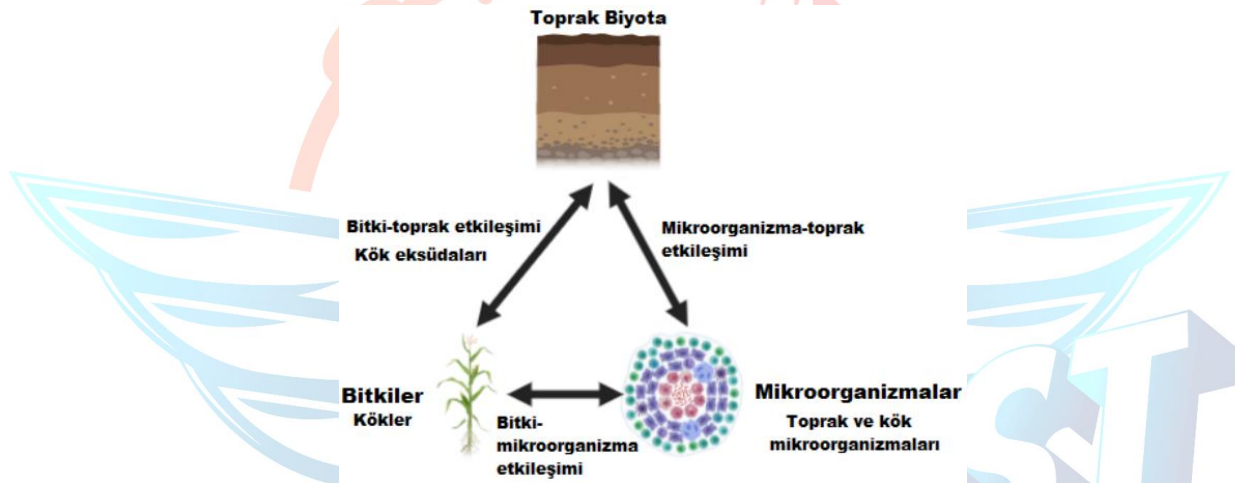


TEKNOFEST**HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ****BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI****PROJE DETAY RAPORU****ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ SEVİYESİ FİKİR KATEGORİSİ****TAKIM ADI****TOPRAK TAKIMI****PROJE ADI****Çay Tarımına Özel Yeni Nesil Gübre Geliştirme:****Bitki Gelişimini Destekleyen Endofitik Çay Bakterilerinden****Mikrobiyal Gübre Üretimi****BAŞVURU ID****466753**

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

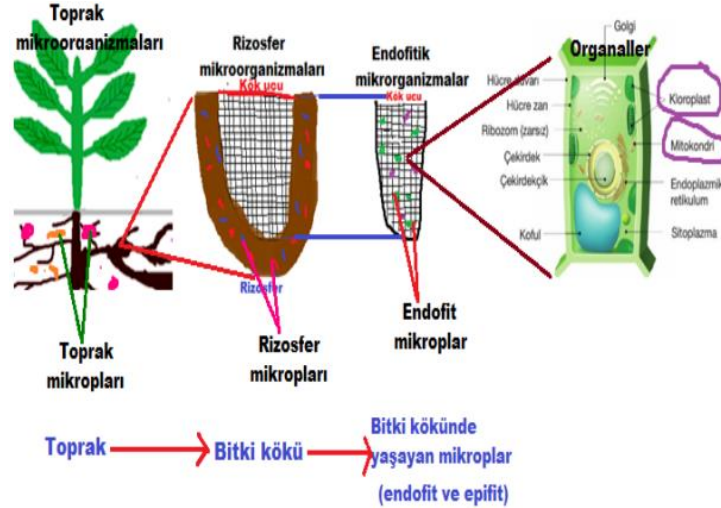
Dünyanın çay ekolojik alanları kapsamında yeri olmamasına rağmen Türkiye bugün sınırlı bir coğrafyada ülkesel tüketim değerlerinin üzerinde kaliteli çay üretebilen bir ülkedir. Diğer yandan çay üretimimizin gerçekleştiği Doğu Karadeniz Bölgesi çaylıkları son zamanlarda çay plantasyonlarının yaşlanması, genç çaylıklarda istenmeyen varyasyonların belirmesi ve yoğun sentetik-kimyasal gübre tüketiminden kaynaklı toprak asitleşmesi gibi bir dizi sorunla karşı karşıyadır. Yapılan araştırmalar çay gelişimi açısından uygun pH aralığına sahip alanların çarpıcı bir şekilde azaldığına işaret etmektedir. Ülkemiz çay tarımını tehdit eden bu koşullarda çay verimi ve kalitesini artırmaya yönelik önlemlerin alınması, alternatif uygulama ve yaklaşımlarının gündeme getirilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle bu proje önerisi mevcut ve yeni kurulan çaylıklarda gübreleme pratiklerinde piyasadaki muadillerinden farklı bir biyogübrenin kullanımı düşüncesine dayanmaktadır.



Şekil 1. Bitkiler, mikrobiyota ve toprak arasındaki etkileşim (Jacoby ve ark., 2017)

Biyogübreler bitkiye faydalı toprak kökenli mikroorganizmalarının taşıyıcı olarak adlandırılan organik ya da inorganik bileşenler içine zerkedilmesi ile elde edilen ve bu mikroorganizmaların belirli sürelerde yaşamasını sağlayacak katkı maddeleri de içeren sıvı ya da katı formdaki bitki gelişim ürünleridir. Geleneksel biyogübre modeli doğal ya da tarım toprak ekosistemlerinden (çoğu durumda rizosfer olarak ifade edilen bitki kök bölgesinden) izole edilmiş faydalı mikroorganizmalara dayanmaktadır. Geleneksel biyogübreler ile ilgili en önemli darboğaz toprağa ya da bitkiye uygulama sürecinde biyogübre içeriğinde yer alan faydalı mikroorganizmaların popülasyon ve aktivitelerinin korunması ve hatta artırılmasıdır. Değişen çevresel koşullar (iklim ve mevsimsel değişimler) ve toprak özellikleri (kuraklık, tuzluluk, alkalilik, asitlik gibi abiyotik faktörler ve topraktaki biyoçeşitliliğin baskısı-biyotik faktörler) çoğu durumda biyogübre uygulamalarının başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmaktadır.

Diğer yandan son yıllarda yapılan araştırmalar faydalı toprak mikroorganizmalarının sadece rizosferde lokalize olmayıp bitkilerin kök, sap, yaprak ve meyve gibi farklı organlarında da yaşam sürdüğünü ve bitki gelişimini desteklediğini ortaya koymuştur. Bu gelişme sayesinde "endofitik" (bitki içinde gelişen) olarak adlandırılan bu mikroorganizmaların bitki içindeki fonksiyonlarının ortaya konması ile ilgili yeni bir araştırma alanı doğmuş ve ayrıca biyogübre sektörü açısından "bitkiye faydalı endofitik mikroorganizmalar" üzerinden biyogübre formülasyonlarının geliştirilmesi şeklinde yeni bir üretim alanı açılmıştır. Bu nedenle proje önerisinde "yeni nesil" ifadesi kullanılmıştır.



Şekil 2. Toprak, bitki kökleri ve bitki kökünde yaşayan mikroplar arasındaki ilişki (Backer ve ark., 2018)

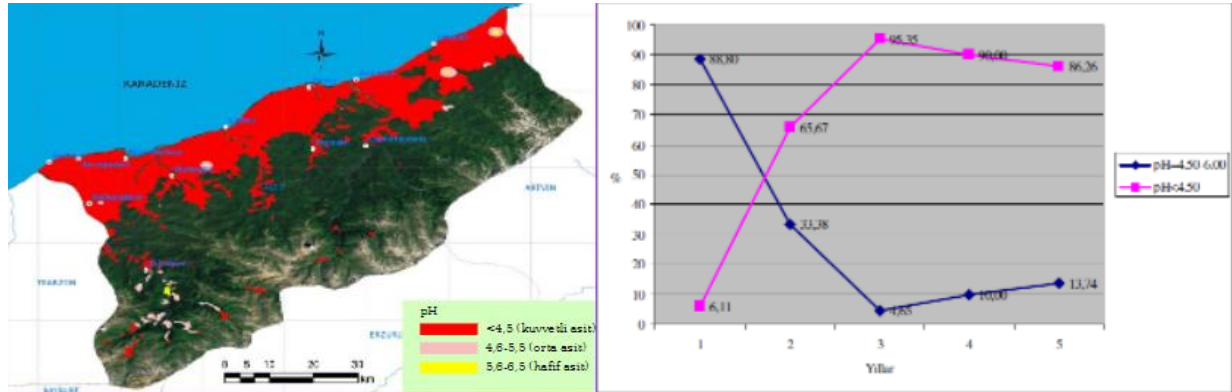
Endofitik mikroorganizmalar toprak kökenli olmakla birlikte “bitki-içi” yaşamları nedeniyle yukarıda ifade edilen abiyotik ve biyotik stres koşullarına maruz kalmazlar. Bu nedenle bu mikroorganizmaların bitkiye faydalı olan türleri üzerinden kurgulanan biyogübre formülasyonları zorlu (kurak, kirli, tuzlu, alkali ve asit) toprak koşullarında geleneksel biyogübrelerle kıyasla daha etkindir. Literatür araştırması ile Türkiye koşullarında bu konuyla ilgili üretilmiş bilimsel veri olmadığı gibi ilgili pazara sunulmuş bir “endofitik mikroorganizma içerikli biyogübre” formülasyonu bulunmamaktadır.

Bu bilgi ve saptamaların ışığında projenin amacı “Türkiye Çay Tarımında” kullanılmak üzere biyogübre pazarına sunulabilecek yeni bir biyogübre preparatı geliştirmektir. Proje önerisi, (i) farklı genotip özellik ve yaştaki çaylıklarından endofitik bakteri izolasyonu ve saflaştırılması; (ii) bitkiye faydalı endofitik bakteri izolatlarının biyokimyasal testler üzerinden belirlenmesi; (iii) bireysel ve karışık kültür optimizasyonu; (iv) elde edilen preparatların sera koşullarında geliştirilecek çay fidanlarında denenmesi; (v) en iyi sonuç gösteren iki “çaya faydalı endofitik bakteri” (ÇFEB) preparatının gerçek çay bahçesi koşullarında denenmesi ve (vi) nihai ÇFEB ürününün sanayi ölçeğinde üretilmesi aşamalarını içermektedir.

2. Problem/Sorun

(I) Ülke ve dünya tarım sektörü ölçeklerinde çok önemli bir yeri olmasına rağmen çay üretimimiz son zamanlarda bazı önemli sorunlarla karşı karşıyadır. Bunlar (i) çay plantasyonlarının yaşlanmasına bağlı azalan çay verimi ve kalitesi; (ii) yaşlanmaya önlem olarak kurulan genç çaylıklarda istenmeyen genetik varyasyonların belirmesi; (iii) bu varyasyonların çay yaprağı kalitesinde arzu edilmeyen değişimleri beraberinde getirmesi ve (iv) çayın üretiminin hızla gelişmeye başladığı 1950’li yıllardan beri sürdürülen yoğun sentetik-kimyasal gübre tüketiminden kaynaklı toprak asitleşmesi gibi problemlerdir. Çayın ekonomik ömrü 50 yılın altındadır. Kırkıncı yaşına ulaşan çaylıkların yeni çay klonları ile plantasyonu önerilmektedir. Son 20 yılda Türkiye’deki çaylıkların %30’nun ekonomik ömrünü tamamlamış (50 yıldan daha yaşlı) çaylıklardan oluştuğu ifade edilmiş (Ural, 2004) ve bu oran son yıllarda daha da artmıştır. Gençleştirme amaçlı budama yaklaşımı çoğu durumda yaşlılık sorununu gidermemektedir. Gençleştirmek maksadıyla çaylıklara uyarlanan farklı çay çeşitleri genetik olarak farklı özelliklere sahip olduklarından dolayı kalite ve üründe istenmeyen farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Diğer yandan Doğu Karadeniz Bölgesi çay tarımı koşullarında da uzun yıllardır sürdürülen yoğun, tek yanlı kimyasal gübre (amonyum sülfat)

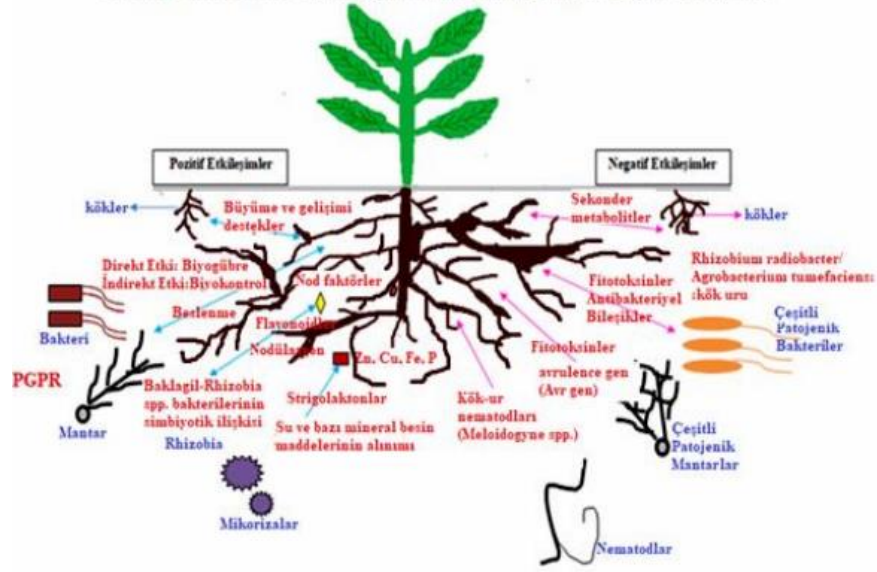
uygulamalarından dolayı toprak pH'sının azaldığı son zamanlarda birçok araştırmamız tarafından farklı bilimsel ortamlarda dile getirilmiştir (Yüksek vd. 2009; Zenginbal, 2013; Savcı, 2012; Özyazıcı vd. 2013). Bu bulgulardan en çarpıcı olanı çay tarımı açısından uygun pH aralığına (4.5-6.0) sahip topraklarımızın dağılımı 1980 yılında Rize Bölgesinde %88 ve Artvin Bölgesinde %93 iken bu değerlerin aynı bölgeler için son yıllarda %4 ve %23'e düşmüş olmasıdır (Özyazıcı vd. 2013). Toprak asitliği yüksek Alüminyum (Al) ve Mangan (Mn) toksitesi, düşük P, K ve Mg yararışlılığı, azalan azot bağlayıcı bakteri aktivitesi ve artan fosfor immobilizasyonu gibi sorunları beraberinde getirmekte ve değişen toprak biyokimyası çay verimi ve kalitesini olumsuz etkilemektedir.



Şekil 3 ve 4. Rize il tarım topraklarının pH'sı Özyazıcı, M.A., Dengiz, O., & Aydoğan, M. (2013). Çay Yetiştirilen Tarım Topraklarının Reaksiyon Değişimleri ve Alansal Dağılımları

(II) Bütün bu darboğazlar ülkemiz çay verimi ve kalitesini artırmaya yönelik yeni yaklaşımlarının gündeme getirilmesini gerektirmiştir. Bu bağlamda 2007 yılında kamu teşvikiyle “organik çay tarımı” modeli çay üreticilerine tanıtılmıştır. Tarım ilaçları kullanılmaksızın çay üretebilme avantajını da kullanarak ÇAYKUR Rize bölgesinde bu hareketin yayılmasına öncülük etmiş ve organik toprak yönetimi kapsamında kullanılan gübre, kompost ve toprak düzenleyici materyaller önem kazanmıştır. 2000’li yılların başından itibaren organik tarım düşüncesi ve uygulamaları içinde giderek artan bir ilgiyle kendine yer edinmiş bir diğer olgu ise hem bitki hem de toprağa uygulanabilen bitkiye faydalı mikroorganizmalar içeren “biyogübreler” olmuştur. Yapılan çok sayıda araştırma bitkiye faydalı mikroorganizmaların azot fiksasyonu, fosfor ve potasyum mobilizasyonu, bitki-gelişim promotörlerinin sentezi ve patojenik organizma baskılama gibi süreçlerde rol alan bazı bakteri ve mantarları olduğunu ortaya koymuştur. Söz konusu bakteri ve mantarlar doğal besin döngülerini restore ederek toprak organik maddesinin inşasına katkıda bulunmaktadır (Saharan ve Nehra, 2011). Bu özelliklerinden dolayı biyogübrelerin geleneksel tarımın vazgeçilmez bileşenleri olan sentetik-kimyasal gübrelerin ve tarımsal mücadele unsurlarının kullanımını azaltacağına ve toprak ve su kaynaklarını koruyacağı öngörülmektedir (Saharan ve Nehra, 2011). Diğer yandan biyogübre uygulamaları ile ilgili bazı darboğazlar mevcuttur. Biyogübrelerin içeriğinde yer alan mikroorganizmaların sayı ve aktivitelerinin korunması (ya da beklentileri karşılayacak şekilde artırılması) çevresel koşullar (iklim, mevsim, toprak özellikleri) ile yakından ilgilidir. Örneğin yağış düzeyinin düşük olduğu koşullarda doğrudan toprağa uygulanan sıvı biyogübrelerin etkinliği kuraklık, tuzluluk, alkalilik gibi abiyotik faktörlerden olumsuz etkilenebilmektedir (abiyotik stres). Ayrıca biyogübre formülasyonlarında yer alan bakteri ve mantarlar uygulandıkları yeni koşullardaki mikrobiyal popülasyonlar ile rekabete girebilmektedir (biyotik stres).

Rizosfer mikrobiyomu ve kök-organizma arasındaki pozitif ve negatif etkileşimler

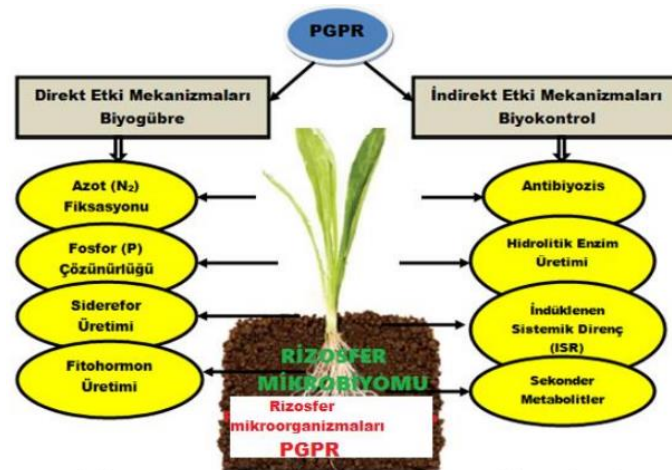


Şekil 5. Rizosfer mikrobiyomu ve bitki kökü-organizma arasındaki pozitif ve negatif etkileşimler (Sharma ve Verma, 2018)

3. Çözüm

Ülke çay tarımının bileşenleri (toprak, çay kalitesi ve verimi) ile ilgili sorunlar bulunmaktadır. Organik tarım yaklaşımı ile bu sorunlara çözüm aranmakta ve ülkemiz çay tarımı koşullarına uygun biyogübrelerin geliştirilmesi kullanımı bir çözüm olarak görülebilir ancak toprak kökenli mikroorganizmalar içeren geleneksel biyogübreler çoğu durumda topraktaki abiyotik ve biyotik stres koşullarına bağlı olarak etkisiz kalabilmektedir.

Oysa bitki doku ve organlarında yaşam süren endofitik mikroorganizmalar dış çevre ile temasları olmadığından yukarıda ifade edilen olumsuz toprak koşullarına ve çevresel değişimlere maruz kalmazlar. Bu nedenle bitki gelişimini ve verimini artırıcı mikroorganizma türleri, doku ve toprak örneklerinden DNA izolasyonu ile metagenomik analizler gerçekleştirilip çay bitkisine özel; verimi ve kaliteyi artıran öncelikle endofitik bakteriler olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların özellikleri eDNA ve yeni nesil dizileme gibi yeni teknolojilerle analiz edilecektir. Bitkiye faydalı olan türleri üzerinden kurgulanan biyogübre formülasyonları zorlu (kurak, kirli, tuzlu, alkali ve de asit) toprak koşullarında geleneksel biyogübrelerle kıyasla daha etkin olabilir. Endofitik mikroorganizmalar (genellikle bakteri ve mantarlar), normal ve zorlu koşullar altında bitkiye faydalı bakterilerdir. Bitki besin alımını geliştirerek ve büyümeyi ve stresle ilgili fitohormonları modüle ederek konukçu bitkilere doğrudan fayda sağlayabilirler. Dolaylı olarak, endofitik bakteriler, antibiyotikler, hidrolitik enzimler, besin sınırlaması ile zararlıları ve patojenleri hedefleyerek ve bitki savunmasını hazırlayarak bitki sağlığını iyileştirebildiği de rapor edilmiştir (Azfal vd., 2019). Endofitik bakteriler konukçu bitkinin büyümesini teşvik etmenin yansıra, aynı zamanda konukçuya stres koşullarını tolere etmede de destek olur ve ayrıca çevredeki rakip bitki türlerine karşı allelopatik etkiler sağlayabilir (Rosenblueth ve Martónez- Romero, 2006). Böylece, konukçu bitkiyi biyotik rekabet ve abiyotik stres faktörlerine karşı destekler. Çok yıllık çay bitkisinin de yüksek bir endofitik bakteri/mantarlar çeşitliliğine sahip olduğuna dair araştırma bulguları mevcuttur (Borah vd., 2019; Xie vd., 2020 ve Hazarika vd., 2021).

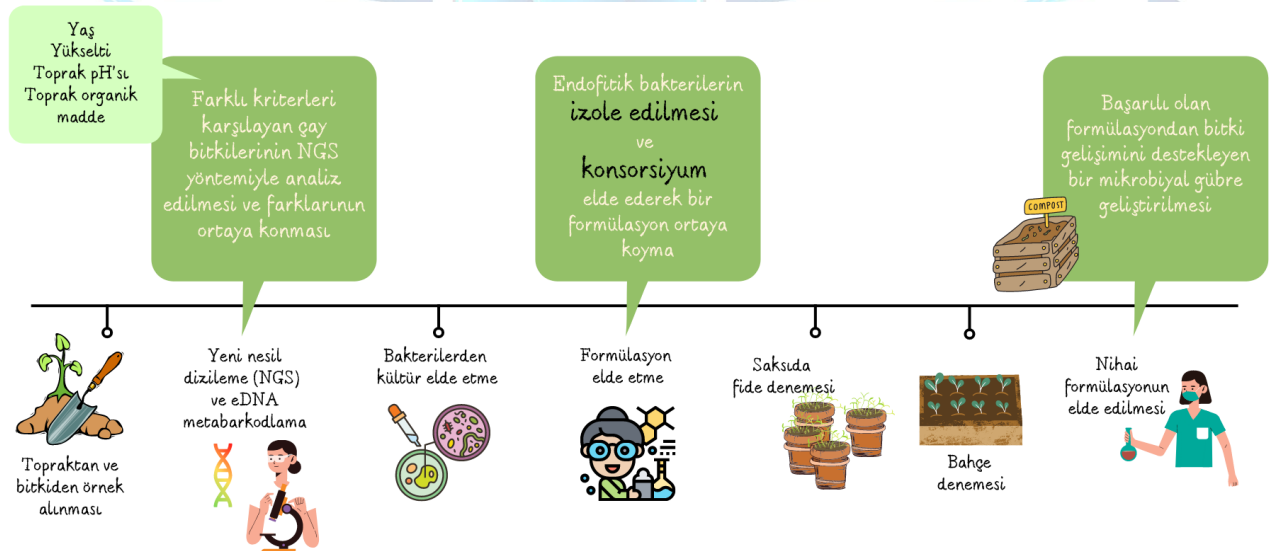


Şekil 6. PGPR direkt ve indirekt etki mekanizması (Meraklı ve Memon)

Literatür taraması ile Türkiye koşullarında bu konuyla ilgili ürettiği bilimsel veri olmadığı gibi ilgili pazara sunulmuş bir “endofitik mikroorganizma içerikli biyogübre” formülasyonu bulunmamaktadır.

Yukarıda ifade edilen avantajları göz önünde bulundurularak bu proje kapsamında Rize Bölgesi çaylıklarından izole edilen endofitik çay bakterilerinin bitkiye faydalı olma vasıfları biyokimyasal testler ile değerlendirilecek ve çaya faydalı endofitik bakteri izolatları deneysel koşullarda çay bitkisine aşılanarak çay verimi ve kalitesine olan katkıları belirlenecektir.

4. Yöntem



Şekil 8. Bitki Gelişimini Destekleyen Endofitik Çay Bakterilerinden Mikrobiyal Gübre Üretimi

4.1 Bitkisel Materyal Örneklemesi

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Çay Araştırma ve Uygulama Merkezi (ÇAYMER) koşullarında homojen olarak geliştirilen 2 farklı çay klonuna (endofitik bakteri çeşitliliği çay genotipinden etkilenmektedir. Türkiye çay tarımının en büyük sorunlarından biri çaylıkların yenilenmesi sırasında farklı kültürlerin kullanılmasından dolayı genetik açıdan homojen olmayan çay plantasyonlarının oluşmuş olmasıdır. Bu durumda bir çaylıkta genetik orjini farklı birkaç çay çeşidi bulunabilmektedir ve endofitik bakteri izolasyonu açısından arzu edilmeyen bir durumdur. Bu nedenle çay materyalinin toplanması aşamasında ÇAYMER koşullarında hangi çay klon/kültürlerin olduğu bilinen çaylıklar tercih edilmiştir.) Fener-3 ve Muradiye-10 ait 2 farklı

yaş düzeyindeki (yapılan araştırmalar çayın fizyolojik yaşı ve örnekleme mevsimine bağlı olarak endofitik çay mikrobiyomunun değişik özellikler sergilediğini gösterdiğinden proje kapsamında seçilen kültürlerin genç ve yaşlı çaylıklarından bahar ve yaz döneminde bitki materyali toplanacaktır) genç ve orta yaşlı ya da yaşlı çaylıklardan çay numuneleri (yaprak, sap ve kök) 2 mevsimde (bahar ve yaz) toplanacaktır. Her çaylık sağlıklı çay bitkilerinden seçilen 5 birey ile temsil edilecektir. Her çaylık için 5 bireyden toplanan yaprak-sap-kök numuneleri ayrı ayrı karıştırılarak bakteriyel izolasyonlar öncesi farkı genotip ve yaş düzeyini temsil edecek örnekler hazırlanacaktır. Toplanan ve parçalanan çay, bitkisel materyali steril poşetlere konularak soğuk koşullarda Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Laboratuvarlarına ulaştırılacaktır.

4.2 Toprak Örnekleme

Araştırmadan elde edilen sonuçların yorumlanmasına katkıda bulunmak üzere fiziksel ve kimyasal toprak analizlerinin yapılabilmesi için yukarıda ifade edildiği üzere seçilen çaylıklardan toprak örnekleri de toplanacaktır. Her çaylığı temsilen seçilen sağlıklı çay bitki bireylerinin ocaklarından toplanan örnekler karıştırılarak kompozit örnekler elde edilecektir. Toprak örnekleri de Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Laboratuvarlarına gönderilecektir.

4.3 Bitkisel Materyalin Yüzey Sterilizasyonu

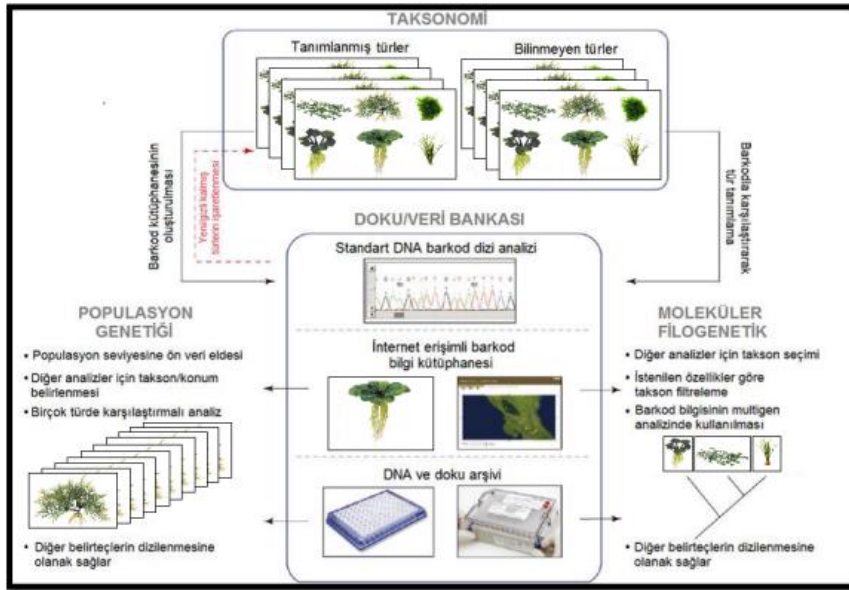
Laboratuvara getirilen çayın yaprak, sap ve kök örnekleri temiz çeşme suyu altında yıkanacak ve ardından 3 dk. %70'lik etil alkolde, 2 dk. %2'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda bekletildikten sonra tekrar %70'lik etil alkole daldırılacaktır. Alkol ile muamele edilmiş örneklerden alkolü uzaklaştırmak için örnekler 5 kez steril su ile yıkanarak yüzey dezenfeksiyonu aşaması tamamlanacaktır. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış bitki örnekleri steril 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi içinde steril havan içerisinde iyice ezildikten sonra 5 dk. bekletilecektir. Yüzey dezenfeksiyonu etkililiğini test etmek için farklı bitki numuneleri havanda ezilmeden önce kullanılan son yıkama suyundan 100 µl alınarak Nutrient Agar (NA) besiyerine steril baget ile yayılacaktır. Elde edilen petri kapları 26 derecede 2 gün inkübasyona bırakılarak bakteri gelişimi olup olmadığı kontrol edilecektir (olmaması durumunda sterilizasyon başarılı olarak kabul edilecektir)

4.4 Bitkisel Materyalin Yüzey Sterilizasyonu

Havanda bulunan süspansiyonlar seri olarak sulandırıldıktan sonra King's B Agar (KB), tryptic soy agar (TSA) ve Nutrient Agar (NA) besi yerlerine bagetle yayılacaktır. Farklı seçici ve genel besi yerlerinde gelişen ve morfolojik olarak birbirinden farklı görülen bakteri kolonileri teşhis ve çalışmalarda kullanılmak üzere uygun besi yerleri üzerinde saflaştırılacaktır. İzolatlar rutin çalışmalar için uygun besi yeri içeren steril plastik petrilerde (6 cm) veya eğik Agarda +4 derecede kısa süreli veya steril %40'lık steril Gliserol içeren Cryo Eppendorf tüpler içerisinde derin dondurucuda (-80 derecede) saklanacaktır.

4.5 Mikrobiyom metabarkodlama

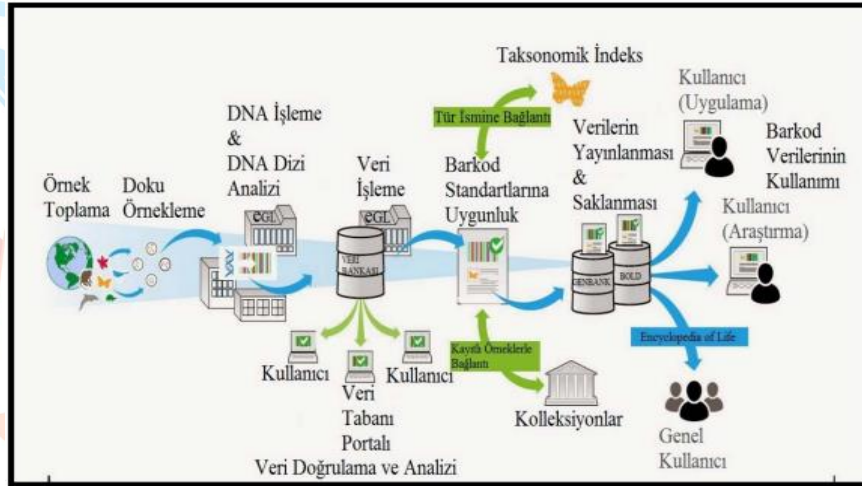
Alınan bitki örneklerinden klasik veya kit bazlı yöntemler ile bakteri DNA'ları izole edilecektir. İzole edilen DNA'lar evrensel bakteri primerleri olan 16S rRNA primerlerini içeren PCR reaksiyonuna sokularak her bir bakteriyi tanımlamamızı sağlayacak hedef gen bölgeleri (barkod bölgeleri) tespit edilecektir.



Şekil 9. Çevresel DNA çalışmalarındaki ana unsurlar ve bunların taksonomi, moleküler filogeni ve popülasyon genetiği çalışmalarındaki rolleri

4.6 Dizileme ve biyoinformatik analizler

Çoğaltılan hedef bakteri gen bölgeleri yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri ile dizilenecektir. Alınan dizi bilgileri sayı, boyut ve kalite bakımından DADA2, obitools ve silva gibi biyoinformatik araçlar ile analiz edilip filtrelenerek bitkinin çeşitli kısımlarındaki mikrobiyom çeşitliliği tespit edilecektir.



Şekil 7. Çevresel DNA iş akış şeması

4.7 Bitkiye Faydalı Endofitik Bakteri Testleri

Derin dondurucuda muhafaza edilen stok bakteri kültürlerinden NA besi yerine çizgi ekim yapılarak petriler 27 derecede 48 saat geliştirilecektir. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kültürlerinden bir loop alınarak Nutrient Broth (NB) besiyerine aktarılacaktır. Bakteri inokulasyonu yapılan sıvı besi yerleri bir gece çalkalayıcıda 140 rpm'de inkübe edilecektir. Elde edilen bakteri solüsyonunun konsantrasyonu sdH₂O ile 107 cfu/ml olacak şekilde ayarlanacaktır. KB besi yerine (20 g L⁻¹ Pepton; 1.5 g L⁻¹ K₂HPO₄; 1.5 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O; 10 ml L⁻¹ gliserol; 16 g L⁻¹ agar) (King 1954) ekimi yapılan endofitik çay bakterileri 24 saat geliştirildikten sonra KOH testine tabii tutularak gram reaksiyonları saptanacaktır. İzolatlar bitki patojeni olmalarına karşı tütünde Hypersensitif Reaksiyon (HR) testine tabi tutulacaktır. (Schaad ve ark. 2001).

4.7.1 Azot Fiksasyon Potansiyelinin belirlenmesi

Çay-endofitik bakteri izolatlarının atmosferik azotu bağlayabilme yetenekleri azot içermeyen Jensen besiyerinde (gelişimine göre değerlendirilecektir. İzolatlar besi ortamına 3 tekerrürlü olarak inokule edilecek 28 derecede 8 gün inkübasyondan sonra besi yerinde gelişim gösteren izolatlar azot bağlama yönünden pozitif kabul edilecektir (Ahmad ve ark., 2008; Bashan ve ark, 1993).

4.7.2 Fosfor Çözme Potansiyelinin belirlenmesi

Çay-endofitik bakteri izolatlarının fosfor çözme kabiliyeti Pikovskaya besi yerinde 25 derecede 10 gün inkübe edilen izolatlardan kolonileri etrafında “halo zone” sergileyen bireyler pozitif (fosfat çözen) olarak değerlendirilecektir. Bu bireylerin arasındaki fark Kumar ve Ram, (2014) tarafından bildirilen fosfat çözme etkinliği indeksi [(halo zone gelişim çapı – koloni çapı) / (koloni çap) x 100] kullanılarak hesaplanacaktır.

4.7.3 Siderofor Sentezi Potansiyelinin belirlenmesi

Çay-endofitik bakteri izolatlarının siderofor sentezi potansiyeli Pérez-Miranda ve ark., 2007 tarafından bildirildiği gibi hazırlanan Chrome azurol S (CAS) ortamının 10 ml’si agar üzerinde geliştirilen bireysel izolatların üzerine uygulanacaktır. Mavi renkli CAS ortamının açık turuncuya dönüşümü siderofor üretim fonksiyonunun ölçütü ve renk dönüşümün turuncu-sarı arasındaki değişimi ise siderofor üretim düzeyinin ölçütü olarak değerlendirilecektir (Kataoka ve ark., 2017).

4.7.4 İzolatların Indol-3-asetik asit (IAA) Sentezi Potansiyelinin belirlenmesi

Çay-endofitik bakteri izolatlarının IAA üretim performansını belirlemek için bireysel izolatlar IAA üretim ortamında (30 g glikoz, 2 g beef extract, 3 g CaCO₃, 1 mM triptofan-pH 7, 1 L destile su) 4 gün boyunca 25 derecede gelişime alınacak, takiben 9000 rpm ‘de 10 dk süre ile santrifüj edilecektir. Üst fazın 300 µl’si 1.2 ml Salkowski ayracı (%2’lik 0.5M FeCl₃, %35 perklorik asit) ile reaksiyona alınarak oluşan renk reaksiyonu 535 nm dalgaboyunda okunacaktır (Acuña et al., 2011).

4.7.5 İzolatların 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) Deaminaz Potansiyelinin belirlenmesi

Çay-endofitik bakteri izolatlarının ACC deaminaz aktivitesi Penrose ve Glick (2003)’e göre Dworkin ve Foster (DF) besiyeri kullanılarak gerçekleştirilecektir. Azot kaynağı içermeyen bu ortam negatif kontrol (NK) olarak kullanılacaktır. Pozitif kontrol (PK) için aynı içeriğe 2 g L-1 (NH₄)₂SO₄ azot kaynağı eklenecektir. ACC-deaminaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla azot kaynağı ((NH₄)₂SO₄) yerine 6 mM steril ACC solüsyonu (filtre edilerek sterilize edilmiş) hazırlanmış ve bu solüsyon (NH₄)₂SO₄ içermeyen katı besiyeri yüzeyine 100 µL eklenerek yayılacaktır. ACC oda sıcaklığında tamamen kuruduktan sonra test edilecek izolatlar çizgi ekim yöntemiyle ekilecektir. Petriler 28 derecede 48-72 saat inkübe edilerek koloni gelişimi gözlenecek ve ACC ilave edilmiş ortamda gelişen fakat NK’de gelişmeyen izolatlar yeniden besi ortamlarına ekimleri yapılacaktır. İkinci aşamada benzer şekilde gelişimi gösteren izolatların ACC deaminaz üretim yeteneğinin olduğu kabul edilecektir. Yukarıda detayları verilen akselik koşullarda gerçekleştirilen biyokimyasal testlerde en yüksek ölçüm değerlerini gösteren izolatlardan bitkili deneysel çalışmalarda kullanmak üzere bir “çaya faydalı endofitik” (ÇFE) bakteri koleksiyonu oluşturulacaktır.

4.8 Çaya Faydalı Endofitik Bakterilerin Bitkili Koşullarda Performans Değerlendirmesi

Oluşturulan ÇFE koleksiyonundan seçilen bireylerin çay verimi ve kalitesini destekleme özelliklerini ortaya koymak için sera ve çaylık denemeleri gerçekleştirilecektir.

4.8.1 Sera Denemesi

ÇAYMER tarafından temin edilecek farklı klonlara ait çay çelikleri peat-perlit (%50 v/v) karışımından oluşan ortamlara şaşırtılarak köklendirmeye bırakılacaktır. Köklendirilen çay fideleri Rize koşullarından toplanan çay toprağı kullanılarak tesadüf parselleri deneme desenine göre saksı denemesi kurulacaktır. Denemede farklı ÇFE bakterilerinin (bireysel ve konsorsiyum uygulamalarının) çay verimi ve kalitesi üzerindeki etkileri çaya verilen dozlarda kimyasal ve organik gübre (ticari kompost) ve kontrol (sadece çay) uygulamaları ile kıyaslanacaktır.

4.8.2 Çaylık Denemesi

Sera denemesinden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi sonucunda sadece en iyi performansı gösteren bir ya da iki ÇFE bakteri uygulaması ÇAYMER koşullarında farklı klonlardan oluşan çaylıklarda gerçek koşullarda denemeye tabii tutulacaktır. Sera çalışmasına benzer şekilde farklı ÇFE bakterilerinin (bireysel ve konsorsiyum uygulamalarının) çay verimi ve kalitesi üzerindeki etkileri çaya verilen dozlarda kimyasal ve organik gübre (ticari kompost) ve kontrol (sadece çay) uygulamaları ile kıyaslanacaktır.

4.8.3 Çaylık Denemesi

Yukarıda ifade edilen sera ve çaylık çalışmalarında en iyi performansı gösteren uygulamalarda yer alan ÇFE bakterilerin tespiti DNA sekans analizi ile belirlenecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Proje önerisinin temel düşüncesi çay bitkisi içinde yaşam süren faydalı bakterilerden biyogübre elde edilmesi ve bunun çayın verim ve kalite özelliklerini artırması düşüncesine dayanmaktadır. Konvansiyonel tarım anlayışı içinde tarımsal kimyasalların (özellikle sentetik gübrelerin) yoğun olarak kullanılmasından dolayı tarım toprakları giderek vasıflarını kaybetmektedir. Bu açıdan toprağı korumaya yönelik yaklaşımlar arasında daha az ya da hiç kimyasal kullanmamaya dayanan organik toprak uygulamaları kamu ve akademik çevrelerden büyük ilgi görmektedir. Bu uygulamalar içinde bitki gelişimini destekleyen faydalı mikroorganizmalar içeren “biyogübreler”in satış değerleri günümüzde milyon dolarlarla ifade edilirken 2025’te milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir. Genel fikir birliği 2019-2027 arasında dünya biyogübre pazarının yıllık % 10-12 artış göstereceği yönündedir.

Diğer yandan Türkiye biyogübre sektörü büyük oranda ithalata dayanmaktadır ve yerli üretimler muadili ithal ürünleri ile rekabet edememektedir. Her ne kadar yerli biyogübre üretimine yönelik kamu, üniversite ve özel sektör girişimleri olsa da standart kalitede ürün elde etme, uygulama zorlukları ve zorlu toprak koşulları gibi nedenlerle sıkıntılar yaşanmakta ve yerli biyogübre pazarı oluşmamaktadır.

Bitkinin sadece rizosferini değil endofitik olarak adlandırılan bitkinin aynı zamanda yaprak, sap ve kök içi mikroorganizmalar kullanılacaktır. Örnekleme, genç çay bitkileri üzerinde yapılacaktır. Tespit yöntemi olarak ise kültür bazlı yöntem yerine metabarkodlama yöntemini yani tek bir örnekleme ve DNA izolasyonu sonrasında tüm mikrobiyomu tür seviyesinde tespitine olanak veren yeni nesil bir yöntem kullanmayı amaçlıyoruz. Metabarkodlama yöntemi ile elde edilen veriler

çeşitli biyoinformatik yöntemler ile analiz edilecek ve takip eden literatür taraması sonrasında ise kültürlenmeye ve bitki gelişimine en uygun suşlar seçilip bu suşlar üzerinde kültür optimizasyon deneyleri gerçekleştirileceğiz.

Projemizin ilerleyen iş paketlerinde kültüre edilen türleri doğa dostu ve geri dönüşümü destekleyen organik atık kompostları ile zenginleştirilerek katı bir gübre karışımı elde etmeyi öngörmekteyiz. Ürünümüzün bitki türüne (çay) spesifik olması onun bir diğer özgünlüğünü ve potansiyelini göstermektedir. Sloganımız olan “Kişiye özel ilaç, bitkiye özel gübre” ‘nin de vurguladığı gibi ürünün gelecekte aynı iş akışı ile farklı bitkilere uygulanabilirliği gelecek vaat etmektedir.

Proje önerisi gerek biyogübre materyali olan faydalı bakterileri farklı bir bilimsel yaklaşımla (rizosfer toprağı yerine bitki-içi yaşam alemi) elde etme düşüncesi ve gerekse çay tarımı gibi problemleri olan (toprak asitleşmesi, genetik kirlilik, yüksek kimyasal gübre tüketimi ve bunlara bağlı düşük verim ve kalite) bir üretim sektöründe bu düşünceyi hayata geçirmeyi hedeflemesiyle yenilikçidir. Literatür ve pazar araştırmaları sonucunda Türkiye’de bir ilk olacaktır.

Son olarak Avrupa Yeşil Mutabakatı, Paris İklim Anlaşması gibi uluslararası anlaşmalara uygunluğun yanında BM'nin sürdürülebilir kalkınma hedeflerinden 12 tanesine ulaşarak uygun bir iş modeli ve ürünle rakiplerimizden avantajlı konumdayız.

Rakip Analizi



6. Uygulanabilirlik

Projenin hayata geçmesi farklı çay klonlarından elde edilen çaya faydalı endofitik (ÇFE) bakterilerin gerçek çaylık koşullarında göstereceği performans sonrasında ticari ölçekte üretilmesi ile mümkün olacaktır. Buna göre çay bitkisinden izolasyon ve biyokimyasal laboratuvar testleri (6-12 ay) ve sera ve çaylık deneme (6-12 ay) süreçleri sonrasında ticari ölçekte üretime geçilebilecektir. Projemiz THS-2 seviyesinde (teknoloji konsepti veya uygulaması formüle edildi) olup, proje sonucunda THS-6 seviyesine (sistem/alt sistem modeli ya da prototipi, uygun çevresel ortamda gösterildi) ulaşacağı öngörülmektedir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Proje fikrinin ilk iş paketi, “çaya faydalı endofitik bakteri preparatı” elde etmektir. Bu preparat bireysel bir bakteriden oluşabileceği gibi birkaç bakteri içeren bir suni konsorsiyum da olabilir. Projenin ilerleyen iş paketlerinde bilimsel deneyler boyunca elde edilen bulgulara bağlı olarak bir biyoreaktör kullanılarak ticari ölçekte üretilmesi ve sıvı ya da katı bir taşıyıcı materyale yüklenerek raf ömrü olan bir ürüne dönüştürülmesidir. Preparattan katı ya da sıvı biyogübre ürüne dönüşüm için 150-200 bin TL.

Projede çay klonlarının temini, sera-fide denemeleri ve saha (çay bahçesi) çalışmaları için RTÜ ÇAYMER ile iş birliği yapılarak koşullarından faydalanılacak olması maliyeti düşürecek en önemli dayanaklardan biridir. Ayrıca elde edilen çaya faydalı endofitik (ÇFE) bakterilerin tanımlama aşamasında Ankara Üniversitesi Teknokent’te yer alan Agrigenomics Hub (AgriGx) Hayvan ve Bitki Genomik Araştırmaları İnovasyon Merkezi koşullarından destek alınacaktır.

Tablo 7.1 Zaman Çizelgesi

| İP No | İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri | Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirileceği | Zaman Aralığı (... Ay) | Başarı Ölçütü ve Projenin Başarısına Katkısı |
|-------|---|---|------------------------|--|
| 1 | Çaydan endofitik (bitki-içi) bakteri izolasyonu | Atakan Pipilos Umut Ferhat Başpınar Atakan Yıldız | 3 ay | %30 |
| 2 | Biyokimyasal testler ve ÇFE bakteri koleksiyonu elde etme | Atakan Pipilos Umut Ferhat Başpınar Atakan Yıldız | 3 ay | %30 |
| 3 | Fide-sera denemesi | Atakan Pipilos Umut Ferhat Başpınar Atakan Yıldız Deniz Sapaz | 5 ay | %10 |
| 4 | Çaylık denemesi | Atakan Pipilos Umut Ferhat Başpınar Atakan Yıldız Deniz Sapaz | 5 ay | %20 |
| 5 | ÇFE bakterilerinin tanımlanması | Atakan Pipilos Umut Ferhat Başpınar Atakan Yıldız | 2 ay | %10 |

Proje planınıza bağlı olarak maddi yönden hangi harcamaları hangi dönemde yapılacağı dönemsel harcama planı şeklinde tablo ile belirtilmelidir.

-İP-1: M-3

-İP-2: M-1, M-3, M-4

-İP-3: M-5

-İP-4: M-5

-İP-5:

- M-1: Akselik kültür çalışmalarında kullanılmak üzere selektif besiyerleri (ya da besiyeri kimyasalları),
- M-2: biyokimyasal test gereksinimleri (renk reaksiyonu oluşturan kimyasallar ve standartlar)
- M-3: Cam ve plastik sarf malzeme (steril petri, erlen, şişe, spatül, naylon/kâğıt poşet, plastik kutu, muhtelif konteyner vs)
- M-4: Akselik kültür çalışmalarında kullanılmak üzere temel cihazlar (ısıtıcılı alkalıyıcı, vorteks karıştırıcı, pH metre prob vs)
- M-5: Sera ve aylık çalışmalarında kullanılmak üzere saksı, viyol, perlit, torf, kimyasal gübre, kompost

Tablo 7.2.1 Projede İzolasyon ve PCR aşamasında kullanılacak malzeme listesi

| Malzeme Adı | Kullanım Amacı | Miktarı ve Birimi | Miktarın Gereelendirilmesi |
|--|------------------------|----------------------------------|---|
| EurX GeneMATRIX Tissue&Bacteria DNA Purification Kit | Bakteri DNA izolasyonu | 5 | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| IsoLab Ethanol | Bakteri DNA izolasyonu | 1 x 5L | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| Omni International 1.4mm Ceramic Bead Media | Bakteri DNA izolasyonu | 1 Kutu (325 gr) | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| Parafilm | Bakteri DNA izolasyonu | 1 Adet 00 mm x 38 Mt 1 x Rulo | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| Safe-Lock Tubes 2 mL | Bakteri DNA izolasyonu | 2 Adet (Birim miktarı 1000) | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| Safe-Lock Tubes 1.5 mL | Bakteri DNA izolasyonu | 2 Adet (Birim miktarı 1000) | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| PCR tubes 0.2 ml | Bakteri DNA izolasyonu | 5 Adet (Birim miktarı 1000) | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| Vertex 10 uL Sterile Tips | Bakteri DNA izolasyonu | 3 Adet (Birim miktarı 1000) | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| Vertex 100 uL Sterile Tips | Bakteri DNA izolasyonu | 3 Adet (Birim miktarı 1000) | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| Vertex 200 uL Sterile Tips | Bakteri DNA izolasyonu | 3 Adet (Birim miktarı 1000) | Alınan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |

| | | | |
|--|-------------------------|-----------------------------|--|
| Vertex 1000 uL Sterile Tips | Bakteri DNA izolasyonu | 3 Adet (Birim miktarı 1000) | Ahnan örneklerden bakteri DNA izolasyonu |
| Thermo Scientific GeneRuler 50 bp DNA Ladder | Bakteri DNA Görüntüleme | 1 Adet (2 ml) | İzole edilen bakteri DNA'larının boyut tayini |
| Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder | Bakteri DNA Görüntüleme | 1 Adet (2 ml) | İzole edilen bakteri DNA'larının boyut tayini |
| Thermo Scientific GeneRuler 1000 bp DNA Ladder | Bakteri DNA Görüntüleme | 1 Adet (2 ml) | İzole edilen bakteri DNA'larının boyut tayini |
| Thermo Scientific Loading Dye | Bakteri DNA Görüntüleme | 1 Adet (2 ml) | İzole edilen bakteri DNA'larının boyanma işlemi |
| Gel | Bakteri DNA Görüntüleme | 1 Adet (500 gr) | İzole edilen bakteri DNA'larının yürütülmesi için gerekli görüntüleme jeli |
| 50X TAE Buffer | Bakteri DNA Görüntüleme | 1 Adet (1 L) | İzole edilen bakteri DNA'larının yürütülmesi için gerekli görüntüleme jeli |

Tablo 7.2.2 Projede bakteri kültür ve optimizasyonu aşamasında kullanılacak malzeme listesi

| Malzeme Adı | Kullanım Amacı | Miktarın Gerekçelenirilmesi |
|---------------------------|-----------------|--|
| Trypticase Soy Agar (TSA) | Bakteri Kültürü | Katı bakteri kültürü oluşturma |
| Lysogeny broth (LB) | Bakteri kültürü | Katı ve sıvı bakteri kültürü oluşturma |
| Petri Kabı | Bakteri kültürü | Katı bakteri kültürü oluşturma |
| İnokulasyon çubuğu | Bakteri kültürü | Katı bakteri kültürü oluşturma |
| Maltoz | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Glikoz | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Galaktoz | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Fruktoz | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Sakkaroz | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |

| | | |
|------------------------------|-----------------------|---|
| Nişasta | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Selüloz | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Kazein | Bakteri kültürü | Kültüre edilen bakterilerin -40'ta saklanması |
| Yeast extract | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Peptin | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| NaCl | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Erlenmayer (500ml) | Bakteri kültürü | Bakteri kültür optimizasyonu |
| Spektrofotometre lm Kveti | Bakteri miktar tayini | Bakteri kültür optimizasyonu |

Tablo 7.2.3 Projede alınacak hizmet listesi

| Hizmet | Kullanım Amacı | Hizmet Alınan Kurum |
|---------------------------|--|---------------------|
| Yeni Nesil Dizileme (NGS) | Mikrobiyom 16s amplikon dizileme | Agrigenomics Hub |
| Biyoinformatik Analizler | Mikrobiyom 16s Amplikon dizi bilgisi manipülasyonu | Agrigenomics Hub |

ay sektöründe FE bakterileri üzerinden bir biyogübre elde edilmesi ile ilgili bir proje mevcut değildir. Proje diğer biyogübre ürünleri ile rekabete gireceği husus içerisinde yer alan faydalı bakterilerin çay bitkisinin içinde aktivite gösterecek olması nedeniyle hem yapraktan hem de topraktan uygulanabilecek olmasıdır. Preparattan katı ya da sıvı biyogübre ürüne dönüşüm için talep edilen destek toplamı 150-200 bin TL'dir.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Projenin hedef kitle si çay tarımında faaliyet gösteren küçük ya da büyük ölçekli çay çiftçileri ve çay üreten özel şirketlerdir. Türkiye kısıtlı çay üretim alanlarına rağmen, 1961 yılında çay ekim alanı büyüklüğü ile dünyada onikinci sıradayken, 2011 yılında sekizinci sıraya yükselmiş ve 1961'de dünyadaki toplam çay tarım alanlarının %1,1'ini oluştururken, 2011'de bu oran %2,3'e ulaşmıştır. Türkiye'nin 2010 yılı için dünya çay pazar payı yaklaşık binde 2'ye yaklaşmaktadır. Ülkemizde ay üretiminin illere göre dağılımını yapacak olursak ilk sırada Rize ilinin olduğu bunu Trabzon ve Artvin'in izlediği görülmektedir. aykur 2015 çay sektörü raporuna göre Doğu Karadeniz'de 762.413 dekarlık alanda 209.084 üretici çay tarımı yapmaktadır. Dolaylı ve direkt olarak istihdam yaratıcı özelliği ile çay ülke ekonomimize yılda yaklaşık 5 milyar dolar katma değer sağlamaktadır (Anonim, 2015). ay tarım alanlarında 2016 yılında yapılan kadastro çalışmaları sonucunda çay tarımı yapılan alan büyüklüğü 830.000 dekar olarak yenilenmiştir.

9. Riskler

| İP No | En Önemli Riskler | Risk Yönetimi (B Planı) |
|-------|---|--|
| 1 | Seçilen çay klonlarından elde edilecek endofitik bakteri sayısı M&M kısmında ifade edilen biyokimyasal laboratuvar (bitkiye faydalılık) testlerinde beklenen performansı göstermeyebilir. | Bu durumda farklı çay klonları denenerek ÇFE bakteri koleksiyonu genişletilmeye çalışılacaktır. |
| 2 | Farklı çay klonlarından elde edilen ÇFE bakteri bireyleri sera ve saha çalışmalarında hangi yollardan bitkiye girebileceği bilinmemektedir. | Bu durumu aşmak için deneysel çalışmalarda hem yaprakтан hem de topraktan uygulamalar gerçekleştirilecektir. |

10. Proje Ekibi

Takım Lideri: Atakan Yıldız

Danışman: Prof. Dr. Oğuz Can Turgay

| Adı Soyadı | Görevi | Okul | Projeyle veya ilgili tecrübesi |
|-------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------------|
| Atakan Yıldız | İş Geliştirici/ Araştırmacı | Ankara Üniversitesi Biyoloji (İngilizce) lisans | Laboratuvar ve TÜBİTAK Projeleri |
| Atakan Pipilos | Teknik Uygulayıcı/Araştırmacı | Ankara Üniversitesi Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans | Laboratuvar ve TÜBİTAK Projeleri |
| Deniz Sapaz | Tasarımcı/Pazarlamacı | Ankara Üniversitesi Siyaset Bilimi ve Kamu Yönetimi lisans | TÜBİTAK Projeleri |
| Umut Ferhat Başpınar | Teknik Uygulayıcı/Araştırmacı | Ankara Üniversitesi Biyoloji (İngilizce) lisans | Laboratuvar ve TÜBİTAK Projeleri |

11. Kaynaklar

1. Acuña, J.J., Jorquera, M.A., Martínez, O.A., Menezes-Blackburn, D., Fernández, M.T., Marschner, P., Greiner, R., Mora, M.L., (2011). Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 11(3): 1-12.
2. Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S., (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities, *Microbiological Res.*, 163, 173-181.
3. Bashan Y., Holguin G., Lifshitz R., Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Fla, 1993, 331-345.
4. Borah, A., Das, R., Mazumdar, R., and Thakur, D. (2019). Culturable endophytic bacteria of *Camellia* species endowed with plant growth promoting characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 127, 825–844. doi: 10.1111/jam.14356

5. Hazarika, S. N., and Thakur, D. (2020). "Actinobacteria," in *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*, eds N. Amareesan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, and A. Sankaranarayanan (Cambridge, MA: Academic Press), 443–476.
6. Kataoka Ryota, Esra Güneri, Oguz Can Turgay, Ahmet Emre Yaprak, Bahar Sevilir, Isa Başköse. 2017. Sodium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria isolated from a halophyte, *Salsola grandis*, in saline-alkaline soils of Turkey. *Eurasian J. Soil Sci.* 6 (3) 216-225.
7. Kumar, G. Kranthi ve M. Raghu Ram. 2014. Phosphate Solubilizing Rhizobia Isolated from *Vigna trilobata*. *American Journal of Microbiological Research*, 2014, Vol. 2, No. 3, 105-109 DOI:10.12691/ajmr-2-3-4.
8. Özyazıcı M.A., Dengiz, O., Aydoğan M. 2013. Çay Yetiştirilen Tarım Topraklarının Reaksiyon Değişimleri ve Alansal Dağılımları. *Toprak Su Dergisi*, Cilt 2 Sayı 1 (23-29)
9. Rosenblueth, M., and Martínez-romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 827–837. doi: 10.1094/MPMI-19-0827
10. Saharan, B.S., Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review *Life Sciences and Medicine Research*, Volume 2011: LSMR-21 1
11. Ural, N. (2004). Tea agriculture and sector <http://www.biriz.biz/cay/caysorun.htm>. (01.04.2013). (Turkish)
12. Xie, S., Feng, H., Yang, F., Zhao, Z., Hu, X., Wei, C., et al. (2019). Does dual reduction in chemical fertilizer and pesticides improve nutrient loss and tea yield and quality? A pilot study in a green tea garden in Shaoxing, Zhejiang Province, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 2464–2476. doi: 10.1007/s11356-018-3732-1
13. Yüksek, T., Göl, C., Yüksek, F. ve Yüksel, E.E. 2009. The Effects of Land-Use Changes on Soil Properties: The Conversion of Alder Coppice to tea Plantations in the Humid Northern Blacksea Region. *African Journal of Agricultural Research*. 4, 7, 665-674.
14. Zenginbal, H. 2013. Rize ili bahçe bitkileri yetiştiriciliğinde çay tarımının yeri, sorunları ve çözüm önerileri. *Türkiye çay yetiştiriciliğinin sorunları ve öncelikleri. II. Rize Kalkınma Sempozyumu Bildiri kitabı*, 101-113. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Yayınları, 64-101, ISBN – 978-605-89443-6-7
15. Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A, Kopriva S. 2017. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Front. Plant Sci.* 8:1617. doi: 10.3389/fpls.2017.01617.
16. Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Smith DL. 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9. doi:10.3389/fpls.2018.01473.
17. Sharma A, Verma RK. 2018. Root–Microbe Interactions: Understanding and Exploitation of Microbiome. *Root Biology*. 323–339. doi:10.1007/978-3-319-75910-4.