

Antibiyotiğe Rezistanslık
Gösteren Bradyrhizobium
japonicum Suşlarının Elde
Edilmesi ve Bunların
Fizyolojik Özellikleri ile
Nodülasyon ve N₂ -Fiksasyon
Yeteneklerinin Belirlenmesi

Doktora Tezi
KAMURAN AYHAN
Gıda Bilimi ve Teknolojisi
. ANKARA
1991

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİBİYOTİĞE REZİSTANSLIK GÖSTEREN Bradyrhizobium
japonicum SUŞLARININ ELDE EDİLMESİ VE BUNLARIN
FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİ İLE NODÜLASYON VE N -FİKSASYON
2
YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

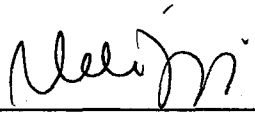
Kamuran AYHAN

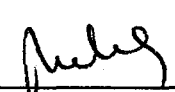
DOKTORA TEZİ

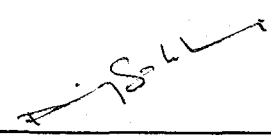
GIDA BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

V. G.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Bu Tez 25/05/1991 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından
95 (Doksanbeş) Not Takdir Edilerek Oybirligi/Oyçokluğu
ile Kabul Edilmiştir.


Prof. Dr. Velittin GÜRGÜN
Danışman


Prof. Dr. Mehmet
AKTAŞ


Prof. Dr. Deniz
GÖKTAN



ÖZET
DOKTORA TEZİ

ANTİBİYOTİĞE REZİSTANSLIK GÖSTEREN Bradyrhizobium
japonicum SUŞLARININ ELDE EDİLMESİ VE BUNLARIN
FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ İLE NODÜLASYON VE N²-FİKSASYON
YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kamuran AYHAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman : Prof.Dr.Velittin GÜRGÜN
1991, Sayfa: 101

Jüri : Prof.Dr.Velittin GÜRGÜN
: Prof.Dr.Mehmet AKTAŞ
: Prof.Dr.Deniz GÖKTAN

- 1- İnokulant üretiminde kullanılan B. japonicum USDA 110 suşundan spontan mutasyon yoluyla 100-2000 mg/l konsantrasyonlar arasında değişen 10 adet farklı antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlar elde edilmiştir. Tek antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlardan STR^R ve CHL^R mutantları diğer antibiyotiklerle kombine edilerek aynı yolla çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren suşlar izole edilmiştir.
- 2- Tek ve çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşların sıvı besiyeri ve inokulant içindeki sayıları ata suş ile kıyaslanmıştır. Sıvı kültür ve inokulant içinde STR^R mutant suşunun sayısı ata suşunkine çok yakın değerde bulunmuştur (Çizelge 4.1).
- 3- Elde edilen mutantların ve ata suşun nodülasyon ve azot fiksasyon yeteneklerini belirlemek amacıyla sera denemeleri yapılmıştır. Buna göre, denemede tek antibiyotiğe dirençlilik gösteren suşlardan STR^R mutant suşunun istatistiki olarak ata suşdan farklı olmadığı ve mutasyon sonucu herhangi bir efektiflik kaybının söz konusu olmadığı anlaşılmıştır. Diğer mutant suşların birbirleri arasında farklılık olmamakla beraber ata suşa göre belli düzeyde efektiflik kayıplarına uğradıkları saptanmıştır (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşların

efektiflik bakımından ata suş gibi davrandığı bazıların ise efektiflik kayıplarına uğradığı anlaşılmıştır (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

- 4- Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlar kullanılarak kurulan tarla denemesi sonuçlarına göre bitki üstü ağırlığı, nodül ağırlığı, tane verimi, protein ve yağ verimleri bakımından STR^R mutant suşunun üstünlük gösterdiği anlaşılmıştır.
- 5- Tarla denemesi sonucunda STR^R mutant suşu ile aşılanan parsellerden alınan bitkilerin köklerinde oluşan nodüllerin serolojik olarak kontrolleri jel-immünodiffüzyon yöntemi ile yapılmış ve bu nodüllerin STR^R mutant suşu tarafından oluşturulduğu doğrulanmıştır (Şekil 3.3).
- 6- Fermenter ve inokulant içindeki kontaminant bakterilerin sayısının ata suş ile hazırlanan inokulantta, STR^R mutant suşu ile hazırlanan inokulanttakinden daha yüksek olduğu, mutant suşun kullanılmasının bu bakterilerin gelişimini % 50 oranında engellediği anlaşılmıştır (Çizelge 4.11).
- 7- STR^R mutant suşunun nodül oluşturma gücünü belirlemek amacıyla ata suşla 1:1 oranında karıştırılmış sıvı kültürü ile yapılan sera denemesi sonucunda oluşan nodüllerin % 60'nın ata suş, % 40'nın ise STR^R mutant suşu tarafından oluşturulduğu saptanmıştır (Çizelge 4.12).
- 8- Kontaminantlar üzerinde Kristal Violet boyasının (1,25 mg/l) konsantrasyonunun çok etkili olduğu, buna karşın Brilliant Green'in etkisiz olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.13).

ANAHTAR KELİMELER: Bradyrhizobium japonicum USDA 110, tek ve çift antibiyotik rezistant mutant, efektiflik, spontan mutasyon, inokulant, jel-immünodiffüzyon, Kristal Violet.

ABSTRACT

PhD Thesis

OBTAINING ANTIBIOTIC-RESISTANT MUTANTS OF
A Bradyrhizobium japonicum STRAIN AND DETERMINATION
OF THEIR PHYSIOLOGICAL PROPERTIES, NODULATION AND
N -FIXING ABILITY
2

Kamuran AYHAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Science and Technology

Supervisor: Prof.Dr.Velittin GÜRGÜN
1991, Page: 101

Jury: Prof.Dr.Velittin GÜRGÜN
Prof.Dr.Mehmet AKTAŞ
Prof.Dr.Deniz GÖKTAN

- 1- From the B. japonicum USDA 110 which is used in inoculant production, some antibiotic resistant mutants which resist to 10 different antibiotics in concentration of 100-2000 mg/l were obtained thru spontaneous mutation. The single antibiotic resistant mutants of STR^R and CHL^R were also used to obtain double antibiotic resistant mutants using same methods.
- 2- The viable cell count of those mutant strains in liquid culture and peat-based inoculants were determined and compared with the viable cell counts of wild type, in same conditions. The counts of STR^R mutant strain in both liquid culture and inoculant were found to be very close to wild-type strain (Table 4.1 and 4.4).
- 3- To determine the nodulation and N₂ - fixation ability of mutants and wild-type strain, a greenhouse experiment had been established. According to results of

greenhouse experiment there were found no difference between STR^R and wild-type on their infectivity and effectivity. Though there were no significant differences on effectivity between all other mutant strains, a considerable lost of effectivity was determined between mutant strains and wild-type strain (Table 4.2 and 4.3). Most of the double antibiotic resistant mutants were effective as high as wild-type (STR-KAN^R, STR-BAC^R, CHL-KAN^R and CHL-BAC^R) while the others (STR-SPC^R, STR-NAL^R and CHL-NAL^R) showed a very low effectiveness (Table 4.5 and 4.6).

- 4- According to shoot weight, nodule weight, seed yield, protein and oil content in field trials, STR^R mutant strain overcome to all other treatments.
- 5- The nodules of STR^R mutant strain treated plants were found to be identical with its own antiserum using jel-immunodiffusion method (Figure 3.3).
- 6- The count of contaminants in fermenter and inoculant prepared with STR^R mutant strain were 50 % less than prepared with wild-type strain (Table 4.1).
- 7- The nodule formation ratio of the mixture of STR^R mutant and wild-type strain (1:1) was 40 and 60 % respectively (Table 4.12).
- 8- The inhibitory effect of Crystal Violet dye (1,25 mg/l) on contaminants was very high while Brilliant Green dye had no effect.

KEY WORDS: Bradyrhizobium japonicum USDA 110, single and double antibiotic resistant mutant, effectivity spontaneous mutation, inoculant, jel-immunodiffusion.

TEŞEKKÜR

Tez konumu öneren, yöneten ve araştırmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam, Prof.Dr. Velittin GÜRGÜN'e, tezimin bir kısmını yürüttüğüm Wageningen Üniversitesi Mikrobiyoloji bölümünde (Hollanda) bana her konuda yardımcı olan Dr.T.A. Lie'ye ve bölüm elemanlarına, tarla denemesini yürüttüğüm Köy Hizmetleri Ankara Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Doç.Dr. Orhan DOĞAN ve Dr.Haluk ÜSTÜN ile Dr.Zeynep DERNEK'e, Toprak Gübre Araştırma Enstitüsünden Dr.Kemal KARUÇ'a, inokulant ile yapılan çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Entite A.Ş. firması İşletme Müdürü Yük.Müh.Fikret DEMİRDÖĞEN'e, tavşan denemelerindeki yardımlarından dolayı Araş.Gör.Şeref TAĞI'ya ve tez yazımında grafikleri hazırlayan Arş.Gör. Nilsun BAKAN'a, Mikrobiyoloji birim elemanlarına, bana maddi ve manevi bakımdan sonsuz destek olan anne ve babama teşekkürü borç bilirim.

Bu araştırma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma kurumunca desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. <u>Bradyrhizobium japonicum</u> 'un Kültürel Özellikleri.....	5
2.2. Antibiyotiğe Dirençli Mutantların Önemi ve İzolasyonları.....	5
2.3. Antibiyotiğe Dirençlilik Gösteren Rhizobium Suşlarının Kullanım Alanları.....	11
3. MATERYAL VE METOD.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Metod.....	21
3.2.1. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.	21
3.2.2. Antibiyotiğe dirençli olan spontan mutant- ların elde edilmeleri.....	25
3.2.3. İki farklı antibiyotiğe dirençlilik göste- ren mutantların seçimi.....	26
3.2.4. Sıvı besiyeri ve inokulant içindeki ata suş ve mutantların sayılarının belirlen- mesi.....	27
3.2.5. Sera denemeleri.....	28
3.2.5.1. Soya tohumlarının yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi.....	29
3.2.5.2. Bitki enfeksiyon testinde kullanılan Mo- difiye Leonard kavanozu sisteminin ha- zırlanması, ekim ve aşılama.....	29

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
3.2.5.3. İnokulant hazırlanması.....	32
3.2.5.4. Bitkilerin hasadı.....	32
3.2.5.5. Bitkilerde ve nodüllerde kuru madde tayini.....	32
3.2.6. Serolojik yöntemler.....	33
3.2.6.1. Antijenlerin elde edilmeleri.....	33
3.2.6.2. Antiserum elde edilmesi.....	34
3.2.6.3. Antiserumların titrasyonu ve aglütinasyon.	35
3.2.7. Jel-immünodiffüzyon yöntemi ve nodül tanım- laması.....	36
3.2.7.1. Jel-immünodiffüzyon kaplarının hazırlan- ması.....	37
3.2.7.2. Nodüllerin antijen olarak hazırlanmaları.	38
3.2.7.3. Jel-immünodiffüzyon işlemi.....	39
3.2.7.4. Presipitasyon bantlarının boyanması.....	39
3.2.7.5. Jel-immünodiffüzyon kaplarının değerlendiril- mesi.....	40
3.2.8. Tarla denemesi.....	41
3.2.8.1. İnokulasyon ve ekim.....	42
3.2.8.2. Sulama ve bakım.....	42
3.2.8.3. Nodülasyon kontrolü ile bitki üstü ve nodüllerin yaş ve kuru ağırlığı.....	43
3.2.8.4. Hasat ve harman.....	43
3.2.8.4.1. Tane verimi.....	43
3.2.8.4.2. 1000 tane ağırlığı tayini.....	44
3.2.8.4.3. Yağ miktarı tayini.....	44
3.2.8.4.4. Protein miktarı tayini.....	44

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
3.2.8.4.5. Protein ve yağ verimi.....	44
3.2.8.4.6. Rutubet tayini.....	45
3.2.8.5. Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi.	45
3.2.9. Ata ve STR ^R mutant suşlarının rekabet denemesi.....	45
3.2.10. Fermenterlerdeki kontaminasyon kontrolü..	46
3.2.11. Son ürün olan inokulanttaki kontaminasyon oranının kontrolü.....	47
3.2.12. Ata ve STR ^R mutant suşlarının kimi anti- mikrobiyel maddeler varlığında gelişme durumları.....	48
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....	50
4.1. Antibiyotiğe Dirençlilik Gösteren Mutantla- rın İzolasyon Sonuçları.....	50
4.2. Antibiyotiğe Dirençlilik Gösteren Mutant Suşların Sıvı Besiyerindeki Üreme Durumları.	50
4.3. Sera Denemeleri Sonuçları.....	53
4.3.1. Tek Antibiyotiğe dirençli mutant suşlarla yapılan bitki enfeksiyon testi sonuçları..	54
4.3.2. Çift antibiyotikle markalanmış mutantlarla hazırlanan inokulantlarla yapılan bitki en- feksiyon testi sonuçları.....	56
4.4. Tarla Denemesi Sonuçları.....	63
4.4.1. Nodülasyon kontrolü, nodüllerin ve bitki üstü kısmının yaş ve kuru ağırlıkları.....	63
4.4.2. Tarla denemesi sonucu elde edilen ürünle yapılan analiz sonuçları.....	70

	<u>Sayfa No</u>
4.4.2.1. Tane verimi.....	70
4.4.2.2. 1000 tane ağırlığı.....	70
4.4.2.3. Rutubet oranı.....	73
4.4.2.4. Tanede protein oranı.....	73
4.2.2.5. Protein verimi.....	73
4.2.2.6. Tanede yağ oranı.....	75
4.2.2.7. Yağ verimi.....	75
4.5. Antiserum Elde Edilmesi ve Jel-İmmünodif- füzyon Yöntemi İle Nodül Tanımlaması.....	76
4.6. Fermenter ve İnokulanttaki Kontaminasyon Sonuçları.....	77
4.7. Ata ve STR Mutant Suşlarının Rekabet Güçleri.....	78
4.8. Ata ve STR Mutant Suşlarının Kristal Violet ve Brilliant Green Varlığında Gelişme Durumları.....	80
5. TARTIŞMA.....	82
KAYNAKLAR.....	90

1. GİRİŞ

Biyolojik azot fiksasyonu azot devrinde dominant transformasyon proseslerinden biridir.

Ortamda yalnızca elementar azot kaynağı bulunduğunda bundan yalnızca azotu indirgeme yeteneğinde olan bazı prokaryonlar yararlanabilir. Bu mikroorganizmalar azotu önce amonyağa indirgerler. Amonyak ise daha sonra amino asit sentezine katılır. Burada esas olan azotun amonyağa indirgenmesi için gerekli olan nitrogenaz enziminin varlığıdır. Amonyaktan aminoasit sentezi ise sadece mikroorganizmalar tarafından değil yüksek canlılar tarafından da gerçekleştirilmektedir. Nitrogenaz enziminin aktivitesi ortamda bulunan tespit edilmiş azot kaynağı miktarı ile sınırlıdır. Buna göre, ortamda fikse edilmiş herhangi bir azot kaynağı yeterince var ise mikroorganizma enerjisini azot fiksasyonu için harcamaz, çünkü bir molekül azotun iki molekül amonyağa indirgenbilmesi için en az oniki mol ATP'ye gereksinimi vardır.

Azot fiksasyonunu gerçekleştiren mikroorganizmalar aerob, anaerob veya fotosentetik olabildikleri gibi başka bir canlıyla ortak yaşayarak veya serbest olarak azot fiksasyonunu gerçekleştirenler de vardır. Bununla beraber azot fikse edici bakterileri sınıflarken genellikle ikinci tip gruplandırma (simbiyotik ve non-simbiyotik) kullanılmaktadır. Buna göre, simbiyotik azot fikse

ediciler grubunda Rhizobium, Frankia ve bazı Cyanobacter grubu yer almakta olup, serbest azot fikse ediciler çok geniş bir grup içine yayılmış bulunmaktadır (Azotobacter, Azospirillum, Azomonas, Clostridium, Klebsiella Rhodospirillum, Pseudomonas, Thiobacillus vd.) (Hahn, 1990 Anonymous 1984a).

Azot protein sentezinin temel elementi olup, bitkiler bunu amonyak, nitrat ve amino asitler halinde protein sentezine katabilirler. Bu nedenle mikroorganizmalar tarafından amonyak halinde fikse edilen azot bitki gelişimi için önem kazanmaktadır. Tarım alanlarında bu olay yeterince yani bitkinin vejetatif gelişimini sınırlamayacak ölçüde gerçekleşiyor ise bu alanlara dışarıdan bir azotlu gübre katılmasına gerek kalmaz. Aksi takdirde üretimi sonderece pahalı olan büyük oranda enerji tüketen ve daha da önemlisi büyük oranda çevre kirliliği yaratan yöntemlerle kimyasal olarak (Haber-Bosch) üretilen fikse edilmiş azot bileşiklerinin kullanılması gerekecektir (Stiefel 1977). Özellikle simbiyotik azot fikse edici mikroorganizmaların fikse ettikleri azot miktarı fazla olduğu için (65 - 335 kg/ha/yıl) (Pijnenborg 1990), bu bakteriler ile aşılansarak yetiştirilen bitkilerde ek bir azotlu gübre kullanımına ya hiç gereksinim duyulmaz ya da starter doz olarak adlandırılan ve bitkinin nodül oluşumuna kadar geçen sürede gereksinim duyduğu kadar azotlu gübre verilmesi yeterli olur. Bu ise azot ekonomisine hem maddi olarak hem de ekolojik olarak önemli katkıda bulunmaktadır. Şöyle ki; soya tarımında inokulant kullanımı

azotlu gübre kullanımına göre 17 misli daha ucuz olmakta (Anonymous 1984a) diğer yandan simbiyotik azot fiksasyonunun derecesi fotosentez ürünleri ile orantılı olarak arttığı ve fiksasyon doğrudan doğruya bitkinin üzerinde yeralan nodüller içinde gerçekleştiği için hem azot fiksasyonu bitki tarafından regüle edilmekte hem de fikse edilen azot bitki içinde kalmaktadır. Böylece azotlu gübre kullanımından direk olarak kaynaklanan çevre kirliliği önlenirken hem de yalnızca bitkinin gereksinim duyduğu kadar azot fiksasyonu gerçekleştiği için hasat sonrası toprakta kalan bitki artıkları dışında bir azot birikimi söz konusu olmaz.

Azot fiksasyon mekanizmasının açıklanması ve buna bağlı olarak inokulant kullanımı yüzyıl kadar önce başlamış olmakla beraber, bugün halen ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülkede inokulant kullanımının yaygınlaştırılmamış olması, yeterli sayıda ve başarılı demonstrasyon denemelerinin yapılmamış ve inokülasyon işleminin çiftçiye ek bir yük getirmiş olmasına bağlanabilir. Bu olumsuzluklara karşın özellikle gelişmiş ülkelerde hem çevre kirliliğini belli oranda önlemek, hem de baklagil üreten çiftçiye ekonomik katkıda bulunmak amacıyla çok detaylı araştırmalar yürütülmektedir. İnokulant kullanımını desteklemek amacıyla Avrupa Topluluğu Ülkelerinde baklagil tarımı desteklenmeye başlamış ve bu sayede 1988 yılında bir hektar için kullanılan azot miktarı 1980'e oranla 10 kg azalmıştır (Pijnenborg 1990).

Ülkemizde Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü ve Entite A.Ş. firması tarafından tüm inokulant gereksinimini karşılayabilecek kadar inokulant üretilebileceği halde talep azlığından dolayı özellikle Entite A.Ş. firması kapasitesinin çok altında çalışmaktadır. Buna karşın üretimin fermantasyon aşamasında çok büyük oranlarda kontaminasyonlara rastlanmakta, bu ise kaliteli inokulant üretimi için maliyetin yükselmesine neden olmaktadır. Bu aşamadaki üretim kayıplarını önlemek amacıyla üretimde kullanılan besiyeri bileşimine enfeksiyon organizmalarının gelişmelerini engelleyecek olan bir antibiyotik ilavesi ve bu antibiyotiğe dirençlilik gösteren bir mutant suş ile üretim yapılması bir çözüm olarak düşünülmüştür.

Antibiyotik rezistant mutantlar elde edilirken bakterilerin üreme istekleri, nodül oluşturma ve azot fiksasyon yeteneği gibi özellikleri değişebileceği için elde edilen mutant suşların bu özelliklerinin olumsuz yönde değişmediği saptandıktan sonra inokulant üretilmiştir. Elde edilen inokulant içine sıvı kültürden belli oranda antibiyotik aktarılacağı için inokulant elde edilmesinde taşıyıcı materyal olarak kullanılan pitten kaynaklanan enfeksiyon mikroorganizmalarının ne derece baskılanacağı araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Bradyrhizobium japonicum'un Kültürel Özellikleri

Rhizobium hücreleri sporsuz, gram negatif ve çubuk şeklinde olup 0.5 - 0.9 µm genişlikte ve 1.2 - 3.0 µm uzunluktadır. Yaşlı hücrelerde polimerik yapıda ve ışığı kırma özelliğinde olan granüllere (poli-β-hidroksi bütik asit) rastlanır ki, bunlar sitoplazmik materyal boyandığında düzgün olmayan bant görünümü verirler (Elkan 1987).

B. japonicum USDA 110 suşunun soya bitkisi köklerinde yüksek oranda azot fikse etme özelliği vardır (Mathis vd. 1986a, Miller vd. 1990). Bu suşun morfolojik olarak farklı koloni oluşturan varyantlarının azot fiksasyon güçlerinin de farklı olduğu ilk defa Kuykendall ve Elkan (1976) tarafından saptanmıştır. Mathis vd. (1986b), Müllen ve Wollum II (1989) de farklı yapıda koloni oluşturan bu suşların esasen aynı atadan oluştuğunu fakat azot fiksasyon güçlerinin buna rağmen farklı olduğunu saptamışlardır. Bu özelliği dolayısıyla B. japonicum USDA 110 suşu birçok araştırmada materyal olarak kullanılmış olup (Kuykendall ve Elkan 1976), bu suşun simbiyotik özellikleri bakımından süper bir suş olduğunu belirtmişlerdir.

2.2. Antibiyotiğe Dirençli Mutantların Önemi ve İzolasyonları

Rhizobiumlarla ilgili ekolojik çalışmaların çoğu suşların tanısı üzerinedir. Tarla koşullarında yürütülen

denemelerde, nodül oluşumundaki başarının ve toprak ve rizosfer bölgesindeki rekabet eden suşların belirlenmesi ile bu suşların birbirleri arasındaki rekabetlerin açığa çıkarılması için toprakta bulunan doğal suşlardan inokulanttan gelen suşun ayırdedilmesi gerekmektedir. Bu gibi çalışmalarda nodül oluşturan suşların etkinliği en basit olarak nodülün görüntüsüyle belirlenebilir. Etketif olmayan suşlar bazan nodül oluşturabilirler, fakat bunlar daha küçük, içleri beyaz veya yeşil renklidir (Vincent 1970). Çeşitli baklagillerde suşa özgü koyu renkli nodül oluştuğu saptanmıştır (Eaglesham vd. 1982). Bu özellikten Bradyrhizobiumlar arasındaki rekabet denemelerinden yararlanılmıştır (Rafique Uddin vd. 1984).

Yüzey sterilizasyonu uygulanmış nodüllerden izole edilen suşların koloni görünüşündeki farklılık suş ayırımında diğerk bir yararlı ve geçerli bir yöntemdir (Kuykendall ve Elkan 1976, Stowers ve Eaglesham 1984).

Batı Afrika topraklarında yapılan bir çalışmada Bradyrhizobiumların farklı topraklarda farklı yapıda koloni oluşturdıkları saptanmıştır (Sinclair ve Eaglesham 1984). Buna göre, bir bölgeden küçük yapılı ve kuru görünümlü koloni tipleri elde edilirken bir başka bölgede büyük ve birbiri peşisıra dizilmiş ıslak görünümlü koloniler elde edilmiştir.

Rhizobium bakterilerinin Kongo kırmızısını absorbe etmedikleri ve absorpsiyonun bir kontaminasyon belirtisi olduğu ileri sürülmekle beraber (Vincent 1970) Kneen ve

LaRue (1983) özellikle R. leguminosarum suşlarının farklı derecelerde boyayı absorbe ettiklerini, bu özelliğin Rhizobium bakterilerini diğer bakterilerden ayırdetmede kullanılamayacağını, ancak suşlar için belirleyici bir markır olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri bakımından Rhizobiumlar çok büyük değişiklikler göstermemekle beraber suş tanımı için bunlardan bir kaçını tamamen yeterli olabilmektedir (Eaglesham 1987).

Rhizobiumların antimikrobiyel maddelere karşı toleranslarının farklı olduğu uzun yıllardır bilinmektedir (Eaglesham 1987). Bu toleransın derecesinin Rhizobium suşları arasında farklı olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Davis 1962, Schwingamer 1964, Schwingamer 1967, Schwingamer ve Dudman 1973, Cole ve Elkan 1979).

Rhizobiumların doğal antibiyotik dirençlilik özelliklerinden yararlanılarak suşların birbirleri ile kıyaslanması ve bunların rekabet güçlerinin belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bununla ilgili olarak birçok sayıda araştırma yapılmıştır (Davis 1962, Diatloff 1977, Pankhurst 1977, Josey vd. 1979, Cole ve Elkan 1979, Mahler ve Bezdicek 1978, Rupela vd. 1981, Antoun vd 1982, Kingsley ve Bohlool 1983, Lindström vd 1990).

Bazı araştırmalarda ise doğal populasyondan inokulumda kullanılan suşların geri izolasyonunda yarar-

lanılmıştır (Beynon ve Josey 1980, Kremer ve Peterson 1982).

Mc Loughlin vd. (1987), R. leguminosarum biovar trifoli'nin antibiyotiğe dirençlilik gösteren 3 suşu ile yaptığı tarla denemelerinde 10⁹ adet/gram G1067 suşu içeren inokulant ile yapılan aşılamalarda elde edilen nodüllerin birinci yıl % 85'inin ikinci yılda % 97'sinin bu suşdan oluştuğunu ortaya koymuşlardır. Böylece hangi suşla inokulant hazırlandığında daha başarılı bir nodülasyon elde edilebileceğini ortaya koymak mümkün olmuştur.

Jenkins ve Bottomley (1985) ise, düşük düzeyde antibiyotik düzeylerine dirençlilik özelliğinin (IAR) serolojik özellikler, elektroforetik protein jel özellikleri, DNA restriksiyon ve plazmid profil özellikleri ile ilişkili olduğunu açıklamışlardır.

İyi karakterize edilmiş ve genetik olarak işaretlenmiş bakteri suşları mikrobiyolojik çalışmalar için vazgeçilmez organizmalardır. Bunlardan antibiyotiklere dirençli mutantlar kolayca direk seleksiyon yöntemleriyle elde edilebilirler. Spontan mutasyon oranı yaklaşık 10 milyonda bir olduğundan bu şekilde elde edilen mutant suşlar antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonlarına diğer hücrelerden daha fazla toleranslı veya dirençli olurlar. Bunların elde edilmesinde bir zenginleştirme işlemine gerek yoktur.

Mutajenler kullanıldığında okzotrofik mutantlar elde edilmekle beraber direk bir seleksiyon sözkonusu değildir. Bu amaçla çoğu kez bir zenginleştirme yapılması gerekir. Bu tip mutantlar gen haritalaması ve biyokimyasal yolların belirlenmesi çalışmalarında yararlıdır (Kuykendall 1987). Rhizobiumlardan elde edilen okzotrofik mutantların nodül oluşturma yeteneğinin kaybolabildiği saptanmıştır, ancak buna rağmen bu tür mutantların azot fikse etme yeteneğinde olan nodüllerin incelenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Kuykendall 1987).

Mutajenler kullanılarak antibiyotiklere dirençli mutantlar elde edilmesi, Rhizobiumların simbiyotik ve saprofitik özelliklerini değiştireceğinden nodül oluşturmaması istenen antibiyotik rezistant mutant suşlar direk seleksiyon yoluyla kazanılmaktadır (Çakmakçı 1987). Bu amaçla elde edilecek mutant suş için, ata suştan 10 hücre içeren kültürden 1 ml'lik kısmının antibiyotiğin çeşitli konsantrasyonlarını içeren petri kaplarındaki agar yüzeyine sürülmesi yeterli olmaktadır (Elkan 1987). Bunun için kullanılacak olan antibiyotik konsantrasyonu, ata suşun gelişimini etkin olarak önleyen konsantrasyondur. Antibiyotik ile işaretlenmiş mutant suşlar seçici gelişme koşullarında gelişirlerken ata suş ancak seçici özellik taşımayan (antibiyotik içermeyen) koşullarda gelişme gösterebilecektir. Antibiyotiğe dirençli suşların identifikasyonunda bazı problemlerle karşılaşılmaktadır. Doğal olarak rifampisine hassas olan B. japonicum

suşlarından 10^{-7} ile 10^{-8} sıklıkta rifampisine dirençli mutantlar elde edilebilmektedir. Bu suşlar $100 \mu\text{g/ml}$ rifampisin varlığında az bir gelişme gösterdikleri halde tamamen inhibisyonları için $250-500 \mu\text{g/ml}$ 'lik bir rifampisin konsantrasyonuna gereksinim duyulmaktadır. B. japonicum bakterisinden elde edilen rifampisin rezistant mutantları doğal olarak oluşan rifampisin rezistant *Bradyrhizobium* suşlarından sadece rifampisin rezistanslık özelliğine göre ayırdedilemezler. Bununla beraber bu iki grubu Rhizobitoksin oluşturması gibi bazı fenotipik özelliklerine göre birbirinden ayırdetmek mümkün olur.

Buna göre, bir tek genetik markır kullanılması bir bakteri suşunun diğerlerinden ayrılmasında yeterli olmayabilir. Gen transfer çalışmalarında iki suşu ayırdetmede birbirinden farklı en az 5 genetik markır kullanılmalıdır. Genetik olarak işaretli bakterilerin tanınmasında sıcaklık, pH ve kullanılabilir karbon kaynakları gibi çevre koşulları bu suşun fenotipik özellikleri üzerine etkili olduğundan önemlidir. Bunların yanısıra bir diğer problem biotik faktörler denilen diğer mikroorganizmalardır. Diğer yandan bakteriyel genetik konusundaki bilgilerin sınırlı olması da bu tip çalışmaları olumsuz yönde etkilemektedir (Elkan 1987).

Kuykendall (1987) tarafından yapılan bir çalışmada direk seleksiyon tekniği kullanılarak B. japonicum I-110 suşuna sırasıyla azid ($10 \mu\text{g/ml}$), rifampin ($500 \mu\text{g/ml}$) ve streptomisin ($1000 \mu\text{g/ml}$) şeklinde dirençlilik kazandı-

rılmış ve böylece B. japonicum I-110 ARS mutant suşu izole edilmiştir. Aynı şekilde aynı ata suş kullanılarak 5-fluorouracil (10 µg/ml) ve nalidiksik asite (500 µg/ml) dirençli I-110 FN mutantı da elde edilmiştir. Genetik olarak işaretlenmiş bu iki suş kullanılarak R-faktör transferi açıklanabilmiştir.

Ekolojik çalışmalarda mutantların kullanılabilmesi için birtakım özelliklere sahip olması gerekir. Bu nedenle antibiyotiğe dirençli mutantların bu özelliklerinin stabil olması ve nodül oluşturma ve N -fiksasyon yeteneklerini kaybetmemeleri gerektiğinden ata suş ile mutantlar arasındaki benzerliklerin araştırılması ve özellikle tarla koşullarındaki sürekliliğinin kontrol edilmesi gereklidir (Bushby 1982, Elkan 1987).

2.3. Antibiyotiğe Dirençlilik Gösteren Rhizobium Suşlarının Kullanım Alanları

Rhizobiumlardan izole edilen antibiyotiğe dirençli mutantlardan baklagillerdeki nodül oluşum fizyolojisinin açıklanmasında yararlanılmaktadır. Eğer antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutantların, simbiyotik özellikleri değişmiyorsa bunlar suş identifikasyon çalışmalarında kullanılabilirler. Buna karşın, bu mutantların simbiyotik özellikleri kayboluyorsa bunlardan sadece bakterinin biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklerinin açıklanmasında yararlanılabilir (Pankhurst 1977).

Rhizobium bakterilerinin baklagil bitkileri ile başarılı bir simbiyotik ilişkiyi oluşturabilmesi için;

a) Bakteri hücresi bitki köküne girerek nodül oluşturabilmeli (enfeksiyon), b) atmosferik azotu amonyak halinde fikse edebilmek için baklagil-bakteri interaksyonuna katılabilmelidir (efektiflik).

Schwinghamer (1964) yaptığı bir çalışmada 3 kros inokulasyon grubunu temsilen seçilen R. leguminosarum, R. trifolii ve R. meliloti suşlarından spontan olarak streptomisin sülfat, kloramfenikol, viomisin sülfat, polimiksin B sülfat, neomisin sülfat ve kanamisin sülfat'a dirençlilik gösteren mutant suşlar izole etmiştir. Her 3 suştan izole edilen viomisin ve neomisine dirençli mutantların efektifliklerini kaybettikleri saptanmıştır. Buna karşılık efektiflik kaybının kloramfenikol, polimiksin ve kanamisine dirençli mutantlarda seyrek olarak olduğu, streptomisine dirençli mutant suşlarda ise görülmediği saptanmıştır. Homolog konukçuda nodül oluşturma yeteneklerinin hiç bir mutantta değişmediği, nodüllerden geri izole edilen mutantlarda viomisine dirençliliğinin ve inefektifliğinin de kalıcı olduğu görülmüştür.

Aynı araştırmacı bir başka çalışmasında (Schwinghamer 1967), R. leguminosarum ve R. trifolii'nin efektif suşlarından 15 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilik gösteren mutant suşlar izole etmiş ve bunların nodülasyon oluşturma yeteneklerini büyük ölçüde koruduklarını saptamıştır. Buna göre streptomisin, spiramisin, kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli olan mutantların çok az veya hiç değişikliğe uğramadıkları; d-siklo-

serin, novobiosin vankomisin ve basitrasine dirençli mutantların yarısının efektifliklerini kısmen veya tamamen kaybettikleri, viomisin ve neomisine dirençlilik gösteren mutantların ise efektifliklerini tamamen kaybettiklerini saptamıştır.

İlk kez DNA transformasyonu ile dirençliliğin transfer edilebildiğinin açıklanmasından beri (Balassa 1954; Schwinghamer ve Dudman'dan 1973), streptomisine dirençlilik Rhizobiumların ekolojik ve genetik çalışmalarında sıkça kullanılmaya başlamıştır. Bu belirtecin avantajları hem antibiyotikle elde edilen mutant suşlarının stabil olması, yüksek konsantrasyonda antibiyotiğe dirençlilik göstermeleri ve diğer antibiyotiklere çapraz rezistanslıklarının az olması hem de simbiyotik yeteneklerdeki kayıpların ender olarak görülmesidir. Yapılan bazı araştırmalarda Rhizobiumlarda sıklıkla kullanılan ikinci bir antibiyotiğin spektinomisin olduğu vurgulanmıştır (Schwinghamer ve Dudman 1973). Bu araştırmacılar 4 Rhizobium cinsinden seçtikleri 8 efektif suştan spektinomisine yüksek düzeyde (200 µg/ml) dirençlilik gösteren spontan mutantlar elde etmişlerdir. Bu mutantların streptomisine çapraz rezistanslık göstermedikleri saptanmıştır. İmmünodiffüzyon yöntemiyle yapılan denemede elde edilen mutant suşlardan sadece ikisinin antijenik karakterlerinde küçük değişikliklere rastlanmış, ancak bu değişikliklerin atasal suşlarda da görüldüğü belirtilmiştir. Spektinomisine dirençli mutantların sadece % 20'sinde kısmi veya tam olarak simbiyotik özelliğın kay-

bolduğu, buna karşın nodüllerden geri izolasyon yoluyla elde edilen suşlarda antibiyotiğe dirençlilik özelliğinin kaybolmadığı saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre Rhizobiumlarla ilgili ekolojik çalışmalarda spektinomisine dirençlilik gösteren mutantların yalnız başına veya streptomisinle kombine edilerek kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Danso ve Alexander (1973), Obaton (1973) tarafından yapılan bir araştırmadan yola çıkarak antibiyotiğe rezistanslık gösteren Rhizobium suşunun toprakta bulunan Xanthomonas ve Erwinia cinslerine ait suşlar ile diğer Rhizobium bakterilerinden oluşturdukları populasyon içindeki davranışlarını incelemişler ve antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşların sayılarının çok daha yavaş bir şekilde azaldığını saptamışlardır.

Gollobin ve Levin (1974), R. japonicum 122 suşundan 39 adet, 138 no'lu suşdan ise 53 adet streptomisine dirençli toplam 92 mutant suş izole etmişlerdir. Bunlar içinden 10.000 µg/ml streptomisin konsantrasyonuna dirençli 3 mutant suşun 25.000 ve 50.000 µg/ml streptomisin konsantrasyonundaki gelişme yeteneklerini kontrol etmişlerdir. Bu suşlardan ikisinin 25.000 µg/ml de gelişebildiklerini, buna karşın hiçbirinin 50.000 µg/ml'de gelişemediklerini saptamışlardır. İzole edilen 92 mutant suşun morfolojik olarak düz koloni yapılarını devam ettirdikleri ve streptomisine bağımlı olmadan hepsinin gelişebildikleri gözlenmiştir. Mutant suşların soya konukçu bitkisiyle nodülasyon ve azot fiksasyon yetenekleri

sera koşullarında denenmiş ve streptomisin dirençliliği- nin simbiyotik özellikler üzerine herhangi bir değişik- liğe neden olmadığı saptanmıştır.

Levin ve Montgomery (1974) bazı B. japonicum suş- larının 55 farklı antibiyotiğe karşı dirençliliklerini incelemişlerdir. Bu araştırmaya göre kullanılan suşlara en etkin olan antibiyotiklerin kanamisin, streptomisin, dihidro streptomisin, triburon ve viomisin olduğu bulun- muştur. Bu antibiyotiklere tek veya bunların ikili kom- binasyonlarına karşı dirençli mutant suşlar elde edilmiş ve bunlar ile ata suşların soya fasulyesini enfeksiyon güçleri ile azot fiksasyon etkinlikleri araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre suşlar arasında enfeksiyon yetenekleri ve azot fiksasyon güçleri bakımından önemli bir fark bulunamamıştır.

Pankhurst (1977), yavaş ve hızlı gelişen Lotus grubu Rhizobium bakterilerinden 16 farklı antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlarla yaptıkları deneme- lerde protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerden streptomisin, spektinomisin, kloramfenikol ve tetrasik- linden elde edilen suşların efektifliklerinin çok az veya hiç değişmediğini, buna karşın nükleik asit sentezini inhibe eden d-sikloserin, novobiosin ve penisilinden elde edilen mutant suşların efektifliklerini % 20-100 arasında kaybettiklerini saptamıştır. Diğer yandan viomisin, neo- misin, kanamisin ve vibramisinden hızlı gelişen suşlar ile elde edilen mutantların efektifliklerini tamamen kaybettiklerini, buna karşın yavaş gelişen suşlardan elde

edilen mutantların ise kaybetmediklerini ortaya koymuştur. Buna paralel olarak 4 farklı varyeteye yapılan aşılama-
larda yavaş gelişen suşlardan elde edilen mutantların
oldukça farklı seviyede efektiflik gösterdikleri de
saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar Rhizobiumların antibiyotik
rezistant mutantların simbiyotik efektiflikleri üzerine
hem bakteri ve hem de bitki özelliklerinin etkili olduğun-
u göstermektedir.

Brockwell vd. (1977) R. trifolii ile yürüttüğü
çalışmada markır olarak hem streptomisin rezistanslığını
hem de bu bakteriden elde ettiği antiserumları kullanmış-
lardır. Buna göre, tarla denemelerinde elde edilen
nodüllerin her iki yöntemle de % 95 ve daha fazla oranda
geri kazanılabildiğini saptayan araştırmacılar ekolojik
çalışmalarda her iki yöntemin de emniyetli bir şekilde
kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Maier ve Brill (1978) B. japonicum'un ticari ino-
kulant üretiminde kullanılan bir suşundan N-metil-N-
nitro-N-nitrosoguanidin maddesiyle okzotrofik mutantla-
rını elde etmişler ve sera koşullarında bunların etkin-
liklerini araştırmışlardır. Elde ettikleri mutantlardan
iki tanesinin ata suşa göre daha erken nodülasyon yaptık-
larını ve bunlardan bir tanesinin çok daha fazla nodül
oluşturduklarını gözlemişlerdir. Sera çalışmalarının so-
nuçlarına göre bu mutantlarla aşılanan bitkilerin ata
suşla aşılanan bitkilere oranla bitki üstü kuru ağırlıkların-
nın % 60, azot içeriklerinin ise % 100 oranında arttığı
saptanmıştır. Buna göre, mutasyon yoluyla elde edilen yeni

suşlar ile verimin arttırılabileceğine işaret eden araştırmacılar bu sonuçların tarla denemeleriyle desteklenmesi gereğini de vurgulamışlardır.

Haktanır (1979) R. leguminosarum suşundan elde ettiği streptomisin ve acriflavine dirençlilik gösteren mutantlarla yaptığı çalışmada elde ettiği mutant suşların bezelyede nodülasyon ve azot fiksasyon etkinliği bakımından ata suşlardan farklı olmadıklarını ortaya koymuştur.

Srivastava vd. (1980) streptomisine dirençlilik gösteren mutantlarla yaptıkları aşılama denemelerinde bezelyede sera koşullarında efektiflik ve rekabet etme gücü bakımından ata suşa oranla üstünlük göstermelerine karşın bunların tarla denemelerinde doğal floraya karşı rekabet edemediklerini saptamışlar ve rekabet gücü yüksek suşlarla çalışma gereğine işaret etmişlerdir.

Amarger (1981) efektif ve inefektif suşların rekabet güçlerini ölçmede antibiyotiğe dirençli mutantlardan yararlanmıştı. Buna göre, R. meliloti'ye ait efektif ve inefektif suşların nodül oluşturmada bir öncelikleri olmadığı bu suşların antibiyotiğe dirençli mutantları kullanılarak deneysel olarak gösterilebilmiştir.

Hale (1982) sera koşullarında streptomisine dirençlilik gösteren R. trifolii suşu ile aşılanan Aküçgülde ata suşa oranla daha iyi bir gelişme olduğunu saptamıştır.

Kuykendall vd. (1982) *Rhizobium* içermeyen topraklara *Rhizobium japonicum* aşılmasının soyadaki nodülasyon üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu denemede ilk yıl *Rhizobium*'un genetik olarak markalanmış I-110 ARS suşu ile aşılanan nodül oluşturan R_{j1} ve nodül oluşturmayan r_{j1} soya hatları ile börülce, sarı fasulye, mısır ve yonca ekimi yapılmış ve ikinci yıl ise sadece nodül oluşturan soya fasulyesi genetik olarak markalanmış bir başka *Rhizobium* suşu ile (I-110 FN) aşılansarak ekilmiştir. İkinci yıl bitkilerde oluşan nodüllerin suşlara göre dağılımı incelenmiş ve birinci yıl nodül oluşturan tohum ile ekilen parsellerde ikinci yıl oluşan nodüllerin halen % 53.4'ünün birinci yıl kullanılan suştan oluştuğu, buna karşın birinci yıl diğer bitkilerin ekildiği parsellerde ikinci yıl elde edilen nodüllerin % 6.7 - 30.6 arasında birinci yıl kullanılan suştan oluştuğu anlaşılmıştır. Buna göre, birinci yıl kullanılan suşun aynı yıl içinde kendine ait baklagil ile nodülasyon oluşturmaması halinde sayısının ve buna bağlı olarak ikinci yıl nodül oluşturma yeteneğinin önemli ölçüde azalacağı sonucuna varılmıştır.

Turco vd. (1986), *R. leguminosarum* suşunun 13 adet ve *R. japonicum* suşunun 3 adet çift antibiyotikle markalanmış suşları ile azot fiksasyon etkinliği ve rekabet denemeleri yapmış ve elde edilen mutantların nodül oluşturma yeteneklerinin ata suşlara göre % 93 daha az olduğunu saptamışlardır. Buna karşın *R. leguminosarum* suşlarının azot fiksasyon etkinliği sadece % 38 oranında azalmıştır. *R. legimunosarum* suşlarının üreme süreleri de

uzamış, ancak üreme hızı ile nodülasyon rekabeti arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Lewis vd. (1987a), yüksek konsantrasyonda rifampin rezistanslığının çeşitli Rhizobiumları işaretlemede kullanıldığını belirttikleri araştırmalarda rifampinin bakterilerin nodülasyon ve N -fiksasyon özellikleri üzerine etkili olduğunu ve bazı baklagillerde inefektif nodül oluşumuna neden olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar yürüttükleri bir başka araştırmada (Lewis vd 1987b) rifampin dirençliliğinin R. meliloti'nin nodül oluşturma rekabetini önemli ölçüde kaybettirdiğini bulmuşlar ve bu nedenle R. meliloti'deki rifampin dirençliliğinin ekolojik çalışmalarda kullanılamayacağını ortaya koymuşlardır.

Kuykendall (1989) spontan mutasyon yoluyla elde ettiği streptomisin (1 mg/ml), rifampin (500 µg/ml) ve azide (10 µg/ml) karşı dirençlilik gösteren B. japonicum I-110 ARS suşunun tarla koşullarındaki nodülasyon yeteneğini, topraktaki yaşama ve canlı kalma süresini araştırmıştır. Buna göre, aynı yıl ve 5 yıl sonra oluşan nodüllerden I-110 ARS suşunu geri izolasyon yoluyla geri kazanmış ve elde ettiği araştırma sonuçlarına göre, bu mutant suşun nodül yapma yeteneğini kaybetmediğini, toprakta uzun süre yaşayabildiğini ve antibiyotikle markalanmış suşların bu gibi çalışmalarda yararlı olduğunu ortaya koymuştur.

Jauhri ve Gupta (1989), inokulant içinde bulunan kontaminantların Rhizobiumların canlılığı üzerine etkili

olduklarını vurgulamışlar ve bu inokulantlardan izole ettikleri kontaminantların 1000 ppm bavistin ve 65 ppm streptomisin ilavesiyle baskı altında tutulabileceğini saptamışlardır. Bununla beraber aynı maddelerin inokulant içine ilave edildiğinde aynı derecede etkili olmadıklarını ortaya çıkarmışlardır. Bu antibiyotiklerden inokülanta 2000 ppm ilave edildiğinde fungus ve aktinomiset gelişiminin engellendiği ancak bakteriyel kontaminantların 16000 ppm'e kadar halen yaşamlarını sürdürdükleri saptanmıştır.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırmada mikroorganizma kültürü olarak azot fiksasyon gücü yüksek olan (Gürgün 1988) Bradyrhizobium japonicum USDA 110 suşu kullanılmıştır.

Denemede kullanılan antibiyotikler; Streptomisin sulfat, Kloramfenikol, Nalidiksik asit, Polimiksin B sulfat, Ampisillin Trihidrat, Basitrasin, Neomisin sülfat Kanamisin sülfat ve Tetrasiklin Sigma, Spektinomisin ise Upjohn firmasından sağlanmıştır.

Antiserum eldesinde Yeni Zelanda tipi 4 aylık tavşanlar kullanılmıştır. Inokulant üretiminde kullanılan pit toprağı inokulant üretimi yapan Entite A.Ş (Ankara) Firmasından temin edilmiştir.

Sera koşullarında yürütülen bitki enfeksiyon testlerinde Williams soya çeşidi kullanılmasına karşın, deneme tarlasında kurulan 1 yıllık tarla denemesinde AP 240 Tekfen soya çeşidinden yararlanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri ve üretim

Bradyrhizobium japonicum USDA 110 suşunun üretiminde temel besiyeri olarak Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyeri kullanılmış olup, bileşimi aşağıda verilmiştir, (Vincent 1970).

Yeast Extrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyeri (Vincent 1970)

K HPO ₂ 4	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Mannitol	10.0 g
Yeast Extrakt	0.5 g
Destile Su	1000 ml
pH= 6.8 - 7.0	

Bileşimi yukarıda verilen besiyeri 100'er ml olacak şekilde sterilize edilmiş ve 28-30°C'ye kadar soğutulmuştur. Antibiyotiğe dirençli mutantların geliştirilmesi için önce denemede kullanılan ata suş B.japonicum USDA 110'dan yukarıda açıklanan sıvı YEM besiyerine öze ile ekim yapılarak 180 devir/dakika'da 25°C'de 5 gün süre ile gelişmeye bırakılmıştır.

Antibiyotiğe dirençli mutantların elde edilmesi için YEM besiyeri aşağıdaki gibi değiştirilmiştir. Denemede B.japonicum USDA 110'un 10 adet farklı antibiyotiğe dirençli mutant suşu elde edileceği için herşeyden önce bu antibiyotikleri içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Bu amaçla ilk önce herbir antibiyotik için 10 mg/ml konsantrasyona sahip antibiyotik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler steril koşullar altında gözenek çapı 0.2 mikron olan steril membran filtrelerden (Schleicher ve Schuell FP 030/3) geçirilerek steril 50 ml'lik erlenler içinde toplanmıştır. Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması aşamasında strepto-

misin sulfat, spektinomisin, neomisin sülfat ve kanamisin sülfat destile suda; kloramfenikol, polimiksin B sulfat ve basitrasin ise etanol ve su karışımı içinde (2 ml etanol+ 8 ml destile su); tetrasiklin sadece etanol içinde; nalidiksik asit 0.1 N NaOH içinde ve ampisilin trihidrat pH'sı 7.8'e ayarlanmış fosfat buffer çözeltilerinde çözüldükten sonra membran filtreden geçirilerek sterilize edilmişlerdir. Antibiyotik stok çözeltilerinin her denemeden önce taze olarak hazırlanmasına özen gösterilmiştir.

Antibiyotik ve agar içeren YEM besiyerinin (YEMA) hazırlanması amacıyla, 1 litre'lik erlenler içindeki 500 ml'lik steril YEMA (Erlenler 60°C'deki su banyosunda tutulur) içinde istenen son antibiyotik konsantrasyonuna uygun olacak miktarda steril antibiyotik çözeltisinden ilave edilerek iyice karıştırılmıştır (Hava kabarcıklarını minimize etmek için bu işlem yavaş bir şekilde yapılmıştır). Sıvı içinde kalabilecek olan hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla besiyeri su banyosunda 10 dakika süreyle bekletilmiş ve steril petri kaplarına dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra petri kapları ters çevrilerek bir naylon torbaya yerleştirilmişler (kurumayı önlemek amacıyla) ve +4°C'deki buzdolabında saklanmışlardır (Somasegaran ve Hoben 1985).

Denemede kullanılan antibiyotikler, etki mekanizmaları ve YEMA içindeki son konsantrasyonları çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan antibiyotiklerin etki mekanizmaları ve YEMA'daki son konsantrasyonları

Antibiyotikler	YEMA besiyerinde kullanılan konsant. (µg/ml)	Kaynaklar
GRUP I (Protein sentezini inhibe edenler)		
Streptomisin sülfat	2000	(Gollobin ve Levin 1974)
Spektinomisin	300	(Schwinghamer ve Dudman 1973)
Kloramfenikol	300	(Cole ve Elkan 1979)
Tetrasiklin	125	(Cole ve Elkan 1979)
GRUP II (Nükleik asit sentezini inhibe edenler)		
Nalidiksik asit	100	(T.A.Lie 1990, sözlü görüşme)
GRUP III (hücre duvarı sentezini veya hücre membranını inhibe edenler)		
Polimiksin B sülfat	400	(Cole ve Elkan 1979)
Ampisilin Trihidrat	1000	(Cole ve Elkan 1979)
Basitrasin	200	(Davis 1962)
GRUP IV (Protein sentezini inhibe edenler ve hücre duvarı geçirgenliğini etkileyenler)		
Neomisin sülfat	300	(Cole ve Elkan 1979)
Kanamisin sülfat	500	(Turco vd. 1986)

3.2.2. Antibiyotiğe dirençli olan spontan mutantların elde edilmeleri

Mutantların eldesi için 3.2.1'de verilen YEM besiyerinde geliştirilen B. japonicum USDA 110 suşunun 5 günlük sıvı kültürü kullanılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.1'de belirtilen antibiyotiklerin yarı konsantrasyonlarını içeren YEMA besiyerli petri kaplarına, bu sıvı kültürden özeyle sürülmüştür. Her bir antibiyotik için 10'ar adet antibiyotikli YEMA içeren petriler kullanılmıştır. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra petri kapları 25°C'de 14 gün süre ile inkübe edilmişlerdir. Bu sürenin sonunda gelişme görülen petri kaplarındaki kolonilerden Çizelge 3.1'deki konsantrasyonları içeren YEMA besiyerlerine transfer edilerek aynı sıcaklıkta ve sürede inkübe edilmişler ve bu sürenin sonunda bu petrilerden seçilen kolonilerle işlem tekrarlanmıştır (Kurumayı önlemek amacıyla petri kaplarının kapakları her seferinde parafilm ile iyice kapatılmıştır). İzole edilen antibiyotik dirençli mutantlar ^RSTR, ^RNEO, ^RSPC, ^RTET, ^RCHL, ^RNAL, ^RPOL, ^RAMP, ^RBAC, ^RKAN şeklinde adlandırılarak elde edildikleri antibiyotiğin konsantrasyonunu içeren YEMA'lı yatık agarlara ve antibiyotiksiz YEMA'ya 4'er paralelli ekilerek 25°C'de gelişimleri tamamlanana kadar bekletildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Kültürler 2 ayda bir aynı koşullarda transfer edilerek canlılıkları ve saflık kontrolleri yapılmak suretiyle sürekli izlenmişlerdir.

3.2.3. İki farklı antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutantların seçimi

Bu amaçla tek antibiyotiğe dirençli hale getirilmiş suşlar çizelge 3.2'de gösterildiği gibi farklı antibiyotik içeren YEMA'lı besiyerlerine öze ile sürme yapılarak 25°C'de 14 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. Dene- mede her mutant için 5'er petri kullanılmış ve petri kapaklarının çevresi parafilm ile iyice kapatılmıştır. Bu süre sonunda oluşan koloniler seçilerek yeniden ilgili antibiyotiği içeren YEMA'lı besiyerine aşılansmış ve inkübasyon sonucunda oluşan koloniler çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlar olarak izole edilmiştir. İzole edilen çift antibiyotiğe dirençli mutantlar STR-NAL^R, STR-BAC^R, STR-KAN^R, STR-SPC^R, CHL-NAL^R, CHL-BAC^R ve CHL-KAN^R şeklinde adlandırılarak elde edildikleri antibiyotiğin konsantrasyonunu içeren YEMA'lı yatık agarlara ve antibiyotiksiz YEMA'ya 4'er paralelli ekilerek 25°C'de gelişimleri tamamlanana kadar bekletildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.2. İki farklı antibiyotiğe dirençli mutantların seçiminde kullanılan antibiyotikler ve elde edilen mutant suşlar

Antibiyotikli YEMA besiyeri	R STR	R CHL
Nalidiksik asit	STR-NAL ^R	CHL-NAL ^R
Basitrasin	STR-BAC ^R	CHL-BAC ^R
Kanamisin	STR-KAN ^R	CHL-KAN ^R
Spektinomisin	STR-SPC ^R	

3.2.4. Sıvı besiyeri ve inokulant içindeki ata suş ve mutantların sayılarının belirlenmesi

Ata suş ve mutantların gram boyama testi ile saf-lıkları kontrol edilmiş ve YEM sıvı besiyerindeki sayıları 5 günlük inkübasyon sonucunda saptanmıştır (Vincent 1970).

Bu amaç ile ata ve mutant suşlar, içinde 20 ml. steril YEM sıvı besiyeri bulunan 100 ml'lik erlenlere 3 tekerrür olacak şekilde aşılanmış ve 25°C'de 5 gün süre ile 180 devir/dakika'da çalkalanarak gelişmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda örneklerden 1 ml. alınarak içinde 9 ml steril fizyolojik tuzlu su (FTS) bulunan test tüplerine aktarılmıştır. Bu işleme her örnek için 10⁻⁸'e kadar devam edilmiştir. Elde edilen seyreltilerden petri kaplarına pastör pipeti yardımıyla birer damla aktarılmıştır. Her kültür için farklı bir pastör pipeti kullanılmış olup, bunların verdiği bir damla ağırlıkları önceden hassas terazide tartılmıştır. Bunun için FTS çözeltisinden 20 damlanın ağırlığı tartılmış ve 1 damlanın ortalama ağırlığı hesaplanmıştır. Dilusyon için kullanılan FTS'nin özgül ağırlığı 1'e yakın olduğundan 1 g = 1 ml kabul edilerek 1 damla ağırlığı hacim olarak alınmıştır (Gürgün ve Halkman 1988). İnokulant içindeki Rhizobium sayısını belirlemeden önce inokulantın seyreltme işlemine hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla steril koşullarda 25 gram inokulant tartılarak 225 ml steril FTS içine aktarılmış ve 30 dakika süreyle 180 devir/dakika'da çalkalanmıştır. Bu ilk 1/10'luk seyreltiyi vermektedir,

diğer seyreltmeler sıvı kültürdeki bakteri sayımında olduğu gibi yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan dilüsyon serisinin en seyreltiğinden başlamak ve her bir suş için aynı pastör pipetini kullanmak suretiyle içinde Kristal Violet (% 0.01) içeren YEMA besiyeri bulunan petri kaplarındaki 6 ayrı bölgeye 1'er damla olacak şekilde aktarılmıştır. Her bir suş için 5 ayrı petri kabı kullanılmıştır. Damla içindeki sıvıyı absorbe edebilmesi için besiyeri içeren petri kapları 37°C'de 1 gün süreyle bekletilmişlerdir. Damlaların emilmesini bekledikten sonra petri kapları ters çevrilip 25°C'de 5 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. Bu sürenin sonucunda koloniler gözle görünür duruma geldiklerinden sayım yapılarak aynı dilüsyondan sayıları 5 petrideki iki damlada oluşan koloni sayısının ortalaması alınarak 1 ml'deki ata suş ve mutantların sayısı hesaplanmıştır.

Buna göre:

$$\text{Sayı (adet/ml)} = \frac{10 \text{ damladaki ort. sayı}}{\text{Bir damlanın hacmi}} \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

Dilüsyon faktörü; petri kaplarındaki besiyerine damlatılan dilüsyondur.

3.2.5. Sera denemeleri

Tek ve çift antibiyotiğe dirençli mutantlar ile ata suş'un nodülasyon ve N₂-fiksasyon kontrolü bitki enfeksiyon testi ile yapılmıştır. Burada önce tohumlara yüzey sterilizasyonu uygulanıp çimlendirildikten sonra

Modifiye Leonard kavanozuna ekimleri yapılmış ve sözkonusu kültürlerle aşılama 4 hafta sonra nodülasyon durumu ile nodül ve bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Sera denemeleri Hollanda'da Wageningen Ziraat Üniversitesinin Mikrobiyolojisi bölümünde yürütülmüştür.

3.2.5.1. Soya tohumlarının yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Soya tohumlarını çimlendirmek amacıyla % 1 oranında agar içeren su-agar ortamı hazırlanmış ve 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilerek petri kaplarına dağıtıldıktan sonra soğumaya bırakılmıştır. Soya tohumları yüzey sterilizasyonu amacıyla önce % 96'lık etil alkol içinde 5 dakika, daha sonra % 5'lik H₂O₂ içinde 15 dakika süreyle bekletilerek yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır (Winarno ve Lie 1979). Tohumlar steril koşullarda, alkole daldırılıp alevden geçirilmiş bir pens yardımıyla su-agar içeren petrilere herbirinde 10-12 adet olacak şekilde aktarılarak 25°C'de 4 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. Soya tohumları çimlendikten sonra bitki enfeksiyon testinde kullanılmışlardır.

3.2.5.2. Bitki enfeksiyon testinde kullanılan Modifiye Leonard Kavanozu sisteminin hazırlanması, ekim ve aşılama

Bitki enfeksiyon testi için Leonard kavanozları yerine 8 x 8 cm boyutlarındaki plastik bardaklar kulla-

nılmıştır. Bu amaçla plastik bardakların altları makasla yarılarak bu yarıktan 4 x 15 cm boyutlarında süngerler geçirilmiş ve bu şekilde hazırlanan bardaklar 360 ml hacimli dışları boyalı cam kavanozlara yerleştirilmiştir. Üstteki kapların içi ağzlarına kadar perlit ile doldurularak alttaki cam kavanozlarla beraber 70°C'de 20 saat süreyle pastörize edilmişlerdir. Diğer yandan pastörizasyondan sonra cam kavanozlara konulmak üzere bitki gelişmesi için gerekli olan besin çözeltisi hazırlanmıştır. Besin çözeltisinin bileşimi aşağıda verilmiştir (mg/litre):

K HPO	360
2 4	
KH PO	120
2 4	
MgSO .7H O	250
4 2	
<u>İz elemetler</u>	
MnSO .4H O	1.00
4 2	
ZnSO .7H O	0.25
4 2	
CuSO .5H O	0.25
4 2	
H BO	0.50
3 3	
Na MoO .2H O	0.05
2 4 2	
Fe(III) Sitrat	30.00
CaSO	0.25
4	

Bu maddeler 50 litre için tartıldıktan sonra 80 litre kapasiteli çelik bir kazan içinde kaynatılan 50 litre çeşme suyuna ilave edilerek karıştırılmış ve 2 saat süreyle kazanın ağzı kapalı olarak tekrar kaynatılmıştır. Steril bir kap kullanılarak bu şekilde hazırlanan besin çözeltisinden önceden 70°C'de 20 saat süre ile pastörize

edilmiş olan plastik kap içindeki perlit üzerine bir miktar dökülmüş ve sonra alttaki cam kavanoz 3/4'üne kadar doldurulmuştur. Hazırlanan kavanoz plastik kapların üzeri kağıtla kapatılarak soğumaya terkedilmiştir. Su-agar ortamında çimlendirilmiş soya tohumlarından kökleri 3-4 cm arasında olanlar seçilerek steril bir pens yardımıyla plastik kaplardaki perlit içine herbir kaptaki 1 adet tohum olacak şekilde dikilmiştir. Bu tohumlar üzerine sıvı besiyerinde üretilen bakteri kültürlerinden 10^8 - 10^9 adet/ml olacak şekilde 1'er ml aşılanmıştır (Vincent 1970).

Aşılama işlemi tamamlandıktan sonra içinde tohum olan plastik kapların üstü kontaminasyonu önlemek amacıyla 70°C'de 20 saat süreyle pastörize edilmiş iri kum (1-2 cm çaplı) ile örtülmüş ve üstüne steril petri kapakları kapatılarak seraya alınmışlardır. Deneme her bakteri suşu için 10 tekerrürlü olarak düzenlenmiş olup, plastik kapların üzerindeki petri kapakları 2 gün sonra uzaklaştırılmıştır. Sera koşulları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir (Lie vd. 1988 a, Lie vd. 1988 b):

Sıcaklık : 24 - 25°C
Işık Periyodu : 16 saat ışık, 8 saat karanlık
Işık İntensitesi : 2500 lux (Fluoresan lambalar ile temin edilmiştir)
Vejetasyon Süresi : 4 hafta

3.2.5.3. İnokulant hazırlanması

Bu amaçla 50'şer gram pH'sı 7.0'ye ayarlanmış pit tartılarak 250 ml hacimli serum şişelerine konmuş ve son rutubeti % 40 olacak şekilde erlenlerde üretilmiş ata ve mutant suşların 5 günlük kültürlerinden ayrı ayrı ilave edilerek inokulantlar elde edilmiştir. Bu şişeler inokulantı olgunlaştırmak amacıyla 25°C'de 7 gün süre ile inkübe edilmişlerdir. Havalandırmayı sağlamak amacıyla şişe içerikleri steril cam baget yardımıyla günde 1-2 kez karıştırılmışlardır. İnkübasyon süresinin bitiminde olgunlaşan inokulantlar +4°C'de soğukta muhafaza edilmişlerdir. Elde edilen olgun inokulanttaki bakteri sayısı 3.2.4'de verilen damla kültür yöntemi ve 3.2.5.2'de açıklanan bitki enfeksiyon testi ile saptanmıştır (Roughley 1970, Gürkün ve Halkman 1988, Demirdöğen 1988, Roughley 1988).

3.2.5.4. Bitkilerin hasadı

Hasat işlemi ekimden 4 hafta sonra yapılmıştır. Bu amaçla bitkiler sökülerek kotiledonun hemen altından kesilmiş ve kök kısımlarındaki nodüllerin ve bitki üstü kısımlarının yaş ve kuru ağırlıkları saptanmıştır.

3.2.5.5. Bitkilerde ve nodüllerde kuru madde tayini

Hasat edilen bitkilerin üst kısımlarının yaş ağırlıkları saptandıktan sonra herbiri ayrı bir kağıt zarf içine (zarfların ağızları açık olarak) yerleştirile-

rek 70°C'de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuş ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Nodüllerin yaş ve kuru ağırlıkları da aynı şekilde belirlenmiş olup kurutma işlemi cam tüpler içinde gerçekleştirilmiştir (Gürgün 1978).

3.2.6. Serolojik yöntemler

Bitki kök nodüllerini oluşturan bakteri tipinin hızlı bir şekilde belirlenmesi amacıyla serolojik yöntemlerden jel-immünodiffüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla ata suş USDA 110 ve USDA 110'un Streptomisine dirençli suşu (STR^R)'nun antiserumları elde edilmiş olup, önce bunların tüp-aglütinasyon yöntemiyle titrasyonları belirlenmiş ve titresi uygun olan serumlar tavşanların kesilmesiyle ayrılarak nodül oluşturan bakterilerin tanımı için kullanılmışlardır.

3.2.6.1. Antijenlerin elde edilmeleri

Antiserum elde etmek amacıyla ata ve STR^R mutant suş'un herbiri antijen olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla her suş, içinde 250 ml YEMA yatık besiyeri bulunan 500 ml'lik erlenler içine aşılansak 28°C'de 6 gün süre ile inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda agar yüzeyinde gelişen bakteriler üzerine steril cam boncuk ve 10 ml steril FTS çözeltisi ilave edilerek çalkalanmak suretiyle bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Bu bakteri süspansiyonundan ağız kapaklı steril cam santrifüj tüplerine steril koşullarda 5'er ml konularak 4000 devir/da-

kikada 20 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve pelet üzerine aynı hacimde FTS ilave edilerek işlem 2 kez daha tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra altta kalan pelet üzerine damla damla steril destile su ilave edilerek 1×10^{10} hücre/ml içeren yoğun bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltinin yarısı şahit çözelti olarak ayrılmış, diğer yarısı ise Mc Farland standartları kullanılarak 1×10^9 hücre/ml'ye seyreltilmiştir. Bu çözelti enjeksiyon için kullanılmış olup her seferinde sadece gerekli olan kısmını çözündürmek amacıyla 1 ml'lik porsiyonlar şeklinde steril ependorf tüplerine konulmuş ve derin dondurucuda saklanmıştır. (Somasegaran ve Hoben, 1985).

3.2.6.2. Antiserum elde edilmesi

Antiserum eldesi için yukarıda hazırlanış şekli verilen antijenler kullanılmış ve bunun için de Gürgün (1978) tarafından verilen yöntem aşılama şemasında ve miktarlarda yapılan değişiklikler dışında aynen uygulanmıştır. Aşılama hayvanı olarak 4 aylık Yeni Zelanda tipi tavşanlar kullanılmıştır. Jel-İmmünodiffüzyon testine uygun antiserum elde etmek amacıyla tavşanlara 3 gün üstüste kulaklarından (intravenous) sırasıyla 0,5 ; 1 ve 1,5 ml antijen aşılanmış ve bir hafta süreyle dinlendirildikten sonra aşılama işlemi arttırılarak tekrarlanmıştır. Buna göre 1. ve 2. gün kulaktan 2'şer ml ve 3. gün 2 ml kulaktan, 2 ml'de deri-altından olmak üzere aşılama yapılmıştır. Bir hafta süreyle dinlendirilen tavşanlardan alınan kanların titrasyonları yapılarak antise-

rum oluşumu kontrol edilmiştir. Yeterli titrasyona ulaşan antiserum içeren tavşanların kanı "Arteria carotis" yoluyla akıtılarak bir mezür içinde toplanmış ve 1 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildikten sonra mezürün iç yüzeyine yapışan pıhtı bir bistürü ile kesilmiş ve serum kısmı ayrılarak + 4°C'de 12 saat süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda oluşan 2. pıhtı da ayrılmış ve serum açık sarı renkte ise başkaca herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Ancak serum rengi kırmızıdan koyu kırmızıya kadar değişiyorsa 3000 devir/dakika'da 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve kırmızı hücreler ayrılmaya çalışılmıştır. Bu şekilde elde edilen antiserumun içine koruyucu olarak % 0.05 oranında fenol ilave edildikten sonra (Vincent 1970) küçük tüpler içine 2'şer ml'lik porsiyonlar şeklinde paylaştırılmış ve -20°C'de saklanmıştır.

3.2.6.3. Antiserumların titrasyonu ve aglütinasyon

Antiserumların titrasyonundan halen antijen ile görülür reaksiyona girebildiği en düşük konsantrasyonu anlaşılmaktadır. Bunu saptamak amacıyla elde edilen antiserum önce bir dizi seyreltme işlemine tabi tutulmuştur. Bunun için antiserumdan ilkönce 0,1 ml alınıp 2,4 ml FTS içine konulmuş ve böylece 1/25'lik seyrelti elde edilmiştir. Bu çözelti iki basamaklı diğer seyreltilerin elde edilmesinde stok çözelti olarak kullanılmıştır.

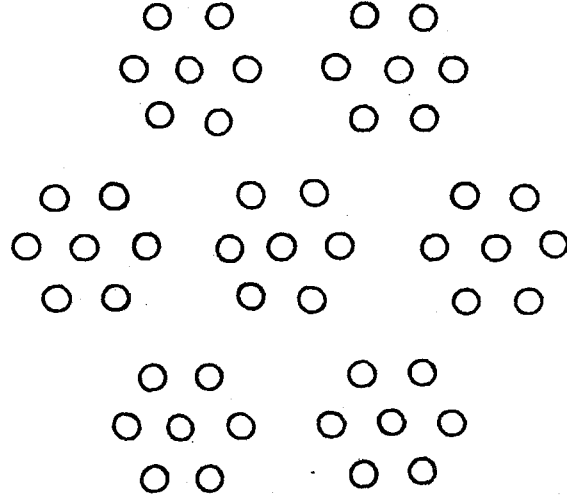
Bundan sonra içinde 1 ml FTS bulunan 3 ml'lik tüplere (Aglütinasyon tüpleri) 1/25 oranında seyreltilmiş olan antiserumlardan 1'er ml ilave etmek suretiyle

1/50'lik; bu tüplerden de yine içinde 1 ml'lik FTS bulunan tüplere 1 ml konularak 1/100'lük ve bu şekilde dilusyona devam edilerek antiserumların 1/400'lük seyreltileri elde edilmiştir. Bu şekilde elde edilen seyreltilerden birim hacim (0,5 ml) alınarak içinde aynı miktarda antijen bulunan Aglütinasyon tüplerine ilave edilmiş ve karıştırılmak suretiyle 37°C'lik su banyosunda 4-12 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda tüp içinde çökelti yapan ve karıştırıldığında kırıntılar halinde sıvı içinde dağılan tüpler (+), bulanık halde kalan tüpler de (-) olarak değerlendirilmiştir (Gürgün 1978).

3.2.7. Jel-immünodiffüzyon yöntemi ve nodül tanımlaması

Tarla koşullarında bitki kökünde oluşan nodüllerin STR^R mutant suşları tarafından oluşturup oluşturulmadığını kontrol etmek amacıyla Jel-immünodiffüzyon yönteminde yararlanılmıştır (Gürgün 1978).

Bu yöntem, Şekil 3.1'de görüldüğü gibi jel içine açılan deliklere doldurulan antijen ve antiserum süspansiyonlarının, karşılıklı olarak diffüzyonları sırasında, birbirleri ile karşılaştıkları yerde bir presipitasyon bandı oluşturmaları esasına dayanır (Somasegaran ve Hoben 1985). Burada incelenen nodül eğer kullanılan antiseruma özgü suş tarafından oluşturulmuşsa, bir presipitasyon bandı oluşur, yabancı suş tarafından meydana gelen nodüllerle elde edilen antijenler bu antiserumla herhangi bir bant oluşturmazlar.



Şekil 3.1. Jel-immünodiffüzyon işleminde jellerde deliklerin açılması sırasında kullanılan hegzagonal şekil

3.2.7.1. Jel-immünodiffüzyon kaplarının hazırlanması

Diffüzyon işlemi için aşağıda bileşimi verilen jeller kullanılmıştır:

% 0.75 Oxoid - İon Agar No: 2

% 0.85 NaCl

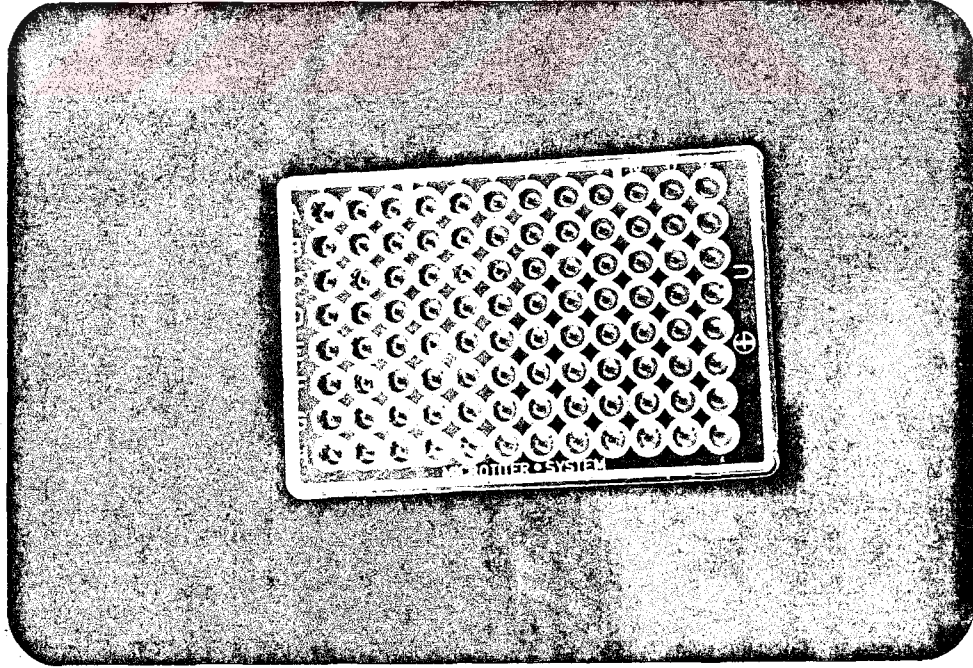
% 0.05 Sodyum-azid

Yukarıda bileşimi verilen jeller 4 mm kalınlıkta olacak şekilde petri kaplarına dökülmüş ve agarın katılaşmasından sonra bir daire üzerinde 4 mm çapında ve kenardan kenara uzaklıkları 4 mm olan ve biri merkezde olmak üzere 7 adet kuyucuk açılmıştır (Şekil 3.1). Bu kuyucukların açılması aşamasında bir mantar deliciden

yararlanılmış olup, daha sonra kesilen agar parçaları bir ucu vakum pompasına bağlı olan bir pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırılmıştır (Gürgün 1978). Bir petri kabı içinde yedili delik kombinasyonlarından birbirini etkilemeyecek şekilde 7 ünite yerleştirilebilmektedir.

3.2.7.2. Nodüllerin antijen olarak hazırlanmaları

Bu amaçla tarla denemesi sırasında alınan örnek bitkilerin köklerindeki nodüller iyice yıkandıktan sonra cam tüpler içine konularak su banyosunda 1 saat süreyle kaynatılmışlardır. Bu şekilde hazırlanan nodüllerin her biri ayrı ayrı şekil 3.2'de görülen Aglutinasyon tablasının kuyucuklarına yerleştirilmiş ve üzerine 4 damla steril FTS ilave edilerek temiz bir cam baget yardımıyla ezilmişlerdir.



Şekil 3.2. Nodüllerin antijen olarak hazırlanmasında kullanılan plastik Aglutinasyon tablası

3.2.7.3. Jel-immünodiffüzyon işlemi

Nodülün ata veya STR^R suşlarından elde edilen antiserumlarıyla reaksiyona girip girmediklerinin kontrolü suretiyle yapılmıştır. Bu amaçla iki tekerrürlü olacak şekilde bir ünitenin merkez kuyucuğuna ata suştan bir diğer ünitenin merkez kuyucuğuna da STR^R suşundan elde edilen antiserum yerleştirilmiş olup, 3.2.7.2.'de hazırlanan herbir nodülden 2 ünitedeki birer kuyucuğa pastör pipeti yardımıyla kuyucuk dışına taşmayacak şekilde aktarılmıştır. Bu şekilde tüm nodüllerden kuyucuklara paralel aktarımlar yapılmıştır. Hazırlanan petri kapları 37°C'de presipitasyon bantları oluşuncaya kadar (12-36 saat) su banyosunda inkübe edilmişlerdir (Kuyucuk içeriklerinin kurumamasına özen gösterilmiştir).

3.2.7.4. Presipitasyon bantlarının boyanması

Diffüzyon kaplarında oluşan presipitasyon bantlarının daha iyi görülebilmesi amacıyla jeller Gürgün (1978)'de verilen yönteme göre boyanmışlardır. Bunun için jeller, öncelikle bağlı olmayan proteinleri uzaklaştırmak amacıyla FTS ile çalkalanarak yıkanmışlardır. Bu işlem 24 saat içinde 2 kez suyu değiştirilerek tekrarlanmıştır. Yıkama işlemi tamamlanan jeller bileşimi aşağıda verilen boya çözeltisi ile 30 dakika süreyle boyanmışlardır. Bu süre sonunda boyanın fazlası akıtılmış ve yıkama çözeltisi ile (boya maddesi içermeyen aynı boyama çözeltisi)

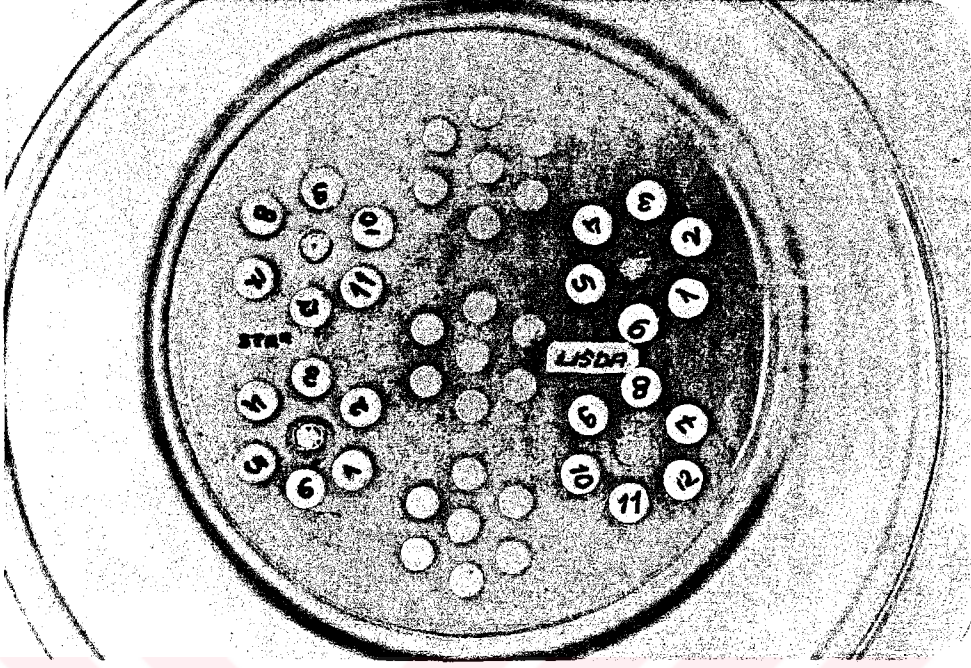
jeller iyice yıkanmış ve geriye yalnızca presipitasyon bandındaki proteinlere bağlı boya kalmıştır (Gürgün 1978)

Boyama Çözeltisi :

Coomassie brilliant blue	250 mg
Metanol	227 ml
Asetik asit (Glasial)	46 ml
Destile su	227 ml

3.2.7.5. Jel-İmmünodiffüzyon kaplarının değerlendirilmesi

İnkübasyona bırakılan diffüzyon kapları, kullanılan antijen ve antiserumların diffüzyon hızlarına bağlı olarak 12-36 saat sonra kontrol edilerek antijen ve antiserum kuyucukları arasında meydana gelen presipitasyon bantları merkezdeki kuyucukta bulunan antiserum için pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3). Eğer belli bir antijenin paralelinde bulunan diğer petri kabında da plakta presipitasyon bandı oluşmuşsa o zaman denemeye alınan nodüllerin her iki suşu da içerdiği sonucuna varılmıştır. Bu şekilde oluşan presipitasyon bantlarına göre, pozitif olarak değerlendirilen antijenlerin toplamı, toplam antijen (nodül) sayısına oranlanmış ve suşun nodül oluşturma gücü yüzde olarak ifade edilmiştir.



R
Şekil 3.3. Ata ve STR mutant suşları ile aşılanan bitkilerde oluşan nodüllerin jel-immüno-diffüzyon yöntemi ile analizleri sonucu elde edilen presipitasyon bantları

3.2.8. Tarla denemesi

Tek ve çift antibiyotiğe dirençli mutantların bazılarında elde ettiğimiz inokulantlar ile (STR^R , CHL^R , BAC^R , $CHL-KAN^R$, $STR-KAN^R$) Entite A.Ş. tarafından ata ve STR^R suşlarından elde edilen inokulantlar ve Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü tarafından CB 1809 (TAL 379) suşu ile üretilen inokulantın nodülasyon ve N_2 -fiksasyon yeteneklerinin tarla koşulları altında belirlenmesi amacıyla Köy Hizmetleri Araştırma Enstitüsü Lodumlu'da tesadüf blokları deseninde 7.5 x 2.4 m parsel boyutlarında 4 tekerrürlü bir deneme kurulmuştur (Anonymous 1979).

3.2.8.1. İnokulasyon ve ekim

Her parsel için gerekli tohum sayısına ve tohumluğun 1000 tane ağırlığına göre hesaplanan tohum miktarı (80 kg/ha) bir polietilen torbaya konmuş ve üzerine % 1 oranında % 10'luk sakkaroz çözeltisinden ilave edilerek (Gürgün 1988) tüm tohumların yüzeylerinin ıslanması sağlanmıştır. Ekim yapılan tarlada ilk defa soya ekildiği için tohumların üzerine yüksek oranda bakteri yapışmasını sağlamak amacıyla % 2 oranında inokulant ilave edilmiş, torba hava ile şişirilip dikkatlice sallanarak inokulantın tohum yüzeyine homojen bir şekilde (yüzey siyah olacak şekilde) yapışması sağlanmıştır. Gölge bir yerde kağıt üzerine yayılan tohumlar, yüzeylerin kurumaması için 15-20 dakika bekletilmiş ve derhal ekime geçilmiştir. Ekim işlemine aşılınmayan tohumlarla başlanmış, böylece onların inokulant ile bulaşmaları önlenmiştir.

Ekim 60.0 cm sıra arası ve 3.0 cm sıra üzeri ekim sıklığında elle yapılmış olup, bakteri aşılınması yapılan tohumların üzeri ekimden hemen sonra toprak ile örtülmüştür. Çıkış tamamlandıktan sonra sıra üzerinde bitkiler arasında 3.7 cm olacak şekilde (1 m'de 27 bitki) seyreltme yapılmıştır.

3.2.8.2. Sulama ve bakım

Sulama, yağmurlama sistemiyle topraktaki su miktarı ve bitkinin gereksinimine bağlı olarak ekimden itibaren 10, 20 ve 30 gün sonra 8'er saatlik sürelerle üç

kez yapılmıştır. Her sulamadan sonra parsellerde görülen yabancı otların öldürülmesi ve oluşan kaymak tabakasının kırılması amacıyla tüm parseller aynı günde çapalanmıştır.

3.2.8.3. Nodülasyon kontrolü ile bitki üstü ve nodüllerin yaş ve kuru ağırlığı

Bitki çıkışıandan 15 gün sonra başlanarak 3 kez nodülasyon kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla parsel başlarından ayrılan 0.5 m'lik uzunluktaki sıralarda yer alan bitkiler kullanılmış, bitki bel yardımıyla çıkarılmış, kök çevresindeki topraklar yıkandıktan sonra nodülasyon durumları gözlenmiştir. Ekimden 2 ay sonra örnekleme alanlarından tesadüfen seçilen bitkilerde bitki ile nodüllerin yaş ve kuru ağırlıkları saptanmıştır.

3.2.8.4. Hasat ve harman

Bitkiler hasat olgunluğuna geldiğinde (ekimden 110 gün sonra) parsel başlarında 0,5 metre ve 2'şer metre dışında kabın içerdeki 2 sınanın bitkileri elle yolunarak hasat edilmişlerdir. Bu şekilde hasat edilen bitkiler elle harman edilmiş ve sağlanan tohumlar tartılarak parsel numaralarına göre ayrı kese kağıdı içinde saklanmıştır.

3.2.8.4.1. Tane verimi

Her parselden elde edilen bitkiler elle harman edildikten sonra tohumlar tartılarak parsellerden elde edilen tane verimi bu değerlere göre hesaplanmıştır.

3.2.8.4.2. 1000 tane ağırlığı

1000 tane ağırlığının belirlenmesinde rastgele 4 kez 100'er adet tane seçilmiş ve 0,01 g duyarlıktaki bir terazide ağırlıkları saptanarak bunun ortalaması alınmış ve bulunan değer 1000 tane ağırlığına yükseltilmiştir.

3.2.8.4.3. Yağ miktarı tayini

Harman sonrası her parseli temsil edecek şekilde ayrılan tohumlardan belli bir miktarı öğütülerek yağ tayininde kullanılmıştır. Tohumlardaki yağ miktarları eter ekstraksiyonuna dayalı Soksele yöntemi ile belirlenerek değerler gram olarak verilmiştir.

3.2.8.4.4. Protein miktarı tayini

Protein tayini için her bir parselden alınan örnekler önce öğütülmüş, daha sonra Kjeldahl yöntemiyle bulunan azot miktarları 6.25 faktörü ile çarpılarak tanenin protein kapsamı belirlenmiştir (Bremner 1965).

3.2.8.4.5. Protein ve yağ verimi

Tarla denemesi sonuçlarına göre bir hektardan elde edilebilecek protein ve yağ miktarları, her parselden elde edilen tane verimleriyle, protein ve yağ oranlarının ayrı ayrı çarpımıyla hesaplanmıştır (Gürgün 1988).

3.2.8.4.6. Rutubet tayini

Öğütülmüş örneklerden 5'er gram tartılarak darası alınmış rutubet kaplarına konulmuşlar ve 105°C 'de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuşlardır. Bu sürenin sonunda desikatöre alınan örnekler soğuduktan sonra tartılarak tohumlardaki rutubet miktarları % olarak saptanmıştır.

3.2.8.5. Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi

Araştırmada yapılan sera ve tarla denemeleri verilerinin varyans analizleri yapılmış (Düzgüneş 1963) ve işlemler arasındaki farklılıklar Duncan testi ile saptanmıştır.

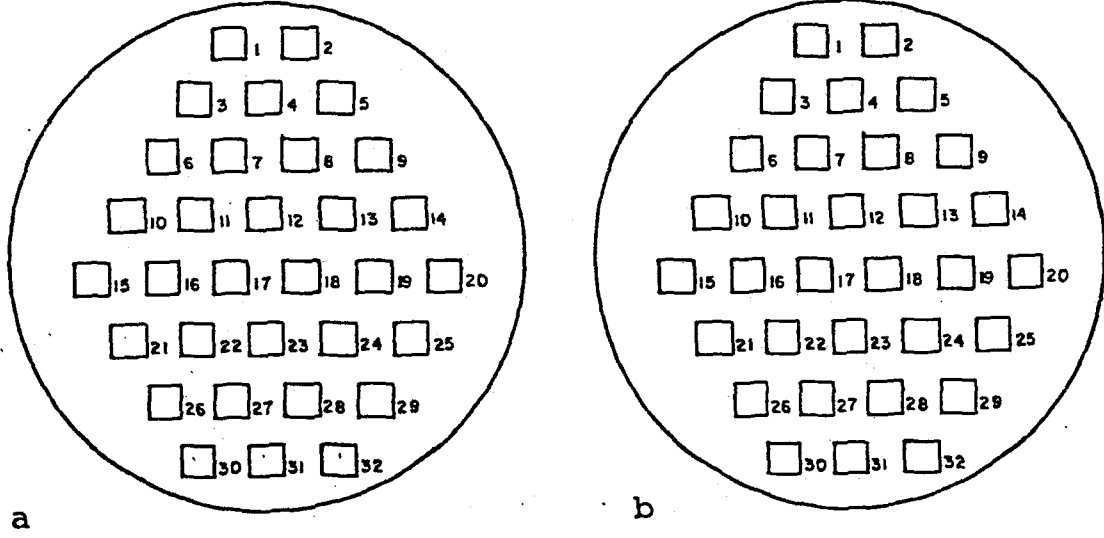
3.2.9. Ata ve STR ^R mutant suşlarının rekabet denemesi

Bradyrhizobium japonicum USDA 110 ve bunun mutantlarından STR ^R suşu 1:1 oranında karıştırılmış ve bunların nodül oluşturma yetenekleri 3.2.5.1'de verilen yöntem kullanılarak elde edilen nodüllerden 3.2.6'da verilen serolojik yöntemler yardımıyla saptanmıştır. Bu amaçla 3.2.5.1'de açıklandığı şekilde sterilize edilip çimlendirilmiş olan Williams tipi soya tohumları Modifiye Leonard kavanozlarına 1'er adet olacak şekilde ekilmiş ve ata ve STR ^R mutant suşunun 4 günlük sıvı kültürleri ve bunların eşit sayıya getirilmiş 1:1'lik karışımı ile 1'er ml olarak aşılantmıştır. Bu şekilde hazırlanan kavanozlar 4 hafta süre ile kontrollü koşullarda serada gelişmeye bırakıl-

mişlardır. Gelişimlerini tamamlamış olan bitkiler hasat edilmiş ve ayrılan kökler nodüllerleriyle birlikte yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla kökler önce içinde deterjanlı su bulunan erlende iyice yıkanmış, daha sonra nodülsüz olan kök kısımları kesilerek uzaklaştırılmış ve bu kök sistemi % 70'lik etil alkolde 5 dakika ve % 5'lik hidrojen peroksit içinde de 20 dakika süreyle bekletilerek yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Bu şekilde hazırlanan kökler önceden 100°C'de alüminyum folya ile sarılarak 1 gece süreyle sterilize edilen kağıt havluların üzerine serilmiş ve köklerin fazla suyu uzaklaştırılmıştır. Bu kökler üzerinden steril bir pens ile alınan herbir nodüle steril bir özenin sivri ucu batırılarak Şekil 3.4'deki düzene göre YEMA ve streptomisinli YEMA besiyeri içeren petri kaplarına ayrı ayrı aşılanmıştır. Bu şekilde her nodül için antibiyotik ve antibiyotiksiz YEMA'lı petrilere ekim yapılmış ve 25°C'de 2 hafta süre ile inkübasyona terkedilmiştir (Lie vd. 1988a). Kontrol amacıyla her iki petri kabına ata ve STR^R mutant suşları da saf kültür halinde aşılanmışlardır. İnkübasyon sonucunda her iki petri kutusunda oluşan koloniler sayılmış ve nodüllerin % olarak hangi suştan oluştukları saptanmıştır.

3.2.10. Fermenterlerdeki kontaminasyon kontrolü

Daha önce her seferinde büyük oranda kontaminasyon saptanan 100 litrelik fermenterlerde 2000 mg/litre olacak şekilde Streptomisin içeren besiyeri hazırlanmış ve STR^R mutant suşu ile aşılanmıştır. 5 günlük fermantasyon süresince hergün alınan örneklerde kontaminasyon olup



Şekil 3.4. Nodüllerde suş belirlenmesi amacıyla kullanılan şekil. a) YEMA besiyeri içeren b) YEMA+Streptomisin içeren petri kapları

olmadığı mikroskopik olarak gram boyama yöntemi ile tesbit edilmiştir.

3.2.11. Son ürün olan inokulanttaki kontaminasyon oranının kontrolü

Bu amaçla ata ve STR^R mutant suşu ile hazırlanan inokulantlardaki Bradyrhizobium ve enfeksiyon bakterilerinin sayısı 3.2.4'de verilen damla kültür yöntemi ile saptanmış ve iki inokulant arasındaki enfeksiyon bakterilerinin oranı yüzde olarak ifade edilmiştir.

3.2.12. Ata ve STR^R mutant suşlarının kimi antimikrobiyel maddeler varlığında gelişme durumları

Bradyrhizobium japonicum USDA 110 ata suş ve onun STR^R mutantının Kristal Violet ve Brilliant Green içeren YEMA besiyerindeki gelişmeleri kontrol edilmiştir. Her iki antimikrobiyel maddenin gram pozitif bakteri gelişimini inhibe ettiği Pattison ve Skinner (1974) tarafından açıklanmıştır. Bu maddelerin 1 mg/ml'lik stok çözeltileri hazırlanıp sterilize edilmiş ve bundan 0,5-5 mg/litre arasında değişen 5 farklı konsantrasyonda 500 ml'lik 5 adet YEMA besiyeri hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri petri kaplarına dökülmüşler ve besiyerleri katılaştıktan sonra her bir petri kabının tabanı camyazar kalemle 4 eşit parçaya bölünmüştür. Denemeye alınan bakteriler öze yardımı ile bu dört alana her seferinde yeniden bakteri kültürü alınarak sürülmüş ve her bir bakteri kültürü için 10 adet petri kabı kullanılmıştır. Bu şekilde aşılanan petriler 25°C'de 2 hafta süre ile inkübe edilmişler ve bu sürenin sonunda üreme durumları antimikrobik madde içermiyen YEMA besiyerindeki üreme durumu ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Söz konusu antimikrobik maddelerin gerçekten topraktan kaynaklanan Gram (+) bakterilere karşı etkili olup olmadıklarını belirlemek amacıyla 1 gram bahçe toprağı alınıp, içinde 50 ml steril destile su bulunan 100 ml'lik erlenlere aktarılmış ve vejetatif hücreleri öldürmek amacıyla erlenler 85°C'de 20 dakika süreyle pastörize edilmiştir. Daha sonra her bir erlen içine ayrı ayrı ata ve STR^R mutant suşu ile kontrol

olarak kullanılan B. megaterium (B17) suşundan 0,5'er ml aşılantıdır. Bu şekilde hazırlanan süspansiyonlardan içinde yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda antimikrobiyel madde içeren YEMA besiyerine aynı şekilde öze ile aşılantıdır. Bu şekilde aşılantı petri kapları 25°C'de 2 hafta süreyle inkübe edilerek bakteriyel gelişme durumları incelenmiştir (Pattison ve Skinner 1974, T.A. Lie 1990, sözlü görüşme).



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Antibiyotiğe Dirençlilik Gösteren Mutantların İzolasyon Sonuçları

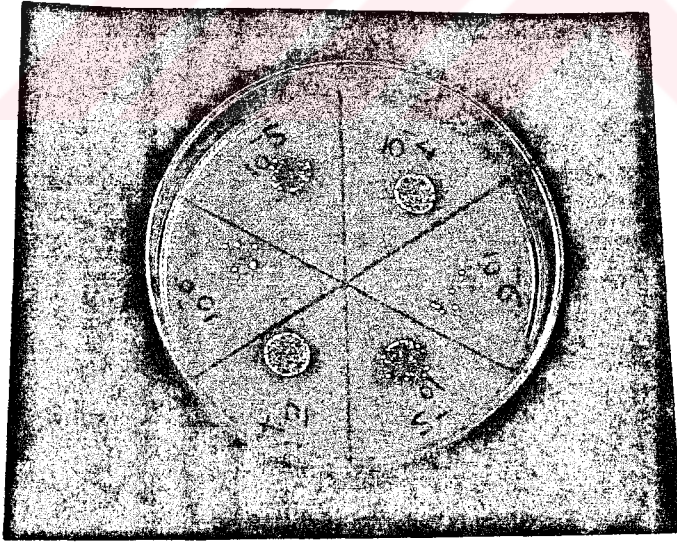
Araştırmada inokulant hazırlanması aşamasında fermenterlerdeki sıvı kültürün üretim basamağında ve bu sıvı kültürün steril olmayan pite ilavesiyle pitten gelen doğal kontaminant bakterilerinin bir ölçüde elimine edilmesinde antibiyotiğe dirençli mutant suşlardan yararlanılacağı için ilk önce ata suştan 3.2.2'de açıklandığı şekilde tek antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutantlar elde edilmiştir. Sıvı kültür üretimi aşamasında ve pitten gelen kontaminantların mikroskopik incelemeler sonucunda çoğunluğunun gram (+) bakterilerin oluşturduğu anlaşıldığından elde edilecek mutant suşların gram (-)'ler yanında özellikle gram (+) bakterilere karşı etkili olması hedeflenerek Çizelge 3.2'de verilen kombinasyon şekli kullanılmıştır. Buna göre tek antibiyotiğe dirençli STR^R ve CHL^R mutant suşları ile 3.2.3'de açıklandığı şekilde her bir antibiyotik için farklı konsantrasyonlar kullanılarak çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlar elde edilmiş ve bunlar STR-BAC^R, CHL-KAN^R vs. şeklinde kodlanmışlardır.

4.2. Antibiyotiğe Dirençlilik Gösteren Mutant Suşların Sıvı Besiyerindeki Üreme Durumları

İzole edilen tek ve çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşların Yeast Ekstrakt Mannitol sıvı be-

siyerindeki gelişme sürelerini ve canlı hücre sayılarını belirlemede damla kültürü yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemin seçilmiş olması, tek bir petri kabı içinde üç farklı dilusyondan ikişer tekerrürlü ekim olanağının sağlanması ve oluşan koloniler bakımından tekerrürler arasında büyük benzerlikler elde edilmesidir (Şekil 4.1).

Damla kültür yöntemi ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı üzere ata suşun 5 günlük sıvı kültüründeki hücre sayısı $8,8 \times 10^8$ adet/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. Aynı süre içindeki hücre sayıları mutant suşlarda oldukça farklılık göstermiş olup, ata suşa en yakın sayı $5,22 \times 10^8$ adet/ml ile STR mutantında görülmüştür. Nalidiksik asidin ve spektinomisininin katıldığı besiyerlerindeki üre-



Şekil 4.1. Damla kültür yöntemi ile elde edilen koloniler

me oldukça düşük seviyede olmuş, buna karşın kloramfenikol, kanamisin ve basitrasın katkılı besiyerinde üreme hızında belli bir düşme görülmemiştir. Diğer yandan polimiksin ve neomisin ile elde edilen tek antibiyotiğe dirençli mutant suşlarındaki üreme hızı da çok düşük bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Tek ve çift antibiyotikle markalanmış mutant suşların YEM sıvı besiyerindeki canlı hücre sayıları (adet/ml)

Ata suş ve mutantları	Canlı hücre sayısı (adet/ml)
<u>B. japonicum</u>	8
USDA 110	$8,80 \times 10^8$
R	8
STR	$5,22 \times 10^8$
R	8
STR-KAN	$1,28 \times 10^8$
R	8
STR-BAC	$1,35 \times 10^6$
R	6
STR-SPC	$4,41 \times 10^6$
R	6
STR-NAL	$1,28 \times 10^7$
R	7
CHL	$4,64 \times 10^8$
R	8
CHL-KAN	$1,04 \times 10^8$
R	8
CHL-BAC	$1,14 \times 10^6$
R	6
CHL-NAL	$1,53 \times 10^7$
R	7
SPC	$1,18 \times 10^6$
R	6
NEO	$3,80 \times 10^6$
R	6
POL	$1,50 \times 10^6$

4.3. Sera Denemeleri Sonuçları

Tek ve çift antibiyotiğe dirençli mutantlar ile ata suşun nodül oluşturma ve azot fikse etme güçlerinin kıyaslanması amacıyla, Modifiye Leonard Kavanozu sisteminin kullanıldığı bitki enfeksiyon testi her bir grup için ayrı ayrı uygulanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Bitki enfeksiyon testinde kullanılan Modifiye Leonard kavanozu sistemi

4.3.1. Tek antibiyotiğe dirençli mutant suşlarla yapılan bitki enfeksiyon testi sonuçları

Bu amaçla kurulan denemede gelişen bitkiler 40 gün sonra hasat edilerek bunların bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3).

Mutantların kullanıldığı bitkilerin, bitki üstü yaş ağırlıkları kontrol bitkinin bitki üstü yaş ağırlığından % 1 düzeyinde daha önemli ve yüksek bulunmuştur.

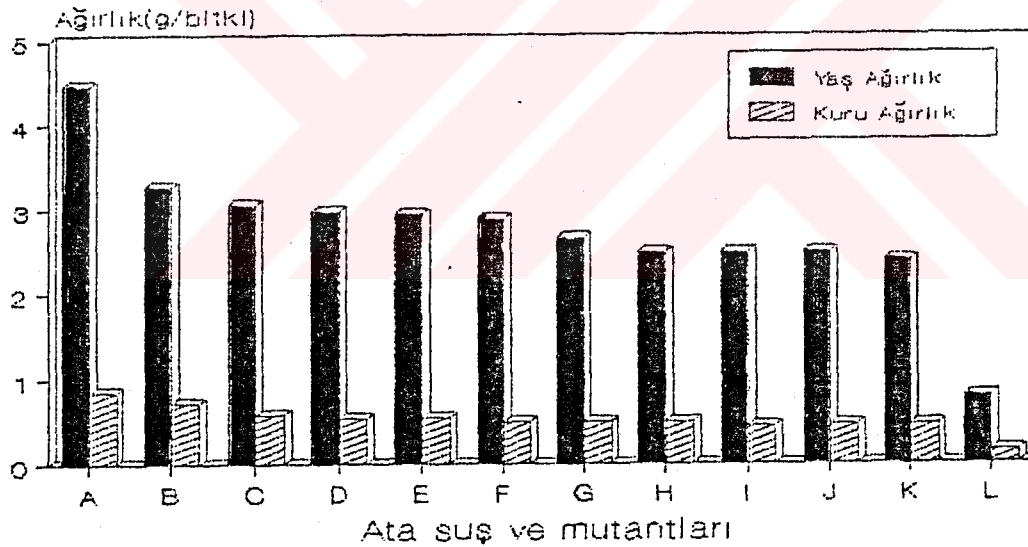
Çizelge 4.2. Ata suş ve tek antibiyotiğe dirençli mutant suşlarla yapılan aşılama sonucu elde edilen bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Ata suş ve mutantları	Yaş Ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar			Kuru Ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar		
<u>B. japonicum</u>			x)			x)
USDA 110	4,47	a	1	0,85	a	.1
R						
STR	3,27	b	2	0,72	a	12
R						
CHL	3,06	bc	2	0,58	b	23
R						
POL	2,98	bc	2	0,54	bc	3
R						
SPC	2,94	bc	2	0,55	bc	3
R						
NAL	2,89	bc	2	0,50	bc	3
R						
KAN	2,66	bc	2	0,50	bc	3
R						
BAC	2,48	bc	2	0,50	bc	3
R						
TET	2,48	bc	2	0,44	c	3
R						
NEO	2,48	bc	2	0,46	bc	3
R						
AMP	2,39	c	2	0,46	bc	3
Kontrol (bakterisiz)	0,80	d	3	0,15	d	4

x) Harfler 0,05; rakamlar 0,01 oranında farklı grupları göstermektedir.

Ata suş ile aşılanan bitkilerin bitki üstü yaş ağırlığı ise kontrol bitkilerin yanında mutantlardan da daha önemli fark göstermektedir. Mutant suşlar arasında oluşturdukları bitki üstü yaş ağırlığı bakımından istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamakla beraber, STR mutantının kullanıldığı bitkilerin bitki üstü yaş ağırlıkları AMP mutantının kullanıldığı bitkilerden % 5 düzeyinde önemli ve daha yüksek bulunmuştur.

Aynı şekil ve çizelgede verilen bitki kuru ağırlıkları incelendiğinde, mutantlardan ve ata suştan elde edilen bitki üstü kuru ağırlıklarının kontrolden yine % 1 düzeyinde önemli olarak daha yüksek olduğu görülmektedir.



A= B. japonicum USDA 110

R	R	R	R
B= STR	E= SPC	H= BAC	K= AMP
R	R	R	
C= CHL	F= NAL	I= TET	L= Kontrol
R	R	R	
D= POL	G= KAN	J= NEO	

Şekil 4.3. Ata suş ve tek antibiyotiğe dirençli mutant suşlarla yapılan aşılama sonucu elde edilen bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Ata ve STR^R mutant suşlarından elde edilen bitkilerin bitki üstü kuru ağırlığı diğer suşlardan % 5 düzeyinde önemli ve yüksek bulunmuştur. KAN^R, BAC^R, POL^R, NEO^R, NAL^R, AMP^R ve STR mutantlarıyla elde edilen bitkilerin kuru ağırlıkları arasında istatistikî olarak herhangi bir fark görülmemiş, CHL^R ve TET^R mutantlarından elde edilen bitkilerde ise % 5 düzeyinde önemli bir farklılık olduğu saptanmıştır.

Aynı bitkilerin köklerinden toplanan nodüllerin yaş ve kuru ağırlıkları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Nodül yaş ağırlıkları bakımından ata suş ile KAN^R, NAL^R, SPC^R ve STR^R mutantları arasındaki farkın % 5 düzeyinde bile önemli olmadığı, buna karşın diğer mutantlarla farkın % 5 ve bazılarıyla da % 1 seviyelerinde önemli olduğu saptanmıştır. Bu nodüllerin kuru ağırlıklarını incelediğimizde ata suş ve STR^R mutantına ait değerlerin diğerinden farklarının % 1 düzeyinde önemli oldukları görülmektedir. Diğerlerine ait kuru ağırlık farklılıklarının istatistikî olarak önemli olmadıkları görülmektedir.

4.3.2. Çift antibiyotikle markalanmış mutantlarla hazırlanan inokulantlarla yapılan bitki enfeksiyon testi sonuçları

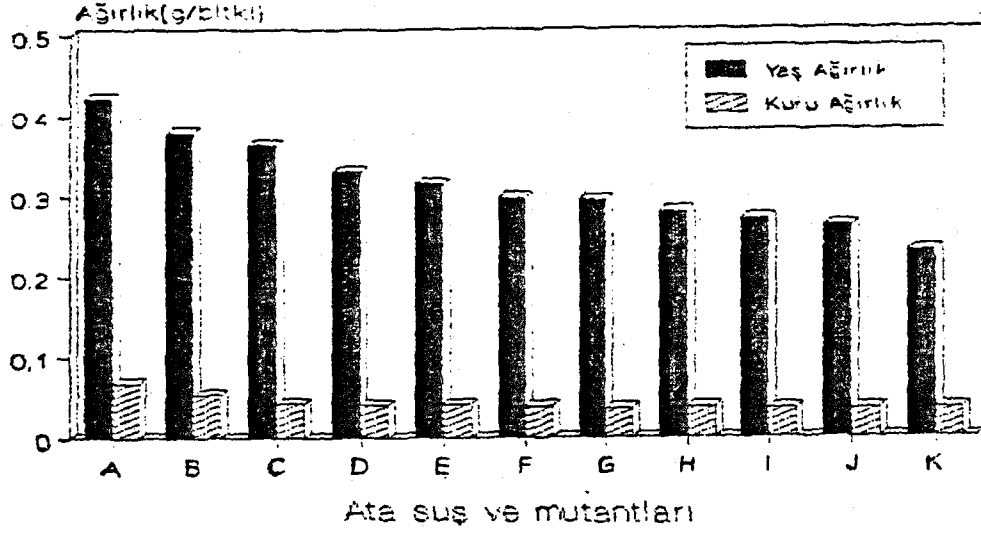
3.2.5.3'de verildiği şekilde ata suş ve mutantlar ile hazırlanan inokulantlardaki hücre sayıları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Ata suş ve tek antibiyotiğe dirençli mutant suşlarla yapılan aşılama sonucu elde edilen bitkilerdeki nodül yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Ata suş ve mutantları	Yaş ağırlık (g/bitki)	Kuru ağırlık (g/bitki)
	Ortalama ve gruplar	Ortalama ve gruplar
<u>B. japonicum</u>	x)	x)
USDA 110	0,422 a 1	0,068 a 1
R		
STR	0,380 ab 12	0,054 ab 12
R		
NAL	0,364 abc 123	0,043 bc 2
R		
SPC	0,331 abcd 123	0,041 bc 2
R		
KAN	0,316 abcd 123	0,042 bc 2
R		
BAC	0,298 bcd 123	0,039 c 2
R		
CHL	0,295 bcd 123	0,036 c 2
R		
POL	0,281 bcd 123	0,038 c 2
R		
NEO	0,272 bcd 23	0,036 c 2
R		
TET	0,262 cd 23	0,036 c 2
R		
AMP	0,231 d 3	0,036 c 2

x) Harfler 0,05; rakamlar 0,01 oranında farklı grupları göstermektedir.

Buna göre, ata suşla elde edilen inokulanttaki canlı Rhizobium sayısı $11,7 \times 10^8$ adet/ml ile en yüksek değeri göstermekte olup bunu STR-KAN mutant suşu ile elde edilen inokulanttaki sayı izlemektedir. Diğer antibiyotiğe dirençli mutantlar ile elde edilen inokulantlardaki Bradyrhizobium sayıları $1,13-9,98 \times 10^8$ adet/ml arasında değişmektedir. Çizelge 4.4'ün Çizelge 4.1 ile kıyaslanmasından anlaşılacağı üzere, ata ve mutant suşların inokulanttaki sayılarının sıvı kültürlerindeki sayılarından daha fazla olduğu görülmektedir.



A= B. japonicum USDA 110 R
 B= STR R E= KAN R H= POL R K= AMP R
 C= NAL R F= BAC R I= NEO R
 D= SPC R G= CHL R J= TET R

Şekil 4.4. Ata suş ve tek antibiyotiğe dirençli mutant suşlarla yapılan aşılama sonucu elde edilen nodül yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Çift antibiyotiğe dirençli mutant suşların nodülasyon ve azot fiksasyon yeteneklerini ata suşla kıyaslamak amacıyla bu suşlarla hazırlanan inokulantlar kullanılarak sera koşullarında bitki enfeksiyon testi yapılmış, bu denemede tek antibiyotiğe dirençli suşlar ile yapılan denemenin aksine her bir kavanoz için 2 adet tohum ekilmiştir. Ekimden 35 gün sonra bitkiler hasat edilerek bitki üstü kısımlarının yaş ve kuru ağırlıkları saptanmıştır. Deneme sonucu elde edilen bulgular Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. İnokulant içindeki ata ve mutant suşların canlı hücre sayıları (adet/ml)

Ata suş ve mutantları	Canlı hücre sayısı (adet/ml)
<u>B. japonicum</u>	8
USDA 110	11,7 x 10 ⁸
R	8
STR-BAC	1,35 x 10 ⁸
R	8
STR-NAL	1,54 x 10 ⁸
R	8
STR-KAN	9,98 x 10 ⁸
R	8
STR-SPC	2,79 x 10 ⁸
R	8
CHL-BAC	2,38 x 10 ⁸
R	8
CHL-KAN	1,67 x 10 ⁸
R	8
CHL-NAL	1,13 x 10 ⁸

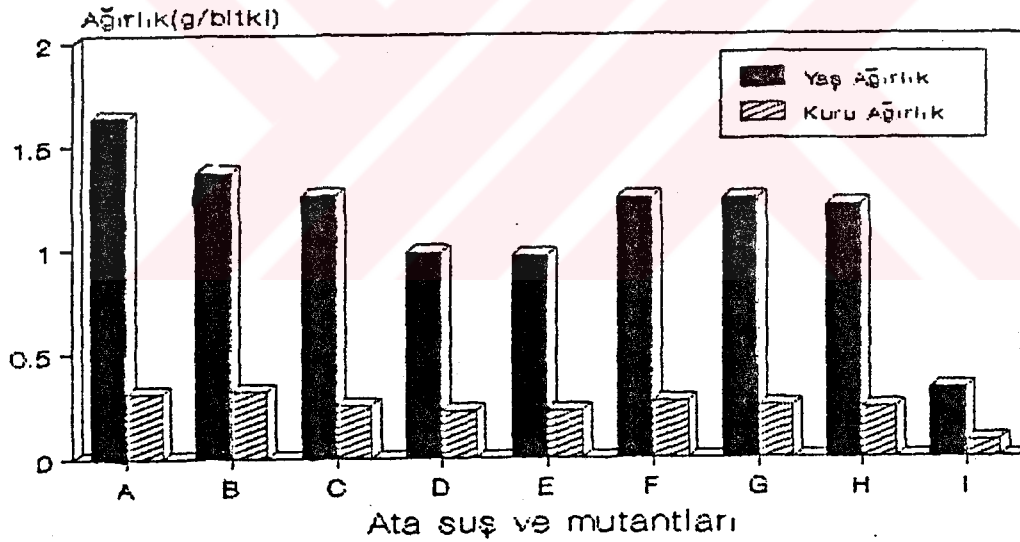
Çizelge 4.5. Ata suş ve çift antibiyotiğe dirençli mutantlar ile hazırlanan inokulantlarla yapılan sera denemesi sonucu elde edilen bitkilerin bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Ata suş ve mutantları	Yaş ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar	Kuru ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar
<u>B. japonicum</u>	x)	x)
USDA 110	1,638 a 1	0,310 ab 1
R		
STR-KAN	1,375 ab 12	0,320 a 1
R		
STR-BAC	1,260 bc 12	0,253 ab 1
R		
STR-NAL	0,987 c 2	0,225 b 1
R		
STR-SPC	0,972 c 2	0,225 b 1
R		
CHL-BAC	1.248 bc 12	0.267 ab 1
R		
CHL-NAL	1,245 bc 12	0,245 ab 1
R		
CHL-KAN	1,213 bc 12	0,240 ab 1
Kontrol (bakterisiz)	0,33 d 3	0,080 c 2

x) Harfler 0,05; rakamlar 0,01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Bitki üstü yaş ağırlıkları 1,64 ile 0,33 gram arasında değişiklik göstermektedir. Ata ve mutant suşları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan aşılama sonucunda elde edilen bitkilerin bitki üstü yaş ağırlıklarının kontrolden farkının % 1 düzeyinde önemli olduğu anlaşılmaktadır. Ata suş ile STR-KAN^R mutant suşundan elde edilen bitkilerin bitki üstü yaş ağırlıkları bakımından istatistik olarak bir fark görülmemiş olmasına karşın, diğer mutant suşlar ile elde edilen değerlere göre farkın % 5 veya % 1 düzeyinde önemli olduğu görülmektedir.

Bitki üstü kuru ağırlıklarına bakıldığında ata suş ve mutantları kullanılarak hazırlanan inokulantlarla ya-



A= B. japonicum USDA 110

B= STR-KAN^R E= STR-SPC^R H= CHL-KAN^R

C= STR-BAC^R F= CHL-BAC^R I= Kontrol

D= STR-NAL^R G= CHL-NAL

Şekil 4.5. Ata suş ve çift antibiyotiğe dirençli mutantlar ile hazırlanan inokulantlarla yapılan sera denemesi sonucu elde edilen bitkilerin bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

pılan aşlamalar sonucu elde edilen bitkilerin bitki üstü kuru ağırlıklarının kontrolden % 1 düzeyinde önemli fark gösterdikleri anlaşılmıştır.

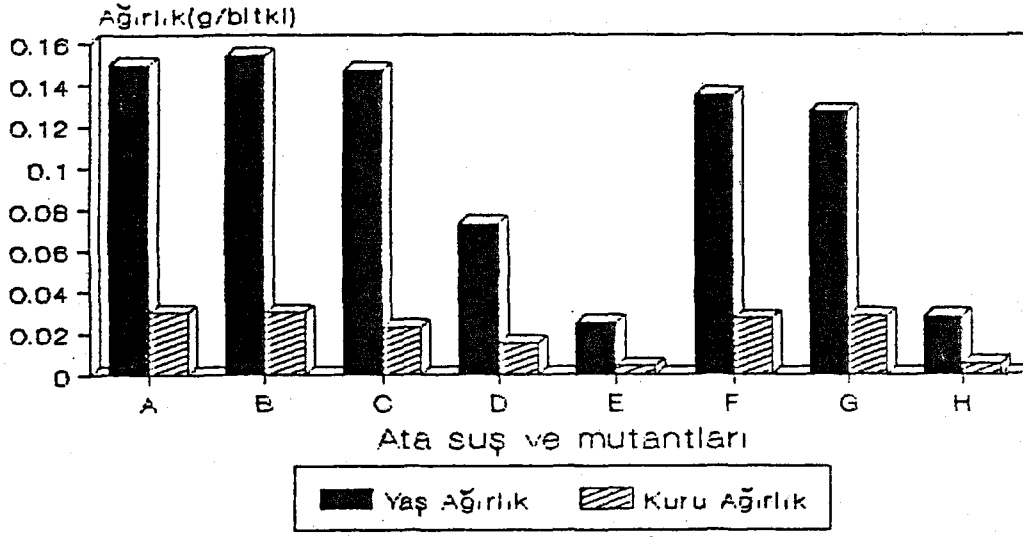
Ata suş ve mutantlarından elde edilen bitkilerin bitki üstü kuru ağırlıkları arasında % 1 düzeyinde önemli fark olmamasına karşın STR-KAN^R ve STR-SPC^R ile STR-NAL^R mutant suşları kullanıldığında elde edilen veriler arasında % 5 düzeyinde istatistiki önemde farklılık olduğu saptanmıştır.

Aynı bitkilerin köklerinden toplanan nodüllerin yaş ve kuru ağırlıkları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Ata suş ve çift antibiyotiğe dirençli mutantlar ile hazırlanan inokulantlarla yapılan sera denemesi sonucu elde edilen bitkilerdeki nodül yaş ve kuru ağırlığı (g/bitki)

Ata suş ve mutantları	Yaş ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar	x)		Kuru ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar	x)	
<u>B. japonicum</u>						
USDA 110	0,150	a	1	0,030	a	1
STR-KAN ^R	0,154	a	1	0,030	a	1
STR-BAC ^R	0,147	ab	1	0,023	b	2
STR-SPC ^R	0,073	c	2	0,015	c	3
STR-NAL ^R	0,025	d	3	0,004	d	4
CHL-KAN ^R	0,135	b	1	0,027	ab	12
CHL-BAC ^R	0,127	b	1	0,028	a	12
CHL-NAL ^R	0,028	d	3	0,005	d	4

x) Harfler 0,05; rakamlar 0,01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.



A= B. japonicum USDA 110
 B= STR-KAN^R E= STR-NAL^R H= CHL-NAL^R
 C= STR-BAC^R F= CHL-KAN^R
 D= STR-SPC^R G= CHL-BAC^R

Şekil 4.6. Ata suş ve çift antibiyotiğe dirençli mutantlar ile hazırlanan inokulantlarla yapılan sera denemesi sonucu elde edilen bitkilerdeki nodül yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Çizelgeden de anlaşılacağı üzere nodül yaş ağırlıkları bakımından ata suş ve mutantları kullanılarak elde edilen bitkilerin nodül yaş ağırlıkları arasında farklılık görülmektedir. STR-BAC^R ve STR-KAN^R mutantları kullanıldığında elde edilen bitkilerin nodül yaş ağırlıklarının ata suşa ait verilerden farklı olmadığı, buna karşın CHL-KAN^R ve CHL-BAC^R ile % 5 ve STR-SPC^R, STR-NAL^R

ve CHL-NAL^R suşları ile ise % 1 düzeyinde önemli bir azalma olduğu anlaşılmıştır.

Nodül kuru ağırlıklarını incelediğimizde ise, CHL-BAC^R, CHL-KAN^R ve STR-KAN^R mutantları kullanılarak elde edilen bitkilerin kuru ağırlıkları arasında önemli bir fark olmadığı, bu suşlardan elde edilen verilerin diğerlerinden % 1 düzeyinde farklı olduğu da anlaşılmıştır.

4.4. Tarla Denemesi Sonuçları

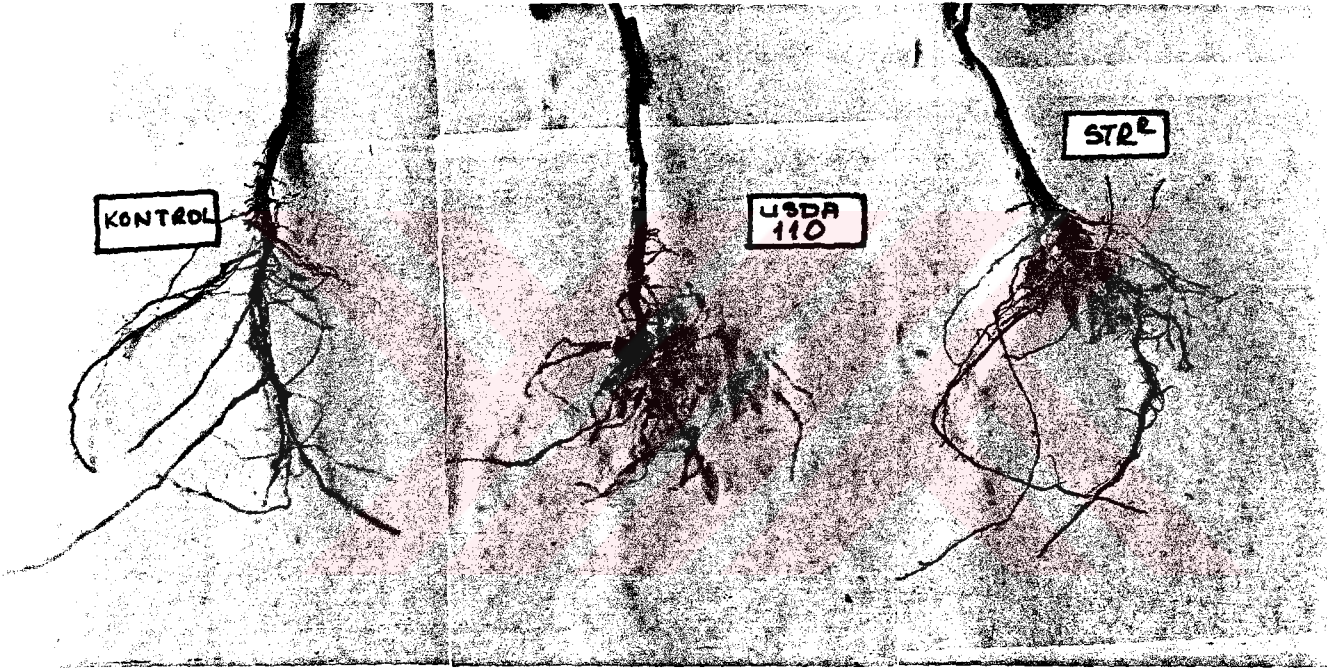
Tarla denemesi sırasında öncelikle bitkilerde nodülasyon kontrolü yapılmıştır. Aşılansmış bitkilerden alınan örneklerde nodül yaş ve kuru ağırlıkları ve bütün parsellerden alınan örneklerde ise bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları saptanmıştır. Hasat sonrası ise ürün verimi, ürünün 1000 tane ağırlığı ile yağ ve protein oranları saptanmış ve bu parametrelerden yararlanılarak yağ ve protein verimleri hesaplanmıştır.

4.4.1. Nodülasyon kontrolü, nodüllerin ve bitki üstü kısmının yaş ve kuru ağırlıkları

3.2.8'de verildiği şekilde ata suş, mutantları ve Toprak Gübre (CB 1809) inokulantları ile yapılan tarla denemesinde bitkilerin ekimden sonra 10. günde çıkışlarını tamamladıkları belirlenmiştir. Ekimin 15. gününde nodülasyon kontrolü yapılmış, ata ve STR^R mutant suşları ile aşılansan parsellerde nodülasyonun başladığı, diğer suşlarla aşılansanlarla, kontrol parsellerde henüz

nodül oluşmadığı kontrol dışındaki parsellerde nodülasyonun ancak 25. günde görüldüğü gözlenmiştir.

Bitkilerin bakla bağlama aşamasında parsellerden alınan örneklerde nodül oluşumu incelendiğinde nodüllerin kök boğazının hemen altında ve dallanan bitki köklerinin ana kökten ayrıldığı kıvrımlarda yoğunlaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.7).

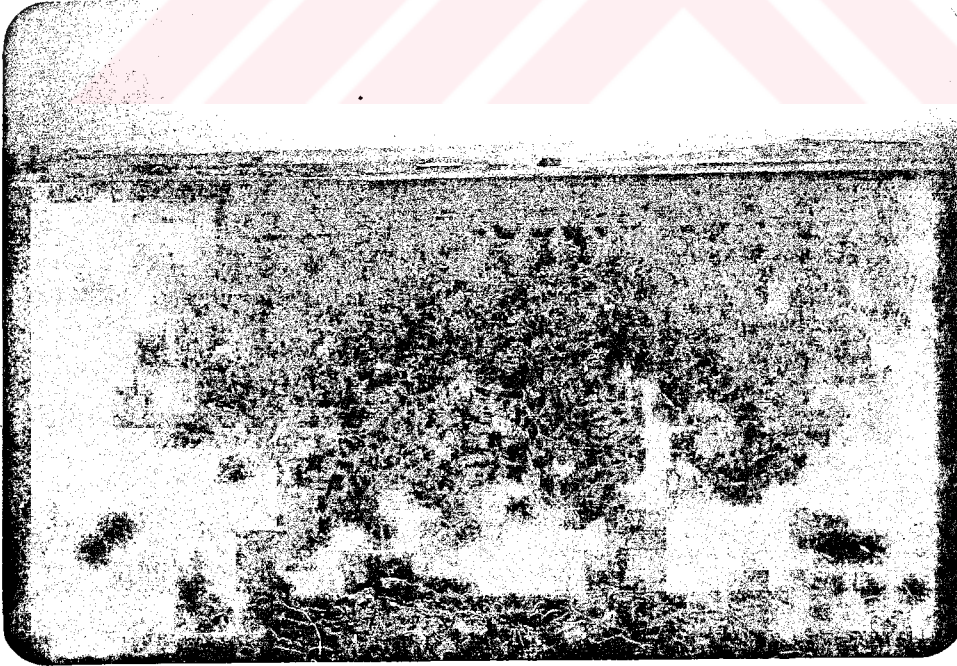


Şekil 4.7. Kontrol (bakteri ile aşılınmamış), ata ve STR^R mutant suşları ile aşılınmış bitkilerde nodülasyon durumu

Denemede çiçeklenme dönemine kadar parseller arasında önemli bir fark görülmemişse de bakla bağlama döneminde parseller arasında bitki gelişimi ve bitki boylarında belirgin farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Kontrol (bakteri ile aşılammamış), ata ve STR^R mutant suşları ile yapılan ekim sonucu elde edilen bitkiler



Şekil 4.9. STR^R mutant suşu ile aşılanan parselin genel görünüşü

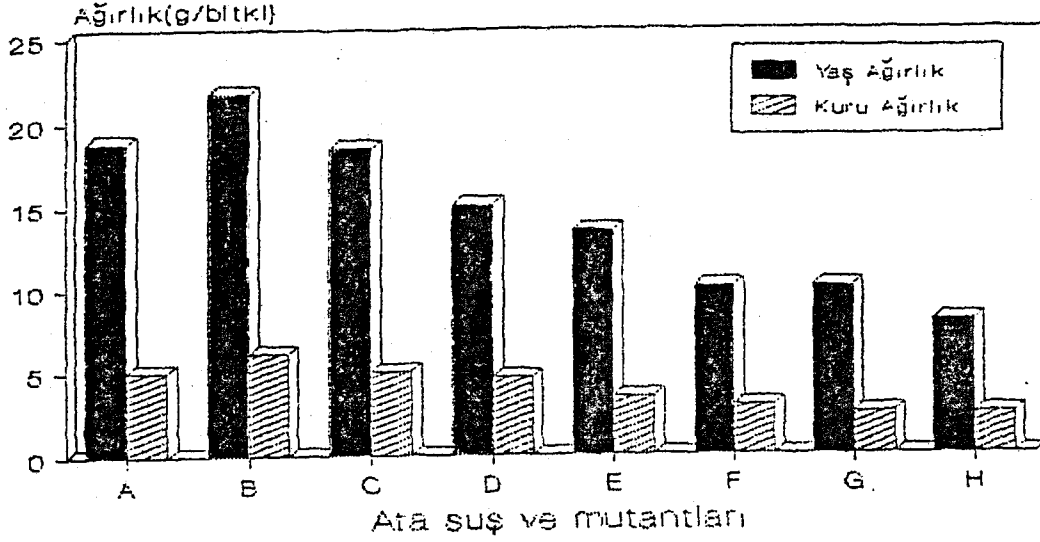
Nodülasyon kontrolü yapmak amacıyla toplanan örneklerde bitki üstü ile nodüllerin yaş ve kuru ağırlıkları da saptanmıştır. Bitki üstü kısımların yaş ve kuru ağırlıkları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelgenin incelenmesinden anlaşılacağı üzere elde edilen bitki üstü yaş ağırlıkları 8,03-21,72 gram arasında değişmektedir. En yüksek değer STR mutant suşu ile yapılan aşılama sonucu elde edilmiş olup, bunu ata suş ile yapılan aşılama sonucu elde edilen bitkilerin bitki üstü yaş ağırlığı izlemiştir. STR mutant suşu, Entite STR ve ata suş arasında istatistiki önemde bir fark olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.7. Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan tarla denemesi sonucu elde edilen bitkilerin bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Ata suş ve mutantları	Yaş ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar	x)		Kuru Ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar	x)	
<u>B. japonicum</u>						
USDA 110	18,89	ab	1	4,98	ab	12
R						
STR	21,72	a	1	6,11	a	1
R						
Entite STR	18,50	ab	1	4,99	ab	123
CB 1809	15,09	bc	12	4,62	ab	123
R						
CHL-BAC	13,47	bcd	12	3,40	bc	23
R						
STR-KAN	10,13	cd	2	2,90	c	23
R						
CHL-KAN	10,12	cd	2	2,44	c	3
Kontrol (bakterisiz)	8,03	d	2	2,39	c	3

x) Harfler 0,05; rakamlar 0,01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.



A= B. japonicum USDA 110
 R
 B= STR
 C= Entite STR
 D= CB 1809
 E= CHL-BAC
 F= STR-KAN
 G= CHL-KAN
 H= Kontrol

Şekil 4.10. Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan tarla denemesi sonucu elde edilen bitkilerin bitki üstü yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Bu 3 suşun kullanıldığı parsellerden elde edilen bitki üstü yaş ağırlıkları diğer suşların kullanıldığı parsellerden elde edilen bitki üstü yaş ağırlıklarından daha yüksek olup, bazı suşlara göre farklılıkları % 5 veya % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Bitki üstü kuru ağırlıkları bakımından yine STR mutant suşu ile yapılan aşlamalar sonucu elde edilen bitkilerde en yüksek değer saptanmıştır. Bunun ardından Entite STR^R, ata suş ve CB 1809 gelmektedir. Bitki üstü

kuru ağırlık bakımından da bu üç suş diğerlerine göre % 5 veya % 1 düzeyinde önemli farklılık göstermiştir.

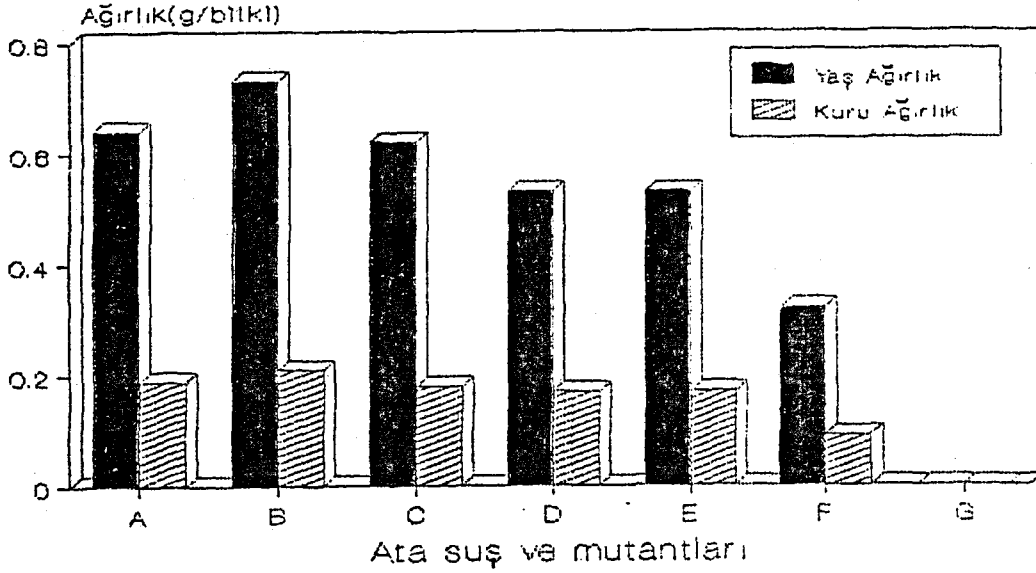
Aynı bitkilerin köklerinden toplanan nodüllerin yaş ve kuru ağırlıkları ise Çizelge 4.8 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. Buna göre, nodül yaş ağırlıkları bakımından STR^R mutant suşunun kullanıldığı bitkilerden elde edilen nodüller en yüksek değeri verirken, bunu ata suş ve Entite STR^R izlemiştir.

Nodül kuru ağırlıklarına bakıldığında da STR^R mutant suşunun en yüksek değere ulaştığı görülmektedir. Kontrol bitkilerde hiç nodülasyon görülmemiş ve inokulant kullanımının nodülasyona neden olması beklenmesine rağmen, tarla koşullarında CHL-KAN^R mutanti ile aşılanan parsellerdeki bitkilerde nodülasyon görülmemiştir. Bu sonuçlara

Çizelge 4.8. Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan tarla denemesi sonucu elde edilen bitkilerdeki nodül yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

Ata suş ve mutantları	Yaş ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar	Kuru ağırlık (g/bitki) Ortalama ve gruplar
	x)	x)
<u>B. japonicum</u>		
USDA 110	0,64 ab 1	0,19 a 1
STR ^R	0,73 a 1	0,21 a 1
Entite STR ^R	0,62 ab 1	0,18 a 1
CB 1809	0,53 b 1	0,17 a 1
CHL-BAC ^R	0,53 b 1	0,17 a 1
STR-KAN ^R	0,32 c 2	0,09 b 2
CHL-KAN ^R	0,00 d 3	0,00 c 3

x) Harfler 0,05; rakamlar 0,01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.



A= B. japonicum USDA 110^R
 B= STR^R
 C= Entite STR^R
 D= CB 1809^R
 E= CHL-BAC^R
 F= STR-KAN^R
 G= CHL-KAN^R

Şekil 4.11. Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan tarla denemesi sonucu elde edilen bitkilerin nodül yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki)

göre, STR^R mutantının nodül oluşturma gücünü kaybetmeyen ve nodül yaş ve kuru ağırlığı bakımından ata suştan fark-sız ve hatta daha üstün bir mutant olduğu anlaşılmak-tadır.

4.4.2. Tarla denemesi sonucu elde edilen ürünle yapılan analiz sonuçları

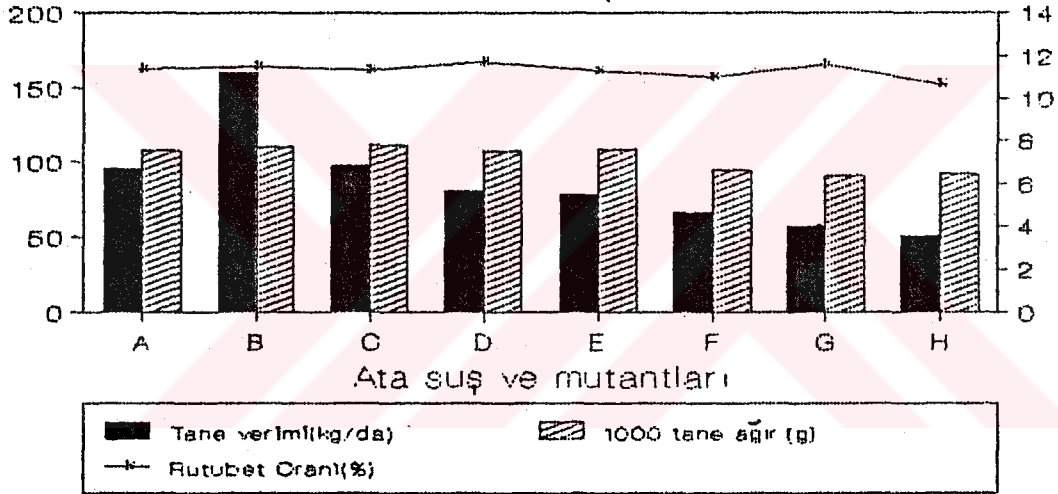
4.4.2.1. Tane verimi

Ata suş ve mutantlarıyla hazırlanan inokulantlarla aşılanmış ve kontrol parsellerden elde edilen tane verimi sonuçları Çizelge 4.9 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Çizelgenin incelenmesinden anlaşılacağı gibi ata suş ve mutantları arasında önemli fark bulunmaktadır. Araştırmada kullanılan ata ve mutant suşların tane verimi 160,47 - 57,35 kg/da arasında değişmektedir. En yüksek tane verimi STR mutant suşu ile yapılan parsellerden elde edilmiştir. Bunu, Entite firmasının ürettiği STR mutantı ve ata suş ile hazırlanan inokulantlarla yapılan parseller izlemiştir. En düşük tane verimi ise bakteri kullanılmayan kontrol parsellerden elde edilmiştir. Ata suş, CB 1809 ve CHL-BAC ile aşılanan parsellerden elde edilen ürünler arasında istatistik olarak bir fark görülmediği, aynı şekilde STR-KAN ve CHL-KAN ile aşılanan parsellerden elde edilen ürün miktarının kontrolden farklı olmadığı saptanmıştır.

4.4.2.2. 1000 tane ağırlığı

Çizelge 4.9'un incelenmesinden anlaşılacağı üzere, elde edilen ürünün 1000 tane ağırlıkları bakımından farklılık gösterdiği ve bu değerlerin 111,78-91,08 gram arasında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek 1000 tane ağırlığı, Entite STR ve STR mutant suşları ile yapılan aşı-

lamalar sonucu elde edilmiş olmakla beraber bunların ata suştan önemli bir farklılık oluşturmadığı anlaşılmıştır. STR-KAN^R ve CHL-KAN^R ile yapılan aşılama sonucu elde edilen soya tohumlarının 1000 tane ağırlıklarının kontrolden farklı olmadığı, buna karşın bunların ata suş, CB 1809, Entite STR^R, STR^R ve CHL-BAC^R ile aşılardan elde edilen 1000 tane ağırlıklarından farkının % 1 ve % 5 düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır.



A= B. japonicum USDA 110
R

B= STR

E= CB 1809

C= Entite STR^R

F= STR-KAN^R

H= Kontrol

D= CHL-BAC

G= CHL-KAN

Şekil 4.12. Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan tarla denemesi sonucu elde edilen tane verimi, 1000 tane ağırlığı ve tanedeki rutubet oranları

Çizelge 4.9. Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan tarla denemesi sonucu elde edilen tane verimi (kg/da), 1000 tane ağırlığı (g) ve tanedeki rutubet oranı (%)

Ata suş ve mutantları	Tane verimi (kg/da) Ortalama ve gruplar	1000 tane ağırlığı (g) Ortalama ve gruplar	Rutubet oranı (%) Ortalama ve gruplar
<u>B. japonicum</u> USDA 110	95,27 bc 2 x)	108,01 a 1	11,39
R STR	160,47 a 1	110,37 a 1	11,51
R Entite STR	97,91 b 2	111,78 a 1	11,35
R CHL-BAC	81,61 bcd 23	107,62 a 1	11,74
CB 1809	78,62 cd 23	108,54 a 1	11,31
R STR-KAN	67,08 de 34	94,50 b 2	11,04
R CHL-KAN	57,35 e 34	91,08 b 2	11,59
Kontrol (Bakterisiz)	50,87 e 4	92,25 b 2	10,68

x) Harfler 0,05; rakamlar 0,01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

4.4.2.3. Rutubet oranı

Çizelge 4.9'un incelenmesinden anlaşılacağı üzere, ata suş ve mutantları kullanılarak yapılan aşılama sonucunda elde edilen soyadaki rutubet miktarları arasında önemli farklılık görülmemiş ve bitkilerin yeterince kurutulduktan sonra hasat edildikleri anlaşılmıştır.

4.4.2.4. Tanede protein oranı

Protein oranları bakımından suşlar arasında önemli farklılık bulunmuştur (Çizelge 4.10). Buna göre, ata suş, CB 1809, Entite STR^R ve STR^R mutantları ile elde edilen ürünlerdeki protein oranlarının CHL-BAC^R, STR-KAN^R, CHL-KAN^R ve kontrole göre % 1 düzeyinde önemli fark gösterdiği saptanmıştır.

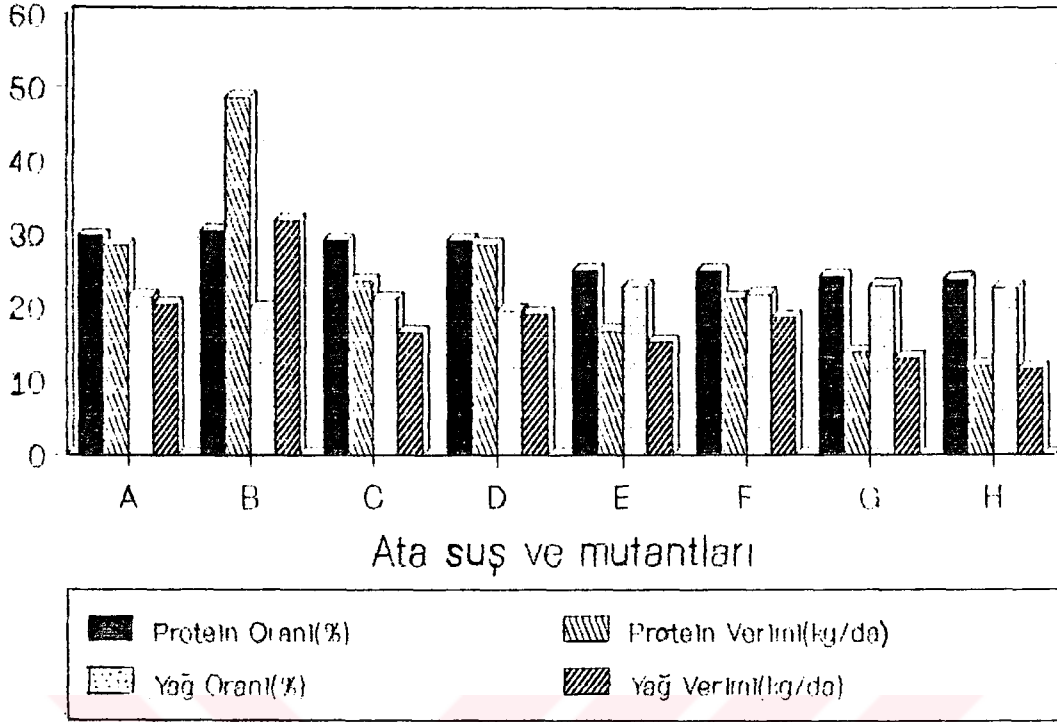
4.4.2.5. Protein verimi

Çizelge 4.10'nun incelenmesinden anlaşılacağı üzere kontrol ve ata suş ile mutantları arasında soyadaki protein verimlerinin 48,68 - 12,05 kg/da arasında değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır. En yüksek protein verimi, STR^R mutant suşu ile aşılanan parsellerden elde edilmiştir. Bunu 28,49 kg/da ile Entite STR^R suşu izlemektedir. En düşük protein verimi ise 12,05 kg/da ile kontrol parsellerden elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan tarla denemesi sonucu elde edilen tanelerin protein oranları (%), protein verimleri (kg/da) ve yağ oranları (%), yağ verimleri (kg/da)

Ata suş ve mutantları	Protein oranı (%) Ortalama ve Gruplar	Protein verimi (kg/da) Ortalama ve gruplar	Yağ oranı (%) Ortalama ve gruplar	Yağ Verimi (kg/da) Ortalama ve gruplar
<u>B. japonicum</u> USDA 110	29,71 a 1	28,38 b 2	21,43 bc 123	20,38 b 2
R STR	30,32 a 1	48,68 a 1	19,83 de 12	31,78 a 1
CB 1809	29,12 a 1	23,58 bc 23	21,05 cd 123	16,56 cd 234
R Entite STR	29,10 a 1	28,49 b 2	19,47 e 3	19,08 bc 23
R STR-KAN	25,01 b 2	16,80 de 345	22,85 ab 1	15,31 de 345
R CHL-BAC	24,95 b 2	21,19 cd 234	21,87 abc 12	18,58 bcd 23
R CHL-KAN	24,27 b 2	13,92 e 45	22,96 a 1	13,09 ef 45
Kontrol (bakterisiz)	23,78 b 2	12,05 e 5	22,84 ab 1	11,61 f 5

x) Harfler 0,05; rakamlar ise 0,01 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.



A= B. japonicum USDA 110
 B= STR^R E= CHL-BAC^R H= Kontrol
 C= Entite STR^R F= CHL-KAN^R
 D= STR-KAN^R G= CB 1809

Şekil 4.13. Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlarla yapılan tarla denemesi sonucu elde edilen yağ ve protein oranları ile yağ ve protein verimleri

4.4.2.6. Tanede yağ oranı

Ata suş ve mutantları ile yapılan aşılama sonucu elde edilen soya tohumundaki yağ oranları Çizelge 4.10 ve Şekil 4.13 de verilmiştir. Buna göre, elde edilen ürünlerdeki yağ oranları arasında önemli farklar görülmüştür. En yüksek değer CHL-KAN^R ile yapılan aşılama sonucu elde edilen soyadan bulunmuştur. CHL-BAC^R, STR-KAN^R ve kontrol parsellerden alınan soya tohumundaki

yağ oranları arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır. STR^R ve Entite STR^R suşlarından elde edilen ürünlerdeki yağ oranının diğerlerinden daha az olduğu ve bunun % 5 düzeyinde önemli olduğu anlaşılmıştır. Entite STR ile yapılan aşılama sonucu elde edilen soyadaki yağ oranının, CHL-KAN^R, CHL-BAC^R, STR^R, STR-KAN^R ve kontrolden % 1 düzeyinde önemli bir düşüş gösterdiği saptanmıştır.

4.4.2.7. Yağ verimi

Denemede elde edilen tane veriminin yağ oranı ile çarpımı sonucu birim alandaki yağ verimleri bulunmuştur (Çizelge 4.10). Soyadaki yağ veriminin 31,78 - 11,61 kg/da arasında değiştiği görülmektedir. En yüksek yağ verimi STR^R mutant suşu ile aşılanan parsellerden, en düşük yağ verimi ise kontrol parsellerden elde edilmiştir.

4.5. Antiserum Elde Edilmesi ve Jel-İmmünodiffüzyon Yöntemi İle Nodül Tanımlaması

Jel-İmmünodiffüzyon yönteminde kullanılmak üzere Somasegaran ve Hoben (1985)'in önerdiği enjeksiyon şeması kullanılmış ve B. japonicum USDA 110 ve STR^R mutantlarıyla aşılanan tavşanlardan alınan kanın antiserumlarında sırasıyla 1/100 ve 1/50 seyreltilerde aglütinasyon saptanmıştır. Bu titrasyon dereceleri Jel-immünodiffüzyon yöntemi için yeterli görülmüştür.

Tarla denemesi sırasında bitki kökünde oluşan nodüllerin STR^R mutant suşu tarafından oluşturulup oluşturulmadığı 3.2.7'de verilen yöntemle göre jel-immünodif-

füzyon testi uygulanarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre B. japonicum USDA 110 ve STR^R içeren inokulantlar ile aşılanan parsellerde oluşan nodüllerin hepsinin sadece kendilerine ait suştan elde edilen antiserumlar ile presipitasyon bandı oluşturduğu ve diğer suştan elde edilen antiserum ile herhangi bir bant oluşturmadığı saptanmıştır (Şekil 3.3).

4.6. Fermenter ve İnokulanttaki Kontaminasyon Kontrolü Sonuçları

Ata ve STR^R mutant suşları ile inokulant hazırlamak amacıyla 5 gün süre ile fermenterlerde geliştirilen kültürler gram boyama yöntemiyle kontrol edilmişlerdir. Boyama sonuçlarına göre Bradyrhizobium bakterilerinin yanında kontaminasyon bakterisi olarak daha çok gram (+) sporlu bakterilere rastlanmıştır. Antibiyotik ilave edilmeden ata suş ile aşılanan fermenterlerde kontaminantların % 50'ler düzeyinde olmasına karşın, streptomisin ilave edilen ve STR^R mutant suşunun kullanıldığı fermenterlerde yok denilecek kadar az olduğu belirlenmiştir.

Fermenterlerde üretilen ata ve STR^R mutant sıvı kültürleri ile inokulantlar elde edilerek 3.2.4'de verilen yönteme göre sıvı kültür ve olgun inokulanttaki Bradyrhizobium bakteri sayılarının yanı sıra olgun inokulanttaki kontaminant bakteriler de sayılmıştır. Çizelge 4.11'den de anlaşılacağı gibi sıvı kültür içinde ata ve STR^R mutant suşlarının 5. gün sonundaki sayıları birbirine çok yakın bulunmuştur.

Çizelge 4.11 İnokulant hazırlamak amacıyla kullanılan sıvı kültür ve olgunlaştırılmış inokulant içindeki ata ve STR^R mutant suşlarının ve olgun inokulantta bulunan kontaminantların sayısı (adet/ml)

Ata ve STR ^R mutant suşları	Sıvı kültür	Olgunlaştırılmış inokulanttaki			
		Toplam bakteri sayısı	<u>B. japonicum</u> USDA 110 sayısı	Kontaminant sayısı	Kontaminant oranı (%)
<u>B. japonicum</u> USDA 110	8 6,69x10 ⁸	8 16,23x10 ⁸	8 11,7x10 ⁸	8 4,53x10 ⁸	28
STR ^R	8 5,56x10 ⁸	8 10,30x10 ⁸	8 7,99x10 ⁸	8 2,34x10 ⁸	23

Hazırlanan inokulantların 7 gün süre ile olgunlaştırılmasının sonucunda olgun inokulanttaki ata ve STR^R mutant suşlarının hücre sayıları sırasıyla $11,7 \times 10^8$ ve $7,99 \times 10^8$ adet/ml bulunduğundan, STR^R mutantının ata suş'a göre gelişme süresinin biraz uzadığı anlaşılmıştır. Aynı inokulantlarda yapılan kontaminasyon bakterilerinin sayılarının ise ata suşla üretilen inokulantlarda $4,53 \times 10^8$ adet/ml ve STR^R mutant suşu ile elde edilenlerde ise $2,34 \times 10^8$ adet/ml olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, ata suş ile üretilen inokulantlarda % 28 oranında kontaminasyon bakterilerinin bulunmasına karşın, STR^R mutant suşu ile üretilen inokulantlarda bu oranın % 23'e azaldığı görülmüştür.

4.7. Ata ve STR^R Mutant Suşlarının Rekabet Güçleri

B. japonicum USDA 110 ve STR^R mutant suşlarının nodül oluşturma güçlerini belirlemek amacıyla 3.2.9'da

açıklandığı şekilde yapılan sera denemesi sonucunda oluşan nodüllerden YEMA ve streptomisin içeren YEMA besiyerinde gelişen koloniler aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir. Aynı bitkinin her bir nodülünden hem YEMA hem de streptomisinli YEMA besiyerine aktarımlar yapıldığında, her iki besiyerinde de gelişme gösteren kolonilerin STR mutant suşu, buna karşın streptomisin içeren YEMA besiyerinde gelişmeyip yalnızca antibiyotiksiz YEMA'da gelişebilenlerin ise ata suş (B. japonicum USDA 110) olduğu sonucuna varılmıştır. Bu deneme sonuçlarına göre, karışık olarak aşılanan bitkilerde oluşan nodüllerin % 60'ının ata suş, % 40'ının ise STR mutant suşları tarafından oluşturulduğu saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Eşit orandaki ata ve STR mutant suşları ile aşılanan bitkilerden elde edilen nodüllerin dağılımı

Bitki kökündeki nodül sayısı	<u>B. japonicum</u> USDA 110	%	R STR	%
22	12	55	10	45
31	20	65	11	35
15	9	60	6	40
16	9	56	7	44
Toplam:84	50	60	34	40

R

4.8. Ata ve STR Mutant Suşlarının Kristal Violet ve Brilliant Green Varlığında Gelişme Durumları

İnokulant üretiminde fermenterlerdeki üretim aşamasında ve steril olmayan pitten gelen kontaminant bakterilerinin gelişimlerini engellemek amacıyla antibiyotik rezistant mutantlardan yararlanmak amaçlanmış olmasına rağmen, ata suş ve antibiyotiğe dirençli mutantlardan atasal özellikleri açısından ata'ya en fazla benzeyen STR^R mutantının yukarıda verilen antimikrobiyel maddelerin varlığındaki gelişimleri incelenmiştir. 3.2.12'de açıklandığı şekilde hazırlanan ve B. japonicum USDA 110 ve STR^R mutantlarının Kristal Violet ve Brilliant Green içeren YEMA besiyerindeki gelişme durumları Çizelge 4.13'de verilmiştir.

R

Çizelge 4.13. B. japonicum USDA 110 ve STR^R mutant suşlarının Kristal Violet ve Brilliant Green içeren YEMA besiyerindeki gelişme durumları

	Kristal Violet (mg/l)					Brilliant Green (mg/l)				
	0,5	1	1,25	2,5	5	0,5	1	1,25	2,5	5
<u>B. japonicum</u> USDA 110	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
^R STR	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
<u>B. megaterium</u> B17	+++	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++

- Gelişme yok
+ Zayıf gelişme
++ İyi gelişme
+++ Çok iyi gelişme

Çizelgeden de anlaşılacağı gibi Brilliant Green içeren petrilerde her iki suş da çok iyi gelişme göstermiş, hatta kontrol amacıyla denemeye alınan B. megaterium'un da bu antimikrobiyel madde varlığında gelişmesini sürdürdüğü gözlenmiştir. Buna karşın Kristal Violet'in 5 mg/l'lik konsantrasyonunda ata suşun gelişiminde herhangi bir azalma görülmediği halde STR^R mutantının gelişimi 2,5 mg/l'de inhibe olmuştur. Gram (+) bakterilere örnek olarak alınan B. megaterium'un 1 mg/ml Kristal Violet içeren ortamda çok az bir gelişme gösterdiği ve 1,25 mg/l'de ise hiç gelişemediği saptanmıştır. Deneme sonuçlarına göre Brilliant Green'in gram (+) bir bakteri olan B. megaterium B17 suşunun gelişimini inhibe etmediği, Kristal Violetin ise bu bakterinin gelişimini kesinlikle durdurduğu anlaşılmıştır.

5. TARTIŞMA

Antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutantların izolasyonu amacıyla B. japonicum USDA 110 suşunun 5 günlük sıvı kültürü kullanılmış ve sıvıdaki sayının 1×10^8 adet/ml düzeyinde olmasına dikkat edilmiştir ki bu da Kuykendall ve Weber (1978), Kremer ve Peterson (1982) ile Elkan (1987) tarafından verilen değerlerle uyumluluk göstermektedir.

Sıvı kültür üretimi aşamasında ve pitten gelen kontaminantların sayılarının azaltılmasında antibiyotik kullanılmasının olumlu etkisi olduğunu açıklayan Jauhri ve Gupta (1989)'nın yaptıkları çalışma amacımızı desteklemektedir. Besiyerine antibiyotik ilavesinin bu avantajından ancak söz konusu antibiyotiğe dirençli mutantlar kullanılması halinde yararlanılabilir. Ne var ki bazı araştırmacılar antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutantların gelişmelerinin ata suşa göre daha yavaş olduğunu belirtmektedirler (Turco vd. 1986). Nitekim Çizelge 4.1'in incelenmesinden de, belli süre içinde tüm mutant suşların ata suşa oranla daha az sayıda geliştikleri görülmektedir. Buna rağmen özellikle STR^R mutant suşunun gelişme hızının ata suşa çok yakın olduğu ve üreme süresi bakımından inokulant üretiminde kullanılmasının bir sakınca yaratmayacağı sonucuna varılabilir.

Elde edilen antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşların ekolojik çalışmalarda kullanılması için ata

suşun özelliklerini taşıması ve hatta daha üstün özelliklere sahip olması istenir (Bushby 1982, Elkan 1987). Elde edilen mutant suşların söz konusu özelliklerini belirlemek amacıyla başvurulan yöntemlerden biri de bitkilerin sera koşullarında yetiştirildikten sonra nodülasyon yetenekleri ve azot fiksasyon güçlerini belirlemektir. Bu amaçla yetiştirilen bitkilerin bitki üstü kısmı ile nodül ağırlıkları efektiflik derecesini belirlemede kullanılmaktadır (Gollobin ve Levin 1974, Levin ve Montgomery 1974, Maier ve Brill 1978, Haktanır 1979). Buna göre, denemizde de söz konusu parametreler tespit edilmiş ve bitki üstü ağırlığı ile nodül ağırlıkları arasında bir korelasyon bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5).

Sıvı kültürde üretilen bakteri sayıları ile (Çizelge 4.1) bu bakterilerle aşılanan bitkilerin bitki üstü ve nodül ağırlıkları kıyaslandığında (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3) sayı ile ağırlık arasında bir korelasyon olduğu görülmektedir. Şöyle ki; ata suşun ve STR mutantının sıvı kültürdeki sayıları birbirine yakın derecede yüksek bulunmuş ve bunların bitki üstü kuru ağırlıkları ve nodül kuru ağırlıkları arasında istatistikî bakımdan önemli bir fark saptanmamıştır. Diğer suşların sıvı kültürdeki sayıları bu iki suştan daha düşük olarak saptanmış olup, bu düşüşe paralel olarak bitki üstü kuru ağırlığı ve nodül kuru ağırlıkları da aynı oranlarda azalmıştır.

Çift antibiyotikle markalanmış suşlarla yürütülen sera denemelerinde aşılama inokulant ile yapılmıştır.

İnokulantta damla kültürü yöntemi ile saptanan sayılar (Çizelge 4.4) bitki üstü ve nodül ağırlıklarıyla (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6) kıyaslandığında sayı ile ağırlık arasında belirgin bir korelasyon saptanmamakla beraber, genelde sayı artışı ile ağırlığın da arttığı söylenebilir.

Tek antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlarla yapılan deneme sonuçları incelendiğinde bitki üstü yaş ağırlığı bakımından ata suşa ait verilerin kontrol ve mutant suşlarla elde edilenlerden istatistiki olarak önemli farkı olduğu saptanmıştır. Mutant suşların kendi aralarında önemli bir farklılık görülmemiştir. Bitki üstü kuru ağırlığı verileri incelendiğinde (Çizelge 4.2) ata suş ve STR^R mutantının kullanıldığı bitkilerin bitki üstü kuru ağırlıklarının kontrol ve diğer mutantlardan önemli farklılık gösterdiği, STR^R mutantının istatistiki olarak ata suştan farklı olmadığı görülmüştür. Buna göre, efektiflik kıstası olarak alınan bitki üstü kuru ağırlığı bakımından STR^R mutantının ata suş'un özelliklerini taşıdığı ve mutasyon sonucu bu bakımdan herhangi bir kayıp olmadığı anlaşılmıştır. Streptomisine rezistanslık gösteren mutantların efektifliklerini kaybetmedikleri Schwinghamer (1964, 1967), Levin ve Montgomery (1974) ve Pankhurst (1977) tarafından da ifade edilmiş, buna karşın diğer antibiyotiklerle elde edilmiş olan mutant suşların % 20 - 100 arasında efektifliklerini kaybettikleri ileri sürülmüştür. Buna göre söz konusu araştırmacıların sonuçları ile bulgularımız arasında önemli benzerlikler görülmektedir. Bitki üstü ağırlığı bakımından

yapılan bu değerlendirme nodül ağırlıkları bakımından da yapıldığında benzeri sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, denememizde elde edilen sonuçlar yine Schwinghamer (1964, 1967), Pankhurst (1977)'nun bulguları ile uyumludur.

Çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlarla hazırlanan inokulantlar içindeki canlı hücre sayıları incelendiğinde (Çizelge 4.4) ata suşun yine en yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. İyi bir inokulantta öngörülen sayının 1×10^8 adet/gr olması gerektiği (Anonymous 1984b), başarılı bir nodülasyon için her bir 10^5 tohuma isabet edecek canlı Rhizobium sayısının da 10^5 adet olması gerektiği kesin görüldüğüne göre (Freire 1977) denememizde kullanılan inokulantlardaki canlı Rhizobium sayılarının standartlara uygun oldukları anlaşılmaktadır.

Çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşların simbiyotik efektifliğini belirlemek için yapılan sera denemesinde yine aynı parametreler irdelenmiştir. Buna göre, bitki üstü ağırlıkları bakımından ata suş ve mutantları ile aşılanan bitkilerden elde edilen verilerin, bakteri kullanılmayan (kontrol) bitkilerin bitki üstü ağırlıklarından önemli farklılık gösterdikleri, buna karşın mutantların ata suşa göre önemli farklılık göstermedikleri ve bu değerlere göre çift antibiyotiğe dirençlilik gösteren mutant suşlarda herhangi bir efektiflik kaybı olmadığı anlaşılmıştır.

Nodül ağırlıkları bakımından ata suş ve mutantları arasında farklılık olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6). STR-NAL^R, STR-SPC^R ve CHL-NAL^R kullanılarak elde edilen verilerin ata suşdan önemli düzeyde düşük değerler gösterdiği görülmektedir. Kimi antibiyotik rezistant mutant suşların efektiflik bakımından ata suş gibi davrandığı, kiminin ise bu özelliğini büyük ölçüde kaybettiği görülmektedir. Bu ise Turco vd. (1986)'nin sonuçları ile büyük ölçüde uyum gösterirken, Levin ve Montgomery (1974)'nin bulguları ile kısmen uyumludur.

Ata suş ve mutantları ile hazırlanan inokulantlar kullanılarak kurulan tarla denemesi sonuçlarına göre bitki üstü ağırlığı, nodül ağırlığı, tane verimi, protein ve yağ verimleri bakımından suşlar arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. STR^R mutant suşu ve ata suşun kullanıldığı parsellerdeki vejetatif bitki gelişimi belirgin bir şekilde üstün olmuş, bu husus söz konusu parametrelere de aynen yansımıştır. Buna göre, bitki üstü ağırlığı bakımından ata suş ve iki farklı STR^R inokulantı ile aşılardan parsellerden elde edilen bitkilerin bitki üstü yağ ağırlıklarının farkının diğer tüm parsellerde yetiştirilen bitkilerinkinden önemli derecede yüksek olması ve bu olgunun diğer parametreler için de geçerli olması STR^R mutantının efektifliğinin en az ata suş kadar yüksek olduğunu göstermektedir. Diğer yandan STR^R mutant suşu ile laboratuvar koşullarında hazırlanan inokulant kullanılmasıyla elde edilen bitkilerin tane, yağ ve protein verimlerinin farkının tüm diğer işlemlerden % 1 düzeyinde

önemli olması, mutant elde edilmesi sırasında bu suşa efektiflik bakımından olumlu bir özellik kazandırıldığını göstermektedir. Maier ve Brill (1978), Srivastava vd. (1980) ve Hale (1982) yaptıkları sera denemelerinde elde ettikleri mutant suşların ata suşa oranla ölçülen parametrelerde daha yüksek değerler verdiğini saptamışlardır. Buna karşın Schwinghamer (1967), Gollobin ve Levin (1974), Levin ve Montgomery (1974), Pankhurst (1977), Haktanır (1979) ve Amarger (1981) elde ettikleri mutantlar ile ata suşlar arasında nodülasyon yetenekleri ve efektiflik bakımından bir farklılık bulunmadığını ortaya koymuşlardır. Diğer yandan Turco vd. (1986) ile Lewis vd. (1987a) mutant suşların bu iki parametre bakımından ata suşlardan daha zayıf olduklarını saptamışlardır.

Ankara yöresinde yapılan çalışmalarda soya verimi, çeşit ve çevre koşullarına göre değişiklik göstermekte olup Dik (1986) 123,96 - 332,54 kg/da, Deniz (1988) 128,44 - 266,84 kg/da ve Gürgün (1988) 171 kg/da'lık bir tane verimi saptamışlardır. Denememizde en yüksek verim ^RSTR mutant suşu ile hazırlanan inokulantlarla yapılan aşılama sonucu elde edilmiş olup 160,47 kg/da'dır. Buna göre elde edilen tane verimi diğer araştırmacıların elde ettikleri tane verimi ile uyumlu olmakla beraber denemede kullanılan AP 240 Tekfen çeşidinin Ankara koşullarına çok uygun olmadığı anlaşılmaktadır. Ancak deneme sırasında sadece bu çeşit bulunabildiği için deneme AP 240 Tekfen ile kurulmak zorunda kalmıştır.

Tanelerin içerdığı protein oranıyla tane veriminin çarpılmasından elde edilen protein verimleri incelendiğinde (Çizelge 4.10) STR^R mutant suşunun kullanıldığı inokulantlarla yapılan aşılama sonucunda elde edilen protein verimi, tane veriminde olduğu gibi en yüksek değerde bulunmuştur. Aynı suşla yapılan aşılama sonucunda elde edilen tane verimindeki artışa karşın, yağ oranı düşmüş, protein oranı artmıştır. Bu ise azot fiksasyonu sonucu protein oranının artması ile açıklanabilir ki elde edilen sonuçlar Gürgün (1988)'ün bulgularıyla uyumludur.

Yağ oranı, verimi yüksek parsellerden elde edilen tanelerde düşük olmakla beraber, yağ verimi incelendiğinde tane verimi yüksek olduğu için bu parametre de söz konusu parsellerde yüksek çıkmıştır (Çizelge 4.10). Bu sonuçlar da Gürgün (1988)'ün sonuçları ile uyumludur.

Ata suşun ardından ata suşun özelliklerine en yakın olarak ikinci sırada yer alan STR^R mutant suşu ile hazırlanan inokulantla aşılama sonucunda elde edilen bitkilerin köklerinde oluşan nodüllerin serolojik olarak kontrolleri yapılmış ve bunların kullanılan STR^R mutant suşu tarafından oluşturulduğu, jel-immünodiffüzyon plaklarında görülen presipitasyon bantları ile doğrulanmıştır (Şekil 3.3.)

Damla kültür yöntemi ile fermenter ve inokulant içinde saptanan kontaminant bakteri sayılarının, STR^R mutant suşu ile üretilen inokulantlarda ata suş ile üretilenlerin yarısı kadar olduğu saptanmıştır (Çizelge

4.11). Bu bulgular Jauhri ve Gupta (1989) nın bulguları ile kısmen uyum içinde olup, kontaminantların baskılanması için araştırıcılar 16000 ppm streptomisine gereksinim duyarlarken, araştırmamızda 2000 ppm streptomisin yeterli olmuştur.

^R STR mutant suşunun nodül oluşturma gúçlerini belirlemek amacıyla yapılan sera denemesinde, ata suş ile ^R STR mutantının 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmasıyla bitki kóoklerinde oluşan nodúllerin % 60'nın ata suş, % 40'nın ise ^R STR mutantı tarafından oluşturulduğu saptanmıştır. Turco vd. (1986) mutant suşlarla ata suşun karıştırılması sonucu oluşan nodúllerin Rhizobium cinsine ve antibiyotik çeşidine bağlı olmaksızın yarı yarıya nodül oluşturduklarını saptamış, bu ise araştırmamızda elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

İnokulant üretimi için fermenterlerdeki üretim aşamasında ve steril olmayan pitle karıştırıldıktan sonra gelebilecek olan kontaminant bakterilerinin gelişimlerini engellemek amacıyla Kristal Violet ve Brilliant Green boyaları kullanılmıştır. Çizelge 4.13'ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi Kristal Violet boyasının 1,25 mg/l'lik konsantrasyonu B. megaterium bakterisinin gelişmesine engel olurken, Brilliant Green'in 5 mg/l'lik konsantrasyonda bile hiç bir etkisi görülmemiştir. Kristal Violet ile elde edilen sonuçlar Pattison ve Skinner (1974)'in araştırma bulguları ile uyumlu olduğu halde, Brilliant Green ile elde edilen sonuçlar uyumlu olmuştur.

KAYNAKLAR

AMARGER, N., 1981. Competition For Nodule Formation Between Effective And Ineffective Strains Of Rhizobium meliloti. Soil Biol. Biochem. 13: 475-480.

ANONYMOUS, 1979. International Network Of Legume Inoculation Trials. NIFTAL Project; University Of Hawaii: 19 p.

ANONYMOUS, 1984a. Legume Inoculants And Their Use. A Pocket Manual, Jointly Prepared By NIFTAL Project. Food and Agriculture Organization Of The United Nations, Rome: 63 p.

ANONYMOUS, 1984b. TS 4109. Mikrobiyel Gbreler Nodozite Bakteri Kltrleri (MBK). 15 s.

ANTOUN, H., BORDELEAU, L.M. ve PREVOST, D., 1982. Strain Identification In Rhizobium meliloti Using The Antibiotic Disk Susceptibility test. Plant and Soil. 66: 45-50.

BEYNON, J.L. ve JOSEY, D.P., 1980. Demonstration Of Heterogeneity In A Natural Population Of Rhizobium phaseoli Using Variation In Intrinsic Antibiotic Resistance J.Gen. Micr. 148: 437-442.

- BROCKWELL, J. SCHWINGHAMER, E.A. ve GAULT, R.R., (1977). Ecological Studies of Root-nodule Bacteria Introduced Into Field Environments-V. A Critical Examination Of The Stability Of Antigenic And Streptomycin-Resistance Markers For Identification Of Strains Of Rhizobium trifoli. Soil Biol. Biochem 9: 19-24.
- BUSHBY, H.V.A., 1982. Direct Quantitative Recovery of Rhizobium From Soil And Rhizosphere. Nitrogen Fixation In Legumes. Academic Press, Avustralya: 288 p.
- BREMNER, J.M., 1965. Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical And Microbiological Properties. Ed. C.A. Black. Amer. Soc. of Agron. Inc. Pub. Agron. Series No: 9. Madison, Wisconsin, U.S.A.
- COLE, M.A ve ELKAN, G.H., 1979. Multiple Antibiotic Resistance In Rhizobium japonicum. Appl. Env. Micr. 37 (5): 867-870.
- ÇAKMAKCI, M.L., 1987. Biyolojik Azot Tespiti ve Ekolojik Araştırma Yöntemleri. Tübitak-Tarmik Ünitesi Yayın No: 2, 57 s.
- DANSO, S.K.A. ve Alexander, M., 1973. Estimating The Density Of Individual Bacterial Populations Introduced Into Field Ecosystems. Can. J. Microbiol. 19: 1450-1451.

- DAVIS, R.J., 1962. Resistance Of Rhizobia To Antimicrobial Agents. J. Bacteriol. 84: 187-188.
- DEMİRDÖĞEN, H.F., 1988. Inokulant Üretiminde Kullanılan Kalite Kontrol Kriterlerinin İrdelenmesi ve Ülkemiz İçin Model Kriterin Belirlenmesi. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi: 32 s.
- DENİZ, N., 1988. Ankara Yöresinde Sulu Koşullarda Yetiştirilebilecek Soya Çeşitleri. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Yayın No. 148. Ankara. 45 s.
- DIATLOF, A., 1977. Ecological Studies Of Root-Nodule Bacteria Introduced Into Field Environments-6. Antigenic And Symbiotic Stability In Lotonis Rhizobia Over A 12-Year Period. Soil Biol. Biochem. 9: 85-88.
- DİK, S., 1986. Değişik Soya Çeşitlerinde Bakla Bağlama Yüksekliği ve Verimin Karşılaştırılması. A.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi: 46 s.
- DÜZGÜNEŞ, O., 1963. Bilimsel Araştırmalarda İstatistik Prensipleri ve Metodları. İzmir, 375 s.
- EAGLESHAM, A.R.J., AHMAD, M.M., HASSOUNA, S. ve GOLDMAN, B.J., 1982. Cowpea Rhizobia Producing Dark Nodules: Use in Competition Studies. Appl. Env. Mıcr. 41(3): 611-618.

EAGLESHAM, A.R.J., 1987. The Use of Antibiotic Resistance for Rhizobium Study. Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker Inc. New York, 440 p.

ELKAN, G.H., 1987. Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker, Inc. New York, 440 p.

FREIRE, J.R., 1977. Inoculation of Soybeans. Exploiting The Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture, Proceedings of A Workshop, Held at Kahului, Maui Hawaii. 469 p.

GOLLOBIN, G.S. ve LEVIN, R.A., 1974. Streptomycin Resistance In Rhizobium japonicum. Arch. Microbiol. 101: 83-90.

GÜRGÜN, V., 1978. Bazı Nohut Rhizobium Suşlarının Kültürel Karakterleri İle Azot Tesbit ve Rekabet Etme Güçlerinin Saptanması Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Ziraat Mikrobiyolojisi Kürsüsü. Doçentlik Tezi:97 s.

GÜRGÜN, V., 1988. Bakteri Aşılması ve Değişik Azot Dozlarının Soyada (Glycine max. (L) Merril) Tane Verimi İle Tanenin Yağ ve Protein Kapsamı Üzerine Etkileri. A.Ü.Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1071, Bilimsel Araştırma ve İnceleme, 574: 22 s.

GÜRGÜN, V. ve HALKMAN, A.K., 1988. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri Gıda Teknolojisi Yayın No: 7, 146 s.

HAKTANIR, K., 1979. Bazı Rhizobium leguminosarum Suş'larının Etkenlik Derecelerinin ve Etkenliği Yüksek Yerli Suşlar İle Yabancı Suşların (Jensen Besin Çözeltisinde ve Bazı Büyük Toprak Grupları Kullanılarak) Nodülasyon Rekabet Yeteneklerinin Saptanması. A.Ü.Z.F. Doçentlik Tezi. 199 s.

HAHN, D., 1990. 16 Sr RNA As Molecular Marker In Ecology of Frankia. Holland. PhD Thesis 126 p.

HALE, C.N., 1982. Methods Of White Clover Inoculation. Their Effect On Competition For Nodule Formation Between Neutralised And Inoculated Strains Of Rhizobium trifolii. N.Z.J. Exp.Agric. 9(2): 169-172.

JAUHRI, K.S. ve GUPTA, M., 1989. Antimicrobial Agents To Suppress Contaminants In Carrier-Based Rhizobial Inoculants. Zentralbl. Mikrobiol. 144 (5): 331-335.

JENKINS, M.B. ve BOTTOMLEY, P.J., 1985. Composition And Field Distribution of The Population of Rhizobium meliloti In Root Nodules Of Uninoculated Field-Grown Alfalfa. Soil Biol. Biochem. 17(2): 173-179.

JOSEY, O.P., BEYNON, J.L., JOHNSTON, A.W.B. ve BERINGER J.E., 1979. Strain Identification In Rhizobium Using Intrinsic Antibiotic Resistance. J. Appl. Bact. 46: 343-350.

- KINGSLEY, M.T. ve BOHLOL, B.B., 1983. Characterization of Rhizobium spp. (Cicer arietinum L.) by immunofluorescence, immunodiffusion, and intrinsic antibiotic resistance. *Can. J. Microbiol.* 29: 518-526.
- KNEEN, B.E. ve LARUE, T.A., 1983. Congo Red Absorption by Rhizobium leguminosarum *Appl. Env. Micr.* 45: 340.
- KREMER, R.J. ve PETERSON, H.L., 1982. Nodulation Efficiency Of Legume Inoculation As Determined by Intrinsic Antibiotic Resistance. *Appl. Env. Micr.* 43 (3): 636-642.
- KUYKENDALL, L.D. ve ELKAN, G.H., 1976. Rhizobium Derivatives Differing in Nitrogen-fixing Efficiency and Carbohydrate Utilization. *Appl. Env. Micr.* 32(4): 511-519.
- KUYKENDALL, L.D. ve WEBER, D.F., 1978. Genetically Marked Identifiable as Inoculum Strain in Nodules of Soybean Plants Grown in Fields Populated with Rhizobium japonicum. *Appl. Env. Micr.* 36 (6): 915-919.
- KUYKENDALL, L.D., DEVINE, T.E. ve CREGAN, P. B., 1982. Positive Role of Nodulation on the Establishment of Rhizobium japonicum in Subsequent Crops of Soybean. *Current Microbiology.* 7: 79-81.
- KUYKENDALL, L.D., 1987. Isolation And Identification of Genetically Marked Strains Of Nitrogen-Fixing Microsymbionts Of Soybeans. *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology.* Marcel Dekker, Inc. New York, 440 p.

- KUYKENDALL, L.D., 1989. Influence Of Glycine Max. Nodulation on The Persistence In Soil Of A Genetically Marked Bradyrhizobium japonicum Strain. Plant and Soil 116: 275-277.
- LEVIN, R.A. ve MONTGOMERY, M.P., 1974. Symbiotic Effectiveness Of Rhizobium japonicum. Plant and Soil. 41: 669-676.
- LEWIS, D.M., BROMFIELD, E.S.P. ve BARRAN, L.R., 1987(a). Rifampin Resistance And Nodulating Competitiveness in Rhizobium meliloti. Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Current Plant Science And Biotechnology in Agriculture. Eds. D.P.S. Verma, N.Brisson, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 338 p.
- LEWIS, D.M., BROMFIELD, E.S.P ve BARRAN, L.R., 1987(b). Effect Of Rifampin Resistance On Nodulating Competitiveness Of Rhizobium meliloti. Can. J.Microbiol. 33: 343-345.
- LIE, T.A., PIJNENBORG, J. ve TIMMERMANS, P.C.J.M., 1988(a). Analysis Of The Host Genes Controlling The Legume. Rhizobium Symbiosis: Some Technical Problems and Pitfalls. Developments In Plant And Soil Sciences. Nitrogen Fixation By Legumes In Mediterranean Agriculture. Martinus Nijhoff Publishers, Boston.

LIE, T.A., DUONG, T.P., HOWERS, A., HIEP, H.N., PIJNENBORG, J., ve Van KAPPELLEVEEN, A. 1988(b). Biological Nitrogen Fixation In Acid-Sulphate Soils. International Symposium on Application of Biotechnology For Small Industries Development In Developing Countries. Bangkok.

LINDSTRÖM, K., LIPSANEN, P. ve KAIJALAINEN, S., 1990. Stability of Markers for Identification of Two Rhizobium galegae Inoculant Strains After Five Years In The Field. Appl. Env. Micr. 56(2): 444-450.

MAHLER, R.L. ve BEZDICEK, D.F., (1978). Diversity of Rhizobium leguminosarum In The Palouse of Eastern Washington. Appl. Env. Micr. 36: 780-782.

MAIER, R.J. ve BRILL, W.J., 1978. Mutant Strains Of Rhizobium japonicum With Increased Ability To Fix Nitrogen For Soybean. Science. 201: 448-449.

MATHIS, J.N., ISRAEL, D.W., BARBOUR, W.M., JARVIS, B.D.W. ve ELKAN, G.H., 1986(a). Analysis of the Symbiotic Performance of Bradyrhizobium japonicum USDA 110 and Its Derivative I-110 and Discovery of a New Mannitol Utilizing, Nitrogen Fixing USDA 110 Derivative. Appl. Env. Micr. 52(1): 75-80.

MATHIS, J.N., BARBOUR, W.M., MILLER T.B., ISRAEL, D.W. ve ELKAN, G.M., 1986(b). Characterization of a Mannitol Utilizing, Nitrogen-Fixing Bradyrhizobium japonicum USDA 110 Derivative. Appl. Env. Micr. 52: 81-85.

McLOUGHLIN, T.J., MERLO A.O. ve JOHANSEN, E., 1987. A Method For Isolating Competition Defective Mutants In Rhizobium. Molecular Genetics Of Plant-Microbe Interactions. Current Plant Science and Biotechnology In Agriculture. Martinus Nijhoff Publishers. Boston. 338 p.

MILLER, K.J., GORE, R.S., JOHNSON, R., BENESI, A.J. ve REINHOLD V.N., 1990. Cell-Associated Oligosaccharides of Bradyrhizobium spp. J.Bact. 172(1): 136-142.

MULLER, M.D. ve WOLLUM II³, A.G., 1989. Variation Among Different Cultures of Bradyrhizobium japonicum strains USDA 110 and 122. Can. J. Microbiol. 35: 583-588.

PANKHURST, C.E., 1977. Symbiotic Effectiveness of Antibiotic-Resistant Mutants Of Fast-and Slow Growing Strains Of Rhizobium Nodulating Lotus Species. Can. J. Microbiol. 23: 1026-1033.

PATTISON, A.C. ve SKINNER, F.A., 1974. The Effects Of Antimicrobial Substances on Rhizobium spp. And Their Use In Selective Media. J. Appl. Bact. 37: 239-250.

PIJNENBORG, J., 1990. Biological Nitrogen Fixation by Lucerne (Medicago sativa L.) In Acid Soils. Holland PhD Thesis 122 p.

RAFIQUE UDDIN, M., Mc LAUGHLIN, W. ve AHMAD, M.H., 1984.
Competition Between Inoculum and Native Rhizobia for
Nodulation of Cowpea (Vigna unguiculata (L) Walp):
Use of a dark-nodule strain. Plant and Soil. 81:305-
307.

ROUGHLY, R.J.1970. The Preparation And Use Of Legume
Seeds Inoculants. Plant and Soil, 32: 675-701.

ROUGHLEY, R.J., 1988. Legume Inoculants; Their Technology
and Application. Developments In Plant And Soil
Sciences Nitrogen Fixation By Legumes In Mediterra-
nean Agriculture. Martinus Nijhoff Publishers Boston.

RUPELA, O.P. JOSEY, D.P., TOOMSAN, B., MITTAL, S., DART,
P.J. ve THOMSON, J.A. 1981. Application Of Inherent
Antibiotic Resistance To Ecological Studies Of
Rhizobia. Biological Nitrogen Fixation Technology
For Tropical Agriculture. Centro Internacional de
Agricultura Tropical, Colombia. 726 p.

SCHWINGHAMER, E.A., 1964. Association Between Antibiotic
Resistance And Ineffectiveness In Mutant Strains Of
Rhizobium spp. Can. J. Microbiol. 10: 221-233.

SCHWINGHAMER, E.A., 1967. Effectiveness Of Rhizobium As
Modifed By Mutation For Resistance To Antibiotics.
Antonie van Leeuwenhoek. 33: 121-1376.

SCHWINGHAMER, E.A ve DUDMAN, W.F., 1973. Evaluation Of
Spectinomycin Resistance As A Marker For Ecological
Studies With Rhizobium Spp. J. Appl. Bact. 36:263-272.

- SINCLAIR, M.J. ve EAGLESHAM, A.R.J., 1984. Intrinsic Antibiotic Resistance in Relation to Colony Morphology in Three Populations of West African Cowpea Rhizobia. *Soil. Biol. Biochem.*, 16 (3): 247-251.
- SOMASEGARAN, P. ve HOBEN, H.J., 1985. Methods In Legume-Rhizobium Technology. University Of Hawaii NIFTAL Project And MIRCEN Department Of Agronomy And Soil Science Hawaii. Institute Of Tropical Agriculture And Human Resources College Of Tropical Agriculture And Human Resources. 367 p.
- SRIVASTAVA, J.S., SINGH, B.D., SINGH, B.D.V.P, SINGTA, R.P., SINGM, R.M., 1980. Use Of Streptomisin Resistance And Phage Senvitiy As Markers In Competition Studies With Rhizobium leguminosarum. *Indian J.Exp. Biol.* 18 (10): 1171-1173.
- STIEFEL, E.I., 1977. The Mechanism Of Nitrogen Fixation. Recent Developments In Nitrogen Fixation. Academic Press, London, 622 p.
- STOWERS, M.D. ve EAGLESHAM, A.R.J., 1984. Physiological And Symbiotic Characteristics Of Fast-Growing Rhizobium japonicum. *Plant and Soil* 77: 3-14.
- TURCO, R.F., MOORMAN, T.B., ve BEZDICEK, D.F., 1986. Effectiveness And Competitiveness Of Spontaneous Antibiotic-Resistant Mutants Of Rhizobium leguminosarum And Rhizobium japonicum. *Soil.Biol. Biochem.* 18 (3): 259-262.

VINCENT, J.M., 1970. A Manual For the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook No: 15. 7 Marylebone Road, London NW. 277 p.

WINARNO, R. ve LIE, T.A., 1979. Competition Between Rhizobia Strains In Nodule Formation: Interaction Between Nodulating And Non-Nodulating Strains. Plant and Soil. 51: 135-149.

Yükseköğ