

Tarımda Mikroorganizmaların Etkin Kullanımı; Mikrobiyal Tüm Genom Temelli Yaklaşımlar

Asiye Esra EREN EROĞLU¹, İhsan YAŞA^{2*}

¹Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir; ORCID: 0000-0003-2096-4635

²Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir; ORCID: 0000-0002-0477-1377

Gönderilme Tarihi: 16 Eylül 2024

Kabul Tarihi: 11 Aralık 2024

ÖZ

Artan nüfus, şehirleşme, iklim değişikliği ve mahsul üretimi üzerindeki baskı, ekosistemin uzun vadeli sürdürülebilirliğini ve işleyişini tehdit etmektedir. Bu bağlamda, biyoçeşitliliğin ve genetik kaynakların korunması, yeşil sürdürülebilir tarım stratejilerinin önemli bir iş planını oluşturmaktadır. Bitki ile ilişkili mikroorganizmalar üzerine yapılan genom tabanlı araştırmalar hem bitki patojenleri hem de bitki gelişimini destekleyici bakterilerin (PGPB) tarımda kullanımını konusundaki bilgi birikimimizi büyük ölçüde geliştirmiştir. Mikroorganizmaların doğal ortamlardaki bazı gen ifadeleri standart laboratuvar koşullarında kültüre edildiklerinde, doğal tetikleyicilerin veya stres sinyallerinin yokluğundan dolayı baskılanabilmektedir. Bu çalışmada, sürdürülebilir tarımda bitki ile ilişkili mikrobiyom çeşitliliğinin ve işlevsel öneminin anlaşılmasında genomik yaklaşımların sunduğu fırsatlar ele alınmıştır. Bakteriye suşların primer ve sekonder metabolitler için tam biyosentetik kapasitesi, yani doğrudan ve dolaylı PGPB mekanizmaları için anahtar belirteçler, tüm genom dizisinin analizi ile ortaya çıkarılabilmektedir. Bakteriye tüm genom yaklaşımı simbiyotik azot fiksasyonunda rol oynayan gen kümeleri, siderofor çeşitliliği, antimikrobiyal/ağır metal direnci ile ilişkili genler başta olmak üzere birçok PGPB özelliklerinin determinantlarını açığa çıkarabilmektedir. Genomik teknolojilerin kullanımı, faydalı bitki-mikroorganizma etkileşimlerinin modülasyonunu sağlayarak sürdürülebilir tarım için umut verici ve çevre dostu yeni uygulamaların geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.

Anahtar Kelimeler: Biyoçeşitlilik, mikrobiyal genomlar, PGPB, sürdürülebilir tarım

Effective Use of Microorganisms in Agriculture; Microbial Whole Genome Based Approaches

ABSTRACT

The increasing population, urbanization, climate change, and the pressure on crop production threaten the long-term sustainability and functioning of ecosystems. In this context, the conservation of biodiversity and genetic resources forms the foundation of green sustainable agriculture strategies. Genomic-based research on plant-associated microorganisms has significantly expanded our knowledge of both plant pathogens and Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB). The expression of certain genes in microorganisms in natural environments can be suppressed when cultured under standard laboratory conditions due to the absence of natural triggers or stress signals. This study explores the opportunities provided by genomic approaches in understanding the diversity and functional significance of plant-associated microbiomes in sustainable agriculture. The full biosynthetic capacity of bacterial strains for primary and secondary metabolites, which are key indicators for both direct and indirect PGPB mechanisms, can be revealed through whole-genome sequencing analysis. The bacterial whole-genome approach can uncover determinants of various PGPB traits, including gene clusters involved in symbiotic nitrogen fixation, siderophore diversity, and genes associated with antimicrobial/heavy metal resistance. The use of genomic technologies will enable the modulation of beneficial plant-microorganism interactions, paving the way for the development of promising and environmentally friendly new applications for sustainable agriculture.

Keywords: Biodiversity, microbial Genomes, PGPB, sustainable agriculture

GİRİŞ

Küresel nüfusun 2050 yılına kadar 11 milyarı aşması beklenmektedir [1]. Bu nüfus artışı, küresel gıda tedariki ihtiyacını da aynı oranda artıracaktır. İklim değişikliği, doğal afetler ve sanayileşmenin tarıma elverişli arazileri azaltması ve verimliliği

düşürmesi nedeniyle mevcut tarımsal ürünler, önümüzdeki 30 yıl içinde insan nüfusunu beslemede yetersiz kalabilir. Günümüz dünyasının koşulları, tarımsal üretim alanlarının önemini ve akıllı-sürdürülebilir tarım uygulama stratejilerinin hayati önemini giderek daha fazla ön plana çıkarmaktadır. Bu bağlamda, biyolojik çeşitliliğin ve genetik

*Sorumlu yazar / Corresponding author: ihsan.yasa@ege.edu.tr

kaynakların korunması, yeşil ve sürdürülebilir tarım stratejilerinin temelini oluşturmaktadır [2].

Bitki-bakteri etkileşimleri tarımda önemli bir rol oynamakta olup, bu etkileşimlerin detaylı analizi büyük bir öneme sahiptir. Bu etkileşimler üç ana kategoriye ayrılabilir: simbiyotik, patojenik ve mutualistik etkileşimler. Simbiyotik etkileşimler, kök nodüllerini kolonize eden mikrosimbiyotların atmosferik nitrojeni bağlayarak bitkilere aktarması ile karakterize edilir [3, 4]. Fitopatogenik etkileşimler ise, bitki hücrelerine saldırmak ve kendi büyümelerini desteklemek için bitki materyallerini kullanmak üzere evrimleşmiş bakteri türleri tarafından gerçekleştirilir. Mutualistik etkileşimlerde ise her iki taraf da fayda sağlar; bakteriler bitki salgılarında yaşar, bitki patojenlerini baskılayarak bitkileri korur veya bitki büyümesini teşvik eden maddeler üretir [5, 6]. Bitki Gelişimini Teşvik Edici Bakteriler (PGPB), ağır metal detoksifikasyonu, azot fiksasyonu, fitohormon üretimi ve fosfat çözünmesi gibi çeşitli mekanizmalarla toprak kalitesine ve bitkilere önemli katkılar sağlar [7, 8, 9].

Doğal ortamlarda bitkilerle etkileşime giren bakteri türlerinin fenotipleri, laboratuvar koşullarında sergiledikleri fenotiplerden farklı olabilir. Bu farklılık, laboratuvar ortamlarında doğal tetikleyicilerin bulunmaması nedeniyle ekolojik işlev için önemli olan birçok genin baskılanmasından kaynaklanır. Buna karşın bakterilerin tüm genom analizleri, simbiyotik azot fiksasyonu, bitki büyümesi, toprak verimliliği ve antibiyotik gibi ikincil metabolitler için faydalı enzimleri kodlayan gen kümelerini inceleme fırsatı sunar. Bu analizler, bir mikroorganizmanın biyogübre olarak kullanılma potansiyelini ve genetik çeşitliliğini kesin olarak ortaya çıkarır [10, 11, 12]. Son yıllarda, bitki ile ilişkili bakteriyel genom verilerinin artması hem fitopatogenler hem de PGPB'ler hakkındaki bilgi birikimimizi önemli ölçüde artırmış ve agroekoloji alanında yeni ufuklar açmıştır.

BITKİ-BAKTERİ ETKİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASINDA TÜM GENOM DİZİLEME TEKNOLOJİSİNİN ROLÜ

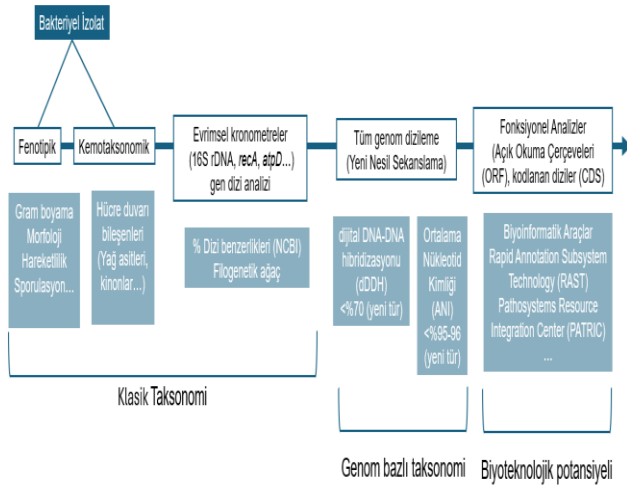
Mikrobiyal genomik, son yıllarda hızla gelişmiştir. Bu gelişim, Next-Generation Sequencing (NGS) teknolojilerindeki teknik ilerlemeler, maliyetlerin azalması ve mikrobiyal toplulukların farklı ortamlardaki işlevselliği hakkında bilgi veren yeni hesaplamalı yaklaşımlardan kaynaklanmaktadır. Kültür bağımsız yöntemlerin yaygın olarak benimsenmesi, mikrobiyal evrim, çeşitlilik ve ekosistem hakkında bilgiler sunan genomik analizlerin yapılmasını sağlamıştır. Bir organizmanın

biyokimyasal, fizyolojik ve ekolojik işlevlerini anlamaya yönelik tüm genom dizileme analizleri, biyoteknoloji alanında olağanüstü fırsatlar yaratmaktadır. Bu analizler, özellikle tarım ve çevre biyoteknolojisi alanlarında sürdürülebilir uygulamaların geliştirilmesi için büyük potansiyel taşımaktadır [13, 14].

Genom dizilerinin işlevsel olarak karakterize edilmesi, yatay gen transferlerinin tespit edilmesi ve mikroorganizmaların bitki beslenmesindeki ve biyojeokimyasal döngülerdeki rollerinin anlaşılmasında önemli araçlar olarak kabul edilmektedir. Örneğin, *Pseudomonas* sp. suşu Pf-5'in PGPB özellikleri, yıllardır biyolojik ve kimyasal yöntemlerle incelenmiş olsa da tüm genom analizleri biyokontrol faktörlerinin sentezinden sorumlu birçok gizli gen kümesini ortaya çıkarmıştır. Genom madenciliği teknikleri ile keşfedilen ve lektin benzeri bakteriyosinleri kodlayan iki *llpA*-benzeri genin işlevselliği, bu genlerin farklı patojenik türleri inhibe etme kapasitesini gösteren *E.coli* hücrelerinde heterolog ekspresyon yoluyla doğrulanmıştır [15]. Benzer şekilde, *P.agglomerans* suşu CPHN2 ve genetik olarak yakın 10 suşun karşılaştırmalı analizleri, fosfat çözünmesi, siderofor üretimi, azot metabolizması ve indol-2-asetik asit (IAA) üretimi gibi PGPB özelliklerine yönelik tahmin edilen gen dizilerini tanımlamıştır. *P.agglomerans* CPHN2'nin tüm genom analizi, bu suşun biyogübre olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymuş ve endofitlerdeki PGP mekanizmalarını açıklamıştır [16]. Ayrıca, *Bacillus* FZB42'nin tüm genom dizilemesinden elde edilen veriler, antifungal lipopeptitleri (sürfaktin, fengisin ve basillomisin D gibi) kodlayan üç gen kümesini kolayca tanımlamış ve bu genlerin ekspresyonu MALDI-TOF kütle spektrometresi analizleri ile doğrulanmıştır [17]. Birçok çalışmada, keşfedilen gen kümeleri hakkında toplanan bilgiler, hedef bileşiklerin izole edilmesi için özel stratejilerin geliştirilmesini sağlamıştır [18]. Örneğin, *Paenibacillus mucilaginosus* 678'in genomik analizi, bu suşun fosfat çözünmesi, ekzopolisakkarit (EPS) üretimi, bitki hormonu üretimi ve biyofilm oluşumu gibi temel özelliklerini genom düzeyinde ortaya koymuştur. Aynı cinsde ait 40 suşta nodülasyonla ilgili genlerin karşılaştırmalı analizi, bu suşların PGPB özelliklerinin genomik temellerini değerlendirmiştir [19]. Karşılaştırmalı işlevsel genom analizi, farklı habitatlardan izole edilmiş aynı türlerin suşları arasındaki mikrobiyal evrimi, habitat adaptasyon mekanizmalarını ve çeşitli metabolik yetenekleri ortaya çıkarmada en etkili yaklaşımlardan biri olarak öne çıkmaktadır.

Genomik yaklaşımlar, simbiyotik konak-bakteri özgüllüğünü belirleyen faktörleri, patojenlerin

konağa adaptasyonunu, konak yelpazesindeki değişiklikleri ve bitkilerle ilişkili bu mikroorganizmalarda yeni türlerin ortaya çıkışını da aydınlatmıştır. Klasik DNA hibridizasyon tekniklerine ek olarak, tüm genom dizisi analizine dayanan biyoinformatik yaklaşımların yeni prokaryotik taksonların tanımlanması için asgari standartlar olarak kullanılması önerilmektedir. Yeni türlerin genomları ile yakından ilişkili türlerin tip suşları arasında yeterli niceliksel karşılaştırmalar yapılmalıdır. Günümüzde bakteriyel suşlar arasındaki genomik benzerlikleri değerlendirmek için en yaygın kullanılan kriterler, Ortalama Nükleotid Kimliği (ANI) ve dijital DNA-DNA hibridizasyonu (dDDH) gibi tekniklerle elde edilmektedir [20, 21]. Bu bağlamda prokaryotların taksonomik karakterizasyonunu gerçekleştirmek için güncel genomik yöntemleri ve in silico veri analizi tabanlı metabolik çeşitlilik analizini birleştiren minimal bir iş akışı önerilmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Prokaryotik taksonomik karakterizasyon ve biyoteknolojik uygulama potansiyelinin değerlendirilmesinde kullanılan minimal iş akışı

Örneğin, bu kriterler izlenerek, *Rhizobium ecuadorensis*, yeni bir tür olarak tanımlanmıştır [22]. Yeni bir tür olan *Ensifer aridi*'nin altı suşu Asya, Afrika ve Hindistan'da izole edilmiştir [23]. *Anthyllis vulneraria* nodüllerinden izole edilen iki yeni tür, MLSA, ANI ve dDDH teknikleri kullanılarak tanımlanmıştır [24]. Benzer şekilde, *Onobrychis viciifolia* kök nodüllerinden izole edilen iki yeni tür, ANI ve dDDH teknikleri kullanılarak tanımlanmıştır. *A.flavescens*'in kök nodülünden yeni bir *Phyllobacterium* türü izole edilmiştir. İzole edilen türler tüm genom analiziyle incelenmiş ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakterilerin (PGPR) özellikleri açıklanmıştır [25, 26].

BİTKİ GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLER (PGPB) ÜZERİNE GENOMİK SON GELİŞMELER

Son yıllarda Next-Generation Sequencing (NGS) gibi teknolojik ilerlemeler hem toprak üstü hem de toprak altı mikrobiyal toplulukların taksonomik ve işlevsel düzeyde incelenmesini büyük ölçüde genişletmiştir. Genomik çalışmalar, bitki beslenmesine katkı sağlayan metabolik yollara sahip spesifik mikrobiyal suşların ortaya çıkarılmasını mümkün kılmaktadır. Örneğin, rizosfer mikrobiyomları üzerine yapılan araştırmalar, bu toplulukların dinamiklerini ve çevresel değişimlere olan tepkilerini açıklayabilmektedir [27]. Mikrobiyom işlevselliği üzerine yapılan bu genomik yaklaşımlar, sürdürülebilir ürün üretimi için büyük potansiyele sahip mikrobiyal adayların keşfedilmesine olanak sağlamaktadır. Son yıllarda, çeşitli PGPB suşlarının genomik karakterizasyonu, bu bakterilerin faydalı etkilerinin moleküler temelleri ve PGPB-bitki etkileşimlerinde rol oynayan genlerin ayrıntılı olarak incelenmesine olanak tanımıştır [28, 29, 30]. Bu çalışmalar, birçok PGPB suşunun çok yönlü işlevi olduğunu ve farklı bitki türleri için faydalı özelliklere sahip olduğunu, farklı mikroorganizmalar arasında korunan genlerin de varlığını göstermektedir [31].

Bitkiler ve onlarla ilişkili mikroorganizmalar, ekosistemler üzerinde olumlu etkileri olan karşılıklı fayda sağlayan ilişkiler geliştirmiştir. Bu ilişkiler, metal toleransı/direnci, bitki büyümesinin teşviki, azot fiksasyonu, fitohormon üretimi ve fosfat çözünmesi gibi mekanizmaları kapsamaktadır. PGPR, etkilerini enzimler ve ikincil metabolitler aracılığıyla göstermektedir. Son dönemde geliştirilen genomik yaklaşımlar ve biyoinformatik araçlar, bu suşların genomlarının ayrıntılı olarak incelenmesine fırsat tanımıştır [32, 33]. Örneğin, vermikomposttan izole edilen ve pirinç, sorgum, nohut ve güvercin bezelyesi gibi bitkilerde PGP aktiviteleri potansiyeline sahip 16 *Streptomyces* suşunun genomik dizileri, yaklaşık 1.850 moleküler işlevi ortaya koymuştur. Bu işlevlerin yaklaşık %50'sinin *Streptomyces* genomlarında bulunduğu, %10'unun suşa özgü olduğu ve geri kalanının ise çeşitli kombinasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir. Genom organizasyonu ayrıca sideroforlar, oksinler, hidrojen siyanür, kitinaz ve selüloz üretimi gibi PGP ve biyokontrol özellikleriyle ilgili genleri de tanımlamıştır [34]. Bir başka çalışmada, ayçiçeği bitkilerinden izole edilen *Bacillus cereus* T4S'nin tam genom dizilimi, petrobaktin, basilbaktin, basitrasin, molibden faktörü, zwittermisin ve fengyisin gibi ikincil metabolitlerin üretiminden

sorumlu genleri açığa çıkarmış ve bu bakteriyel biyokontrol ajanlarının fitopatogenlere karşı etkinliğini göstermiştir. T4S suşu ile ayçiçeği tohumlarının ve köklerinin sera koşullarında aşılması, ayçiçeği verimine katkıda bulunmuş ve bitki büyümesini teşvik eden genlerin önemini vurgulamıştır [35]. Ayrıca, *Saccharibacillus brassicae* ATSA2'nin genom analizi, demir alımı (fhuABD, afuABC, fbpABC, fepCDG) ve fosfat çözünmesi (pstABC, phoABH, phnCDEP) ile indol-3-asetik asit (trpABCDEF) ve diğer fitohormon biyosentezi genleriyle ilgili gen kümelerini tanımlamıştır. Genomda, bitki büyümesini teşvik eden surfaktin, karotenoidler, sideroforlar (stafilobaktin) ve basilen gibi ikincil metabolitler de bulunmuş, bu suşun PGP özelliklerinin altında yatan mekanizmalar hakkında kapsamlı bilgiler sağlanmıştır [36].

Baklagiller ile Rhizobia arasındaki simbiyotik azot fiksasyon sistemi, sürdürülebilir yeşil tarımın geliştirilmesinde büyük öneme sahiptir. Farklı suşlardaki konak özgüllüğünden sorumlu olan birçok gen, karşılaştırmalı genomik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. *B.diazoefficiens* 113-2'nin genomu dizilenmiş ve bu suşun genomik özellikleri, farklı türlerden ve konaklardan alınan altı rizobiyal suşla karşılaştırılmıştır. NodW, NodK, NodJ, NifB, FixK ve FixJ gen aileleri, tür ve konak özgüllüğü hakkında önemli moleküler bilgiler sağlamıştır [37]. *Bradyrhizobium sediminis* sp. nov., temel nodülasyon ve fotosistem genlerinden yoksun simbiyotik adacıklarına sahip üç suş olarak tanımlanmıştır. Bu üç suş, serbest yaşayan *Bradyrhizobium* izolatları arasında en küçük genomlara sahip olup, yeni bir tür olarak önerilmiştir. Bu üç izolat ve diğer yayınlanmış genomlar arasındaki işlevsel farklılıklar, *Bradyrhizobium* cinsinin oldukça heterojen olduğunu ve topluluk içinde çeşitli roller oynadığını, simbiyotik olmayan azot fiksasyonu da dahil olmak üzere farklı işlevler üstlendiğini göstermiştir [38]. Konak özgüllüğünden sorumlu genetik bilgiler, Rhizobia'nın baklagiller arasında konak yelpazesini genişletmek için önemli roller oynayacak ve baklagil dışı bitkilerle simbiyozunun genetik determinantları hakkında yeni bilgiler sağlayabilecektir. *Agrobacterium* AB2/73'ün tüm genomu dizildiğinde, taç gall tümörlerinin indüksiyonu için benzersiz bir konak aralığına sahip olduğu ve 500 kbp'den büyük, olağanüstü bir mega Ti (Tümör indüksiyonu) plazmidini içerdiği saptanmıştır. Bu plazmit, virülans faktörleri ile bitki büyüme düzenleyicileri olan, sitokinin ve oksin biyosentezinde yer alan tzs, iaaM ve iaaH genlerini içermektedir. Bu bakterinin spesifik konak aralığı özellikleri üzerine yapılacak çalışmalar için

pTiAB2/73'ün benzersiz genomik yapısının ayrıntılı analizi gereklidir [39].

Bitki hormon düzeylerini düzenleyen ve simbiyotik etkileşimleri kolaylaştıran faydalı enzimleri kodlayan genlere ek olarak, antibiyotik gibi aktif bileşikler kodlayan biyosentetik gen kümeleri de tüm genom analizleri ile ortaya çıkarılmıştır. Chen vd. [40], genomunda varsayılan antimikrobiyal etkiye sahip ikincil metabolitlerin ribozomal ve ribozomal olmayan sentezinde yer alan 13 gen kümesi tespit edilmiştir. Xu vd. [41], rizosfer suşu *B. velezensis* SQR9'un, *Fusarium oxysporum*'a karşı antagonistik aktivitede önemli rol oynayan bir lipopeptit bileşiği (basilomisin D) ürettiğini ve ayrıca biyofilm oluşumunda rol oynayan genlerin ifadesini etkilediğini bildirmiştir. Biyolojik kontrol faaliyetleri, bazıları bitkilerde sistemik direnç kazandırabilen poliketidler ve döngüsel lipopeptitler gibi bakteriyel ikincil metabolitlerden kaynaklanmaktadır [42].

TARIMSAL UYGULAMALARDA GENOMİK VERİLERİN KULLANIMI

Bakteriyel genomlarda karmaşık metabolik yolları düzenleyen yeni genlerin keşfi, endosimbiyotik biyolojinin ve bu organizmaların ürün iyileştirmedeki çok işlevli rollerinin anlaşılması için genetik bir temel sunmaktadır. Avantajlı mikrobiyal organizmaların biyogübre olarak kullanılması, gıda güvenliğini sağlamada ve ürün üretimini artırmada tarım için vazgeçilmez öneme sahiptir [43]. Stres dirençli *Bacillus megaterium* STB1 karakterize edilmiş ve bu bakterinin hem normal hem de stres koşullarında bitki büyümesini destekleyebilme kapasitesi gösterilmiştir. STB1 genomu, çok yönlü stres direnci, ksenobiyotik ayrıştırma, patojen karşıtı aktiviteler ve toprak ile rizosfer kolonizasyonuna bağlı özelliklerle ilişkili birçok genetik öğe barındırmaktadır. Ayrıca, oksinler ve sitokininlerin biyosentezi ile poliaminler, GABA, brassinosteroidler ve etilen seviyelerinin düzenlenmesiyle ilgili genler de tespit edilmiştir. Bu örnek çalışma, *B. megaterium*'un PGPB rolüne yeni bir bakış açısı sunmuş ve tarımsal uygulamalara yönelik yeni bulgular ortaya koymuştur [44].

Biyogübre üretiminde rekombinant DNA teknolojisi gibi moleküler biyoteknoloji araçlarının kullanılması, faydalı bitki gelişimini teşvik eden mikroorganizmalara önemli bitki büyüme faktörlerinin, örneğin fitohormonların, üretim yollarının geliştirilmesiyle metabolik yolların iyileştirilmesini sağlayabilir. Bu teknoloji birçok fayda sunmaktadır, çünkü biyolojik yollar hassas bir şekilde kontrol edilebilir ve mikroorganizmaların

verimli biyogübreler üretmesi için tamamen yeni işlevler tasarlanabilir [45]. AcdS geninin klonlanması ve ifade edilmesi, önemli ACC deaminaz aktivitesine sahip rekombinant *Azoarcus* sp. CIB suşunun geliştirilmesine yol açmıştır; bu da Rhodocyclaceae ailesine ait bu özelliğe sahip ilk PGPB'yi meydana getirmiştir. Rekombinant CIB suşu, Cd (kadmiyum) maruziyetinin neden olduğu stres koşullarında pirinç bitkilerini koruma yeteneğini göstermiş ve pirinç fidanlarında Cd konsantrasyonunu artırmıştır. Pirinç köklerindeki reaktif oksijen türlerinin seviyesindeki düşüş, bu koruyucu etkiyi doğrulamaktadır. Geniş konakçı aralığına sahip pSEVA237acdS plazmidi, stres koşullarıyla karşılaşabilecek bitkilerin büyümesini iyileştirmek için ACC deaminaz aktivitesine sahip PGPB mühendisliğinin yolunu açmıştır [46].

Azot, bitki üretimi için en önemli faktörlerin başında gelir. Faydalı rizobakterilerden *Pseudomonas protegens* Pf-5, *Pseudomonas stutzeri* A1501'den X940 kozmidine eklenen nitrojenazı kodlayan genler kullanılarak genetik olarak azot bağlayıcı hale getirilmiştir. Arabidopsis, yonca, uzun yumak ve mısırın Pf-5 X940 ile aşılması, toprakta amonyum konsantrasyonunu artırmış ve azot yetersiz koşullarda bitki verimliliğini artırmıştır [47]. Bir başka çalışmada, *A.vinelandii* genomu boyunca dağılmış 17 nif ile ilgili gen, örtüşen- uzatma (overlap-extension) PCR ve kesintisiz klonlama yöntemleri kullanılarak sentetik gen kümelerine birleştirilmiş ve *Escherichia coli*'de ifade edilmiştir. Nif ile ilgili 17 genin transkripsiyonu ve translasyonu sırasıyla RT-qPCR ve LC-MS/MS kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuç olarak *E.coli*'nin anaerobik ve mikroaerofilik koşullarda nitrojenaz aktivitesi gösterdiği görülmüştür. Bu suş, *A.vinelandii*'den gelen diğer genlerin azot bağlama üzerindeki etkilerini araştırmak için yararlı bir model olarak kullanılmıştır. *A.vinelandii*, oksijene duyarlı bir nitrojenaz üretmesine rağmen aerobik koşullar altında bile azot bağlayabilmektedir; bu nedenle *A.vinelandii*'nin nif ile ilgili genlerinin heterolog ifadesi, biyolojik azot bağlama yöntemlerinin geliştirilmesi için umut verici bir strateji olarak değerlendirilmektedir [48]. Bu çalışmalar, çeşitli ürünlerde etkili rekombinant inokülanlar geliştirme potansiyelini göstermektedir.

Mikrobiyal genomik alanındaki araştırmalar, tarımsal uygulamaların geliştirilmesinde son yıllarda güçlü bir araç olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, bu derlemede tartışılan genomik yaklaşımların saha uygulamalarına entegrasyonu, multidisipliner çalışmalar ile daha da güçlendirilebilir. Çevresel faktörler, mikroorganizmaların gen ekspresyonlarını, büyüme

oranlarını ve işlevselliklerini doğrudan etkilemektedir [49]. Mikroorganizmaların belirli çevrelerdeki başarılı performansı, bu ortamların ekolojik ve fiziksel özellikleri ile yakından ilişkilidir. Örneğin, bir bölgede yüksek verim sağlayan bir mikrobiyal suş, farklı bir ekosistemde etkisiz veya işlevsiz hale gelebilir. Bu bağlamda, yerel ekosistemlere özgü mikroorganizmaların izolasyonu, genomik karakterizasyonu ve genetik optimizasyonu, saha uygulamalarının başarısı açısından kritik öneme sahiptir. Saha çalışmaları öncesinde kapsamlı yerel mikrobiyom analizlerinin gerçekleştirilmesini öneriyoruz. Öte yandan laboratuvar ortamında etkili olduğu görülen mikrobiyal çözümlerin, gerçek saha koşullarında test edilmesi zorunludur. Bu doğrultuda, küçük ölçekli pilot saha denemeleri, mikroorganizmaların çevresel faktörlere dayanıklılığını değerlendirmek ve genetik işlevselliklerini doğrulamak için önemli bir adım olacaktır. Mikroorganizmaların genetik kararlılığının sağlanması, saha uygulamalarının uzun vadeli başarısı için elzemdir. Doğal ortamlarda meydana gelebilecek genetik değişiklikler veya gen kayıpları, mikrobiyal çözümlerin etkinliğini zamanla azaltabilir. Bu nedenle, saha denemeleri süresince kullanılan bakteriyel suşların genetik kararlılığı da düzenli olarak takip edilmelidir.

SONUÇ

Son zamanlarda post genomik teknolojiler, prokaryotların taksonomisine ve metabolik kapasitelerine yeni genom temelli tanımlar getiren çeşitli algoritmaların oluşturulmasını sağlamıştır. Bu algoritmalar mikrobiyal türleşme ve fonksiyonel çeşitlilik hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Bu gelişmelerin ardından artık prokaryotik taksonların tanımlanması için belirli genlerin filogenileri ve klasik DNA hibridizasyon tekniklerinin yanı sıra tüm genom dizi analizine dayalı biyoinformatik yaklaşımların kullanımı önerilmektedir. Genomik teknolojiler, taksonomik özellikler olarak moleküler belirteçlerin yanı sıra virülans faktörleri veya bitki gelişimini destekleyici özellikleri kapsayan genoma özgü önemli bilgiler de sağlamaktadır. Biyoçeşitliliğin ekosistem üzerindeki katma değerinin hesaplanamayacak kadar büyük olduğu dikkate alındığında, bitki gelişimini destekleyen bakteriler ve bunların tüm zirai bitkilere adapte edilebilme öngörüsünün gerçekleşmesinin ilk adımı, bitki ile ilişkili bakterilerin tüm genomik özelliklerinin ortaya çıkarılmasıdır. Elde edilen genomik veriler, genetik kaynakların korunması ve kullanımı için depolanmalı ve tarımsal açıdan önemli bitkiler ile verimli simbiyozlar oluşturabilecek

popülasyonların çeşitlendirilmesi çalışmalarında kaynak olarak kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Ohyama, T. (2017). The role of legume-Rhizobium symbiosis in sustainable agriculture. Legume nitrogen fixation in soils with low phosphorus availability: Adaptation and Regulatory Implication 1-20.
- Karaca, M., Ince, A.G. (2019). Conservation of biodiversity and genetic resources for sustainable agriculture. Innovations in Sustainable Agriculture 363-410.
- Binyamin, R., Nadeem, S.M., Akhtar, S., Khan, M.Y., Anjum, R. (2019). Beneficial and pathogenic plant-microbe interactions: A review. Soil & Environment 38(2).
- Hallmann, J. (2001). Plant interactions with endophytic bacteria.
- Pontes, J.G.D.M., Fernandes, L.S., dos Santos, R.V., Tasic, L., Fill, T.P. (2020). Virulence factors in the phytopathogen-host interactions: an overview. Journal of Agricultural and Food Chemistry 68(29):7555-7570.
- Li, E., de Jonge, R., Liu, C., Jiang, H., Friman, V.P., Pieterse, C.M., ... & Jousset, A. (2021). Rapid evolution of bacterial mutualism in the plant rhizosphere. Nature Communications 12(1):3829.
- Ren, X.M., Guo, S.J., Tian, W., Chen, Y., Han, H., Chen, E., ... & Chen, Z.J. (2019). Effects of plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculation on the growth, antioxidant activity, Cu uptake, and bacterial community structure of rape (*Brassica napus* L.) grown in Cu-contaminated agricultural soil. Frontiers in Microbiology 10, 1455.
- Fukami, J., Cerezini, P., Hungria, M. (2018). Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. Amb Express 8(1):73.
- Nazir, N., Kamili, A.N., Shah, D. (2018). Mechanism of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth- A review. Int. J. Manag. Technol. Eng, 8, 709-721.
- Lardi, M., Pessi, G. (2018). Functional genomics approaches to studying symbioses between legumes and nitrogen-fixing rhizobia. High-Throughput 7(2):15.
- Wang, Z., Lu, K., Liu, X., Zhu, Y., Liu, C. (2023). Comparative functional genome analysis reveals the habitat adaptation and biocontrol characteristics of plant growth-promoting bacteria in NCBI databases. Microbiology Spectrum 11(3):e05007-22.
- Duflos, R., Vailleau, F., Roux, F. (2024). Toward ecologically relevant genetics of interactions between host plants and plant growth-promoting bacteria. Advanced Genetics 2300210.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S., Wolf, Y.I. (2021). Evolution of microbial genomics: conceptual shifts over a quarter century. Trends in Microbiology 29(7):582-592.
- Gao, F. (2019). Recent developments of software and database in microbial genomics and functional genomics. Briefings in Bioinformatics 20(2):732-734.
- Parret, A.H., Temmerman, K., De Mot, R. (2005). Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Applied and Environmental Microbiology 71(9):5197-5207.
- Kumar, V., Eid, E.M., Al-Bakre, D.A., Abdallah, S.M., Širić, I., Andabaka, Ž., ... & Choi, K.S. (2022). Combined use of sewage sludge and plant growth-promoting rhizobia improves germination, biochemical response and yield of ridge gourd (*Luffa acutangula* (L.) Roxb.) under field conditions. Agriculture 12(2):173.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., ... & Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42.
- Paterson, J., Jahanshah, G., Li, Y., Wang, Q., Mehnaz, S., Gross, H. (2017). The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. FEMS Microbiology Ecology, 93(3):fiw249.
- Wang, R., Huo, B., Chen, L., Li, K., Yi, G., Wang, E., ... & Sui, X. (2023). Rhizobia modulate the peanut rhizobacterial community and soil metabolites depending on nitrogen availability. Biology and Fertility of Soils 1-14.
- Janda, J.M. (2021). Taxonomic classification of bacteria. In Practical Handbook of Microbiology pp.161-166. CRC Press.
- Christensen, H., Olsen, J.E. (2023). Sequence-based classification and identification. In Introduction to Bioinformatics in Microbiology pp.131-151. Cham: Springer International Publishing.
- Ribeiro, R.A., Martins, T.B., Ormeno-Orrillo, E., Marcon Delamuta, J.R., Rogel, M.A., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2015). *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. International

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65(Pt_9):3162-3169.
23. Le Quéré, A., Tak, N., Gehlot, H.S., Lavire, C., Meyer, T., Chapulliot, D., ... & Munive, J.A. (2017). Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. BMC Genomics 18(1):1-24.
 24. Le Quéré, A., Tak, N., Gehlot, H.S., Lavire, C., Meyer, T., Chapulliot, D., ... & Munive, J.A. (2017). Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. BMC genomics, 18(1):1-24.
 25. Ashrafi, S., Kuzmanović, N., Patz, S., Lohwasser, U., Bunk, B., Spröer, C., ... & Thünen, T. (2022). Two new Rhizobiales species isolated from root nodules of common sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) show different plant colonization strategies. Microbiology Spectrum 10(5):e01099-22.
 26. Eren Eroğlu, A.E., Eroğlu, V., Yaşa, İ. (2024). Genomic insights into the symbiotic and plant growth-promoting traits of “Candidatus Phyllobacterium onerii” sp. nov. isolated from endemic *Astragalus flavescens*. Microorganisms 12(2):336.
 27. Kumar, A., Dubey, A. (2020). Rhizosphere microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. Journal of Advanced Research 24, 337-352.
 28. Petrillo, C., Castaldi, S., Lanzilli, M., Selci, M., Cordone, A., Giovannelli, D., Isticato, R. (2021). Genomic and physiological characterization of Bacilli isolated from salt-pans with plant growth promoting features. Frontiers in Microbiology 12, 715678.
 29. Snak, A., Vendruscolo, E.C.G., Santos, M.F.D., Fiorini, A., Mesa, D. (2021). Genome sequencing and analysis of plant growth-promoting attributes from *Leclercia adecarboxylata*. Genetics and Molecular Biology, 44, e20200130.
 30. Flores, A., Diaz-Zamora, J.T., Orozco-Mosqueda, M.D.C., Chávez, A., de Los Santos-Villalobos, S., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G. (2020). Bridging genomics and field research: draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* CR71, an endophytic bacterium that promotes plant growth and fruit yield in *Cucumis sativus* L. 3 Biotech, 10, 1-7.
 31. Guerrieri, M.C., Fiorini, A., Fanfoni, E., Tabaglio, V., Cocconcelli, P.S., Trevisan, M., Puglisi, E. (2021). Integrated genomic and greenhouse assessment of a novel plant growth-promoting rhizobacterium for tomato plant. Frontiers in Plant Science 12, 660620.
 32. Lu, S., Feng, L., Zhou, D., Jia, M., Liu, Z., Hou, Z., ... & Yu, J. (2022). Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* CNBG-PGPR-1 for studying the promotion of plant growth. Molecular Plant-Microbe Interactions 35(12):1115-1119.
 33. Rehman, M., Jyoti, S.Y., Regon, P., Kakati, S., Mishra, P.K., Tanti, B. (2023). Comparative genomics analyses of some selected pseudomonas strains having biocontrol, plant growth promoting and bioremediation activities using bioinformatic tools. Biological Forum - An International Journal 15(6):1-16.
 34. Subramaniam, G., Thakur, V., Saxena, R.K., Vadlamudi, S., Purohit, S., Kumar, V., ... & Varshney, R.K. (2020). Complete genome sequence of sixteen plant growth promoting streptomyces strains. Scientific Reports 10(1):10294.
 35. Adeleke, B.S., Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O. (2021). Genomic analysis of endophytic *Bacillus cereus* T4S and its plant growth-promoting traits. Plants 10(9):1776.
 36. Jiang, L., Seo, J., Peng, Y., Jeon, D., Park, S.J., Kim, C.Y., ... & Lee, J. (2023). Genome insights into the plant growth-promoting bacterium *Saccharibacillus brassicae* ATSA2T. AMB Express 13(1):9.
 37. Li, R., Feng, Y., Chen, H., Zhang, C., Huang, Y., Chen, L., ... & Zhou, X. (2020). Whole-genome sequencing of *Bradyrhizobium diazoefficiens* 113-2 and comparative genomic analysis provide molecular insights into species specificity and host specificity. Frontiers in Microbiology 11, 576800.
 38. Jin, C.Z., Wu, X.W., Zhuo, Y., Yang, Y., Li, T., Jin, F.J., ... & Jin, L. (2022). Genomic insights into a free-living, nitrogen-fixing but non nodulating novel species of *Bradyrhizobium sediminis* from freshwater sediment: Three isolates with the smallest genome within the genus *Bradyrhizobium*. Systematic and Applied Microbiology 45(5):126353.
 39. Hooykaas, M.J., Hooykaas, P.J. (2021). Complete genomic sequence and phylogenomics analysis of *Agrobacterium* strain AB2/73: a new *Rhizobium* species with a unique mega-Ti plasmid. BMC Microbiology 21, 1-17.
 40. Chen, X., Huang, H., Zhang, S., Zhang, Y., Jiang, J., Qiu, Y., ... & Wang, A. (2021). *Bacillus velezensis* WZ-37, a new broad-spectrum biocontrol strain, promotes the growth of tomato seedlings. Agriculture 11(7):581.
 41. Xu, Z., Xie, J., Zhang, H., Wang, D., Shen, Q., Zhang, R. (2019). Enhanced control of plant wilt

- disease by a xylose-inducible degQ gene engineered into *Bacillus velezensis* strain SQR9XYQ. *Phytopathology* 109(1):36-43.
42. Liu, G., Kong, Y., Fan, Y., Geng, C., Peng, D., Sun, M. (2017). Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria. *Journal of Biotechnology* 249, 20-24.
43. Kaur, S., Dwibedi, V., Sahu, P.K., Kocher, G.S. (Eds.). (2023). *Metabolomics, proteomes and gene editing approaches in biofertilizer industry*. Springer.
44. Nascimento, F.X., Hernández, A.G., Glick, B.R., Rossi, M.J. (2020). Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*, 25, e00406.
45. Ali, R. (2021). Role of recombinant DNA technology in biofertilizer production. *Microbiota and Biofertilizers: A Sustainable Continuum for Plant and Soil Health*, 143-163.
46. Fernández-Llamas, H., Ibero, J., Thijs, S., Imperato, V., Vangronsveld, J., Díaz, E., Carmona, M. (2020). Enhancing the rice seedlings growth promotion abilities of *Azoarcus* sp. CIB by heterologous expression of ACC deaminase to improve performance of plants exposed to cadmium stress. *Microorganisms* 8(9):1453.
47. Setten, L., Soto, G., Mozzicafreddo, M., Fox, A. R., Lisi, C., Cuccioloni, M., ... & Ayub, N.D. (2013). Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions. *Plos One*, 8(5):e63666.
48. Tatemichi, Y., Nakahara, T., Ueda, M., Kuroda, K. (2021). Construction of recombinant *Escherichia coli* producing nitrogenase-related proteins from *Azotobacter vinelandii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 85(10):2209-2216.
49. Jordan, H.R., Tomberlin, J.K. (2017). Abiotic and biotic factors regulating inter-kingdom engagement between insects and microbe activity on vertebrate remains. *Insects* 54(8). <https://doi.org/10.3390/insects8020054>.