i>Orchis tridentata</i>	Toprak	+

Çizelge 4.2. Fosfat çözünürlülüğü sonuçları (devam)

	<b>İzolat</b>	<b>Orkide Adı</b>	<b>İzole Edildiği Yer</b>	<b>Fosfatı Çözme</b>
55	<b>HA-67</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	++
56	<b>HA-68</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	+
57	<b>HA-69</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	+
58	<b>HA-70</b>	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	-
59	<b>HA-71</b>	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	+
60	<b>HA-72</b>	<i>Limodorum abortivum</i>	Toprak	++
61	<b>HA-73</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	+
62	<b>HA-74</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
63	<b>HA-75</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	-
64	<b>HA-76</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	-
65	<b>HA-77</b>	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
66	<b>HA-78</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
67	<b>HA-80</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	+
68	<b>HA-81</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
69	<b>HA-82</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
70	<b>HA-83</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
71	<b>HA-84</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
72	<b>HA-85</b>	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	-
73	<b>HA-86</b>	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	+
74	<b>HA-87</b>	<i>Platanthera bifolia</i>	Toprak	-
75	<b>HA-88</b>	<i>Platanthera bifolia</i>	Toprak	-
76	<b>HA-89</b>	<i>Ophrys apifera</i>	Kök	+
77	<b>HA-90</b>	<i>Ophrys apifera</i>	Toprak	-
78	<b>HA-91</b>	<i>Ophrys apifera</i>	Toprak	-
79	<b>HA-92</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	+
80	<b>HA-93</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	+
81	<b>HA-94</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	+
82	<b>HA-95</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
83	<b>HA-96</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
84	<b>HA-97</b>	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
85	<b>HA-98</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	+
86	<b>HA-99</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
87	<b>HA-100</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	+
88	<b>HA-101</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	++
89	<b>HA-102</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	++
90	<b>HA-103</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	+
91	<b>HA-104</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	+
92	<b>HA-105</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
93	<b>HA-106</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	++
94	<b>HA-107</b>	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-

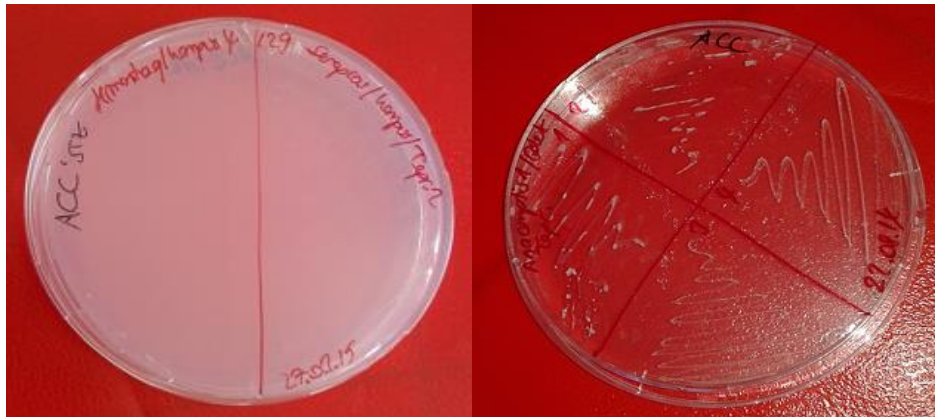
Çizelge 4.2. Fosfat çözünürlülüğü sonuçları (devam)

İzolat	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	Fosfatı Çözme	
95	HA-110	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	++
96	HA-112	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
97	HA-113	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
98	HA-114	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
99	HA-116	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
100	HA-117	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
101	HA-118	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
102	HA-119	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	+
103	HA-120	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	-
104	HA-121	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	+
105	HA-122	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
106	HA-124	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	++
107	HA-125	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	+
108	HA-126	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	++
109	HA-127	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
110	HA-128	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
111	HA-129	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	-

(+) Fosfat çözünürlülüğü gözlemlendi.  
 (++) Daha iyi çözünürlük gözlemlendi.

#### 4.2.2. ACC deaminaz aktivitesi

ACC deaminaz aktivitesi gösteren PGPR adayı bakterileri belirlemek için 111 örnek ACC eklenen ve ACC eklenmeyen Brown & Dilworth minimal besiyeri (BD) ortamına ayrı ayrı ekildi (Şekil 4.3). ACC eklenmeyen BD besiyerindeki üremesiyle karşılaştırıldığında, ACC eklenen BD petrisinde daha iyi üreme gösteren 32 bakteri izolatının ACC deaminaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi (Çizelge 4.3).



Şekil 4.3. BD besiyerinde ACC deaminaz aktivitesi



Çizelge 4.3. ACC-deaminaz aktivitesi sonuçları

	İzolat	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	ACC deaminaz
1	HA-1	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	-
2	HA-3	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	+
3	HA-4	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	-
4	HA-5	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	-
5	HA-6	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	-
6	HA-7	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	-
7	HA-8	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	-
8	HA-10	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
9	HA-11	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
10	HA-12	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	-
11	HA-13	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	+
12	HA-14	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	-
13	HA-15	<i>Orchis provincialis</i>	Kök	-
14	HA-16	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	-
15	HA-17	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	+
16	HA-18	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	-
17	HA-19	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	-
18	HA-20	<i>Orchis laxiflora</i>	Toprak	-
19	HA-21	<i>Orchis laxiflora</i>	Toprak	-
20	HA-22	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
21	HA-23	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
22	HA-24	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
23	HA-25	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
24	HA-26	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
25	HA-27	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
26	HA-28	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
27	HA-29	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
28	HA-30	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
29	HA-31	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
30	HA-33	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
31	HA-34	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	+
32	HA-35	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	-
33	HA-36	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	-
34	HA-37	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	+
35	HA-38	<i>Ophrys sphegodes</i>	Toprak	+
36	HA-39	<i>Ophrys sphegodes</i>	Toprak	-
37	HA-43	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	-
38	HA-44	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	+
39	HA-45	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-

Çizelge 4.3. ACC-deaminaz aktivitesi sonuçları (devam)

	İzolat	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	ACC deaminaz
40	HA-46	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
41	HA-47	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
42	HA-48	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
43	HA-49	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
44	HA-50	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	+
45	HA-51	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
46	HA-52	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
47	HA-53	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
48	HA-55	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
49	HA-57	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	-
50	HA-59	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	+
51	HA-62	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	+
52	HA-63	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	-
53	HA-64	<i>Orchis tridentata</i>	Toprak	+
54	HA-65	<i>Orchis tridentata</i>	Toprak	-
55	HA-67	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	+
56	HA-68	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	+
57	HA-69	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	-
58	HA-70	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	-
59	HA-71	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	-
60	HA-72	<i>Limodorum abortivum</i>	Toprak	-
61	HA-73	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
62	HA-74	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
63	HA-75	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	+
64	HA-76	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	-
65	HA-77	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
66	HA-78	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
67	HA-80	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	+
68	HA-81	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
69	HA-82	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	+
70	HA-83	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
71	HA-84	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
72	HA-85	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	-
73	HA-86	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	+
74	HA-87	<i>Platanthera bifolia</i>	Toprak	-
75	HA-88	<i>Platanthera bifolia</i>	Toprak	+
76	HA-89	<i>Ophrys apifera</i>	Kök	+
77	HA-90	<i>Ophrys apifera</i>	Toprak	-
78	HA-91	<i>Ophrys apifera</i>	Toprak	+

Çizelge 4.3. ACC-deaminaz aktivitesi sonuçları (devam)

	İzolat	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	ACC deaminaz
79	HA-92	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
80	HA-93	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
81	HA-94	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
82	HA-95	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
83	HA-96	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
84	HA-97	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
85	HA-98	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
86	HA-99	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
87	HA-100	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	-
88	HA-101	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	-
89	HA-102	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	+
90	HA-103	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	-
91	HA-104	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	+
92	HA-105	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
93	HA-106	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
94	HA-107	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
95	HA-110	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	-
96	HA-112	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
97	HA-113	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
98	HA-114	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
99	HA-116	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
100	HA-117	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	-
101	HA-118	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
102	HA-119	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	-
103	HA-120	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	
104	HA-121	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	+
105	HA-122	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
106	HA-124	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	-
107	HA-125	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	-
108	HA-126	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	-
109	HA-127	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	-
110	HA-128	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
111	HA-129	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	-

(+) ACC deaminaz aktivitesi gözlemlendi.

(-) ACC deaminaz aktivitesi gözlenmedi.

### 4.2.3. İndol-3-Asetik Asit (IAA) üretimi

İndol-3-Asetik Asit üretimini belirlemek için Luria Bertani Broth besiyerinde üretilen bakterilerden (Şekil 4.4) elde edilen süpernatantlar ve salkowski ayracı mikroplate'e eklendi. Karanlıkta 30 dakika inkübasyonun ardından IAA üretiminin belirlenmesi için 111 izolat saf IAA ile hazırlanmış standartlar ve köre (blank) karşı okundu (Çizelge 4.4).



Şekil 4.4. LB sıvı besiyerinde üreyen bakteri örnekleri

En düşük standart değeri 10 µg/ml kriter alınarak sonuçlar değerlendirildiğinde 28 örnekte indol-3-asetik asit üretimi < 10 µg/ml ölçüldü. 7 izolat ise 20 µg/ml'den fazla ölçülerek *Serratia plymuthica* HRO-C48 (e-nema GmbH, Almanya) suşunun konsantrasyon değerine (21,7) yakın değerler verdi. Yüksek IAA değerleri saptanan 7 izolattan 6'sı rizosfer toprağından izole edildi.

Çizelge 4.4. Ölçülen IAA değerleri

	İzolat	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	IAA (µg mL <sup>-1</sup> )
1	HA-1	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	17,8
2	HA-3	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	< 10
3	HA-4	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	< 10
4	HA-5	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	11,4
5	HA-6	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	< 10
6	HA-7	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	< 10
7	HA-8	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	< 10
8	HA-10	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	13,3
9	HA-11	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	11,7
10	HA-12	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	< 10
11	HA-13	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	14,6
12	HA-14	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	13
13	HA-15	<i>Orchis provincialis</i>	Kök	17,1

Çizelge 4.4. Ölçülen IAA değerleri (devam)

	İzolat	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	IAA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
14	HA-16	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	14,1
15	HA-17	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	14,6
16	HA-18	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	< 10
17	HA-19	<i>Orchis laxiflora</i>	Kök	< 10
18	HA-20	<i>Orchis laxiflora</i>	Toprak	11,7
19	HA-21	<i>Orchis laxiflora</i>	Toprak	< 10
20	HA-22	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	< 10
21	HA-23	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	10
22	HA-24	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	14,3
23	HA-25	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	18,4
24	HA-26	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	11,7
25	HA-27	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	< 10
26	HA-28	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	10,1
27	HA-29	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	10
28	HA-30	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	13,7
29	HA-31	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	12,9
30	HA-33	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	< 10
31	HA-34	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	< 10
32	HA-35	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	< 10
33	HA-36	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	< 10
34	HA-37	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	11,2
35	HA-38	<i>Ophrys sphegodes</i>	Toprak	17,3
36	HA-39	<i>Ophrys sphegodes</i>	Toprak	10,1
37	HA-43	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	13,7
38	HA-44	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	< 10
39	HA-45	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	< 10
40	HA-46	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	< 10
41	HA-47	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	14,2
42	HA-48	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	< 10
43	HA-49	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	13,1
44	HA-50	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	16,5
45	HA-51	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	< 10
46	HA-52	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	< 10
47	HA-53	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	16,1
48	HA-55	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	15,1
49	HA-57	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	13,1
50	HA-59	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	12
51	HA-62	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	11,5
52	HA-63	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	13,4

Çizelge 4.4. Ölçülen IAA değerleri (devam)

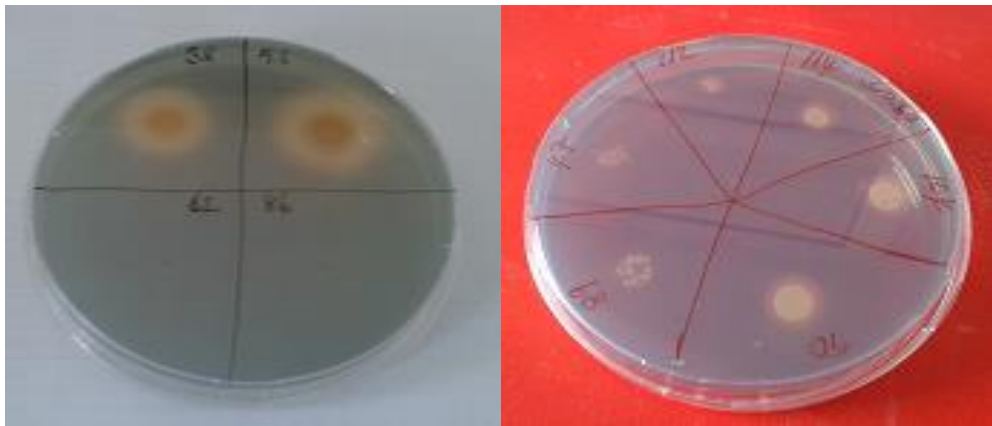
	İzolat	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	IAA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
53	HA-64	<i>Orchis tridentata</i>	Toprak	13,8
54	HA-65	<i>Orchis tridentata</i>	Toprak	11,6
55	HA-67	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	13,4
56	HA-68	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	13,8
57	HA-69	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	< 10
58	HA-70	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	16,9
59	HA-71	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	14,2
60	HA-72	<i>Limodorum abortivum</i>	Toprak	16,4
61	HA-73	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	11,9
62	HA-74	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	14,3
63	HA-75	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	16,1
64	HA-76	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	16,4
65	HA-77	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	14,7
66	HA-78	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	< 10
67	HA-80	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	16,1
68	HA-81	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	20,9
69	HA-82	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	< 10
70	HA-83	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	18,5
71	HA-84	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	12,5
72	HA-85	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	14,2
73	HA-86	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	16,6
74	HA-87	<i>Platanthera bifolia</i>	Toprak	19,1
75	HA-88	<i>Platanthera bifolia</i>	Toprak	14,2
76	HA-89	<i>Ophrys apifera</i>	Kök	14,2
77	HA-90	<i>Ophrys apifera</i>	Toprak	16,8
78	HA-91	<i>Ophrys apifera</i>	Toprak	20,2
79	HA-92	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	17,3
80	HA-93	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	17,5
81	HA-94	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	13,8
82	HA-95	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	19,1
83	HA-96	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	16,1
84	HA-97	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	21,8
85	HA-98	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	14
86	HA-99	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	< 10
87	HA-100	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	15
88	HA-101	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	14,4
89	HA-102	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	12,5
90	HA-103	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	23,1
91	HA-104	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	15,8

Çizelge 4.4. Ölçülen IAA değerleri (devam)

92	HA-105	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	14,6
93	HA-106	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	21,4
94	HA-107	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	13,1
95	HA-110	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	< 10
96	HA-112	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	17,1
97	HA-113	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	< 10
98	HA-114	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	23
99	HA-116	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	15,2
100	HA-117	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	13,8
101	HA-118	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	16,1
102	HA-119	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	14
103	HA-120	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Toprak	16,4
104	HA-121	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	14,4
105	HA-122	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	16,6
106	HA-124	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	15,5
107	HA-125	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	27,2
108	HA-126	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	12,4
109	HA-127	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Kök	< 10
110	HA-128	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	14,1
111	HA-129	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	14,2

#### 4.2.4. Siderofor üretimi

Fosfatı çözme, ACC deaminaz ve indol-3-asetik asit üretimi özelliklerinin hepsine sahip olduğu belirlenen potansiyel PGPR izolatlarının siderofor üretiminin test edilmesi için CAS agar besiyeri kullanıldı. Mavi-yeşil renkteki CAS agar besiyerinde siderofor üreten bakteri kolonilerinin etrafında turuncu renk oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.5). 17 izolattan 10'unda siderofor üretimi pozitif olarak belirlendi (Çizelge 4.5).



Şekil 4.5. Siderofor üreten bakteri izolatları

Çizelge 4.5. PGPR adayı bakterilerin siderofor üretimi

İzolot	Orkide Adı	İzole Edildiği Yer	Siderofor Üretimi
1 HA-13	<i>Limodorum abortivum</i>	Kök	-
2 HA-17	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	-
3 HA-25	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
4 HA-37	<i>Ophrys sphegodes</i>	Kök	-
5 HA-38	<i>Ophrys sphegodes</i>	Toprak	+
6 HA-50	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	+
7 HA-53	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
8 HA-55	<i>Orchis coriophora</i>	Toprak	+
9 HA-59	<i>Spiranthes spiralis</i>	Kök	+
10 HA-62	<i>Orchis tridentata</i>	Kök	-
11 HA-64	<i>Orchis tridentata</i>	Toprak	+
12 HA-67	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Kök	-
13 HA-82	<i>Himantoglossum caprinum</i>	Toprak	-
14 HA-86	<i>Platanthera bifolia</i>	Kök	-
15 HA-104	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kök	+
16 HA-112	<i>Orchis coriophora</i>	Kök	+
17 HA-121	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	Toprak	+

### 4.3. Seçilen PGPR Adayı Bakterilerin Dizi Analizi Sonuçları

Fosfatı çözümlü hale getirme, ACC-deaminaz üretme, IAA oluşturma ve siderofor üretimi özelliklerini gösterdiği belirlenen 17 bakteri izolatınının 16S rDNA primerleri (fd1-rd2) kullanılarak MacroGen firmasına ticari olarak yaptırılan dizi analizi sonuçları NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak değerlendirildi ve bu dizilerin *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium* (*Rhizobium*), *Stenotrophomonas* cinslerine ait olabileceği belirlendi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Dizi analizi sonuçları

İzolot	Orkide Adı	İlişkili bulunan Bakteri	% Benzerlik
HA-13	<i>Limodorum abortivum</i>	<i>Bacillus</i>	% 99
HA-17	<i>Spiranthes spiralis</i>	<i>Bacillus</i>	% 99
HA-25	<i>Orchis coriophora</i>	<i>Pseudomonas</i>	% 99
HA-37	<i>Ophrys sphegodes</i>	<i>Acinetobacter</i>	% 99
HA-38	<i>Ophrys sphegodes</i>	<i>Acinetobacter</i>	% 99
HA-50	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	<i>Bacillus</i>	% 99



Çizelge 4.6. Dizi analizi sonuçları (devam)

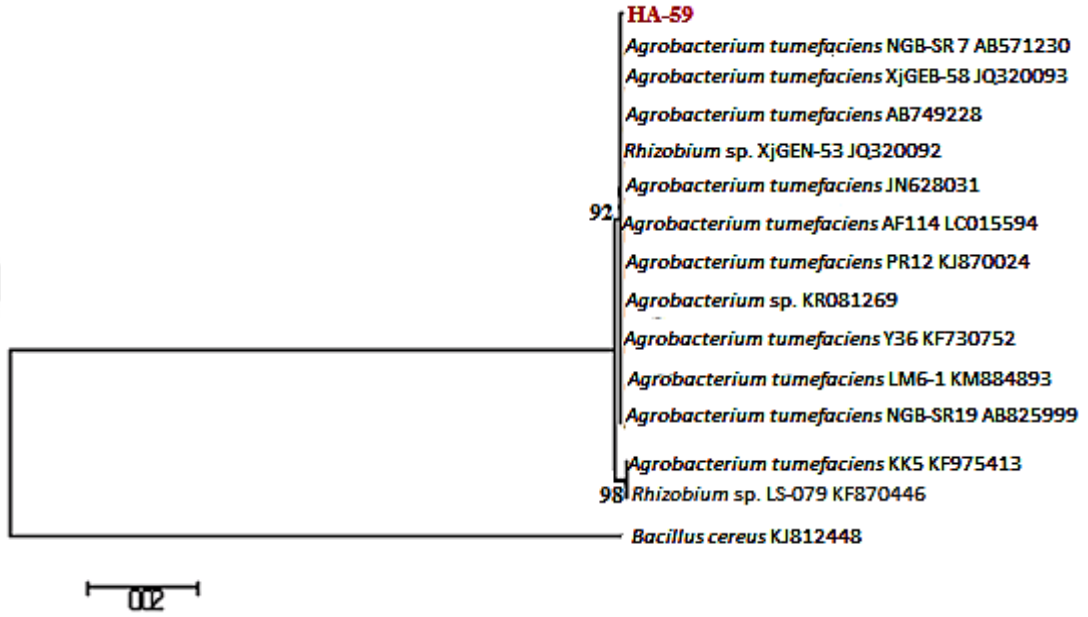
İzolat	Orkide Adı	İlişkili bulunan Bakteri	% Benzerlik
HA-53	<i>Orchis coriophora</i>	<i>Pseudomonas</i>	% 99
HA-55	<i>Orchis coriophora</i>	<i>Pseudomonas</i>	% 99
HA-59	<i>Spiranthes spiralis</i>	<i>Agrobacterium(Rhizobium)</i>	% 99
HA-62	<i>Orchis tridentata</i>	<i>Bacillus</i>	% 99
HA-64	<i>Orchis tridentata</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	% 99
HA-67	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	<i>Bacillus</i>	% 99
HA-82	<i>Himantoglossum caprinum</i>	<i>Pseudomonas</i>	% 99
HA-86	<i>Platanthera bifolia</i>	<i>Paenibacillus</i>	% 99
HA-104	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	<i>Bacillus</i>	% 99
HA-112	<i>Orchis coriophora</i>	<i>Bacillus</i>	% 99
HA-121	<i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i>	<i>Lysinibacillus</i>	% 99

#### 4.4. Filogenetik Analizler

Filogenetik analizler için veri seti oluşturmak amacıyla, aday PGPR olarak seçilen 17 izolatın yakın benzerlik gösterdiği 16S rDNA gen dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından indirildi. Veri setleri oluşturulduktan sonra diziler ClustalX ile hizalandı. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi için MEGA 6.06 programında Neighbor-Joining algoritması ve Kimura 2-parameter model kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu. Elde edilen ağaçların istatistiksel olarak güvenilirliklerinin belirlenebilmesi için 10000 tekrarlı bootstrap analizleri yapıldı ve % 50'nin üzerinde desteklenen düğümler ağaçlarda belirtildi.

#### 4.4.1. *Agrobacterium (Rhizobium)* izolatının filogenetik analizi

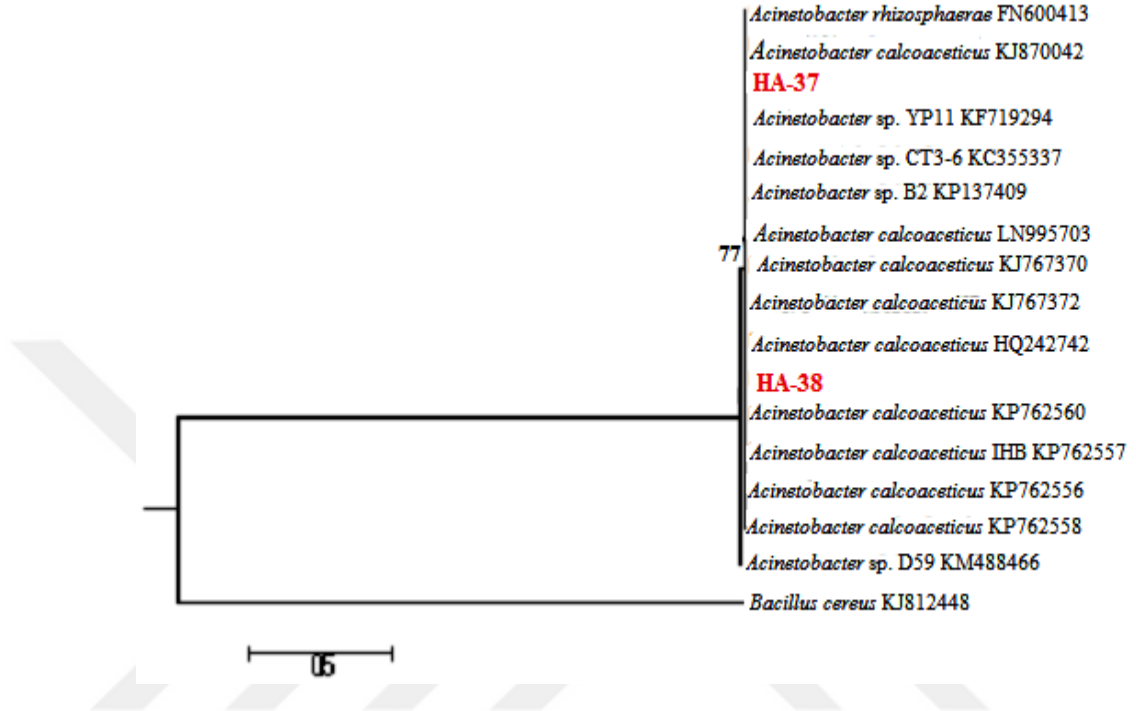
PGPR adayı olarak belirlediğimiz HA-59 izolatının ve NCBI veri tabanında yakın benzerlik gösterdiği dizilerle oluşturulan filogenetik ağaç (Şekil 4.6) incelendiğinde HA-59'un *Agrobacterium (Rhizobium)* cinsi ile ilişkili, *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium tumefaciens*) ile daha yakın ilişkili olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. HA-59 izolatı ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı (Referans diziler NCBI erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilen PGPR adayı bakterilere ait diziler 'HA' ön eki ile gösterilmiştir).

#### 4.4.2. *Acinetobacter* izolatının filogenetik analizi

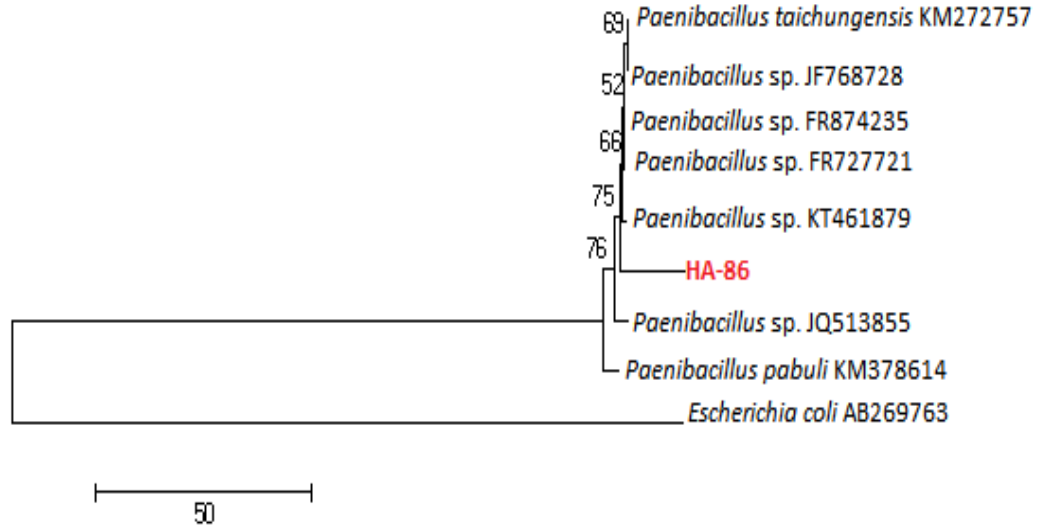
HA-37 ve HA-38 için oluşturulan filogenetik ağaca göre her iki izolatın da *Acinetobacter* cinsine ait olduğu, *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Acinetobacter rhizosphere* ile ilişkili olabileceği görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. HA-37 ve HA-38 izolatlarının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı (Referans diziler NCBI erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilen PGPR adayı bakterilere ait diziler ‘HA’ ön eki ile gösterilmiştir).

#### 4.4.3. *Paenibacillus* izolatının filogenetik analizi

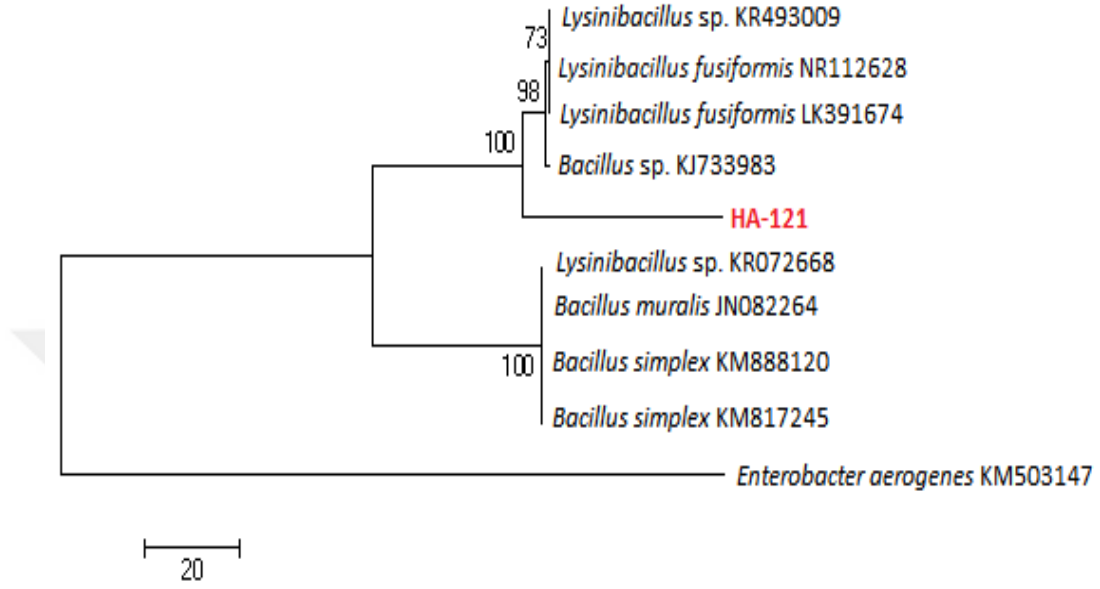
HA-86'nın benzer dizilerle oluşturulan filogenetik ağacı incelendiğinde *Paenibacillus* cinsi ile ilişkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. HA-86 izolatının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı (Referans diziler NCBI erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilen PGPR adayı bakterilere ait diziler 'HA' ön eki ile gösterilmiştir).

#### 4.4.4. *Lysinibacillus* izolatının filogenetik analizi

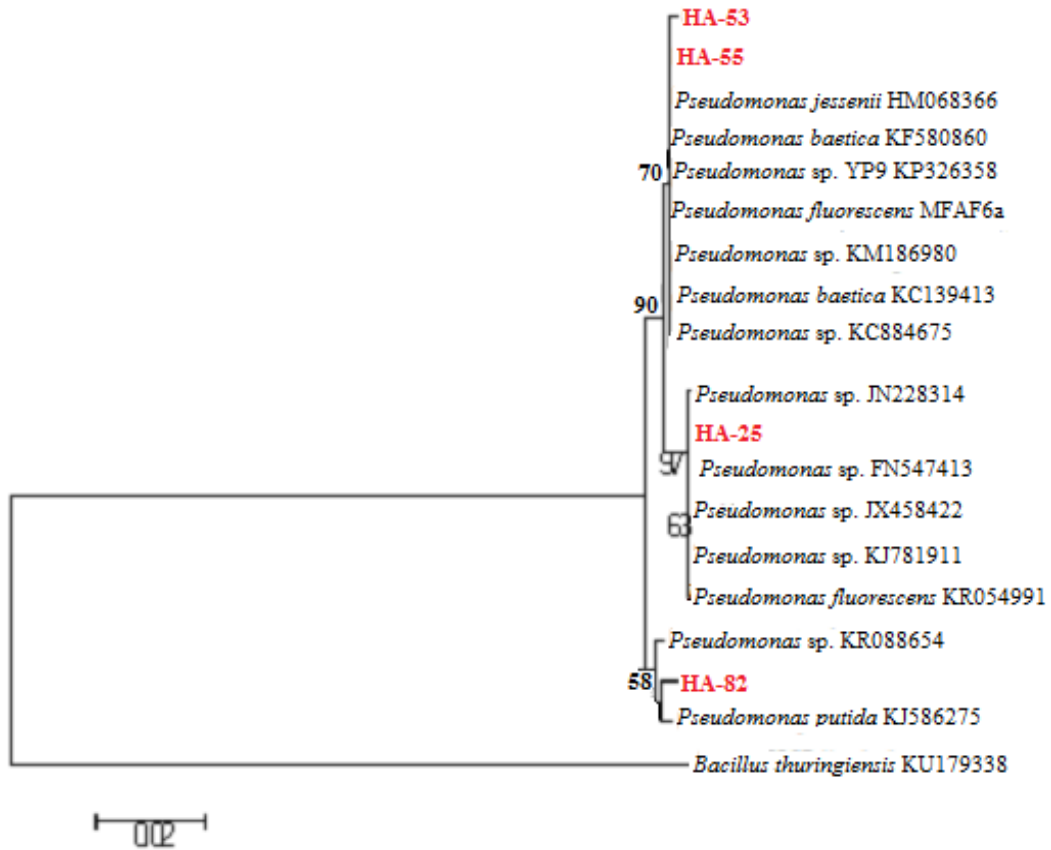
HA-121 izolatı *Lysinibacillus* ve *Bacillus* cinsleri ile benzer bulunmuştur. Ağaç incelendiğinde *Lysinibacillus* sp., *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus* sp. ile ilişkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. HA-121 izolatının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı (Referans diziler NCBI erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilen PGPR adayı bakterilere ait diziler 'HA' ön eki ile gösterilmiştir).

#### 4.4.5. *Pseudomonas* izolatlarının filogenetik analizi

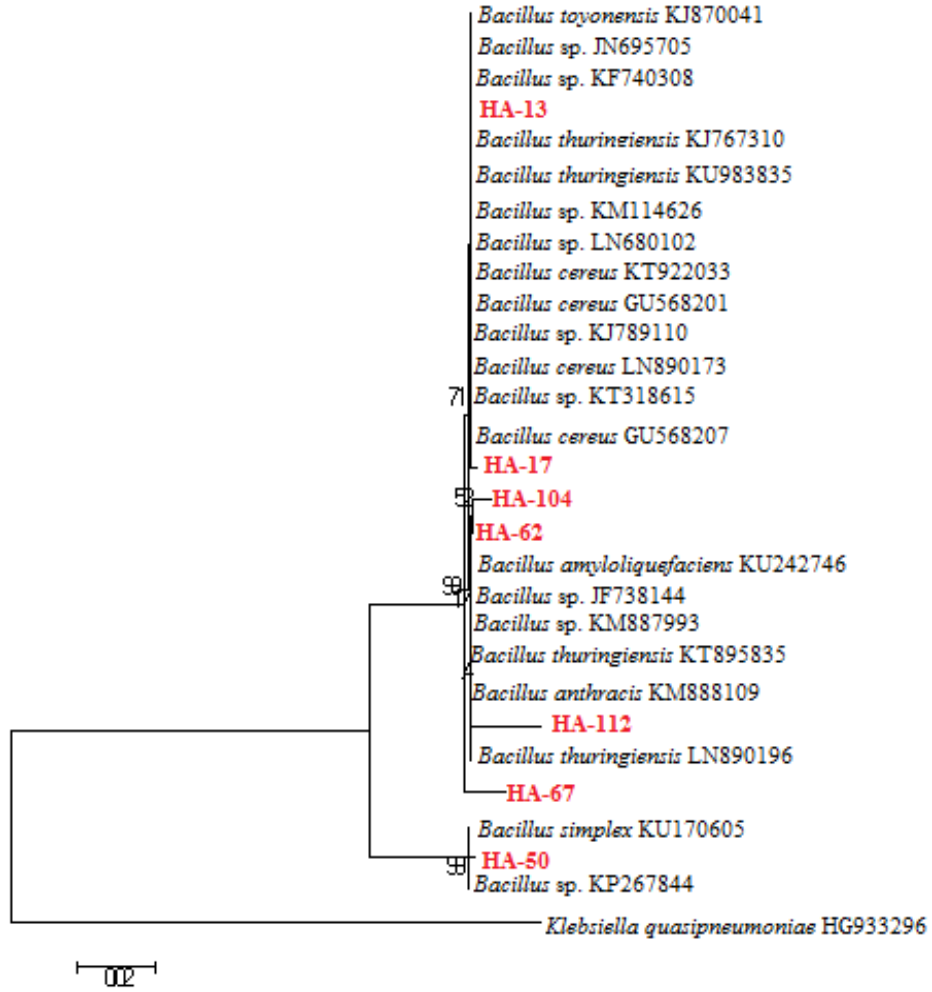
Veritabanındaki benzer dizilerle oluşturulan filogenetik ağacı incelendiğinde HA-25, HA-53, HA-55, HA-82 *Pseudomonas* cinsi ile ilişkili bulunmuştur. HA-53, HA-55 izolatları *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas jessenii*, *Pseudomonas baetica* türleri ile; HA-25'in *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens* ile; HA-82'nin ise *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida* ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. HA-25, HA-53, HA-55, HA-82 izolatlarının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı (Referans diziler NCBI erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilen PGPR adayı bakterilere ait diziler 'HA' ön eki ile gösterilmiştir).

#### 4.4.6. *Bacillus* izolatlarının filogenetik analizi

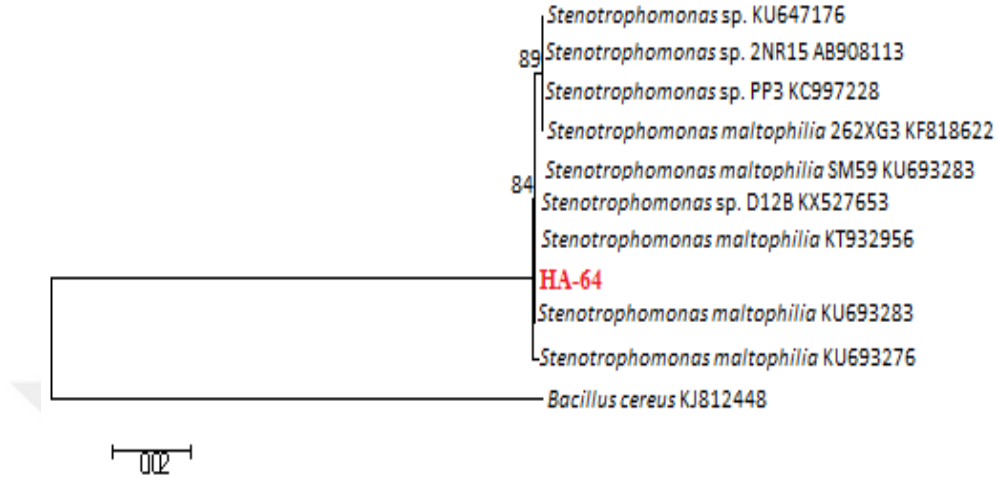
HA-13, HA-17, HA-50, HA-62, HA-67, HA-104 ve HA-112 izolatlarının *Bacillus* cinsi ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir. HA-50 *Bacillus simplex* ile yakın ilişkili olarak değerlendirilmiştir, diğerleri için tür düzeyinde belirleyici bir ayırım yapılamamıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. HA-13, HA-17, HA-50, HA-62, HA-67, HA-104 ve HA-112 izolatlarının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı (Referans diziler NCBI erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilen PGPR adayı bakterilere ait diziler 'HA' ön eki ile gösterilmiştir).

#### 4.4.7. *Stenotrophomonas* izolatının filogenetik analizi

HA-64 izolatının filogenetik olarak *Stenotrophomonas* cinsi ile ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. HA-64 izolatının ve benzer 16S rDNA dizilerinin Neighbour Joining algoritması ile oluşturulmuş filogenetik ağacı (Referans diziler NCBI erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilen PGPR adayı bakterilere ait diziler 'HA' ön eki ile gösterilmiştir).



## 5. TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada yabancı orkide bitkisinin rizosferinden ve köklerinden izole edilen bakterilerin bitki gelişimini arttırıcı bakteri olup olmadıklarının belirlenmesi ve karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. İzole edilen bakterileri test etmek için PGPR'lerin önemli özelliklerinden olan fosfatı çözünebilir hale getirme, indol-3-asetik asit üretimi, ACC (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit) deaminaz aktivitesi ve siderofor üretimi seçilmiştir.

*Anacamptis pyramidalis*, *Himantoglossum caprinum*, *Limodorum abortivum*, *Platanthera bifolia*, *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora*, *Spiranthes spiralis*, *Ophrys apifera*, *Ophrys sphegodes*, *Orchis coriophora*, *Orchis laxiflora*, *Orchis provincialis*, *Orchis tridentata* türlerine ait toplanan örneklerden toplam 111 bakteri izole edilmiştir.

Bitki gelişimini arttırıcı rizobakteriler azotu ve fosforu bitki için kullanılabilir hale getirerek, indol-3-asetik asit gibi hormonlar üreterek, ACC deaminaz enzimi ile etilenin olumsuz etkisini engelleyerek, siderofor üretimi ile demir alınımını arttırarak, uyarılmış sistemik dayanıklılık oluşturarak, antibiyotik üreterek, zararlı mikroorganizmalara karşı litik enzimler ve bazı metabolitler üreterek, mevcut yer ve besin için bitkinin rekabet gücünü arttırarak bitki gelişimine katkıda bulunurlar (Podile & Kishore, 2006; Kaymak, 2010; Saharan & Nehra, 2011; Rathore, 2014; Gupta vd, 2015; Kundan vd, 2015; Yadav vd, 2015; Goswami vd, 2016; Parray vd, 2016).

PGPR özellikleri gösteren bakterilerin belirlenmesi için yapılan çalışmalar çoğunlukla tarla bitkilerinde yapılmıştır. Orkidelerde bu alanda yapılan çalışma çok azdır. Genellikle orkide çimlenmesine etkisi olan ya da çimlenmeyi arttırma potansiyeli olan bakteriler üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Orkide rizosferinden bitki gelişimini arttırıcı bakteri izole edilmesine yönelik ya da orkidelerden izole edilen bakterilerle çalışmamızda seçilen PGPR özelliklerinin hepsinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, çok fazla olmamakla beraber indol asetik asit üreten bakterilerin orkide çimlenmesinde etkisinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır.

Orkidelerin büyüme ve gelişiminde bakterilerin yararlı etkisi ilk olarak 1922’de Lewis Knudson tarafından bildirilmiştir. *Epidendrum* ve *Laeliocattleya*’nın köklerine çimlenmeyi arttırmak için diazotrofik *Rhizobium leguminosarum*’u (önceden *Bacillus radicumicola*) inoküle etmişlerdir (Silva vd, 2015). 1980’lerden sonra Avusturyalı araştırmacılar orkide substrat köklerinin iç tabakasından endofitik bakteri izole etmişler ve bunların *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Arthrobacter* ve *Kurthia* cinslerine ve *Enterobacteria*’ya ait olduklarını tespit etmişlerdir (Wilkinson vd, 1989; Wilkinson vd, 1994; Tsavkelova vd, 2004).

Tsavkelova vd (2007a) epifitik orkide *Dendrobium moschatum* köklerinden *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Sphingomonas* ve *Mycobacterium* cinslerine ait bakteri izole etmişlerdir. Yaptıkları çalışma bakterilerin orkide çimlenmesi için esasi olduğunu ve pratik açıdan orkide tohumlarının IAA üreten suşlar ile muamelesinin orkidelerin in vitro çoğaltılması için yararlı olabileceğini göstermiştir.

Tsavkelova vd (2007b)’nin tropikal orkideler *Paphiopedilum appletonianum* ve *Pholidota articulata* ile yaptıkları başka bir çalışmada *Paphiopedilum* köklerinde *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Erwinia* ve *Nocardia* suşlarının, *Pholidota* köklerinde ise *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Burkholderia* ve *Paracoccus* suşlarının kolonize olduğunu göstermişlerdir. Farklı epifitik ve terrestrial türlerin (*Dendrobium*, *Paphiopedilum*, *Ponthieva* ve *Dactylorhiza* cinsleri) orkide tohumlarının *Dendrobium leonis* (Lindl.) Rchb.’den izole edilen *Bacillus* ile muamelesinin orkide çimlenmesi ve gelişimini önemli ölçüde teşvik ettiğini gözlemlediklerini belirtmişlerdir.

Faria vd (2012) ise *Cymbidium eburneum* orkidesinin meristeminden izole edilen yirmi endofitik bakteriyi, kolorimetrik yöntemlerle indol üretim miktarına, in vitro fosfat çözünürlüğü ve sera koşulları altında bitki gelişimini artırma potansiyellerine göre değerlendirmişlerdir. Tanımlanan *Paenibacillus* cinsine ait sekiz örnek indol üretimi göstermiş ve hiçbiri fosfatı çözmemiştir. Tüm bakteri suşları *Cattleya* cinsi orkide tohumlarına aşılandıklarında deney sürecinde bitki canlılığını arttırmış ve bitki gelişimini teşvik etmişlerdir. Çalışma sonucunda orkide türlerinde endofit olan IAA üreten bakterilerin diğer orkide türleri için inokülant olarak kullanılabilmesi sonucuna varmışlardır.

Silva vd (2015) simbiyotik in vitro tohum çoğaltılmasında fungal ve bakteriyel partnerlerin bitki büyümesi ve gelişmesine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, *Dendrobium*'un mikorizal fungus veya bitki büyüme düzenleyicileri eklenmeden PGPR ile kültüre edilmesi sonucunda orkide-ilişkili bakterilerin tohum çimlenmesinin uyarılmasında önemli rolü olduğunu göstermişlerdir.

Galdiano Junior vd (2011) *Cattleya walkeriana* orkidesinin rhizoplane'ninden izole edilen 36 izolattan dört tanesini çok iyi oksin üreten rizobakteriyel organizma olarak *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium* ve *Enterobacter* olarak tanımlamışlardır.

Son on yılda bitki gelişimini uyarıcıları, ürün verimini arttırmaları, çevreye daha az zararlı olmaları ve kimyasal gübrelerin maliyetini azaltmaları nedeniyle PGPR araştırmaları önem kazanmıştır (Kundan vd, 2015).

Türkiye'deki PGPR ile ilgili çalışmalara bakıldığında çilekte *Bacillus lentimorbus*, *B. megaterium*, *B. pumilis*, *B. subtilis*, *Enterobacter intermedium*, *Kurthia sibirica*, *Paenibacillus polymyxa* ve *Pantoea agglomerans*'ın *Botrytis cinerae*'ya karşı biyokontrol ajan olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Dönmez vd, 2011). Yine çilekte yapılan bir çalışmada PGPR olan *Pseudomonas* BA-8, *Bacillus* OSU-142 ve *Bacillus* M3'ün tek başına ya da birlikte uygulanmasının gelişimi arttırdığı gözlenmiştir (Esitken vd, 2010).

Çakmakçı vd (2007) beş farklı azot fikse eden ve iki farklı fosfat çözen PGPR bakteriyi arpa (*Hordeum vulgare*) tohumlarına aşılama ve sera koşullarında arpa bitkisinin gelişimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bakteriler oksin üretimi (IAA) için Bent vd (2001)'in ve fosfat çözme kapasiteleri için Pal (1998) ve Mehta & Nautiyal (2001)'e göre test edilmiş ve sonuçta PGPR'lerin altısının IAA ürettiği ve üçünün fosfatı çözdüğü, aynı zamanda bütün izolatların azot fiske ettiği ve arpa gelişimini arttırdığı gözlenmiştir.

Ertürk vd (2010) yabancı ahududu, buğday ve domates bitkilerinin rizosferinden izole edilen yedi PGPR izolatının (*Bacillus* RC23, *Paenibacillus polymyxa* RC05, *Bacillus subtilis* OSU-142, *Bacillus* RC03, *Comamonas acidovarans* RC41, *Bacillus megaterium* RC01, *Bacillus simplex* RC19) kivinin (*Actinidia deliciosa*) köklenme ve kök gelişimine olumlu etkisi olduğunu tesbit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 25 µg/ml triptofan varlığında tüm bakterilerin

yüksek oranda IAA ürettiklerini de belirlemişlerdir (*Paenibacillus polymyxa* RC05'te 32.8 µg/ml, *Bacillus simplex* RC19'da 33.6 µg/ml, *Bacillus* RC23'te 20.4 µg/ml).

Çakmakçı vd (2011) çay rizosferinden azot fiksasyonu, fosfat çözme, ACC deaminaz aktivitesi gösteren bakterileri belirlemek için azotsuz katı malat-sükroz, ACC deaminaz için DF salt besiyeri, fosfat çözünürlüğü için NBRIP-BPB besiyeri kullanarak 644 izolattan 394'ünün azot fiske edebildiğini, 305'inin fosfatı çözdüğünü ve 93'ünün ACC deaminaz aktivitesi gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Karakurt vd (2011) bitki gelişimini arttıran dört bakterinin (*Bacillus subtilis* OSU142, *Bacillus megaterium* M-3, *Burkholderia cepacia* OSU-7, *Pseudomonas putida* BA-8) tek başına ve birlikte uygulanmasının vişnenin (*Prunus cerasus*) vejetatif gelişimine ve meyve tutumuna olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Orhan (2016) buğdayda (*Triticum aestivum*) 18 halotolerant ve halofilik bakterinin amonyum, indol-3-asetik asit, ACC deaminaz üretimi, fosfat çözünürlüğü, azot fiksasyonu özellikleri yönünden bitki gelişimini arttırma yetenekleri araştırılmış ve sadece bir izolatanın (*Bacillus*) fosfatı çözdüğünü, yaklaşık % 66'sında ACC deaminaz, % 44'ünde IAA üretme potansiyeli olduğunu belirlemişlerdir.

Benzer şekilde Açıkgöz vd (2016) çimende (turfgrass); Canpolat vd (2006) arpa (*Hordeum vulgare*) ve buğdayda; Kaymak vd (2008) nanede (*Mentha piperita* L.); Samancıoğlu vd (2016) lahanada; Orhan vd (2006) ahududunda, Esitken vd (2006) kiraz ağacında; Sabir vd (2011) *Vitis* spp.'de; Turan vd (2012) buğdayda PGPR izolatları kullanarak bitki gelişimine olumlu etkilerini belirledikleri çalışmalar mevcuttur.

Fosfor biyolojik olarak büyüme ve gelişme için önemli besinlerden biridir. Fosfatı çözen rizobakterilerin bu özelliği bitkide fosfor alınımını arttırması açısından önemli rol oynamaktadır (Habib vd, 2016). Çoğu toprak bakterisi, özellikle *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsine ait olanlar, formik asit, asidik, propiyonik, laktik, glikolik, fumarik ve süksinik asit salgılayarak fosfatın çözülmeyen formunu çözülebilir hale dönüştürme yeteneğine sahiptir (Vazquez vd, 2000; Kumar vd, 2012). Örnekleme yapılan orkidelerden izole edilen bakterilerin fosfatı çözünür hale getirme özelliği olup olmadığını belirlemek için Pikovskaya agar (% 0.5 trikalsiyum fosfatlı) besiyeri kullanılmış ve 111 örnekten 65'inin fosfatı çözdüğü belirlenmiştir.

Rathaur vd (2012) *Withania somnifera*'nın (*Solanaceae*) rizosferinden kadmiyum ve nikeli tolere eden PGPR'lerin izolasyonu ve karakterizasyonunu amaçladıkları çalışmada, test izolatu rizobakteri P-35'in fosfat çözünürlüğünü belirlemek için Pikovskaya agar besiyerini kullanmışlar ve söz konusu izolatu tohuma aşılmasının tohum çimlenmesini, kök ve sürgün gelişimini önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir.

Kumar vd (2012) altı taze fasulye rizosferik toprak örneğinden izole ettikleri 30 bakterinin PKV agar kullanarak fosfat çözünürlüğü özelliklerini test etmişler ve 20'sinin fosfatı çözdüğünü belirlemişlerdir.

Goswami vd (2014) PKV besiyeri kullanarak *Suaeda fruticosa* (*Amaranthaceae*) bitkisinin rizosferinden izole ettikleri 85 izolatu 23'ünün fosfatı çözdüğünü ve 11'inin IAA ürettiğini, 7'sinin ise hem fosfatı çözme hem de IAA üretme özelliği olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmada izole edilen bakterilerin İndol-3-asetik asit (IAA) üretip üretmediğini belirlemek için Brick vd (1991)'de tanımlanan kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Hazırlanan IAA standartlarına ve IAA üreten *Serratia plymuthica* HRO-C48 suşunun (Kalbe vd, 1996; Müller vd, 2008) IAA konsantrasyon miktarına göre değerlendirme yapıldığında 111 izolattan 83'ünde 10 µg/ml-20 µg/ml arasında değişen IAA değerleri saptanmıştır. 28'inde 10 µg/ml'dan küçük değerler ölçülmüş ve 7 izolatta ise referans suş olarak kullanılan *Serratia plymuthica* HRO-C48 suşunun çalışmamızda ölçülen konsantrasyon değerine (21.7 µg/ml) yakın değerler bulunmuştur.

Fürnkranz vd (2009) yabancurpu ağacı (*Moringa oleifera*), sorgum (*Sorghum vulgare*), ayçiçeği (*Helianthus annuus*) ve aspir (*Carthamus tinctorius*) rizosferinden izole ettikleri 54 bakterinin IAA sentezini araştırdıkları çalışmada, yaptığımız çalışmaya benzer şekilde elde ettikleri bakteri süpernatantlarını ve salkowski ayracını mikroplate'e yükleyerek spektrofotometrede okumuşlar ve sonuçları *Serratia plymuthica* HRO-C48 ile karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Yine Silva vd (2012)'de *Brachiaria brizantha*'nın kök ve toprak örneklerinden izole ettikleri 72'i izolatu indol-3-asetik asit üretimi için çalışmamıza benzer şekilde Brick vd (1991)'de belirtilen kolorimetrik yöntem ile mikroplate okuyucu kullanılarak IAA konsantrasyonlarını ölçmüşler ve izolatlarının triptofan varlığında 68'inde 0.39 µg/ml-195 µg/ml arasında değişen IAA konsantrasyon değerleri belirlemişlerdir.

Kannapiran & Ramkumar (2011) IAA üretimini test etmek için Brick vd (1991) ve Gordon & Weber (1951)'den modifiye ettikleri yöntemi kullanmışlar ve test ettikleri izolatlardan *Azotobacter chroococcum*'da IAA miktarını 23.6 µg/ml ve *Azotobacter beijerincki* 17.6 µg/ml olarak belirlemişlerdir.

Dasri vd (2014) 4 epifitik orkideden (*Dendrobium 'anna'*, *Dendrobium pulchellum*, *Cattleya 'Queen Sirikit'* ve *Aerides falcate*) izole ettikleri 25 rizobakterinin IAA üretimini belirledikleri çalışmalarında beş izolatın IAA üretimini pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Bu beş izolat içinde triptofanla desteklenmiş King B besiyerinde 6 gün kültüre edilen bir izolat 2.5mM triptofanla (0.5 g/l) desteklenmiş besiyeri kullanılarak 67.18 µg/ml ile en yüksek IAA değerini vermiştir. Çalışmamızda 27.2 µg/ml değeri ile en yüksek IAA değerini veren izolat (HA-125) *Serapias vomeraceae* orkidesinden izole edilmiştir. 20 µg/ml'den daha yüksek ölçülen diğer IAA değerleri *Himantoglossum caprinum* (HA-81 ve HA-97), *Ophrys apifera* (HA-91), *Anacamptis pyramidalis* (HA-106), *Orchis coriophora* (HA-113) türlerinden izole edilen izolatlarla ait bulunmuştur.

ACC deaminaz enzimi (E.C.4.1.99.4) bitki hormonu etilenin öncülüdür ve 1978'de keşfedildiğinden beri (Honma & Shimomura, 1978) ACC deaminaz aktivitesi birçok bakteride, özellikle *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Burholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rastolnia* ve *Rhizobium*'un kökleri ile ilişkili toprak bakterilerinde belirlenmiştir (Glick vd, 1995; Glick vd, 2007; Contesto vd, 2008). ACC deaminaz ACC'nin alfa ketobütirat ve amonyuma hidrolizini katalizleyen enzimdir. Rizosfer toprak örneklerinden izole edilen birçok bakteriyel suş azotun tek kaynağı olarak ACC'yi kullanmaktadır (Penrose & Glick, 2003). ACC deaminaz içeren PGPR uygulanan bitkiler sel, ağır metaller, fitopatojenlerin varlığı, kuraklık ve yüksek tuzluluk gibi stres koşullarında sentezlenerek etilen stresinin zararlı etkilerine daha dirençli olmaktadır (Penrose & Glick, 2003).

İzole edilen bakterilerin ACC deaminaz enzimi aktivitesini belirlemek için çalışmamızda Brown & Dilworth Minimal besiyeri (BD) kullanılmıştır. ACC eklenen ve eklenmeyen BD besiyerine ekilen 111 izolattan 32'si ACC eklenmemiş BD besiyeri ile karşılaştırıldığında ACC deaminaz aktivitesi göstermiştir. Contesto vd (2008) yaptıkları çalışmada dört rizobakterinin ACC deaminaz aktivitesinin *Arabidopsis*'in kök gelişimine, kök yapısı ve kök tüyü uzunluğuna olumlu etkileri olduğunu belirlemişlerdir.

Husen vd (2009) azot kaynağı olarak ACC ya da amonyum sülfatla desteklenen DF tuz besiyeri kullanarak soya fasulyesi rizosferinden izole ettikleri kök gelişimini arttıran 13 bakteriden 11'inde ACC deaminaz üretimini pozitif olarak değerlendirmişlerdir. (Mayak vd, 2004) ACC deaminaz-içeren bakteri *Achromobacter piechaudii* ARV8'in domates bitkisinde kuraklık ve tuzluluk stresini maskeleyiği de gösterilmiştir (Goswami vd, 2016).

PGPR'lerin başka bir önemli özelliği bitki gelişimine indirekt etkisi olan siderofor üretimidir. Sideroforlar bakteri ve fungus gibi mikroorganizmalar tarafından demir stresi durumunda oluşturulan güçlü demir iyonu şelatörleridirler (Verma vd, 2012).

Siderofor üretiminin belirlenmesi için araştırmacılar tarafından en yaygın olarak CAS (Chrome Azurol S) agar besiyeri kullanılmıştır (Sayyed vd, 2005; Ahmad vd, 2008; Tailor & Joshi, 2012; Rathour vd, 2012; Sakthivel & Karthikeyan, 2012; Anand & Nikhilesh, 2013). Çalışmamızda da siderofor üretiminin belirlenmesi için CAS (Chrome Azurol S) agar besiyeri kullanılmış ve bu besiyerine ekilen 17 bakteriden 10'unun siderofor ürettiği belirlenmiştir.

Cherif-Silini vd (2016) buğday rizosferinden izole ettikleri 35 bakteri suşunun siderofor üretimini test etmek için CAS agar besiyerini kullanmışlar ve filogenetik analizleri sonucunda *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Paenibacillus*'la ilişkili bakteriler elde etmişlerdir.

Günümüzde 16S rDNA bakterilerin taksonomisi için çok önemli bir standarttır (Wang & Sun, 2009). 16S rDNA dizileme tekniği bakteri türlerinin tanımlanması, filogenetik akrabalıklarının ve bakteri türleri arasındaki pozisyonlarının analizi için yaygın olarak kullanılan moleküler bir belirteçtir (Woese vd, 1985; Woese, 1987; Janda & Abbott, 2007; Ribeiro & Cardoso, 2012; Aziz, 2015). Bakteriyel filogeni ve taksonomi çalışmalarında 16S rRNA geninin housekeeping genetik belirteci olarak çok daha yaygın kullanılmasının sebepleri; hemen hemen tüm bakterilerde var olması, 16S rRNA geninin fonksiyonunun zamanla değişmemiş olması ve 16S rRNA geninin informatik amaçlar için (1500 bp) yeterince uzun olması sayılabilir (Patel, 2001; Janda & Abbott, 2007).

Tropikal epifitik orkideler olan *Acampe papilosa* ve *Dendrobium moschatum* orkidelerinin kökleri ile ilişkili bakterilerin belirlenmesi için yapılan çalışmada,

*Acampe papilosa*'dan *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* ve *Xanthomonas* cinslerine ait, *Dendrobium moschatum*'dan ise *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Aquaspirillum* cinslerine ait bakteriler elde edilmiştir (Tsavkelova vd, 2004).

Bhusan Bal vd (2013) tropikal pirinç bitkisinin rizosferinden izole ettikleri bakteri izolatlarının filogenetik analizlerini yaptıklarında *Bacillus*, *Microbacterium*, *Methylophaga*, *Agromyces* ve *Paenibacillus* cinslerine ait olduklarını belirlemişlerdir.

Bu çalışmada ise PGPR özellikleri gösteren 17 izolatın 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium* (*Rhizobium*), *Stenotrophomonas* cinslerine ait olabileceği belirlenmiştir.

En sık raporlanan PGPR'ler arasında *Bacillus* suşları çok yaygındır (Qiao vd, 2014). Çalışmamızda da PGPR adayı olarak belirlenen bakterilerden en fazla *Bacillus* cinsi ile ilişkili organizmalar elde edilmiştir. *Bacillus* endospor oluşturmaları nedeniyle diğer bakterilere göre avantajlıdır ve bu nedenle biyofungusit ya da biyogübre gibi preparatların temel bileşenini oluşturmaktadır (Qiao vd, 2014; Cherif-Silinil vd, 2016).

*Pseudomonas* cinsi içinde şu ana kadar 144 tür tanımlanmıştır ve Gram (-) bakterilerin en fazla türe sahip cinsidir. *Bacillus*'dan sonra en sık tesbit edilen organizmalardan biri olan *Pseudomonas* suşları birçok orkide kökünden izole edilmiş olup çalışmamızda da PGPR izolatlarından 4'ü (HA-25, HA-53, HA-55, HA-82) bu grupta ilişkili bulunmuştur. Dolayısıyla söz konusu veriler literatürle uyumludur.

Bir izolatın (HA-121) *Lysinibacillus* ve *Bacillus* cinsiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. *Lysinibacillus* *Bacillaceae* ailesine aittir. Bu cinsteki organizmaların önceden *Bacillus* üyeleri olduğu kabul edilmiş, fakat 2007'de *Lysinibacillus* cinsine dahil edilmişlerdir (Ahmed vd, 2007; Xu vd, 2015). Mevcut literatüre göre izolatımız (HA-121) PGPR organizması olarak bu yeni cins açısından dünya ölçeğinde yeni kayıt olma potansiyeli taşımaktadır.



*Paenibacillus* cinsi ilk olarak Ash vd (1993) tarafından önerilmiştir ve *Bacillus* cinsinden ayrılmıştır. Gram (+), spor oluşturan, fakültatif aerobik bakteri grubudur. Bitki gelişimini arttıran rizobakteri olarak *Paenibacillus* cinsine ait birçok bakteri tanımlanmıştır (Timmusk vd, 1999; Bent vd, 2001; Sangeeth vd, 2012; Bhusan Bal vd, 2013). Örneğin *Paenibacillus polymyxa* PGPR olarak tanımlanan türlerdendir (Timmusk vd, 1999). Bir izolatın (HA-86) bu cins ile ilişkili olduğu tesbit edilmiş fakat tür düzeyinde ayrımı net olarak yapılamamıştır. Dolayısıyla bu cins orkidelerde tesbit edilmiş olup ülkemizde ve bölgemizdeki orkideler için tesbit edilen ilk PGPR organizması olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada elde edilen iki izolatın (HA-37 ve HA-38) yüksek bootstrap değerleriyle *Acinetobacter* cinsine ait oldukları belirlenmiştir. Bu cinse ait izolatlar birçok orkideden elde edilmiş ve diğerlerinde olduğu gibi PGPR özelliği tesbit edilmemiştir. Bu nedenle elde edilen izolatların orkidelerde PGPR özelliği taşıyan organizmalar olarak hem dünya hem de ülkemiz ölçeğinde ilk kayıt olma özellikleri bulunmaktadır.

Bir izolatın (HA-59) *Agrobacterium (Rhizobium)* cinsi ile ilişkili olduğu, bootstrap değerleri dikkate alındığında *Agrobacterium tumefaciens*'le yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bir başka izolatın (HA-64) ise yüksek bootstrap değerleri dikkate alınarak *Stenotrophomonas* cinsi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. *Stenotrophomonas* diğer bitkilerde PGPR olarak belirlenmiş cinsler arasındadır. Orkide köklerinden izole edilen suşlar arasında da *Stenotrophomonas* ve *Agrobacterium* cinsine ait bakteriler belirlenmiş olmakla birlikte diğer cinslerde olduğu gibi PGPR özellikleri değerlendirilmemiştir. Dolayısıyla bizim çalışmamız orkide bitkisinden izole edilen bakterilerin PGPR özelliklerinin belirlenmesi açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.

Tsakelova vd (2016) *Dendrobium nobile*'den elde edilen bakteriler için ilk kez PGPR tanımını kullanmış olsa da, bu çalışmada PGPR özelliği olarak sadece IAA özelliği tesbit edilmiştir. Elde edilen mevcut veriler ışığında, orkide rizosferinden PGPR özelliği taşıyan bakterilerin tanımlanmasına yönelik yaptığımız bu çalışma dünyada ve ülkemizde ilk kayıt olma özelliği taşımaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada doğal ortamda yetişen yabancı orkidelerin rizosfer bölgesinde yaşayan olası PGPR özelliği taşıyan bakterilerin tanımlanması, genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi ve hangi mekanizmalarla bitki gelişimini desteklediklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bitkilerin gelişimine çeşitli mekanizmalarla katkısı olan rizobakterilerin belirlenmesi ve bu etkileri gösteren yeni PGPR aday bakterilerin belirlenmesi için moleküler düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda mikrobiyom kavramının öne çıkmasıyla birlikte bu tip çalışmaların önemi daha da artmaktadır.

PGPR etki mekanizmalarına odaklanan çalışmaların çoğu ticari PGPR'lerin etkinliğini arttırmaya yöneliktir. Bu sürecin daha iyi yönetilebilmesi açısından organizmanın gelişimi sırasında sinyal çevrimi mekanizmasını ve düşman ataklarından bitkiyi koruyan biyokontrol mekanizmasını açıklayan omik teknolojilerinden yararlanılabilecektir (Rathore, 2014).

Moleküler yaklaşımlar toprakta kültürü yapılabilen organizmaların yanı sıra kültürü yapılamayan mikroorganizmaların (bazı Archaea üyeleri) varlığını da ortaya çıkarmaktadır (Tarkka vd, 2008). Halihazırda *Pseudomonas* ve *Bacillus* gibi serbest yaşayan rizobakteriyel suşlara odaklanılmaktadır. Ancak, simbiyotik olmayan endofitik bakterilerden özgün ilişkileri ve büyüme arttırıcı etkileri bakımından öğrenilecek çok şey vardır (Compant vd, 2010).

PGPR araştırmalarında çoğunlukla ticari öneme sahip bitkiler seçilmektedir. Çalışmamızda seçilen yabancı orkide bitkisinden elde ettiğimiz sonuçlar, orkidelerin doğada ayakta kalma gücüne katkısı olan bakterilerin de PGPR özelliği taşıyabileceğini göstermiştir. Elde edilen veriler çimlendirme deneyleri ile de desteklenebildiğinde daha değerli olacaktır. Ayrıca filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde genel belirteç olan 16S rDNA dizilemesine ek olarak başka housekeeping genlerin kullanımı ile de elde edilen ağaçlardan daha ayrıntılı bilgi sağlanabilecektir.

Yapılan çalışmada, belirtilen PGPR özelliklerini taşıyan bakteriler tesbit edilmiş, 16S dizileme tekniği kullanılarak teşhisleri yapılmış ve ilişkili olduğu bakteri cins ve türleri belirlenmiştir. Literatürde belirtilen PGPR organizmalarına ek olarak bu bağlamda daha önce belirtilmemiş olan bakteriler de tesbit edilmiştir. Dolayısıyla, ülkemizde ve yöremizde farklı orkide türlerine ait bakteriyel biyoçeşitliliğin ortaya çıkarılması ve bunların literatüre kazandırılması bakımından, aynı zamanda ülkemizde bu alandaki ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

PGPR potansiyeline sahip bu bakterilerin tarımsal öneme sahip diğer bitkilerde ve kültür bitkilerinde inokülant olarak kullanılabilmesi çalışmanın diğer önemli bir özelliğini oluşturmaktadır.

Elde edilen mevcut veriler ışığında, orkide rizosferinden PGPR özelliği taşıyan bakterilerin tanımlanmasına yönelik yapılan bu çalışma dünyada ve ülkemizde ilk kayıtları barındırmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Acıkgöz E, Bilgili U, Sahin F & Guillard K (2016). Effect of plant growth-promoting *Bacillus* sp. on color and clipping yield of tree turfgrass species. *Journal of Plant Nutrition*, 39(10): 1404-1411. doi.org/10.1080/01904167.2016.1143501
- Ahemad M & Khan M S (2011). Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria: recent advancement. *Insight Microbiology*, 1(3): 39-54. doi:10.5567/IMICRO-IK.2011.39.54
- Ahemad M & Kibret M (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*, 26(1): 1-20. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Ahmad F & Ahmad I (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163: 173-181.
- Ahmad M, Zahir Z A, Khalid M, Nazli F & Arshad M (2013). Efficacy of *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 170–176. doi:10.1016/j.plaphy.2012.11.024
- Ahmed A & Hasnain S (2010). Auxin producing *Bacillus* sp. : Auxin quantification and effect on the growth *Solanum tuberosum*. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1): 313–319. doi:10.1351/PAC-CON-09-02-06
- Ahmed E & Holmström S J M (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3): 196-208. doi: 10.1111/1751-7915.12117
- Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A & Fujiwara T (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov sp nov. and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:1117-1125.
- Ahn I P, Park K & Kim CH (2002). Rhizobacteria-induced resistance perturbs viral disease progress and triggers defense related gene expression. *Molecules and Cells*, 13(2):302-308.
- Akhtar M S & Siddiqui Z A (2010). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Biocontrol of Plant Diseases and Sustainable Agriculture. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria* (Editör Maheshwari D K, *Microbiology Monographs* 18, Springer Heidelberg Dordrecht London New York),157-195.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M & Ullrich C I (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, 97(5): 883–893. doi:10.1093/aob/mcl027

- Anand P & Nikhilesh K (2013). Isolation of Plant Growth Promoting Bacteria from wheat (Lok-1) rhizosphere. *International Journal of Science and Research*, 4(6): 2319-7064.
- Andrews S C, Robinson A K & Rodriguez-Quinones F (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 215–237.
- Antoun H & Prevost D (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (Editör Siddiqui Z A, Springer, The Netherlands), 1–39.
- Araujo W L, Marcon J, Maccheroni Jr W, Elsas J D V, Vuurde J W L V & Azevedo J L (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental*, 68(10): 4906-4914.
- Arora N K, Khare E, Oh J H, Kang S C & Maheshwari D K (2008). Diverse mechanisms adopted by *Pseudomonas fluorescent* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(4): 581–585. doi:10.1007/s11274-007-9505-5
- Arı E (2000). Orkideler ve Türkiye’deki Mevcut Durum. *Derim*, 17(3): 136-152.
- Aziz Z F A (2015). 16S rRNA Phylogenetic Analysis of the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Associated with Pepper (*Piper nigrum* L.). *Research in Plant Biology*, 5(4): 21-27.
- Babalola O O, Osir E O, Sanni A I, Odhaimbo G D & Bulimo W D (2003). Amplification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soils. *African Journal of Biotechnology*, 2(6): 157–160. doi:10.5897/AJB2003.000-1032
- Babalola O O (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letter*, 32(11): 1559-1570.
- Bafana A (2012). Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region. *World Journal of Microbiology and Biotechnonology*, 29(1): 63-74. doi 10.1007/s11274-012-1158-3
- Bais H P, Weir T L, Perry L G, Gilroy S & Vivanco J M (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Microbiology*, 57: 233-66.
- Baldani V L D, Baldani J I & Dobereiner J (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum eropedicae* and *Burkholderia* spp.. *Biology and Fertilization of Soils*, 30: 485-491.
- Bao Z, Sasaki K, Okubo T, Ikeda S, Anda M, Hanzawa E, Kaori K, Tadashi S, Hisayuki M & Minamisawa K (2013). Impact of *Azospirillum* sp. B510 inoculation on rice-associated bacterial communities in a paddy field. *Microbes and Environments*, 28(4): 487-490.

- Barriuso J, Solano B R, Lucas J A, Lobo A P, Garcia-Villaraco A & Manero F J G (2008). Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plana Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Plant-Bacteria Interactions Strategies and Techniques to Promote Plant Growth* (Editör Ahmad I, Pichtel J & Hayat S, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim), 1-17.
- Basak B B & Biswas D R (2009). Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers. ) grown under two Alfisols. *Plant Soil*, 317(1): 235–255. doi:10.1007/s11104-008-9805-z
- Bashan Y, Holguin G & Lifshitz R (1993). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria. *In Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, (Editörler Glick B R & Thompson J E, CRC Press, Boca Raton, Florida), 331-345.
- Bayrak D & Ökmen G (2014). Bitki Gelişimini Uyarıcı Kök Bakterileri. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(1): 1-13.
- Belimov A A, Safronova V I, Sergeyeva T A, Egorova T N, Matveyeva V A, Tsyganov V E, Borisov A Y, Tikhonovich I A, Kluge C, Preisfeld A, Dietz K J & Stepanok V V (2001). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(7): 642–652.
- Belimov A A, Hontzeas N, Safronova V I, Demchinskaya S V, Piluzza G, Bullitta S & Glick B R (2005). Cadmium-tolerant plant growth promoting rhizobacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 241–250.
- Beneduzi A, Ambrosini A & Passaglia L M P (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 34(4): 1044-1051.
- Beneduzi A, Moreira F, Costa P B, Vargas L K, Lisboa B B, Favreto R, Baldani J I & Passaglia L M P (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63:94-104.
- Bent E, Tuzun S, Chanway C & Enebak S (2001). Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 793-800.
- Berendsen R L, Pieterse C M & Bakker P A (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17: 478–486.
- Berg G (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1): 11-18. doi: 10.1007/s00253-009-2092-7
- Berg R H, Tyler M E, Novick N J, Vasil V & Vasil I K (1980). Biology of *Azospirillum* sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(3): 642–649.

- Bertani G (1951). Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62: 293–300.
- Bhattacharyya P N & Jha D K (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4): 1327-1350.
- Bhusan Bal H, Das S, Dangar T K & Adhya T K (2013). ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of Basic Microbiology*, 53(12): 972-84. doi:10.1002/jobm.201200445
- Boddey R M, Polidoro J C, Resende A S, Alves B J R & Urquiaga S (2001). Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and other grasses. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28(9): 889-895.
- Boukhalfa H, Lack J, Reilly S D, Hersman L & Neu M P (2003). Siderophore production and facilitated uptake of iron and plutonium in *P. putida*. *American Institute of Physics Conference Proceedings*, 6-10 July, 673:343-344, New Mexico (USA).
- Brick J M, Bostock R M & Silverstone S E (1991). Rapid insitu assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2): 535-538.
- Brown C M & Dilworth M J (1975). Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacterioids. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 86: 39-48.
- Canpolat M Y, Bilen S, Çakmakçı R, Şahin F & Aydın A (2006). Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils*, 42: 350-357.
- Cattelana A J, Hartela P G & Fuhrmann J J (1999). Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Science Society of America Journal*, 63(6):1670–1680. doi:10.2136/sssaj1999.6361670x
- Chandanie W A, Kubota M & Hyakumachi M (2005). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and plant growth promoting fungus *Phoma* sp. on their root colonization and growth promotion of cucumber. *Mycoscience*, 46: 201-204.
- Chandanie W A, Kubota M & Hyakumachi M (2006). Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. *Plant Soil*, 286: 209–217.
- Chen Y, Mei R, Lu S, Liu L & Kloepper J W (1996). The use of Yield Increasing Bacteria (YIB) as Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Chinese agriculture. *Management of soil borne diseases* (Editörler Utkhede R S & Gupta V K, Kalyani publishers, Ludhiada. New Delhi), 164-184.
- Cherif-Silini H, Silini A, Yahiaoui B, Ouzari I & Boudabous A (2016). Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat

rhizosphere. *Annals of Microbiology*, 66(3): 1087-1097. doi 10.1007/s13213-016-1194-6

- Ciccillo F, Fiore A, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S & Chiarini L (2002). Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. *Environmental Microbiology*, 4(4): 238-245.
- Clayton G W, Rice W A, Lupwayi N Z, Johnston A M, Lafond G P, Grant C A & Walley F (2004). Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: Nodulation, N<sub>2</sub> fixation and nitrogen partitioning. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(1): 79-88.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C & Barkai E A (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 4951–4959.
- Contesto C, Desbrosses G, Lefoulon C, Bena G, Borel F & Galland M (2008). Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Science*, 175(1-2): 178–189.
- Cornelis P (2010). Iron uptake and metabolism in Pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6): 1637-1645.
- Cummings S P (2009). The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. *Environmental Biotechnology*, 5(2): 43-50.
- Czaban J, Gajda A & Wroblewska B (2007). The motility of bacteria from rhizosphere and different zones of winter wheat roots. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(2): 301-308.
- Çakmakçı R, Dönmez M F & Erdoğan Ü (2007). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Barley Seedling Growth, Nutrient Uptake, Some Soil Properties and Bacterial Counts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(3): 189-199.
- Çakmakçı R (2009). Stres Koşullarında ACC Deaminaz Üretici Bakteriler Tarafından Bitki Gelişiminin Teşvik Edilmesi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1): 109-125.
- Çakmakçı R, Ertürk Y, Dönmez M F, Turan M, Atasever A, Sekban R, Kutlu M & Haznedar A (2011). Bitki gelişimini teşvik edici bakterilerin çay gelişme, verim, besin alımı ve enzim aktivitesi üzerine etkisi. *GAP VI. Tarım Kongresi*, 9-12 Mayıs, 7: 22-28, Şanlıurfa.
- Danhorn T & Fuqua C (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61: 401-422. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093316



- Dasri K, Kaewharn J, Kanso S & Sangchanjiradet S (2014). Optimization of indole-3-acetic acid (IAA) production by rhizobacteria isolated from epiphytic orchids. *KKU Research Journal*, 19: 268-275.
- Davis P H (1965-1988). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. I-X, Edinburg University Press, Edinburg.
- De Freitas J B, Benerjee M R & Germida J J (1997). Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 24:358-364.
- De Salamone I E G, Dobereiner J, Urquiaga S & Boddey R M (1996). Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. *Biology and Fertility of Soils*, 23: 249-256.
- Demir M, Cevahir N, Kaleli İ, Yıldırım U, Şahin R & Tepeli E Ç (2008). Alt solunum yolu örnekleri ve solunum yolu dışı örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında siderofor, total matriks proteaz ve elastaz aktivitesinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 42: 197-208.
- Dey R, Pal K K, Bhatt D M & Chauhan S M (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 159(4): 371-394. doi:10.1016/j.micres.2004.08.004
- Diaz-Zorita M & Fernandez-Canigia M V (2009). Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology*, 45(1):3-11. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.07.001
- Dobbelaere S, Vanderleyden J & Okon Y (2003). Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2):107-149.
- Dobereiner J (1961). Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Plant and Soil*, 15(3): 211–216.
- Donate-Correa J, Leon-Barrios M & Perez-Galdona R (2004). Screening for plant growth promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant Soil*, 266(1): 261–272. doi:10.1007/s11104-005-0754-5
- Dönmez M F, Esitken A, Yildiz H & Ercisli S (2011). Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by Plant Growth Promoting Bacteria. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(4): 758-763.
- Dunfield K E & Germida J J (2003). Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7310-7318.
- Egamberdiyeva D (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3):184-189. doi:10.1016/j.apsoil.2007.02.005

- El-Akhal M R, Rincon A, Coba de la Pena T, Lucas M M, El Mourabit N, Barrijal S & Pueyo J J (2013). Effects of salt stress and rhizobial inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars. *Plant Biology*, 15(2): 415–421. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00634.x
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H & Minamisawa K (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11): 5285–5293. doi:10.1128/AEM.67.11.5285-5293.2001
- Elkoca E, Kantar F & Sahin F (2008). Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*, 31:157-171. doi:10.1080/01904160701742097
- Erdem B (2013). Mikrobiyal Sideroforlar ve Biyoteknolojideki Uygulama Alanları. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi/The Black Sea Journal of Sciences*, 3(8): 77-88.
- Erper İ, Hatat Karaca G, Özkoç İ & Turkkkan M (2013). Binucleate *Rhizoctonia repens* as a Biocontrol Agent against Damping-Off Disease of Cucumber Plant. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 7(1): 58-61.
- Ertürk Y, Ercişli S, Haznedar A & Çakmakçı R (2010). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research*, 43: 91-98.
- Esitken A, Pirlak L, Turan M & Sahin F (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, 110: 324-327.
- Esitken A, Yildiz H A, Ercisli S, Donmez M F, Turan M & Gunes A (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, 124(1): 62-66.
- Fan B, Chena X H, Budiharjoa A, Bleiss W, Vaterc J & Borrissa R (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151: 303–311.
- Faria D C, Dias A C F, Melo I S & Costa F E C D (2012). Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, doi 10.1007/s11274-012-1173-4
- Fernando W G D, Nakkeeran S & Zhang Y (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (Editör Siddiqui Z A, Springer Dordrecht The Netherlands), 67-109.
- Ferreira A S, Pires R R, Rabelo P G, Oliveira R C, Luz J M Q & Brito C H (2013). Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian cerrado under greenhouse and field conditions. *Applied Soil Ecology*, 72:103-108.

- Flores-Felix J D, Silva L R, Rivera L P, Marcos-Garcia M, Garcia-Fraile P, Martinez-Molina E, Mateos P F, Velazquez E, Andrade P & Rivas R (2015). Plants probiotics as a tool to produce highly functional fruits: the case of *Phyllobacterium* and vitamin C in strawberries. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0122281
- Flores-Felix J D, Menendez E, Rivera L P, Marcos-Garcia M, Martinez-Hidalgo P, Mateos P F, Martinez-Molina E, Velazquez M D L E, Garcia-Fraile P & Rivas R (2013). Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(6): 876–882. doi:10.1002/jpln.201300116
- Fürnkranz M, Müller H & Berg G (2009). Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116(4): 149-155.
- Galdiano Junior R F, Pedrinho E A N, Castellane T C L & Lemos E G M (2011). Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid and their role in acclimatization. *Rev Bras Ciencia Solo*, 35: 729–737.
- Garcia C A, Rossi B P, Alcaraz E, Vay C & Franco M (2012). Siderophores of *Stenotrophomonas maltophilia*: detection and determination of their chemical nature. *Revista Argentina de Microbiologia*, 44: 150-154.
- Garcia-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramirez-Bahena M H, Flores-Felix J D, Fernandez M T, Mateos P F, Rivas R, Igual J M, Martinez-Molina E, Peix A & Velazquez E (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One*, 7(5): e38122. doi:10.1371/journal.pone.0038122
- Garcia-Fraile P, Menendez E & Rivas R (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering*, 2(3): 183-205. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.183
- Gasser I, Cardinale M, Müller H, Heller S, Eberl L, Lindenkamp N, Kaddor C, Steinbüchel A & Berg G. ( 2011). Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant and Soil*, 347: 125-136.
- Ghorbanpour M & Hatami M (2014). Biopriming of *Salvia officinalis* Seed with Growth Promoting Rhizobacteria Affects Invigoration and Germination Indices. *Journal of Environmental Sciences*, 8(22): 29-36.
- Ghosh S, Penterman J N, Little R D, Chavez R & Glick B R (2003). Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(3): 277–281. doi:10.1016/S0981-9428(03)00019-6
- Gianfreda L (2015). Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15 (2): 283-306.

- Glick B R, Karaturovic D & Newell P (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 533–536.
- Glick B R, Patten C L, Holguin G & Penrose D M (Editors) (1999). *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. Imperial College Press, 276, London.
- Glick B R, Cheng Z, Czarny J & Duan J (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-containing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 329–339.
- Glick B R (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169: 30–39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
- Gordon S A & Weber R P (1951). Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology*, 26: 192-195. doi:10.1104/pp.26.1.192
- Goswami D, Dhandhukia P, Patel P & Thakker J N (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*, 169(2014): 66-75.
- Goswami D, Thakker J N & Dhandhukia P C (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1): 1-19. doi: 10.1080/23311932.2015.1127500
- Govindarajan M, Balandreau J, Muthukumarasamy R, Revathi G & Lakshminarasimhan C (2006). Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil*, 280(1): 239-252. doi:10.1007/s11104-005-3223-2
- Govindarajan M, Balandreau J, Kwon S W, Weon H Y & Lakshminarasimhan C (2007). Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecology*, 55: 21–37. doi:10.1007/s00248-007-9247-9
- Gravel V, Antoun H & Tweddell R J (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8): 1968-1977. doi:10.1016/j.soilbio.2007.02.015
- Gupta A, Rai V, Bagdwal N & Goel R (2005). In situ characterization of mercury resistant growth promoting fluorescent pseudomonads. *Microbiological Research*, 160 (2005): 385–388.
- Gupta G, Parihar S S, Ahirwar N K, Snehi S K & Singh V (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7(2): 96-102.

- Habib S H, Kausar H & Saud H M (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in Okra through ROS-scavenging enzymes. *BioMed Research International*, doi:10.1155/2016/6284547
- Haider N, Nabulsi I & Kamary Y (2012). Phylogeny of Orchidaceae species in northwest Syria based on ISSRs. *Journal of Plant Biology Research*, 1(2): 36-50.
- Han H S, Supanjani S & Lee K D (2006). Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant, Soil and Environment*, 52(3): 130–136.
- Han J, Suna L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y & Song W (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR<sub>4</sub> both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 66-76.
- He K & Bauer C E (2014). Chemosensory signaling systems that control bacterial survival. *Trends Microbiology*, 22(7): 389-398. doi: doi:10.1016/j.tim.2014.04.004
- Hiltner L (1904). Over recent experiences and problems in the field of soil bacteriology and special those into account the grundung and brache. *Arb Deutsche Agricultural Enges*, 98: 59-78.
- Honma M & Shimomura T (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43: 1825–1831.
- Hungria M, Campo R J, Souza E M & Pedrosa F O (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331: 413-425. doi:10.1007/s11104-009-0262-0
- Hungria M, Nogueira M A & Araujo R S (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, 49(7): 791-801. doi:10.1007/s00374-012-0771-5
- Hurek T, Handley L L, Reinhold-Hurek B & Piche Y (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 15(3): 233-242.
- Hurek T & Reinhold-Hurek B (2003). *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*, 106(2-3): 169–178. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.07.010
- Husen E, Wahyudi A T, Suwanto A & Saraswati R (2009). Soybean seedling root growth promotion by 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing *Pseudomonas*. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 10(1): 19-25.
- Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M & Sa T M 2008. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology*, 56(4): 327-33. doi:10.1007/s00284-007-9086-4

- Isawa T, Yasuda M, Awazaki H, Minamisawa K, Shinozaki S & Nakashita H (2010). *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. *Microbes and Environments*, 25(1): 58-61.
- James E K, Gyaneshwar P, Mathan N, Barraquio W L, Reddy P M, Iannetta P P, Olivares F L & Ladha J K (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(9): 894-906.
- Janda J M & Abbott S L (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9): 2761-2764.
- Jarak M, Mrkovacki M, Bjelic D, Josic D, Hajnal-Jafari T & Stamenov D (2012). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African Journal of Microbiology Research*, 6(27): 5683-5690.
- Jha C K & Saraf M (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*, 5(2): 108-119.
- Joo G J, Kim Y M, Kim J T, Rhee I K, Kim J H & Lee I J (2005). Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *The Journal of Microbiology*, 43(6): 510–515.
- Kai X, Yuan Z, Rayner S & Hu X (2015). Genome comparison provides molecular insights into the phylogeny of the reassigned new genus *Lysinibacillus*. *BMC Genomics*, 16:140, doi 10.1186/s12864-015-1359-x
- Kao C M, Chen S C, Chen Y S, Lin H M & Chen Y L (2003). Detection of *Burkholderia pseudomallei* in rice fields with PCR-based technique. *Folia Microbiologica*, 48(4): 521-524.
- Kalbe C, Marten P & Berg G (1996). Members of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape. *Microbiologi Res*, 151: 4433–4400.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kayokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Taceuchi C, Yamada M & Tabata S (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Research*, 7(6): 331–338.
- Kang B G, Kim W K, Yun H S & Chang S C (2010). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports*, 4: 179–183.
- Kannapiran E & Ramkumar V S (2011). Inoculation effect of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth of black gram (*Phaseolus mungo* Roxb; Eng). *Annals of Biological Research*, 2 (5) :615-621.
- Karakurt H, Kotan R, Dadaşoğlu F, Aslantaş R & Şahin F (2011). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color

- values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya). *Turkish Journal of Biology*, 35(2011): 283-291.
- Kardaş Ş & Ökmen G (2014). ACC Deaminaz ve Mikroorganizmalar, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 7(1): 69-78.
- Kaur H, Kaur J & Gera R (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A boon to Agriculture. *International Journal of Cell Science and Biotechnology*, 5(2016): 17-22.
- Kaymak H (2010). Potential of PGPR in Agricultural Innovations. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria* (Editör Maheshwari D K, *Microbiology Monographs* 18, Springer Heidelberg Dordrecht London New York), 45-79.
- Kaymak H C, Yarali F, Guvenc I & Donmez M F (2008). The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. *African Journal of Biotechnology*, 7(24): 4479-4483.
- Khan A L, Waqas M, Kang S M, Al-Harrasi A, Hussain J, Al-Rawahi A, Al-Khiziri S, Ullah I, Ali L, Jung H Y & Lee I J (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(8): 689–695. doi:10.1007/s12275-014-4002-7
- Khan M S, Zaidi A & Ahmad E (2014). Mechanism of phosphate solubilisation and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. (Khan M S, Zaidi A & Mussarrat J editors). doi:10.1007/978-3-319-08216-5\_2
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111–120. doi:10.1007/BF01731581. PMID 7463489
- King E O, Ward M K, Raney D E (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2): 301-307.
- Kloepper J W & Schroth M N (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Agners, France, 2: 879-882.
- Kloepper J W, Leong J, Teintze M & Schroth M N (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885–86.
- Kloepper J W, Zablotowick RM, Tipping E M & Lifshitz R (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. Keister D L, Cregan P B (Editors), *The Rhizosphere and Plant Growth*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 315–326.
- Kloepper J W, Ryu C M & Zhang S (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp.. *Phytopathology*, 94(11): 1259-1266. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259

- Knudson L (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot Gazette*, 73: 1–25.
- Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M & Sessitsch A (2008). Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil*, 304:35–44. doi 10.1007/s11104-007-9517-9
- Kumar H, Bajpai V K, Dubey R C, Maheshwari D K & Kang S C (2010). Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. *Crop Protection*, 29(6): 591–598. doi:10.1016/j.cropro.2010.01.002
- Kumar A, Kumar A, Devi S, Patil S, Payal C & Negi S (2012). Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology*, 4(1): 01-05.
- Kundan R, Pant G, Jadon N, Agrawal P K (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 6(2): 1-19. doi: 10.4172/jbfbp.1000155
- Küçük Ç & Güler İ (2009). Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bazı Biyokontrol Mikroorganizmalar. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 7(1): 30-42.
- Labuschagne N, Pretorius T & Idris A H (2010). Plant Growth Promoting Rhizobacteria as biocontrol agents against soil-borne plant diseases. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria* (Editör Maheshwari D K, *Microbiology Monographs* 18, Springer Heidelberg Dordrecht London New York), doi 10.1007/978-3-642-13612-2\_9
- Ladeiro B (2012). Saline agriculture in the 21st century: Using salt contaminated resources to cope food requirements. *Journal of Botany*, 2012: 1-7. doi:10.1155/2012/310705
- Li Q, Saleh-Lakha S & Glick B R (2005). The effect of native and ACC deaminase containing *Azospirillum brasilense* Cd1843 on the rooting of carnation cuttings. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(6):511–514. doi:10.1139/w05-027
- Lifshitz R, Kloepper J W, Kozlowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping E M, & Zaleska, I (1987). Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 390-395.
- Liu F, Xing S, Ma H, Du Z & Ma B (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20): 9155–9164. doi:10.1007/s00253-013-5193-2
- Louden B C, Haarmann D & Lynne A M (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1): 51-53. doi:10.1128/jmbe.v12i1.249



- Lugtenberg B & Kamilova F (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541-556.
- Ma W, Guinel F C & Glick B R (2003). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ACC deaminase protein promotes the nodulation of pea plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4396–4402. doi:10.1128/AEM.69.8.4396-4402.2003
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J & Sa T (2006). Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1- aminocycloprpane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fjisawaense*. *Planta*, 224(2): 268–278. doi:10.1007/s00425-005-0211-y
- Maniatis T, Fritsch E F & Sambrook J (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 545.
- Mann E W (1969). Inhibition of tobacco mosaic virus by a bacterial extract. *Phytopathology*, 59(5): 658–662.
- Martinez-Viveros O, Jorquera M A, Crowley D E, Gajardo G, Mora M L (2010). Mechanisms and Practical Considerations Involved in Plant Growth Promotion by Rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3): 293-319.
- Matzanke B F (1991). Structures, coordination chemistry and functions of microbial iron chelates. *CRC Handbook of Microbial Iron Chelates*(Editör Winkelmann G, Boca Raton, FL, USA: CRC Press), 15–64.
- Maurhofer M, Hase C, Meuwly P, Metraux J P & Defago G (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 84(2): 139–146.
- Mayak S, Tivosh T & Glick B R (1999). Effect of wild type and mutant plant growth promoting rhizobacteria on the rooting of mungbean cuttings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18(2):49–53. doi:10.1007/PL00007047
- Mayak S, Tirosh T & Glick B R (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 565-572.
- Mazzola M, Fujimoto D K, Thomashow L S & Cook R J (1995). Variation in Sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to Antibiotics Produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. and Effect on Biological Control of Take-All of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7): 2554–2559.
- McNear Jr D H (2013). The rhizosphere-roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge*, 4(3): 1.
- Mehta S & Nautiyal C S (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*, 43: 51-56.
- Mirik M (2005). Biberde bakteriyel leke etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik

mücadele olanakları, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 184, Adana.

- Mougel C, Offre P, Ranjard L, Corberand T, Gamalero E, Robin C & Lemanceau P (2006). Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula*. gaertn cv jemalong line J5. *New Phytologist Trust*, 170:165-175.
- Munoz-Rojas J & Caballero-Mellado J (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, 46(4): 454–464. doi:10.1007/s00248-003-0110-3
- Murphy J F & Zehnder G W (2000). Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against tomato mottle virus. *Plant Disease*, 84(7): 779–784.
- Muthukumarasamy R, Revathi G & Vadivelu M (2000). *Acetobacter diazotrophicus*: prospects and potentialities-An overview. In *Recent Advances in Biofertilizer Technology* (Editörler Yadav A K, Motsara M R & Ray Chaudhury S, Society for Promotion & Utilization Resources & Technology, New Delhi), 126-153.
- Müller H, Westendorf C, Leitner E, Chernin L, Riedel K, Schmidt S, Eberl L & Berg G (2008). Quorum-sensing ejects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. *FEMS Microbiology Ecology*, 67: 468–478. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00635.x
- Nakkeeran S, Dilantha W G & Siddiqui Z A (2005). Plant growth-promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (Editör Siddiqui Z A, Springer, The Netherlands), 257–296.
- Omar M N A, Mahrous N M & Hamouda A M (1996). Evaluating the efficiency of inoculating some diazotrophs on yield and protein content of 3 wheat cultivars under graded levels of nitrogen fertilization. *Annals of Agricultural Sciences*, 41: 579–590.
- Orhan E, Esitken A, Ercisli S, Turan M & Sahin F (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111: 38-43.
- Orhan F (2016). Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 77: 1-7.
- Özdener Y & Özkoç İ (1994). *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. (*Orchidaceae*) tohumlarının simbiyotik olarak çimlendirilmesi üzerine endomikorizal fungusların etkisi. *Kükem Dergisi*, 19(2): 71-75.
- Özkoç İ (1994). İki yeni fungal izolat kullanılarak *Orchis laxiflora* Lam. tohumlarının simbiyotik olarak çimlendirilmesi. *Kükem Dergisi*, 176(2): 13-16.
- Özkoç İ & Dalcı M (1992). İki farklı kültür ortamında *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo) Gözl et. Reinhard (*Orchidaceae*) tohumlarının çimlenme

ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. *Doğa-Turkish Journal of Biology*, 16: 158-164.

- Özkoç İ, Karaca G H & Erper İ (2002). Pathogenicity of *Rhizoctonia repens* Bernard on different plants and its effect on the suppression of root-rot on cucumber plants. *Acta Horticulture*, 579: 463-467.
- Özkoç İ, Aydın E B, Nohut O K, Gürkanlı C T & Altınkaynak H (2014). Bitki büyümesini arttıran mikroorganizmalar ve etki mekanizmaları. *Türkiye 2. Orkide ve Salep Çalıştayı*, İzmir 2012, Türkiye 2. Orkide ve Salep Çalıştayı Bildirileri, 213-246, İzmir.
- Pal S S (1998). Interaction of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant Soil*, 198: 169-177.
- Pandey A, Sharma E & Palni L M S (1998). Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(1): 379-384.
- Pandey P, Aeron A & Maheshwari D K (2010). Sustainable Approaches for Biological Control of Fusarium Wilt in Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh). *Plant Growth and Health Promoting Bacteria* (Editör Maheshwari D K, Microbiology Monographs 18, Springer Heidelberg Dordrecht London New York), 231-251.
- Pant B (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*, 7(10): 448-467.
- Parray J A, Jan S, Kamili A N, Qadri R A, Egamberdieva D & Ahmad P (2016). Current perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*. doi10.1007/s00344-016-9583-4
- Patel J B (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Journal of Molecular Diagnostic*, 6: 313-321.
- Patten C L & Glick B R (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3): 207-220.
- Penrose D M & Glick B R (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiology Plant*, 118: 10-15.
- Pereira J A R, Cavalcante V A, Baldani J I & Döbereiner J (1988). Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, 110(2): 269-274. doi:10.1007/BF02226807
- Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P & Putten W H V D (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 789-799.
- Pikovskaya R I (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activities by some microbiyal species. *Microbiologica*, 17: 362-370.

- Pliego C, Kamilova F & Lugtenberg B (2011). Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. *Bacteria in agrobiology: crop ecosystems* (Editor Maheshwari D K) Springer, Germany), 295–343.
- Podile A R & Kishore K (2006). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria* (Editor Gnanamanickam S S, Springer), 195–230.
- Prathap M & Ranjitha Kumari B D (2015). A critical review on plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 6(4). doi:10.4172/2157-7471.1000266
- Przemieniecki S W, Kurowski T P, Korzekwa K & Karwowska A (2014). The effect of psychrotrophic bacteria isolated from the root zone of winter wheat on selected biotic and abiotic factors. *Journal Of Plant Protection Research*, 54(4), 407-413. doi: 10.2478/jppr-2014-0061
- Qiao J Q, Wu H J, Rong Huo R, Gao X W & Borriss R (2014). Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1-12. doi: 10.1186/s40538-014-0012-2
- Quan C S, Wang X & Fan S D (2010). Antifungal Compounds of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Its Action Mode. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria* (Editor Maheshwari D K, Microbiology Monographs 18, Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 117-156.
- Radzki W, Gutierrez Manero FJ, Algar E, Lucas-Garcia J A, Garcia-Villaraco A & Ramos-Solano B (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104(3): 321–330. doi:10.1007/s10482-013-9954-9
- Rajkumar M, Nagendran R, Kui J L, Wang H L & Sung Z K (2006). Influence of plant growth promoting bacteria and Cr(VI) on the growth of Indian mustard. *Chemosphere*, 62: 741–748.
- Ramadan E M, AbdelHafez A A, Hassan E A & Saber F M (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria and their potential for biocontrol of phytopathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 10(15): 486-504. doi:10.5897/AJMR2015.7714
- Ramprasad D, Debasish S & Bhattar S (2014). Plant growth promoting rhizobacteria-an overview. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 2(2): 30-34.
- Rathaur P, Ramteke P W, Raja W & John S A (2012). Isolation and characterization of nickel and cadmium tolerant plant growth promoting rhizobacteria from rhizosphere of *Withania somnifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(18): 253-261.
- Rathore P (2014). A review on approaches to develop plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(2): 403-407.

- Raupach G S, Liu L, Murphy J F, Tuzun S & Kloepper J W (1996). Induced systemic resistance of cucumber and tomato against cucumber mosaic virus using plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Disease*, 80: 891–894.
- Rawat S & Mushtaq A (2015). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria from legume rhizosphere. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4): 38-42.
- Reinhold-Hurek B & Hurek T (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1): 29–54.
- Reddy P R, Ahmed S K M H & Suresh D (2003). Impact of Biofertilizer Application on Crop Growth and Yield of Different Crops. *6 th Int. PGPR Workshop*, India.
- Ribeiro C M & Cordoso E J (2012). Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, 167(2): 69-78.
- Rovira A D (1965). Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Review Microbiology*, 19: 241-266.
- Sabir A, Yazici M A, Kara Z & Sahin F (2011). Growth and mineral acquisition response of grapevine rootstocks (*Vitis* spp.) to inoculation with different strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Science of Food and Agriculture*, 92(1015): 2148–2153.
- Sabry S R S, Saleh S A, Batchelor C A, Jones J, Jotham J, Webster G, Kothari S L, Davey M R & Cocking E C (1997). Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proceedings: Biological Sciences*, 264(1380): 341–346.
- Saharan B S & Nehra V (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 2011: LSMR-21.
- Sahoo R K, Ansari M W, Pradhan M, Dangar T K, Mohanty S & Tuteja N (2014). Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoclasma*, 251(4): 943–953. doi:10.1007/s00709-013-0607-7
- Saitou N & Nei M (1987). The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406-425.
- Sakthivel U & Karthikeyan B (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from the rhizosphere of *coleus forskohlii* grown soil. *International Journal of Recent Scientific Research*, 3(5): 288-296.
- Saldajeno M G B, Ito M & Hyakumachi M (2012). Interaction between the plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-2 and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: impact on biocontrol of soil-borne diseases, microbial population, and plant growth. *Australasian Plant Pathology*, 41(3): 271–281.

- Saleem M, Arshad M, Hussain S & Bhatti A S (2007). Perspective of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Containing ACC deaminase in Stress Agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34: 635–648.
- Saleh S S & Glick B R (2001). Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and *Pseudomonas putida* UW4. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(8):698–705. doi:10.1139/cjm-47-8-698
- Sallam N A, Raid S N, Mohamed M S, El-eslam A S (2013). Formulations of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas fluorescens* for biocontrol of cantaloupe root rot caused by *Fusarium solani*. *Journal of Plant Protection Research*, 53 (3): 295–300.
- Samancıoğlu A, Yıldırım E & Şahin Ü (2016). Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakteri Uygulamalarının Farklı Sulama Seviyelerinde Yetiştirilen Lahanada Fide Gelişimi, Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Etkisi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 19 (3): 332-338.
- Sambrook J, Fritsch E F & Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandal G & Sögüt Z (2010). Türkiye Orkideleri (Salepler). *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(2): 109-116.
- Sangeeth K P, Bhai R S & Srinivasan V (2012). *Paenibacillus glucanolyticus*, a promising potassium solubilizing bacterium isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.) rhizosphere. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 21(2): 118–124.
- Santos S N, Kavamura V N, Silva J L D, Melo I S D & Andreote F D (2010). Plant growth promoter rhizobacteria in plants inhabiting harsh tropical environments and its role in agricultural improvements. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria Microbiology Monographs* (Editör Maheshwari D K, 18, Springer Heidelberg Dordrecht London New York), 251-272. doi:10.1007/978-3-642-13612-2
- Saraçlı M A (2006). "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor. *Gülhane Tıp Dergisi*, 48: 244-250.
- Saraf M, Jha C K & Patel D (2010). The role of ACC deaminase producing PGPR in sustainable agriculture. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria Microbiology Monographs* (Editör Maheshwari D K, Microbiology Monographs, 18, Springer Heidelberg Dordrecht London New York), 365-385.
- Sayyed R Z, Badgujar M D, Sonawane H M, Mhaske M M & Chincholkar S B (2005). Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. *Indian Journal of Biotechnology*, 4(4): 484-490.
- Schwyn B & Neilands J B (1987). Universal Chemical Assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47-56.
- Sekar S & Kandavel D (2010). Interaction of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and endophytes with medicinal plants – New avenues for phytochemicals. *Journal of Phytology*, 2(7): 91-100.

- Sezik E (1984). Orkidelerimiz Türkiye'nin Orkideleri. *Sandoz Kültür Yayınları*, 6: 11-32.
- Shaharoon B, Arshad M, Zahir Z A & Khalid A (2006a). Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACCdeaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9):2971–2975. doi:10.1016/j.soilbio.2006.03.024
- Shaharoon B, Arshad M & Zahir Z A (2006b). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Letters in Applied Microbiology*, 42(2):155–159. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01827.x
- Shaharoon B, Naveed M, Arshad M & Zahir Z A (2008). Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonas* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1): 147–155. doi:10.1007/s00253-008-1419-0
- Shaikh S S, Sayyed R Z & Reddy M S (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: an ecofriendly approach for sustainable agroecosystem. Springer International Publishing Switzerland. Hakeem et al. (editor), *Plant, Soil and Microbes*. doi 10.1007/978-3-319-27455-3\_10
- Sharma S K, Ramesh A & Johri B N (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* strain sks\_bnj\_1 and its influence on rhizosphere soil properties and nutrition of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Virology & Microbiology*, 2013:1-19. doi:10.5171/2013.446006
- Sheng X F & He LY (2006). Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(1): 66–72. doi: 10.1139/w05-117
- Sheng X F & Xia J J (2006). Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere*, 64(6): 1036–1042. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.051
- Shin S H, Lim Y, Lee S E, Yang N W & Rhee J H (2001). CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiological Methods*, 44(1): 89–95.
- Silo-Suh L A, Lethbridge B J, Raffel S J, He H, Clardy J & Handelsman J (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6): 2023–2030.
- Silva M C P, Figueiredo A F, Andreote F D & Cordoso E J (2012). Plant growth promoting in *Brachiaria brizantha*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1): 163-171. doi 10.1007/s11274-012-1169-0
- Silva J A T, Tsavkelova E A, Zeng S, Ng T B, Parthibhan S, Dobranszki J, Cardosa J C & Rao M V (2015). Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242: 1–22. doi:10.1007/s00425-015-2301-9

- Simonet P, Normand P, Moiroud A & Bardin R (1990). Identification of *Frankia* strains in nodules by hybridization of polymerase chain reaction products with strain-specific oligonucleotide probes. *Archives Microbiology*, 153(3): 235–240. doi:10.1007/BF00249074
- Sindhu S S, Dua S, Verma M K & Khandelwal A (2010). Growth Promotion of Legumes by Inoculation of Rhizosphere Bacteria. *Microbes for Legume Improvement* (Editor Khan M S, Zaidi A & Musarrat J, Springer-Verlag/Wien), 195-236.
- Singh A & Duggal S (2009). Medicinal Orchids: An overview. *Ethnobotanical Leaflets*, 13: 351-363.
- Singh B K, Millard P, Whiteley A S & Murrell J C (2004). Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology*, 12(8): 386-393.
- Sokolova M G, Akimova G P & Vaishlia O B (2011). Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 302–307. doi:10.1134/S0003683811030148
- Solano B R, Barriuso J & Manero F J G (2008). Physiological and molecular mechanisms of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Plant-Bacteria Interactions Strategies and Techniques to Promote Plant Growth* (Editörler Ahmad I, Pichtel J & Hayat S, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim), 41-54.
- Souza R D, Ambrosini A & Passaglia L M P (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4): 401-419. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Spaepen S, Vanderleyden J & Remans R (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4):425-48. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Sreedevi B, Preethi S, Pramoda J & Kumari (2014). Isolation, production and optimization of siderophore producing *Pseudomonas* from paddy soil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2(1): 71-88.
- Stein T, Hayen-Schneg N & Fendrik I (1997). Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 969-971.
- Stoessl A & Arditti J (1984). Orchid phytoalexins. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives* (Editor Arditti J, Cornell University Press, New York), 151–175.
- Tailor A & Joshi B H (2012). Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. *Journal of Environmental Research And Development*, 6(3A): 688-694.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A & Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12):2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197



- Tarkka M, Schrey S & Hampp R (2008). Plant Associated Soil Micro-organisms. *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence* (Editörler Nautiyal C S & Dion P, Soil Biology, 15, Springer-Verlag Berlin Heidelberg), : 3-51.
- Tejera N, Lluch C, Martinez-Toledo M V & Gonzalez-Lopez J (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant Soil*, 270(1): 223–232. doi:10.1007/s11104-004-1522-7
- Thamer S, Schadler M, Bonte D & Ballhorn D J (2011). Dual benefit from a belowground symbiosis: nitrogen fixing rhizobia promote growth and defense against a specialist herbivore in a cyanogenic plant. *Plant Soil*, 341: 209–219. doi: 10.1007/s11104-010-0635-4
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins D G (1997). The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876-4882.
- Tilak K V B R & Ranganayaki N, Pal K K (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria, *Current Science*, 89(1): 136-150.
- Timmusk S & Wagner E G H (1999). The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 12: 951-959.
- Tsavkelova E A, Cherdyntseva T A & Netrusov A I (2004). Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiology*, 73(6): 710–715.
- Tsavkelova E A, Cherdyntseva T A, Klimova S Y, Shertakov A I, Botina S G & Netrusov A I (2007a). Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Arch Microbiol*, 188: 665-664. doi10.1007/s00203-007-0286-x
- Tsavkelova E A, Cherdyntseva T A, Botina S G, Netrusov A I (2007b). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbial Research*, 162: 69-76.
- Tsavkelova E A, Egorova M A, Leontieva M R, Malakho S G, Kolomeitseva G L & Netrusov A I (2016). *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria. *Plant Growth Regul*, 80: 79–91.
- Tsavkelova E (2011). Bacteria Associated with Orchid Roots. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Response (Editor Maheshwari D K)*, New York, 221-258. doi:10.1007/978-3-642-20332-9
- Turan M, Gulluce M, Wiren N V & Sahin F (2012). Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(6): 818-826. doi:10.1002/jpln.201200054

- Upadhyay S K, Singh J S, Saxena A K & Singh D P (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4):605-611. doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00533.x
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M L, Touraine B, Moenne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dye F & Prigent-Combaret C (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1-19. doi:10.3389/fpls.2013.00356
- Valverde A, Burgos A, Fiscella T, Rivas R, Velazquez E, Rodriguez-Barrueco C, Cervantes E, Chamber M & Igual J M (2006). Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. *Plant and Soil*, 287(1): 43-50. doi:10.1007/s11104-006-9057-8
- Van Loon L C, Bakker P A H M & Pieterse C M J (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483. doi:10.1146/annurev.phyto.36.1.453
- Van Loon L C (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3): 243–254. doi:10.1007/s10658-007-9165-1
- Vazquez P, Holquin G, Puente M E, Lopez-Cortez A & Bashan Y (2000). Phosphate solubilizing microorganism associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 460-468.
- Verma J P, Yadav J, Tiwari K N & Lavakushi & Singh V (2010). Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *International Journal of Agricultural Research*, 5(11): 954-983.
- Verma V C, Singh S K & Prakash S (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Basic Microbiology*, 51(5): 550–556. doi: 10.1002/jobm.201000155
- Verma V, Joshi K & Mazumdar B (2012). Study of siderophore formation in nodule-forming bacterial species. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2(11): 26-29.
- Vessey J K (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2): 571–586.
- Wang W & Sun M (2009). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16S rDNA sequences. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3): 505-521.
- Wani P A & Khan M S (2010). *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11): 3262–3267. doi: 10.1016/j.fct.2010.08.035

- Wani S A, Chand S & Ali T (2013). Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production: An overview. *Current Agriculture Research Journal*, 1(1): 35–38. doi: <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.1.1.04>
- Wilkinson K G, Dixon K W & Sivasithamparam K (1989). Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytologist*, 112(3): 429–435.
- Wilkinson K G, Dixon K W, Sivasithamparam K & Ghisalberti E L (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant Soil*, 159(2): 291–295. doi:10.1007/BF00009292
- Woese C R, Stackebrandt E, Macke T J & Fox G E (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(2):143-151.
- Woese C R (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2): 221–271.
- Yadav A, Gaur I, Goel N, Mitra J, Saleem B, Goswami S, Paul P K & Upadhyaya K C (2015). Rhizospheric microbes are excellent plant growth promoters. *Indian Journal of Natural Sciences*, 5(30): 6584-6595.
- Yang J, Kloepper J W & Ryu C M (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1): 1–4.
- Yanni Y, Rizk R, Abd-El Fattah F K, Squartini A, Corich V, Giacomini A, Bruijn F D, Rademaker J, Maya-Flores J, Ostrom P, Vega-Hernandez M, Hollingsworth R I, Martinez-Molina E, Mateos P, Velazquez E, Wopereis J, Triplett E, Umali-Garcia M, Anarna J A, Rolfe B G, Ladha J K, Hill J, Mujoo J, Ng P K & Dazzo F B (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* by *trifolii* with rice roots. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 845–870. doi: 10.1071/PP01069
- Yao L, Wu Z, Zheng Y, Kaleem I & Li C (2010). Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology*, 46(1): 49–54.
- Young J P W & Haukka K E (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*, 133: 87–94. doi: 10.1111/j.1469-8137.1996.tb04344.x
- Zahir Z A, Arshad M, Frankenberger W T J (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Advance in Agronomy*, 81:97-168. doi:10.1016/S0065-2113(03)81003-9
- Zahir Z A, Munir A, Asghar H N, Shaharoon B & Arshad M (2008). Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5): 958-963.
- Zaidi S, Usmani S, Singh B R & Musarrat J (2006). Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 64(6): 991–997.

Zehnder G W, Yao C, Murphy J F, Sikora E R & Kloepper J W (2000). Induction of resistance to tomato against cucumber mosaic cucumo virus by plant growth promoting rhizobacteria. *Biocontrol*, 45: 127–137.

Zhuang X, Chen J, Shim H & Bai Z (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*, 33(3): 406–413. doi:10.1016/j.envint.2006.12.005



## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hilal ALTINKAYNAK  
Doğum Yeri : Merzifon  
Doğum Tarihi : 20.06.1977  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Amasya Lisesi (1994)

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji  
(1999)

Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji  
Anabilim Dalı (Şubat 2006-Mart 2009)

### Çalıştığı Kurum

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Moleküler  
Mikrobiyoloji Laboratuvarı (2001-halen)