



Tuz stresi altında gelişen bitkilerden izole edilen endofit bakterilerin bazı bitki gelişimini teşvik etme mekanizmalarının ve hıyar fide gelişimine etkilerinin belirlenmesi

Determination of some plant growth promoting mechanisms of endophytic bacteria isolated from plants grown under salt stress and their effects on cucumber seedling growth

Ümmügülsüm OLUR¹, Ceylan Pınar UÇAR¹, Ahmet AKKÖPRÜ²

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı 65080 Tuşba, Van, Türkiye.

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü 65080 Tuşba, Van, Türkiye.

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Makale tarihi / Article history:

DOI: [10.37908/mkutbd.954216](https://doi.org/10.37908/mkutbd.954216)

Geliş tarihi / Received: 18.06.2021

Kabul tarihi / Accepted: 24.08.2021

Keywords:

Plant growth, salt stress, siderophore, phosphatase, cucumber.

Corresponding author: Ahmet AKKÖPRÜ

✉: ahmetakkopru@yyu.edu.tr

Ö Z E T / A B S T R A C T

Aims: Endophytic bacteria (EB) may contribute to plant growth and health in plants growing under stress. In this context, the study aimed to isolate endophytic bacteria from wild plants grown under saline conditions and determine plant growth-promoting (PGP) mechanisms and evaluate their effects on cucumber plant biomass.

Methods and Results: Different isolates of EB were isolated from plants growing in a natural salt source area in the Lake Van basin. In order to determine the PGP properties of these isolates; ability to dissolve phosphate, ACC-D activity, siderophore production and growth at different salt (NaCl) concentrations of these isolates were investigated. Their effects on plant growth were tested on cucumber plants under climatic chamber conditions. The 62 EBs were isolated from 26 plants belonging to *Amaranthaceae*, *Poaceae*, *Zygophyllaceae*, *Fabaceae*, and *Chenopodiaceae*, *Hypericaceae* families. It was determined that 40% of these isolates had phosphatase activity and 97% had the ability to produce siderophores. Furthermore, it was determined that 92% of the isolates could grow at 0.85M, 58% at 1.28M, 8% at 1.7M and only one isolate could grow at 2.56M of NaCl concentration. Some EB isolates significantly increased the plant shoot and root fresh and dry weight.

Conclusions: Plants growing under stress in nature have a very high potential in terms of hosting bacteria that can contribute to their struggle in adverse environmental conditions and support plant health and growth.

Significance and Impact of the Study: Obtained PGPR isolates with certain characters able to survive under stress, it has been observed that the preference of plants growing under pressure may increase the chance of success.

Atıf / Citation: Olur Ü, Uçar CP, Akköprü A (2021) Tuz stresi altında gelişen bitkilerden izole edilen endofit bakterilerin bazı bitki gelişimini teşvik etme mekanizmalarının ve hıyar fide gelişimine etkilerinin belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(3) : 635-648. DOI: [10.37908/mkutbd.954216](https://doi.org/10.37908/mkutbd.954216)

GİRİŞ

Bitkiler doğada biyotik ve abiyotik stres faktörleri ile baş edebilmek için çeşitli mekanizmalara sahip olmalarının yanı sıra çevrelerinde bulunan bazı

mikroorganizmalardan yardım da alabilirler. Bu organizmalar arasında bakteriler en önemli grubu oluşturmaktadır. Bitki için olumsuz etkisi olmayan ve bitki gelişimini teşvik eden bakteriler “bitki gelişimini teşvik eden kökbakterileri /bakteriler” (Plant Growth

Promoting Rhizobacteria/Bacteria – PGPR/PGPB olarak ifade edilir (Hallmann ve ark., 1997; Azevedo ve ark., 2000; Rosenblueth ve Martínez-Romero 2006; Ryan ve ark., 2008; Romano ve ark., 2020). PGPB bitkilerde kolonize olma özelliklerine göre; i) bitki yüzeyinde yaşayan epifit bakteriler, ii) yaşamlarının bir döneminde bitki iç dokularında kolonize olabilen endofit bakteriler olarak iki gruba ayrılabilir. Endofit Bakteriler (EB); yüzey dezenfeksiyonu yapılmış bitki dokularından veya bitkilerin iç kısımlarından izole edilebilen, vasküler dokuları ile bitkinin tamamına yayılabilen, konukçuya zarar vermeden yaşamının en azından bir bölümünü bitki bünyesinde geçiren mikroorganizmalar olarak tanımlanır (Hallmann ve ark., 1997; Sülü ve ark., 2016; Hardoim ve ark., 2011). Lokal ya da sistematik olarak iç dokularında kolonize olabilen endofit bakteriler; meyve, çiçek, yaprak, gövde, kök ve tohumlardan izole edilebilirler (Lilley ve ark., 1996; Ryan ve ark., 2008; Duman ve Soylu, 2019). EB'in bitkilerdeki yaygınlığının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda test edilen tüm bitkilerde varlıkları tespit edilmiştir (Surette ve ark., 2003; Duman ve Soylu, 2019). EB'ler bitki sağlığı ve gelişimine PGPB ile benzer mekanizma ve yollarla doğrudan ya da dolaylı olarak katkı sağlayabilirler (Saharan ve Nehra, 2011; Pieterse ve ark., 2014; Santoyo ve ark., 2016; Aktan ve Soylu, 2020). PGPB temel besin maddelerinin alımını arttırarak ya da kullanılabilir formda dönüştürerek, bitki hormon seviyesini modüle ederek ya da fotosentezi arttırarak bitkiye doğrudan katkı sunabilir (Pieterse ve ark., 2014; Santoyo ve ark., 2016). Ayrıca, bazı PGPB, bitkilerde etilenin öncüsü olan 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) bileşimini parçalayan bir enzim olan ACC-Deaminaz (ACC-d) üretimi yoluyla zararlı etilen seviyesini düşürerek bitkiye katkıda bulunabilir (Glick, 2014). Öte taraftan antagonizm, rekabet veya savunma sistemlerini uyarma yoluyla biokontrol ajanı olarak hareket edebilir. Simbiyotik ilişkileri teşvik ederek ya da ksenobiyotikleri etkisizleştirerek bitkiye dolaylı olarak katkı sağlayabilirler (Antoun ve Prévost, 2006; Saharan ve Nehra, 2011; Santoyo ve ark., 2016).

Epifitik PGPR'lardan farklı olarak endofitler iç dokularında yaşamlarından dolayı bitkiyle daha yakın bir ilişki kurabilir ve ürettikleri metabolitler bitki tarafından doğrudan algılanabilir veya alınabilir. Gerek epifit gerekse endofit bakteriler iletim sistemleri yoluyla diğer bitki dokularına ulaşmaları sayesinde uygulandığı bitki dokusu dışındaki alanlarda da birçok mekanizmayla fungal ve bakteriyel hastalık etmeni patojenlerle mücadele avantajına sahiptir (Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Hardoim ve ark., 2008; Bozkurt ve Soylu, 2019; Romano ve ark., 2020; Soylu ve ark., 2020; Atay ve ark., 2020). Ayrıca EB'lerin bitki içinde kolonize olmaları

dış ortamda gelişimlerini sınırlandıran biyotik ve abiyotik faktörlerden korunmalarını sağlayabilir ve uzun süre bitkide varlıklarını sürdürmelerine yardımcı olur (Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Mercado-Blanco ve Lugtenberg, 2014; Akköprü ve ark., 2021).

Bu avantajlarından dolayı EB'in tarımsal üretime aktarılma çalışmaları her geçen gün artmaktadır. Fakat, Antoun ve Prévost (2006) Rhizobakterlerin yalnızca %2-5'nin PGPR potansiyeline sahip olabileceğini bildirmektedir. Bu nedenle başarılı izolatların elde edilmesi EB veya PGPR'ın bitkisel üretime aktarımında en fazla emek ve zaman harcanan süreçlerin başında gelmektedir.

Brader ve ark. (2014) bitki ve bakterilerin ürettiği ve bitki sağlığına katkısı olan bazı metabolitlerin yalnızca bir organizma tarafından üretilmeyeceği, bitki ve mikroorganizma(lar) arasındaki ilişkinin sonucunda üretilebileceğini belirtmiştir. Bu olgu, olumsuz koşullarda popülasyondaki diğer bitkilere nazaran daha sağlıklı olan veya hayatta kalan bitkiler yalnızca kendi genotipik özellikleri veya ürettikleri metabolitler ile fark yaratamayacağı savını güçlendirmektedir. Ayrıca Szymańska ve ark. (2018) ve Ma ve Gong (2013) tuz stresi altında gelişen halofit ve diğer bitkilerdeki bakteri florasının yoğunluk ve çeşitlilik açısından önemli düzeyde değiştiğini belirlemişlerdir.

Bu çerçevede başarılı EB adaylarını tuzluluk stresi altında gelişen bitkilerden elde etme şansının yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu hipotezimizi sınamak için Van Gölü havzasında yer alan çok tuzlu su kaynağının etkisi altında bulunan topraklarda yetişen bitkilerden EB izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatlar PGPR markörlerinden olan; fosfatı çözündürme kabiliyeti, ACC-d aktivitesi, siderofor üretimi ve farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarda gelişim yetenekleri incelenmiştir. Ayrıca izolatların bitki gelişimine etkileri iklim odası koşulları ile doğrudan hıyar bitkisi üzerinde test edilmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Endofit bakterilerin izolasyonu

Çalışmada kullanılan endofit bakteriler Van ilinin Tuşba ilçesine bağlı Gedikbulak (Timar) mahallesinde (38.39 N - 42.83 E) bulunan ve doğal tuz elde etmek amacıyla aktif şekilde kullanılan çok tuzlu su kaynağının etkisi altında olan topraklarda gelişen bitkilerden izole edilmiştir (Şekil 1) (Olur, 2020). Bitkilerin maruz kaldıkları tuz oranının belirlenmesi amacıyla; su örnekleri alınarak Elektriksel Kondüktivite (EC) metre (Hanna HI 2020-02) yardımıyla EC değerleri ölçülmüştür.

Tuzlu suya maruz kalan toprakta gelişen ve morfolojik olarak sağlıklı görünen Çizelge 1'de belirtilen farklı

familyalara ait yabancı bitki örnekleri köklenip etiketlenerek laboratuvara getirilmiştir. Bu amaçla alınan bitkiler musluk suyu ile yıkanıp toprak kalıntıları uzaklaştırılarak yaprak, sürgün ve kök kısımlarından bisturi yardımıyla 1-2 cm büyüklüğünde örnekler alınmıştır. Hazırlanan örnekler "Tween 20" (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) ilave edilmiş %5'lik sodyum hipokloritte (NaClO₃) 10 dakika, ardından %70'lik etanolde 10 dakika bekletilmiştir. Ardından üç defa steril saf suda 1'er dk. durularak steril kurutma kağıtları arasında kurutulmuştur. Yüze sterilizasyonu yapılan bitki dokuları steril havanda 2-3 mL distile steril su ilave edildikten sora ezilmiş ve elde edilen süspansiyon 10 kat seyreltilip Cycloheximide katkılı TSA (30 g L⁻¹ Tryptic soy broth, 16 g L⁻¹ Agar) ortamına yayma yöntemiyle ekilmiştir. Bakteriyel koloniler gelişene kadar 24 oC' de inkübasyona bırakılmıştır.

Sterilizasyonun başarısını belirlemek için son durulama işleminde kullanılan sudan 0.1 mL alınarak Cycloheximide katkılı (0,01g L⁻¹) TSA ortamına yayılarak ekimi yapılmış ve 24 oC'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda herhangi bir bakteriyel gelişmenin olmaması durumunda yüze dezenfeksiyonunun başarılı bir şekilde yapıldığına karar verilmiştir. Aksi durumda örnek çalışma dışı bırakılmıştır (Babier ve Akköprü 2020).

Başarılı bir şekilde yüze sterilizasyonu yapılmış örneklerin petrilere gelişen kolonilerden morfolojik olarak farklı olanlar alt kültüre alınarak saflaştırılmıştır. Saf koloniler gliserol katkılı NB (Nutrient Broth 8 g L⁻¹, Glycerol 20 mL L⁻¹) ortamına aktarılarak -80 C'de stok olarak saklanmıştır.

EB'lerin bitki gelişimini teşvik etme mekanizmalarının belirlenmesi

İzole edilen endofitik bakteriler King' B (KB) besiyerine (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) ekilmiştir. KB ortamında 24 saat geliştirilen bakteriler KOH testine tabii tutularak Gram reaksiyonları ve 366 nm UV ışık altında floresan özellikleri saptanmıştır. İzolatlar bitki patojeni olmalarına karşı tütünde Hypersensitif Reaksiyon (HR) testine tabi tutulmuştur (Schaad ve ark. 2001).

Fosfatı çözündürme aktivitesinin belirlenmesi

EB'lerin fosforu çözebilme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla NBRIP Agar besiyerinde (10 g L⁻¹ glukoz; 5 g L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂; 0.1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0.2 g L⁻¹ KCl; 0.25 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O; 5 g L⁻¹ MgCl₂ 6H₂O; 15 g L⁻¹ agar; pH 7) birbirine eşit uzaklıkta 4 noktaya ekilmiş ve 14 gün süreyle 24°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Nautiyal,

1999). Bu süre sonunda koloni çevresinde oluşan saydam zonlar ölçülmüştür. Zon yarıçapı; 0-1 mm aralığında olanlar; "+", 1-3 mm için "++", 3 ve üzeri mm olanlar için "+++" şeklinde kategorize edilmiştir.

Siderofor üretimi

Siderofor aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Blue-CAS Agar besiyeri kullanılmıştır. Besi yeri Schwyn ve Neilands, (1987)'nin önerdiği metodun Louden ve ark., (2011) ve Babier ve Akköprü (2020) tarafından yapılan uyarlanması ile elde edilmiştir. EB'lerin 24 saatlik saf kültürleri CAS agar besiyerine birbirine eşit uzaklıktaki dört noktaya ekilmiş, 7 gün 24°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda EB kolonileri çevresinde oluşan sarı bölgelerin yarıçapları mm olarak ölçülerek değerlendirme yapılmıştır.

ACC deaminaz aktivitesinin belirlenmesi

Besi ortamındaki tek azot kaynağı olan ACC 'yi kullanma yetenekleri üzerinden izolatların ACC-deaminaz aktivitesi araştırılmıştır. Bunun amaçla, Penrose ve Glick (2003)'in belirttiği yöntemin uyarlanması ile hazırlanan DF besiyerinden faydalanılmıştır. DF besiyeri: 5 mM (670 mg L⁻¹) malik asit; 2 g L⁻¹ glukoz; 2 g L⁻¹ sitrik asit; 4 g L⁻¹ KH₂PO₄; 6 g L⁻¹ Na₂HPO₄; 0.2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1 µg L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; 10 µg L⁻¹ MnSO₄; 70 µg L⁻¹ ZnSO₄; 50 µg L⁻¹ CuSO₄; 10 µg L⁻¹ MoO₃; 18 µg L⁻¹ agar 121°C'de 20 dk. otoklav edilmiştir. Azot kaynağı içermeyen bu ortam negatif kontrol (NK) olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol (PK) için aynı içeriğe 2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ azot kaynağı eklenmiştir. 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 yayılmıştır. ACC oda sıcaklığında tamamen kuruduktan sonra test edilecek izolatlar çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. Petrilere 28°C'de 48-72 saat inkübe edilerek koloni gelişimi gözlenmiştir. ACC ilave edilmiş ortamda gelişen fakat NK'de gelişmeyen izolatlar yeniden besi ortamlarına ekimleri yapılmıştır. İkinci aşamada benzer şekilde gelişimi gösteren izolatların ACC deaminaz üretim yeteneğinin olduğu kabul edilmiştir.

EB'lerin tuza tolerans düzeylerinin belirlenmesi

Endofit bakterilerin tuz toleransını belirlemek için farklı konsantrasyonlarda %2.5, 5, 7.5, 10, 15 NaCl çözeltisi ilave edilmiş TSA besi yeri hazırlanmıştır. Endofit bakterilerin 24 saat geliştirilen kültürleri farklı konsantrasyonlarda tuz içeren ve içermeyen (NK) besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Petrilere 24°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra

gelişimleri gözlenmiş ve gelişmenin olduğu en yüksek doz eşik kabul edilmiştir (Olur, 2020).

EB'lerin bitki gelişimine etkilerinin belirlenmesi

Elde edilen aday EB'in bitki gelişimine etkilerinin belirlenmesi için standart hıyar (*Cucumis sativus* L.) çeşidi Bursa (Alfa Tohumculuk) kullanılmıştır. Tohumlar musluk suyu yardımıyla yıkanarak koruyucu tohum ilaçlarından arındırılmıştır. Tohumlar 1/1 oranında steril torf ve perlit karışımından oluşan yetiştirme ortamının doldurulduğu viyollere ekilmiştir. Ekilen viyoller 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık periyotta $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa ve %60-65 nem koşullarına sahip iklim odasında gelişime bırakılmıştır.

Kotiledon yapraklar açıldıktan sonra ilk ve gerçek yaprakların açılması sırasında da ikinci EB süspansiyonu (108 CFU/mL) köklere içirme biçiminde (10 mL/fide) uygulanmıştır. EB uygulanmayan bitkiler ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Her endofit bakteri adayı için 10 adet hıyar fidesi kullanılmıştır. Bitkilerin yetiştirme periyodu süresince ihtiyaç duydukları besin haftalık 10mL/Bitki olarak uygulanan Hoagland besin çözeltisi ile karşılanmıştır. Tohum ekiminden 14 gün sonra sürgün ve kök yaş/kuru ağırlıklarına göre bitki gelişim parametreleri değerlendirilmiştir.

Bu amaçla bitkiler kök boğazından kesilerek sürgün yaş ağırlıkları için tartılmıştır. Kökler yetiştirme ortamı kalıntılarının yıkanarak uzaklaştırılmasından sonra kurutma kağıtları yardımıyla fazla suları alınarak tartılmıştır. Yaş ağırlıkları alınan sürgün ve kök örnekleri 65°C 'de 48-72 saat kurutularak kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

Verilerin analizi

In vitro çalışmalar 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 2 petri olacak şekilde dizayn edilmiştir. In vivo bitki çalışmaları ise her uygulama grubunda en az 7 en fazla 12 bitki ile yapılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Çalışmalar ile elde edilen veriler SAS programı yardımıyla DUNCAN çoklu karşılaştırma testine göre $P<0,05$ önem aralığı düzeyinde analiz edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Endofit bakteri izolatların izolasyonu

Yürütülen çalışmada tuz stres altında gelişen yabancı bitkilerden endofit bakteri izolasyonu yapılarak bazı PGP karakterleri belirlenmeye çalışılmıştır. Stres kaynağı olan tuzlu suyun Elektriksel Kondüktivite (EC) değeri 39.42

mS/cm ile "çok tuzlu su" kategorisine girdiği belirlenmiştir. Tuzlu suya maruz kalan bu bölgeden farklı familyalara ait 26 bitki örneği alınmıştır (Çizelge 1). Örnekler kanalların kenarında ve tuz havuzlarının yakın çevresinde tuz stresine maruz kalmış olmasına dikkat edilerek toplanmıştır (Şekil 1a). Yapılan izolasyon işlemlerinden sonra toplam 69 EB izole edilmiştir. Yedi izolat tütünde HR oluşumuna neden olmasından dolayı patojen olma ihtimaline karşı elenerek sonraki testlere tabi tutulmamıştır. Aday EB'in 25'i kökten, 24'ü yapraktan ve 13'ü gövdeden izole edilmiştir (Şekil 1b). Stres faktörüne karşı başarılı PGPR adayı elde etme sürecinde aynı veya benzer stres baskısı altında gelişen bitkilerde yapılacak çalışmalar ile başarı şansının artırılabilceği ön görülmektedir. Navarro-Torre ve ark. (2017) bitkilerin aşırı tuzluluğa karşı yüksek toleransında bakterilerin önemli bir rol oynayabileceğini ileri sürmektedir. Buna paralel olarak Szymańska ve ark. (2018) balofitik bitkilerle ilişkili endofitik bakterilerin bitki büyümesini teşvik edebileceğini belirtmiştir. Mesa ve ark. (2015) ise ağır metal kirliliğinden kaynaklanan tuz stresi koşullarında gelişen bitkilerden EB izole etmiş ve bu bakterilerin benzer koşullardaki bitkilerin gelişimine çeşitli yollar ile katkılarının olabileceğini ortaya koymuştur.

Bu gibi çalışmalarda işgücü ve başarı şansını arttırmak amacıyla birçok yöntem denenmiştir. Bunlardan en yoğun kullanılan yöntem belirli PGPR markör karakterlerin in vitro testler ile araştırılarak başarılı olanların seçimine dayanmaktadır. Benzer yaklaşımla Zinnel ve ark. (2002) 853, Babier ve Akköprü (2020) 191 endofitik bakteri türünü izole ederek karakterize etmişlerdir. Bu yönde yapılan çalışmalarda in vitro da markör olarak; azot fiksasyonu, fosforun biyolojik olarak alınabilir hale gelmesi, indol asetik asit üretimi (Lee ve ark., 2004) ve siderofor üretimi (Tsavkelova ve ark., 2007; Jha ve ark., 2012) gibi karakterler seçilerek test edilmiştir (Babier ve Akköprü 2020). Bu testlerde başarı sağlayan EB'lerin bitki gelişim ve verimi üzerine olumlu etkileri rapor edilmiştir. Böylece önemli düzeyde maliyet ve iş gücü azaltılmıştır. Fakat bu yaklaşımdaki gibi zayıf noktalardan biri PGPR'ın bilinen veya araştırılan karakterler dışında bir etki mekanizması ile etkinlik gösterebilecek olması halinde potansiyel izolatların belirlenemeyeceği gerçeğidir. Bu çerçevede Maggini ve ark. (2019) belirttiği gibi hızlı yöntemler ile aday izolatların in vivo testler ile bitkideki etkilerinin denemesi gerekmektedir.



Şekil 1. EB izolasyonu. a) Endofit bakteri izolasyonunda kullanılan konukçu bitkilerin toplandığı çok tuzlu su kaynağının (EC 39.42 mS/cm) etkisi altında bulunan alanlar. b) EB'lerin izole edildiği bitki dokularına göre dağılımı (%).
Figure 1. EB isolation. a) Areas under the influence of a very salt water source (EC 39.42 mS/cm) where host plants used for endophyte bacteria isolation were collected. b) Distribution (%) of EBs by plant tissues from which they were isolated.

Çizelge 1. EB'lerin izole edildikleri konukçu bitkiler ve ait oldukları tür, cins ve familyalar

Table 1. The host plants from which EBs are isolated and their species, genus and families to which they belong

Sıra No	Bitki Kodu	Bitkinin bağlı olduğu takson (Tür, Cins veya Familya)	Sıra No	Bitki Kodu	Bitkinin bağlı olduğu takson (Tür, Cins veya Familya)
1	T1	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>	14	T19	<i>Zygophyllum fabago</i> ; <i>Zygophyllaceae</i>
2	T2	<i>Eremopoa songarica</i> ; <i>Poaceae</i>	15	T20	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>
3	T3	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>	16	T21	<i>Hypericum sp.</i> ; <i>Hypericaceae</i>
4	T5	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>	17	T23	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>
5	T7	<i>Secale cereale</i> ; <i>Poaceae</i>	18	T25	<i>Zygophyllum fabago</i> ; <i>Zygophyllaceae</i>
6	T8	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>	19	T26	<i>Chenopodium sp.</i> <i>Amaranthaceae</i>
7	T10	<i>Zygophyllumfabago</i> ; <i>Zygophyllaceae</i>	20	G114	<i>Poaceae</i>
8	T11	<i>Astragalus sp.</i> ; <i>Fabaceae</i>	21	G115	<i>Poaceae</i>
9	T12	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>	22	G116	<i>Poaceae</i>
10	T13	<i>Suaeda altissima</i> ; <i>Chenopodiaceae</i>	23	G117	<i>Poaceae</i>
11	T14	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>	24	G118	<i>Poaceae</i>
12	T16	<i>Kochia prostrata</i> ; <i>Amaranthaceae</i>	25	G119	<i>Poaceae</i>
13	T18	<i>Chenopodium sp.</i> ; <i>Amaranthaceae</i>	26	G120	<i>Poaceae</i>

Endofit bakteri izolatların bitki gelişimini teşvik etme mekanizmalarının belirlenmesi

İzolatların morfolojik karakterleri KB besiyerinde 24 saatlik kültürleri baz alınarak yapılmış ve elde edilen bulgular Çizelge 2'de verilmiştir. İzolatların % 75.81'inin Gram (-), % 24.19'nun Gram (+) olduğu ve % 9.67'sinin floresan pigment ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

EB'lerin tuza tolerans düzeyinin belirlenmesi için izolatlar NaCl içeren TSA besiyerinde gelişmeye bırakılmışlardır. En alt limit olan % 2.5 NaCl konsantrasyonunda sadece 1 izolat gelişmemiştir. İzolatların % 92'si % 5 lik NaCl konsantrasyonunda gelişmiş, bunların % 14'ü zayıf gelişme göstermiştir. İzolatların % 8'i zayıf olmakla birlikte % 58'i % 7.5'lük konsantrasyonunda tam gelişme göstermiştir. İzolatların % 8'i % 10 tuz konsantrasyonunda gelişirken, yalnızca T16K1 izolatı % 15 lik tuz konsantrasyonda gelişebilmiştir (Çizelge 2).

Genel olarak izole ettiğimiz endofitlerin tuza farklı düzeylerde tolerans gösterdiği belirlenmiştir. Gilmour (1990) ve Ruginescu ve ark (2020) tuzlu ortamlarda bulunan organizmaları; halotolerant (0 - 0.3M NaCl optimum gelişme ve 0 - 1M NaCl'de gelişebilme yeteneğine sahip olanlar), orta derecede halofilik (0.2 - 2.0M NaCl optimum gelişme ve 0.1 - 4.5M NaCl'de gelişebilme yeteneğine sahip olanlar) ve aşırı derecede halofilik (3 - 5M NaCl optimum büyüme ve 1.5 - 5.5M NaCl'de gelişebilme yeteneğine sahip olanlar) olarak gruplandırmışlardır. Kushner (1993) halofilik bakterilerin Gram pozitif veya Gram negatif, aerobik veya fakültatif anaerobik olabileceğini ve 0.2 ila 5.2 M arasında değişen tuz konsantrasyonlarında gelişebileceklerini göstermiştir. Elde ettiğimiz izolatlardan yalnızca T16K1'nin %15'lik (2.5 M) tuz konsantrasyonunda geliştiği belirlenmiştir. Diğer izolatların ise genel olarak

tuz stresine farklı düzeylerde tolerant oldukları belirlenmiştir. Biyogübre ve biyokontrol ajanı olarak kullanılacak bakterilerin tuzluluk gibi ekstrem koşulları tolere edebilmesi onların farklı ekolojik koşullarda yaşamlarını sürdürebilmelerinde ve etkinlik göstermelerinde önemli bir avantaj sağlayabilir. Halotolerant mikroorganizmaların yüksek tuzluluk koşullarında gelişmek için en önemli stratejilerden biri, organik çözünen maddelerin taşınması ve / veya biyosentezidir (Roberts, 2005). Çoğu halofilik bakteri, farklı çözünen maddeleri hücre içinde muhafaza eder ve bu maddelerin mikroorganizmaları dehidrasyon, ısı, kuruma, donma ve UV radyasyonu gibi farklı stres koşullarına karşı koruyabileceği bildirilmiştir (Roberts 2005; Remonsellez ve ark. 2018). Yapmış olduğumuz çalışmada EB'in fosfat çözündürme yetenekleri NBRIP besiyerinde oluşturulan zonların ölçümü ve kategorizasyonu (Zon çapı 0-1 mm aralığında olanlar; +, 1-3 mm için ++, 3 ve üzeri mm için +++ olarak) ile belirlenmiştir. İzole edilen EB'in % 40'lık kısmının fosfataz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. G115KIT EB 3 mm üzerinde zon çapı oluşturarak en başarılı izolat olmuştur. Fosfat çözündürme yeteneğine sahip izolatların %12.9'u "+" (1-3 mm) ve % 25.8' i "+" (0-1 mm) derecesinde zon oluşturmuştur. Otuz yedi izolatin ise fosfataz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 2). İzolatların siderefor üretim yetenekleri inokulasyondan 7 gün sonra Blue-CAS besiyerinde koloni çevresinde oluşan sarı zon ölçümleri ile belirlenmiştir (Çizelge 2). İzolatların %96.77'sinin Blue-CAS agar ortamında siderefor ürettiği belirlenmiştir. Buna karşılık iki izolat siderefor aktivitesi gösterememiştir. Ortalama 4.5 mm ile en büyük zonu T1K2 ve T18K2 izolatları oluşturmuştur (Çizelge 2). Siderefor üretimi ve fosfatı çözündürme yetenekleri endofitik bakteriler arasında yaygın özelliklerdendir. Genel olarak, PGPR'ler çözünmeyen fosfatları asidifikasyon, şelatlama, mineral çözücü bileşikler, hücre dışı polisakkaritlerin üretimi, organik asitlerin salınması, inorganik asitler ve çeşitli hücre dışı fosfatazlar salgılayarak organik fosfatların mineralizasyonunu gerçekleştirerek bitkinin kullanımına sunabilir (Etesami ve Maheshwari, 2018). Ayrıca PGPR demir için yüksek afiniteye sahip düşük molekül ağırlıklı sidereforlar ile bitki ve birçok canlı grubu için kullanıma uygun olmayan demir (Fe³⁺) formuna bağlanarak hem

kendi hem de bitkinin alınımına uygun hale getirebilmekte ve bu yolla bitki gelişimine katkı sağlamaktadır (Cornelis 2010; Rajkumar ve ark., 2010; Shanmugaiah ve ark., 2015; Aktan ve Soylu, 2020). Diğer taraftan sidereforlar ağır metaller ile kompleks oluşturabilir, böylece bitkiye ulaşımını engelleyerek olası zararlarını sınırlandırabilir (Etesami ve Maheshwari, 2018). Ayrıca bakteriler ürettiği demire yüksek afiniteli sidereforlar ile rizosferde bulunan patojen veya zararlı mikroorganizmalarla demir rekabetine girerek gelişimlerini sınırlandırabilir (Shanmugaiah ve ark. 2015; Gu ve ark. 2020). Yapılan birçok çalışma ile çilek, soya fasulyesi, baklagiller, ayçiçeği ve kaktüs gibi bitkilerden elde edilen endofitik bakterilerin yaygın olarak mineral fosfatı çözebilme ve siderefor üretim yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Kuklinsky-Sobral ve ark., 2004; Forchetti ve ark., 2007; Dias ve ark., 2009; Puente ve ark., 2009; Palaniappan ve ark., 2010; Duman ve Soylu, 2019). Sağlıklı hıyar ve kabak bitkilerinden izole edilen endofitik bakteriler in vitro koşullarda 104 izolattan yaklaşık %50'sinin siderofor üretimi ve %32'sinin ise fosfatı çözebilme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır (Fakhraei, 2015). Silini-Chérif ve ark. (2012) IAA, siderofor ve fosfatı çözme aktivitelerine sahip P. agglomerans'ın tuzlu koşullarda bitki gelişimini arttırdığı belirlenmiştir. Çalışmamızda da 62 izolattan yaklaşık %97'sinin siderofor üretimi ve %40'ının fosfat çözme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Bu yönüyle tuz stresi altında gelişen bitkilerden izole edilen EB'in önemli bir potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir. Bitki ile ilişkili bazı bakteriler, ürettikleri ACC-deaminaz enzimi ile etilenin öncülü olan ACC'yi parçalayarak karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanır. Böylece stresli koşullar altında etilenin bitki gelişimine zarar verebilecek seviyelere ulaşmasını engellenmekte veya zararı azaltılmaktadır (Penrose ve Glick, 2003). Genellikle diğer markörler (IAA, fosfataz, siderefor) kadar sıklıkla karşılaşılmasa da EB'lerde yaygınlığının %13,9 düzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Babier ve Akköprü 2020). Çalışmamızda izolatların besi ortamındaki tek azot kaynağı olan ACC'yi kullanma yeteneklerinin tespiti üzerinden belirlenmeye çalışılmıştır (Penrose ve Glick, 2003). Fakat çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz EB izolatlarının hiçbiri ACC'li ortamda gelişme göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Çalışma kapsamında izole edilen endofit bakterilerin (EB) karakterizasyonu. İzolatların KOH testi ile gram reaksiyonları, floresan ışığa özellikleri, fosfat çözündürme ve siderofor üretim yetenekleri ile farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimleri test edilmiştir

Table 2. Characterization of endophyte bacteria (EB) isolated within the scope of the study. Gram reactions with the "KOH" test, fluorescent properties, abilities of phosphate dissolution, abilities of siderophore production abilities and developments at different salt concentrations were tested

No	İzolat Kodu **	Gr	Flo.	P.sol	Sid. (mm)	ACC	NaCl konsantrasyonları (% ve Molar)				
							% 2,5 (0.43M)	% 5 (0.85M)	% 7,5 (1.28M)	% 10 (1.7M)	% 15 (2.56M)
1	T1K1-A	(-)	-	-	3.5	-	+	-	-	-	-
2	T1K1-B	(-)	+	-	2.5	-	+	+	-	-	-
3	T1K2	(-)	-	+	4.5	-	+	+	zayıf	-	-
4	T2K1	(-)	-	-	2.5	-	+	zayıf	-	-	-
5	T2K2	(-)	-	+	1	-	+	+	+	-	-
6	T3K1	(+)	-	-	4	-	+	+	+	+	-
7	T5S1	(-)	-	-	1	-	+	+	+	-	-
8	T7K1	(-)	-	+	2.25	-	+	zayıf	-	-	-
9	T8Y1	(-)	-	-	3.5	-	+	+	+	-	-
10	T10S1	(-)	-	-	1.5	-	+	+	-	-	-
11	T11S1	(-)	-	+	2.5	-	+	+	zayıf	-	-
12	T12K1	(-)	-	+	1.1	-	+	+	+	-	-
13	T13K1	(+)	-	+	1.9	-	+	+	+	-	-
14	T14K1	(-)	-	+	2	-	+	+	+	zayıf	-
15	T14K2	(-)	-	-	3.25	-	+	-	-	-	-
16	T16S2	(+)	-	-	1.75	-	+	zayıf	-	-	-
17	T16K1	(-)	-	++	3.1	-	+	+	+	+	+
18	T18K1	(-)	-	-	0	-	+	+	+	-	-
19	T18K2	(-)	-	+	4.5	-	+	+	+	+	-
20	T19K1	(-)	-	-	2.15	-	+	+	-	-	-
21	T20K2	(+)	-	-	3.25	-	+	+	-	-	-
22	T21Y1-A	(+)	-	-	2.25	-	+	+	zayıf	-	-
23	T21Y1-B	(+)	-	-	1.5	-	+	+	+	-	-
24	T23Y1	(-)	-	-	1.5	-	+	+	+	-	-
25	T23K1	(-)	-	-	4.25	-	+	+	-	-	-
26	T25K1	(-)	-	-	2.5	-	+	zayıf	-	-	-
27	T25K2	(-)	-	-	0	-	-	-	-	-	-
28	T25Y1	(-)	-	+	2.5	-	+	+	+	-	-
29	T25Y2	(-)	+	++	3	-	+	+	-	-	-
30	T26Y1	(-)	-	+	2.5	-	+	+	+	-	-
31	T26Y3	(-)	-	-	2.25	-	+	+	+	-	-
32	T26K1	(-)	-	-	1.5	-	+	+	zayıf	-	-
33	T26K2	(-)	-	-	1.25	-	+	+	+	-	-
34	G114S1T	(+)	-	-	1	-	+	+	+	-	-
35	G114Y1	(-)	-	-	1	-	+	+	+	-	-
36	G114YIT	(-)	+	++	2	-	+	+	-	-	-
37	G114Y2	(-)	-	++	1	-	+	zayıf	-	-	-
38	G114Y2T	(-)	-	+	2.75	-	+	+	+	-	-
39	G114Y3	(-)	-	-	1.25	-	+	+	+	-	-
40	G115K1T A	(-)	-	+++	3	-	+	-	-	-	-
41	G115Y1T	(-)	-	-	1.25	-	+	+	+	-	-
42	G115S1	(+)	-	-	2	-	+	+	+	-	-

Çizelge 2 (devamı). Çalışma kapsamında izole edilen endofit bakterilerin (EB) karakterizasyonu. İzolatların KOH testi ile gram reaksiyonları, floresan ışımaya özellikleri, fosfat çözündürme ve siderofor üretim yetenekleri ile farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimleri test edilmiştir

Table 2 (continued). Characterization of endophyte bacteria (EB) isolated within the scope of the study. Gram reactions with the "KOH" test, fluorescent properties, abilities of phosphate dissolution, abilities of siderophore production abilities and developments at different salt concentrations were tested

No	İzolat Kodu **	Gr	Flo.	P.sol	Sid. (mm)	ACC	NaCl konsantrasyonları (% ve Molar)				
							% 2,5 (0.43M)	% 5 (0.85M)	% 7,5 (1.28M)	% 10 (1.7M)	% 15 (2.56M)
43	G116K1T	(+)	-	-	2	-	+	+	+	-	-
44	G116S1	(-)	-	+	1.25	-	+	-	-	-	-
45	G116S1T	(-)	-	+	2	-	+	+	-	-	-
46	G116S2	(+)	-	+	1.25	-	+	+	+	-	-
47	G116Y2	(+)	-	-	2	-	+	+	zayıf	-	-
48	G116Y4	(-)	-	+	2.75	-	+	zayıf	-	-	-
49	G116Y1	(+)	-	+	2	-	+	zayıf	-	-	-
50	G116Y3	(-)	-	-	2	-	+	+	-	-	-
51	G117K1	(+)	-	-	1.75	-	+	+	+	+	-
52	G118K1	(+)	-	-	3.5	-	+	+	+	-	-
53	G118K1T	(-)	+	++	2.25	-	+	zayıf	-	-	-
54	G118S1	(-)	-	++	2.5	-	+	+	+	-	-
55	G118S1T	(-)	-	-	1	-	+	+	+	-	-
56	G118S2	(-)	-	-	2.5	-	+	+	+	-	-
57	G119S1	(-)	-	-	2.5	-	+	+	-	-	-
58	G119Y1T	(+)	-	-	1.5	-	+	+	-	-	-
59	G119Y2T	(-)	-	-	1.5	-	+	zayıf	-	-	-
60	G120S2	(-)	-	-	1.25	-	+	+	+	-	-
61	G120S3	(-)	+	++	2.75	-	+	+	-	-	-
62	G120S4	(-)	+	++	3.25	-	+	+	+	-	-

*Gr: Gram reaksiyonu (% 3'lük KOH testi ile); Flo: KB besiyerinde Floresan pigment üretimi; P.sol: Fosfat çözündürme yeteneği ve derecesi; Sid.: siderefor üretim yeteneği

** izolat kodları: ilk harf ve takip eden rakam(lar) bitki kodunu (Çizelge 1), sonraki harf(ler) ve rakam(lar) o bitkiden elde edilen EB izolatını ifade etmektedir.

*** Sonuçlar üç tekerrürlü olup her tekerrür 2 petrinin ortalamasıdır. "+" özelliğinin varlığını, "-" ise yokluğunu ifade etmektedir.

Endofit bakteri izolatların bitki gelişimine etkileri

Çalışmamızda test edilen tüm EB'lerin iklim odasında yürütülen *in vivo* çalışmalar ile bitki gelişim parametrelerinden sürgün ve kök yaş/kuru ağırlıklarına etkileri belirlenmiştir (Çizelge 3). Yapılan birçok çalışmada endofit bakterilerin farklı düzeylerde bitki kök ve sürgün gelişimine önemli katkılar yaptığı belirlenmiştir (Zhao ve ark 2015; Manjunatha ve ark 2017; Mahmood ve Kataoka, 2020). Bu katkılar bazen yalnızca bir parametre üzerinde olurken bazılarında birkaç parametre üzerinde olmaktadır.

Sürgün yaş ağırlığı bakımından; endofit bakteri G116S2, T25K1, T26Y1, T2K2 ve T7K1 izolatlarının kontrol grubuna (NK) göre sürgün yaş ağırlığını önemli düzeyde arttırmıştır. Bazı izolatlar kontrole göre fark yaratmış olsa da bu etkileri istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

G114Y2 izolatı ise sürgün yaş ağırlığında azalışa neden olmuştur.

Sürgün kuru ağırlığı bakımından; EB G115K1T ve T2K2 izolatları NK'ye göre sürgün kuru ağırlığını önemli düzeyde arttırarak en başarılı izolatlar olmuşlardır. Genel olarak bu izolatlar dışında sürgün ağırlığındaki değişim istatistiki önem aralığında bulunmamıştır. Fakat az sayıda da olsa G114Y2, G114S1T, G118K1T1 ve T20K2 gibi bazı izolatlar kontrol grubuna göre azalışlara neden olmuştur.

Kök yaş ağırlığı bakımından; EB G114Y1, G114Y2T, G114Y3, G116S1, G118K1T1, T25K1 ve T26Y3 izolatları kök yaş ağırlığını önemli düzeyde arttırmıştır. Buna karşılık T25Y2 ve G120S3 izolatları kök yaş ağırlığını önemli düzeyde azaltmıştır. Bunun dışında kalan izolatların kök yaş ağırlığına istatistiki önem aralığında bir etkileri olmamıştır.

Kök kuru ağırlığına bakıldığında ise G118K1T1 EB izolatı NK'e göre kök kuru ağırlığını önem derecesinde arttırmış, fakat T8Y1, T16S2, T16K1, T13K1, G120S3 ve G116Y2 izolatları kök kuru ağırlığını önemli düzeyde azaltmıştır. Diğer izolatlar ise kök kuru ağırlığına önemli bir etkide bulunmamıştır (Çizelge 3).

Elde ettiğimiz izolatlardan yalnızca T16K1'nin %15'lik (2,5M) tuz konsantrasyonunda gelişme başarısını göstermiştir. Bu izolat aynı zamanda fosfat çözündürme ve siderefor üretim yeteneğine sahiptir. Fakat izolatın bitki gelişimine bir katkısı olmadığı gibi bazı parametrelerde azalışa neden olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan T2K2 izolatı sürgün yaş ve kuru ağırlık ile kök yaş ağırlığına önemli katkılar sağlamış olmasına rağmen, yalnızca zayıf fostat çözündürme ve siderefor üretim yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2 ve 3). Mahmood ve Kataoka (2020), yapmış oldukları çalışmada iki endofit izolatın eşit ölçüde kök gelişimini artırmalarına rağmen, her iki izolat bitki metabolitleri

üzerine etkinlikleri farklılık göstermiştir. Gamalero ve ark. (2020), bu etkinin bitki gelişimine olan etkileri veya test edilen mekanizmalar dışında başka bilinmeyen mekanizmaların da rol oynayabileceğinin dikkate alınması gerektiğini belirtmiştir. Akköprü ve ark. (2018), EB'nin bitkiye olan katkıları gelişim koşullarına göre değiştiği ve belirli bir düzeye kadar stres altında olan bitkilere katkının daha belirgin ve fazla olacağını belirlemiştir.

Çalışmalarda elde edilen *in vivo* ve *in vitro* sonuçlar arasındaki bu uyumsuzluklara ek olarak PGPR'ın bilinen veya araştırılan karakterler dışında bir etki mekanizması ile etki gösterebilecek olması durumu nisbeten daha ekonomik ve pratik olan bu seçim sürecinin en zayıf yönünü oluşturmaktadır. Bu nedenle bazı araştırmacılar seçimin doğrudan bitki çalışmaları sonucuna göre yapılmasını önermekte veya Thomas'ın (2004) belirttiği gibi doku kültürü çalışmaları ile bu sürecin kısaltması gerektiğini belirtmektedir.

Çizelge 3. Karakterize edilen endofit bakterinin hıyar fidelerinde sürgün ve kök yaş / kuru ağırlıklarına etkisi. Veriler 14. gün yapılan ölçümleri ile elde edilmiştir

Table 3. Effect of characterized endophyte bacteria on shoot and root fresh and dry weights in the cucumber seedlings. The data were obtained by measurements made on the 14th day

No	İzolat Kodu	SYA*	SKA	KYA	KKA
1	NK	6.19 a-d	0.46 b-d	0.84 f-q	0.043 b-ı
2	G111S1	5.20 a-e	0.38 b-f	0.53 p-q	0.043 b-ı
3	G114S1T	4.04 de	0.26 e-g	0.77 j-q	0.027 d-k
4	G114Y1	5.52 a-e	0.36 c-g	1.34 a-c	0.028 d-k
5	G114Y1T	4.85 c-e	0.40 b-f	0.62 l-q	0.028 d-k
6	G114Y2	3.70 e	0.20 g	0.80 h-q	0.028 d-k
7	G114Y2T	5.43 a-e	0.43 b-f	1.24 a-g	0.038 b-k
8	G114Y3	5.31 a-e	0.44 b-e	1.34 a-c	0.05 a-c
9	G115K1T	5.52 a-e	0.70 a	0.93 c-q	0.05 ab
10	G115K2	5.02 b-e	0.33 c-g	0.88 e-q	0.033 b-k
11	G115Y1T	5.43 a-e	0.37 b-g	1.15 a-j	0.040 b-j
12	G116K1T	5.78 a-e	0.45 b-d	1.06 a-l	0.040 b-j
13	G116S1	5.29 a-e	0.30 c-g	1.47 a	0.037 b-k
14	G116S2	6.57 a-c	0.43 b-f	1.06 a-l	0.034 b-k
15	G116Y1	5.85 a-e	0.41 b-f	0.84 e-q	0.045 b-g
16	G116Y2	5.18 a-e	0.32 c-g	0.95 b-p	0.017 k
17	G116Y4	5.87 a-e	0.42 b-f	0.59 m-q	0.026 d-k
18	G117K1	5.61 a-e	0.33 c-g	0.96 b-g	0.026 d-k
19	G118K1	4.76 c-e	0.36 c-g	0.74 j-q	0.023 g-k
20	G118K1T1	4.76 c-e	0.25 e-g	1.32 a-d	0.07 a
21	G118S1	4.46 c-e	0.28 d-g	0.97 b-n	0.031 b-k
22	G118S1T	5.72 a-e	0.43 b-f	0.97 b-g	0.042 b-j
23	G119S1	5.09 b-e	0.34 c-g	0.73 j-q	0.024 g-k
24	G119Y1T	5.69 a-e	0.37 b-g	1.02 b-m	0.035 b-j
25	G119Y2T	4.02 de	0.26 e-g	0.56 n-q	0.022 h-k
26	G120S1	5.85 a-e	0.38 b-f	0.81 g-q	0.037 b-k
27	G120S2	4.69 c-e	0.28 d-g	0.82 f-q	0.27 d-k

Çizelge 4 (devamı). Karakterize edilen endofit bakterinin hıyar fidelerinde sürgün ve kök yaş / kuru ağırlıklarına etkisi. Veriler 14. gün yapılan ölçümleri ile elde edilmiştir

Table 3 (continued). Effect of characterized endophyte bacteria on shoot and root fresh and dry weights in the cucumber seedlings. The data were obtained by measurements made on the 14th day

28	G120S3	3.91 de	0.29 c-g	0.41 s	0.020 jk
29	G120S4	4.42 c-e	0.36 c-g	0.70 k-q	0.080 c-k
30	T10S1	4.15 c-e	0.27 e-g	0.71 j-q	0.021 ı-k
31	T11S1	5.76 a-e	0.37 c-g	0.80 j-q	0.034 b-k
33	T14K1	5.09 b-e	0.31 c-g	0.73 j-q	0.025 e-k
34	T14K2	4.36 c-e	0.27 e-g	0.68 k-q	0.027 d-k
35	T16K1	4.47 c-e	0.25 fg	0.77 j-q	0.020 jk
36	T16S2	4.80 c-e	0.28 d-g	0.50 r-q	0.018 k
37	T18K1	5.18 a-e	0.36 c-g	0.88 e-q	0.022 g-k
38	T19K1	5.27 a-e	0.33 c-g	0.52 p-q	0.032 b-k
39	T1K1A	4.64 c-e	0.31 c-g	0.55 n-q	0.025 e-k
40	T1K1B	5.64 a-e	0.34 c-g	1.23 a-h	0.038 b-k
41	T1K2	4.23 c-e	0.28 d-g	1.06 b-l	0.033 b-k
42	T20K2	4.49 c-e	0.25 fg	0.61 m-q	0.033 b-k
43	T21Y1A	5.33 a-e	0.38 b-f	0.93 c-q	0.028 d-k
44	T21Y1B	5.55 a-e	0.38 b-f	0.92 c-q	0.038 b-k
45	T23K1	4.96 b-e	0.35 c-g	1.02 b-m	0.05 b-e
46	T23Y1	5.40 a-e	0.38 b-f	0.90 d-q	0.046 b-f
47	T25K1	6.25 a-d	0.38 b-f	1.27 a-e	0.05 a-c
48	T25K2	4.80 c-e	0.30 c-g	1.00 b-m	0.040 b-k
49	T25Y2	5.86 a-e	0.43 b-f	0.48 rs	0.038 b-k
50	T26K1	4.83 c-e	0.37 b-g	0.90 d-q	0.025 e-k
51	T26Y1	7.34 ab	0.47 bc	1.12 a-j	0.028 d-k
52	T26Y3	5.52 a-e	0.41 b-f	1.36 ab	0.044 b-h
53	T2K1	5.89 a-e	0.47 bc	0.74 j-q	0.032 b-k
54	T2K2	7.50 a	0.55 a	1.23 a-ı	0.048 b-d
55	T5S1	5.76 a-e	0.39 b-f	1.25 a-f	0.047 b-e
56	T7K1	6.24 a-d	0.37 b-g	0.52 p-q	0.021 ı-j
57	T8Y1	5.94 a-e	0.38 b-f	0.68 k-q	0.020 jk

* S.Y.A: gövde yaş ağırlığı, S.K.A: gövde kuru ağırlığı, K.Y.A: kök yaş ağırlığı, K.K.A: kök kuru ağırlığı, NK: negatif kontrol (EB uygulanmamış grup)

** istatistiki analize tabi tutulan değerler 7-15 bitkinin ortalamasından elde edilmiştir. Bitki örnekleri ortalama değerleri SAS programında DUNCAN çoklu karşılaştırma testine göre $P<0,05$ önem aralığı düzeyinde analiz edilmiştir. Aynı sütün üzerindeki aynı harf ile belirtilen ortalama değerler önemsizdir.

Sonuç olarak, yürüttüğümüz çalışma ile tuzlu koşullar altında gelişmiş olan yabancı bitkilerden EB'lerin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik etme mekanizmalarının belirlenerek, *in vivo*'da hıyar bitkisi biyomasına etkileri gözlenmiş ve bitki gelişimini uyarma potansiyeline sahip EB'leri elde etme süreçleri incelenmiştir. Çalışma bulguları ışığında EB seçim sürecinde *in vitro* ve *in vivo* verilerin her izolat için tutarlı olmayabileceği gözlenmiştir. Ayrıca tuz stresi altında gelişen bitkilerden elde edilen EB'lerin farklı düzeylerde tuzu stresini tolere ettikleri, siderefor ve fosfat çözüldürme yetenekleri bakımında da varsıl oldukları görülmüştür. Ayrıca bitki gelişimini teşvik etme

potansiyellerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Belirli karakterlere sahip izolatların eldesi için stres altında gelişen bitkilerin tercih edilmesinin başarı şansını arttırabileceği gözlenmiştir.

ÖZET

Amaç: Endofit bakteriler (EB) stres altında gelişen bitkilerde, bitki gelişimi ve sağlığına katkı sağlayabilirler. Bu çerçevede çalışmanın amacı; tuzlu koşullarda yetiştirilen yabancı bitkilerden endofitik bakterilerin izole edilmesi, bitki gelişimini teşvik etme (PGP) mekanizmalarının ve hıyar bitkisinin biyokütlesi

üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Yöntem ve Bulgular: Çalışmamızda Van Gölü havzasında yer alan bir doğal tuz kaynağı bölgesinde gelişen bitkilerden EB izolatlarının izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatların PGP özelliklerinin belirlenmesi amacıyla; fosforu çözündürme kabiliyeti, ACC-D aktivitesi, siderofor üretimi ve farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri incelenmiştir. Bitki gelişimine etkileri ise iklim odası koşullarında hıyar bitkisi üzerinde test edilmiştir. *Amaranthaceae; Poaceae, Zygothylaceae, Fabaceae; Chenopodiaceae, Hypericaceae* familyalarına ait 26 bitkilerden 62 EB izole edilmiştir. Bu izolatlardan %40'ının fosfataz aktivitesine, %97'sinin ise siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatların %92'sinin 0,85 M de, %58'inin 1,28 M de, %8'inin 1,7 M de ve yalnızca bir izolatın ise 2.56 M NaCl varlığında gelişebildiği tespit edilmiştir. Bazı EB izolatlarının bitki sürgün ve kök yaş kuru ağırlığında önemli düzeyde artış sağladığı belirlenmiştir.

Genel Yorum: Doğada stres altında gelişen bitkilerin, olumsuz çevre koşullarında mücadelelerine katkı yapacak, bitki sağlığı ve gelişimlerini destekleyebilecek bakterilere ev sahipliği yönünden oldukça yüksek potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir.

Çalışmanın Önemi ve Etkisi: Belirli karakterlere sahip, stres altında hayatta kalabilecek EB izolatların elde edilmesi için yapılan çalışmada stres altında gelişen bitkilerin tercih edilmesinin başarı şansını arttırabileceği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bitki gelişimi, tuz stresi, siderofor, fosfataz, hıyar.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Van yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2019-7928 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Yazar(lar) çalışma konusunda çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

Akköprü A, Çakar K, Hussein A (2018) Effects of endophytic bacteria on disease and growth in plants under biotic stress. *YYU J. Agr. Sci.* 28(2): 200-208.

- Akköprü A, Akat Ş, Özaktan H, Gül A, Akbaba M (2021) The long-term colonization dynamics of endophytic bacteria in cucumber plants, and their effects on yield, fruit quality and angular leaf spot disease. *Scientia Horticulturae* 282: 110005.
- Aktan ZC, Soylu S, (2020) Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. *KSU Tarım ve Doğa Dergisi* 23: 641-654.
- Antoun H, Prévost D (2006) Ecology of plant growth promoting. In: PGPR: Biocontrol and biofertilization. (Eds. Siddiqui Z. A.). Springer, Netherlands, pp 1-39.
- Atay M, Kara M, Uysal A, Soylu S, Kurt Ş, Soylu EM (2020) *In vitro* antifungal activities of endophytic bacterial isolates against postharvest heart rot disease agent *Alternaria alternata* in pomegranate fruits. *Acta Horticulturae* 1289: 309-314.
- Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, de Araújo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3: 15-16.
- Babier Y, Akköprü A (2020). Çeşitli kültür bitkilerinden izole edilen endofitik bakterilerin karakterizasyonu ve bitki patojeni bakterilere karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 30(3): 521-534.
- Bozkurt İA, Soylu S (2019) Elma kök uru hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter*'e karşı epifit ve endofit bakteri izolatlarının antagonistik potansiyellerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 16: 348-361.
- Brader G, Compant S, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A (2014) Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion In Biotechnology* 27: 30-37.
- Cornelis P (2010) Iron uptake and metabolism in Pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1637-1645.
- Dias A, Costa F, Andreote F, Lacava P, Teixeira M, Assumpcao L (2009) Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25: 189-195.
- Duman K, Soylu S (2019) Characterization of plant growth-promoting traits and antagonistic potentials of endophytic bacteria from bean plants against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bitki Koruma Bülteni* 59: 59-69.
- Etesami H, Maheshwari DK (2018) Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action

- mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156: 225-246.
- Fakhraei D (2015) Endofitik bakterilerin hıyar bitkilerinde dayanıklılığı uyarma yoluyla *Fusarium solgunluğuna* etkililiğinin araştırılması. Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, 139 sy.
- Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D, Abdala G (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 1145-1152.
- Gamalero E, Favale N, Bona E, Novello G, Cesaro P, Massa N, Glick BR, Orozco-Mosqueda MC, Berta G, Lingua G (2020) Screening of bacterial endophytes able to promote plant growth and increase salinity tolerance. *Appl. Sci.* 10: 5767.
- Glick, BR (2014) Bacteria with ACC Deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169: 30-39.
- Gilmour D (1990) Halotolerant and halophilic microorganisms. In: *Microbiology of extreme environments*. Edwards C. (Ed.). McGraw – Hill NY USA, 1990, 147-177.
- Gu S, Yang T, Shao Z, Wang T, Cao K, Jousset A, Friman V-P, Mallon C, Mei X, Wei Z, Xu Y, Shen Q, Pommier T. (2020) Siderophore mediated interactions determine the disease suppressiveness of microbial consortia. *mSystems* 5: e00811-19.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee, WF, Kloepper, JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.
- Hardoim P, Nissinen R, van Elsas JD (2012) Ecology of bacterial endophytes in sustainable agriculture. In *Bacteria in agrobiolgy: plant probiotics* (pp. 97-126). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jha B, Gontia I, Hartmann A (2012) The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halo tolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil* 356: 265-277.
- Kuklinsky-Sobral J, Araujo W, Mendes R, Geraldi I, Pizzirani-Kleiner A, Azevedo, J (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* 6: 1244-1251.
- Kushner DJ (1993) Growth and nutrition of halophilic bacteria. *The biology of halophilic bacteria*. R.H. Vreeland and L.I. Hochstein (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida, 87-104.
- Lee S, Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla JE, Kennedy C (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriology* 186: 5384-5391.
- Lilley AK, Fry JC, Bailey MJ, Day MJ (1996) Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 231-242.
- Louden BC, Haarmann D, Lynne A M (2011) Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology Biology Education* 12(1): 51-53.
- Ma B, Gong JA (2013) Meta-analysis of the publicly available bacterial and archaeal sequence diversity in saline soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 2325-2334.
- Maggini V, Mengoni A, Gallo ER (2019) Tissue specificity and differential effects on *in vitro* plant growth of single bacterial endophytes isolated from the roots, leaves and rhizospheric soil of *Echinacea purpurea*. *BMC Plant Biol.* 19: 284.
- Mahmood A, Kataoka R (2020) Metabolite profiling reveals a complex response of plants to application of plant growth-promoting endophytic bacteria. *Microbiological Research* 234: 126421.
- Manjunatha BS, Asha AD, Nivetha N, Bandappa, Govindasamy V, Rathi M.S, Paul S (2017) Evaluation of endophytic bacteria for their influence on plant growth and seed germination under water stress conditions. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(11): 4061-4067.
- Mercado-Blanco J, Lugtenberg BJJ (2014) Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Curr. Biotechnol.* 3: 60-75.
- Mesa J, Mateos-Naranjo E, Cavedes MA, Redondo-Gómez S, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID (2015) Endophytic cultivable bacteria of the metal bioaccumulator *Spartina maritima* improve plant growth but not metal up take in polluted marshes soils. *Front. Microbiol.* 6: 1450.
- Navarro-Torre S, Barcia-Piedras JM, Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Camacho M, Cavedes M. A, Rodríguez-Llorente ID (2017) Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology* 19(2): 249-256.
- Olur Ü (2020) Tuzlu ortamda gelişen bitkilerden izole edilen endofit bakterilerin hıyar bitkisinde köşeli yaprak leke hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *lacrymans*), tuz stresi ve bitki gelişimine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 87 sy.

- Palaniappan P, Chauhan PS, Saravanan VS, Anandham R, Sa TM (2010) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biology and Fertility of Soils* 46: 807-816.
- Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC Deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* 118: 10-15.
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347-375.
- Puente M, Li C, Bashan Y (2009) Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany* 66: 389-401.
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H (2010) Potential of siderophore producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28: 142-149.
- Remonsellez F, Castro-Severyn J, Pardo-Esté C, Aguilar P, Fortt J, Salinas C, Barahona S, León J, Fuentes B, Areche C, Hernández KL, Aguayo D, Saavedra CP (2018) Characterization and salt response in recurrent halotolerant *Exiguobacterium* sp. sh31 isolated from sediments of Salar de huasco, Chilean altiplano. *Front. Microbiol.* 9: 2228.
- Roberts, MF (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1(1): 1-30.
- Romano I, Ventorino V, Pepe O (2020) Effectiveness of plant beneficial microbes: overview of the methodological approaches for the assessment of root colonization and persistence. *Front. Plant Sci.* 11: 6.
- Rosenblueth, M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 827-837.
- Ruginescu R, Gomoiu I, Popescu O, Cojoc R, Neagu S, Lucaci I, Batrinescu-Moteau C, Enache M (2020) Bioprospecting for novel halophilic and halotolerant sources of hydrolytic enzymes in brackish, saline and hypersaline lakes of Romania. *Microorganisms* 8: 1903.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes. Recent development and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278: 1-9.
- Saharan B, Nehra V (2011) Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research* 2011: 1-30.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183: 92-99.
- Schaad NW, Jones BJ, Chun W (2001) Laboratory guide for identification plant pathogenic bacteria. APS Press, USA.
- Shanmugaiah V, Nithya K, Harikrishnan H, Jayaprakashvel M, Balasubramanian N (2015) Biocontrol mechanisms of siderophores against bacterial plant pathogens in: Kannan, V. R., & Bastas, K. K. (Eds.). *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*. CRC press.
- Silini-Chérif H, Silini A, Ghoull M, Yadav S (2012) Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. *Pak. J. Biol. Sci.* 15(6): 267-76.
- Soylu EM, Soyulu S, Kara M, Kurt Ş (2020) Sebzelelerde sorun olan önemli bitki fungal hastalık etmenlerine karşı vermikomposttan izole edilen mikrobiyomların *in vitro* antagonistik etkilerinin belirlenmesi. *KSU Tarım ve Doğa Dergisi* 23: 7-18.
- Surette MA, Sturz AV, Lada RR, Nowak J (2003) Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil* 253: 381-390.
- Sülü SM, Bozkurt İA, Soyulu S (2016) Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. *MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 21: 103-111.
- Szymańska S, Borruso L, Brusetti L, Hulisz P, Furtado B, Hryniewicz K (2018) Bacterial microbiome of root-associated endophytes of *Salicornia europaea* in correspondence to different levels of salinity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25: 25420-25431.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.* 162: 69-76.
- Thomas P (2004) A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Current Science* 87: 67-72.
- Ullah A, Mushtaq H, Ali U, Hakim AE, Mubeen S, Chaudhary HJ (2018) Screening, isolation, biochemical and plant growth promoting characterization of endophytic bacteria. *Microbiol. Curr. Res.* 2(3): 62-68.
- Zhao L, Xu, Y, Lai XH, Shan C, Deng Z and Ji Y (2015) Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(4): 977-989.

Zinniel DK, Lambrecht P, Harris BN (2002) Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria

from agronomic crops and prairie plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2198-2208.