

---

*Araştırma Makalesi / Research Article*

---

## ***Arabidopsis thaliana* ile *Pseudomonas putida* Arasındaki Etkileşimin *in vitro* Koşullarda Belirlenmesi**

Özlem AKKAYA\*

*Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kocaeli, Türkiye*  
(ORCID: 0000-0003-0478-1417)

---

### **Öz**

*Arabidopsis thaliana* genomu dizilenmiş genetik, biyokimyasal ve biyoteknolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan model bir bitkidir. *Pseudomonas putida* bakterisi ise bitki köklerinde kolonize olabilen, genomu dizilenmiş, bitki büyümesini teşvik eden, patojenik olmayan ve bitki-bakteri etkileşimlerinin anlaşılması için model olmaya aday rizosferik bir bakteridir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı *A. thaliana*'nın *in vitro* çimlenmesi ve fidiciklerinin büyümesi üzerine *P. putida*'nın etkisinin değerlendirilmesidir. Bu amaçla, yüzey sterilasyonu yapılmış *A. thaliana* tohumlarının inokülasyonu için  $2 \times 10^3$ - $2 \times 10^5$  CFU/ml aralığındaki bakteri konsantrasyonları pipetleme metodu kullanılarak denenmiştir. Ayrıca, aynı bakteriyel süspansiyonlar 3, 5, 10 ve 14 günlük *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş fidiciklere de uygulanmıştır. Bu araştırma alanı, bitki-bakteri etkileşimlerinde inokülasyonun öneminin anlaşılmasına önemli bir yarar ve bunun yanı sıra daha sonraki kapsamlı çalışmalar için bir katkı sağlayacaktır. Dahası, sonrasında bitki-bakteri etkileşimleri aracılığıyla biyoremediasyonun başarılmasına yardımcı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Arabidopsis*, *Pseudomonas putida*, Bitki-bakteri etkileşimleri.

---

## **Determination of Interaction between *Arabidopsis thaliana* and *Pseudomonas putida* Under *in vitro* Conditions**

---

### **Abstract**

*Arabidopsis thaliana* - is a whole genome sequenced model plant that is commonly used in genetic, biochemical and biotechnological studies. *Pseudomonas putida* is also a genome sequenced plant growth promoting non-pathogenic bacteria that can be colonized on plant roots which can be a good candidate for understanding the plant-bacteria interactions. Therefore, the aim of this study concerns the evaluation of the effects of *P. putida* on the *in vitro* germination and seedling growth of *A. thaliana*. Different bacterial concentrations from  $2 \times 10^3$ - $2 \times 10^5$  CFU/ml will be tested for the inoculation of surface sterilized *A. thaliana* seeds by pipetting method. Moreover, the same bacterial suspensions will also applied to 3, 5, 10 and 14 days old *in vitro* germinated seedlings. This area of research will provide a contribution for extensive further studies together with a significant advance to understand the importance of inoculation in plant-bacteria interactions. Moreover, it will help to achieve bioremediation through plant-bacterial associations for future studies.

**Keywords:** *Arabidopsis*, *Pseudomonas putida*, plant-bacteria interactions.

---

### **1. Giriş**

Doğada, sağlıklı ve herhangi bir semptomu olmayan bitkiler; arkealar, mantarlar, bakteriler ve protistalar (tümü bitki mikrobiyotası olarak isimlendirilir) gibi farklı mikroorganizmalar ile birlikte yaşayarak karmaşık bir mikrobiyal topluluk (konsorsiyum) oluşturmakta, bitkinin büyümesi ve gelişmesini iyileştirebilmektedir [1-3]. Bitkilerin köklerinde kolonize olan ve bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), farklı mekanizmalarla bitki

---

\*Sorumlu yazar: [ozlem@gtu.edu.tr](mailto:ozlem@gtu.edu.tr)

Geliş Tarihi: 12.12.2018, Kabul Tarihi: 29.04.2019

üzerinde etki göstermektedir. Birçok PGPR bitki patojenlerinin inhibisyonu aracılığıyla bitki büyümesini uyarabilir. Bazı PGPR'lar patojenlerin büyüme ve aktivitesini doğrudan inhibe ederken [4]; diğerleri dolaylı yoldan uyarılmış sistemik duyarlılığı (Induced systemic resistance, ISR) harekete geçirerek hastalıkları baskılayabilir. ISR sistemini uyan bakterilerden biride *Pseudomonas* spp.'dir [5]. *P. putida* çürükçül yaşayan bir toprak bakterisi olup; tahıl bitkilerinin köklerinde kolonize olma yeteneğine sahiptir [6,7]. Bitkiye büyümesi için avantaj sağlayan iyi tanımlanmış bir biyokontrol ajanıdır [8].

Özellikle son 10 yıldır modern mikrobiyolojinin farklı alanlarındaki uyumlu birlikteliklerin sonucunda biyoteknolojik kullanıma uygun hale getirilmiş, önemli bir mikroorganizmadır. *P. putida* KT2440 "güvenli soy" olarak tamamen dizilenmiştir [9], yalnızca GRAS olarak sertifikalanmış (Federal Register: Certified Host-Vector Systems. Vol. 47. 1982) bir organizma olmakla kalmayıp; ayrıca biyodegradasyon için de model bir organizma olarak m-ksilen ya da toluen gibi aromatik bileşikler degrade edebilme kapasitesine sahiptir [10]. Bu rizobakteri aynı zamanda çok sayıda bitkide kolonize olma yeteneği göstermiş olup, mısır tohumlarına yapışma özelliği büyük oranda çalışılmıştır [6]. KT2440'ın genom analizleri bakterinin fitohormonların üretimi gibi bitki büyümesini teşvik edici yollarda gerekli genlere sahip olduğunu göstermiştir [11]. KT2440 gibi mutualistik mikroorganizmalar bitkinin direncini artırarak ya da antagonistik etki göstererek bitkiyi patojenlerden koruyabilir [12,13]. Tüm bu yararlı etkileri KT2440'ı tarımsal kullanım için önemli bir biyolojik ajan konumuna getirmektedir.

*A. thaliana*, küçük boyutu, kolayca kültüre alınması, hızlı yaşam döngüsü, çabuk tohum vermesi, genomunun dizilenmiş olması ve çok sayıda mutant varyantının bulunması nedeniyle, bitkiler ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimlerin araştırılması da dahil olmak üzere bitki biyolojisi çalışmalarında genellikle kullanılan bir bitki türüdür [14]. Ayrıca, *A. thaliana* kullanılarak bitki-bakteri etkileşimleri üzerine birçok çalışma rapor edilmiştir [15-19]. *P. putida* KT2440 bakterisiyle yapılan detaylı çalışmalara karşın; bu bakteri tarafından kök kolonizasyonuna *Arabidopsis* bitkisinin yanıtı hakkında çok detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bitki bakteri etkileşimleriyle ilgili çalışmalarda ilk adım, bitkinin en uygun bakteri konsantrasyonu ile en optimal şartlar altında inokülasyonudur.

Bu çalışmada, model bitki *A. thaliana*'nın *in vitro* koşullarda bitki büyümesi ve gelişimi üzerine *P. putida* KT2440'ın etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda, *A. thaliana* bitkisine ait tohumlar ve fidecikler çeşitli konsantrasyonlardaki bakteri süspansiyonlarıyla pipetleme yöntemi kullanılarak bitki doku kültürü koşullarında inoküle edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, daha sonra bu bakterinin tek başına ya da mikrobiyal topluluklar içinde biyogübre veya fitoremediasyon amaçlı kullanımına yönelik uygulamalar için önemli yarar sağlayacaktır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Bitki Materyali ve Büyüme Koşulları

*A. thaliana* tohumlarının (Col-0)(Gebze Teknik Üniversitesi, Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir), %70' lik (v/v) etanol ile 1-2 dakika süreyle ve sürekli çalkanarak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Etanolün uzaklaştırılmasından sonra tohumlar 10 dakika %15'lik çamaşır suyuyla (NaOCl) yıkanmıştır. Sterilizasyondan sonra, tohumlar üç kez steril su (dH<sub>2</sub>O) ile 5 dakika süreyle durularak, yarı-katı Murashige-Skoog [20; M02 555, pH 5.6; Duchefa, Haarlem, the Netherlands] besiyeri üzerine aktarılmıştır. 10 tohum içerecek şekilde hazırlanan her bir Petri kabı, tohumların eş zamanlı çimlenmesini sağlamak üzere 3 gün boyunca 4°C'ta ve karanlıkta bekletilmiştir. 3 günün sonunda, Petri plakaları 22±2°C'ta 16 saat aydınlık (3000 lüks) ve 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında bitki büyüme odasında dikey olarak büyümeye bırakılmıştır.

### 2.2. Bakteri Büyüme Koşulları

*P. putida* KT2440, daha önce *A. thaliana* bitkisiyle yapılmış deneylerde MPYE (Yeast Extract (3gr/l), Pepton (3gr/l), 1 M stok MgCl<sub>2</sub> (1,6mM), 1 M stok CaCl<sub>2</sub> (1mM), pH 7,0) [21] besiyerinin tek başına bitki büyümesi üzerine olumlu etki göstermesi [22] nedeniyle; bu besiyerinde ve 30°C'ta inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 ml sıvı MPYE besiyeri tek koloni ile inoküle edilerek 170 rpm'de gece boyu çalkalanarak büyümeye bırakılmıştır. Büyüme sonrası McFarland 0.5 standardı ile eşit olacak şekilde

ayarlanmış bakteri kültürünün  $10^{-1}$ - $10^{-8}$  arası seri dilüsyonları hazırlanarak, her birinden MPYE katı besiyeri içeren 3'er Petriye 100 µl örnek yayılmıştır. Petri plakaları gece boyu  $30^{\circ}\text{C}$ 'ta inkübasyona bırakılarak; inkübasyon bitiminde 30 ile 300 arasında koloni içerenler seçilmiş ve sayılmıştır.  $10^{-6}$  dilüsyonuna ait Petri plakalarından sırasıyla 139, 104 ve 104 koloni sayılmış, hesaplamalar bakteri konsantrasyonu [(CFU/ml)=(dilüsyon faktörü x Petri plakalarındaki bakteri sayısı)/Petriye yaymada kullanılan hacim (ml)] formülü kullanılarak yapılmıştır. Buna göre büyümüş sıvı kültürdeki bakteri sayısı  $1 \times 10^9$  CFU/ml'dir.

### 2.3. Bitkinin Bakteriyle İnokülasyonu

*A. thaliana* tohum ve *in vitro* koşullarda çimlendirilen fidecik olmak üzere iki farklı fizyolojik evrede, *P. putida* KT2440'nin farklı konsantrasyonlardaki ( $2 \times 10^3$ - $2 \times 10^5$  CFU/mL) süspansiyonlarıyla inoküle edilmiştir. Buna göre, vernalizasyondan hemen sonra 0-,3-,5-,10- ve 14-günlük *A. thaliana* bitkileri bakteriyle inokülasyon için kullanılmıştır. İnokülasyon için bakteriyle pipetleme yöntemi [23]'e göre yapılmıştır.  $2 \times 10^3$ - $2 \times 10^5$  CFU/mL olacak şekilde hazırlanan bakteri dilüsyonlarından ve sadece MPYE besiyerinden 1 ml, bu bitkicikler üzerine pipetlenmiştir. Petri plakaları bir süre kurumaya bırakıldıktan sonra, dikey olarak bitki büyüme odasına yerleştirilmiştir. Bakteriyle inoküle edilmeyen *A. thaliana* bitkicikleri kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir Petri plakası 10 bitki içerecek ve 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmış, bitki büyüme odasında  $22^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında büyümeye bırakılmıştır.

### 2.4. Bitki Çimlenmesi ve Büyümesi Üzerine *P. putida*'nın Etkisinin Değerlendirilmesi

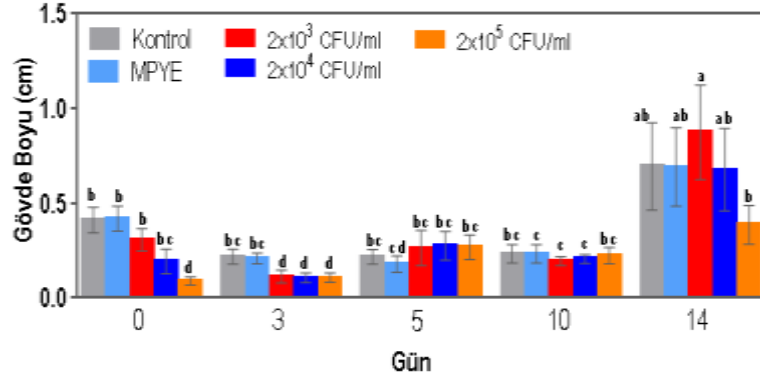
Bitkinin çimlenmesi ve gelişimi üzerine bakterinin etkisini gözlemleyebilmek amacıyla, 0-,3-,5-,10-günlük iken bakteriyle inoküle edilen bitkilerin 14. gününde; 14-günlük iken bakteriyle inoküle edilen bitkilerin ise 21. gününde bitki gövde boyu, kök boyu, taze ağırlık ve kuru ağırlığı belirlenmiştir.

### 2.5. İstatistiksel Analizler

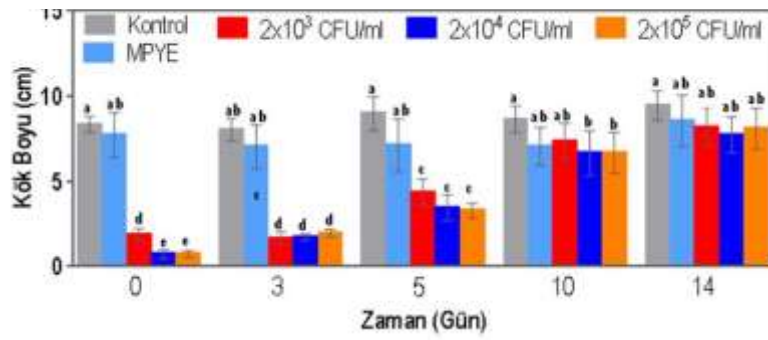
Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri SPSS 12.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Denemeler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için veriler ANOVA ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak farklı görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar  $P \leq 0.05$  seviyesinde LSD çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Oransal veriler ise Ki kare ( $X^2$ ) testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmanın başlangıcında yapılan ön denemelerde farklı konsantrasyonlardaki *P. putida*'nın *A. thaliana* tohum çimlenme yüzdesine olumsuz bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir [24]. Pipetleme yöntemi aracılığıyla bakteri ile inoküle edilen *A. thaliana* tohum ve fideciklerinin kök ve gövde boyu analizlerine göre; bakteri tohum (0. gün) veya fideciklerin erken gelişimsel dönemlerinde (3-5-günler) inoküle edildiğinde; muhtemelen yol açtığı stres nedeniyle bitkiciklerin kök ve gövde büyümesini inhibe etmiş; ancak fidecik gelişiminin daha ileri safhalarında (14. gün) bu etki ortadan kalkarak; gövde ve kök boyu için denenen tüm bakteri konsantrasyonlarında, Şekil 1 ve Şekil 2'de belirtildiği gibi kontrol grubuyla benzer oranlarda büyüme kaydedilmiştir.

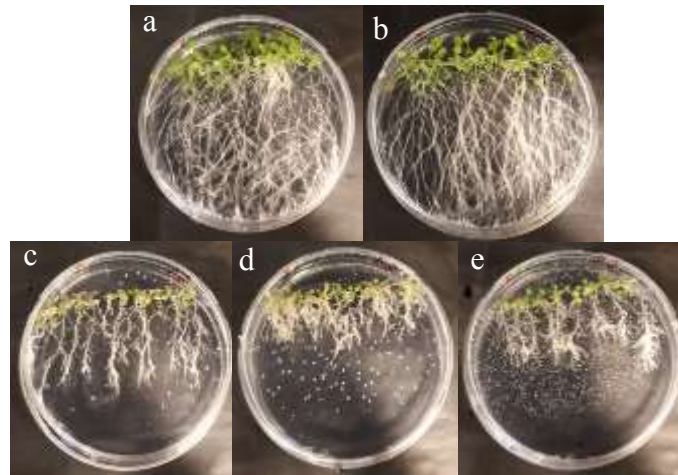


Şekil 1. *A. thaliana* bitkisinin gövde boyu üzerine *P. putida* KT2440 bakterisinin farklı konsantrasyonlarının etkisi



Şekil 2. *A. thaliana* bitkisinin kök boyu üzerine *P. putida* KT2440 bakterisinin farklı konsantrasyonlarının etkisi

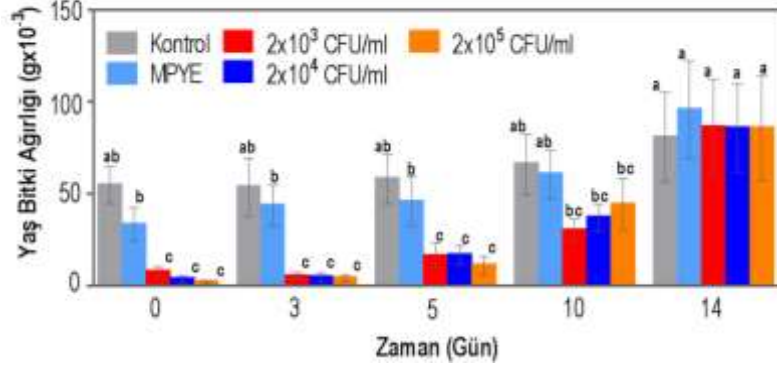
Bakterinin artan konsantrasyonlarının bitki gelişimi üzerine oluşturduğu etki; Şekil 3’de verildiği gibi bitki morfolojisinde de gözlenmiştir. Artan bakteri konsantrasyonu kök boyunda kısılmaya yol açarken; lateral köklerde ve kök tüylerinde artışa neden olmuştur.



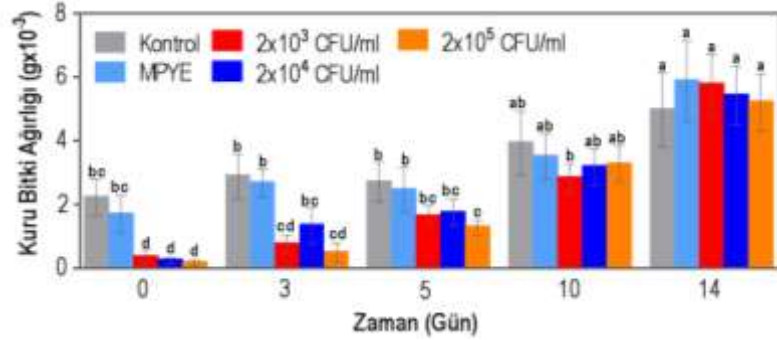
Şekil 3. 5. günlük iken bakteriyel inoküle edilen *A. thaliana* bitkiciklerinin 14. günde morfolojik görünüşleri a) Kontrol, b) Sadece MPYE besiyeriyle inokülasyon, c)  $2 \times 10^3$  CFU/ml, d)  $2 \times 10^4$  CFU/ml, e)  $2 \times 10^5$  CFU/ml bakteriyel inokülasyon

Bitkinin yaş ve kuru ağırlığına bakıldığında ise; 0, 3, 5 ve 10 günlük iken bakteriyel inoküle edilen bitkiciklerde; bakteri konsantrasyonunun  $2 \times 10^3$  CFU/ml ve üzerinde olduğu durumlarda; Şekil 4

ve Şekil 5’de belirtildiği üzere yaş bitki ve kuru bitki ağırlığında azalma tespit edilirken; bitkinin 14. gününde uygulanan bakteriyel inokülasyonlar ise bitkinin yaş ve kuru ağırlığında kontrol grubuyla benzer sonuçlar ortaya çıkarmıştır.



Şekil 5. *A. thaliana* bitkisinin yaş ağırlığı üzerine *P. putida* KT2440 bakterisinin farklı konsantrasyonlarının etkisi



Şekil 6. *A. thaliana* bitkisinin kuru ağırlığı üzerine *P. putida* KT2440 bakterisinin farklı konsantrasyonlarının etkisi

#### 4. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada bir toprak bakterisi olan *P. putida* KT2440’ın farklı fizyolojik evrelerinde *A. thaliana*’nın çimlenmesi ve gelişimi üzerine etkisi *in vitro* koşullarında değerlendirilmiştir. Bitkiyle inokülasyon için pipetleme yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; bakterinin denenen tüm konsantrasyonları bitki büyümesinin erken evrelerinde olumsuz etki gösterirken; ilerleyen dönemlerde bitkinin kök uzunluğu, gövde uzunluğu, yaş ve kuru ağırlığında kontrol grubuyla benzer veriler elde edilmiştir. Bu sonuçlar, bitki-bakteri etkileşim çalışmaları için uygulanan bakteri konsantrasyonunun yanı sıra; bitkinin en uygun fizyolojik evresinde muamelenin de önemine dikkat çekmektedir. *P. putida* KT2440 özellikle degradasyon çalışmaları için elverişli, metabolik olarak çok yönlü bir bakteridir. Bu çalışmada bakterinin bitki büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkilemeyen optimal konsantrasyonu ( $2 \times 10^{-3}$  CFU/ml) ve inokülasyon zamanı (14. gün) tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler, söz konusu bakterinin sürdürülebilir tarım ürünlerinin gelişimi için biyogübre olarak ya da fitoremediasyon gibi farklı amaçlara hizmet etmek üzere tek başına veya farklı bakteriyel türlerden oluşturulacak mikrobiyal topluluklar içinde yer alarak bitkiye fayda sağlama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma Gebze Teknik Üniversitesi BAP (2018-A105-41) tarafından desteklenmiştir.



## Kaynaklar

- [1] Buee M., De Boer W., Martin F., van Overbeek L., Jurkevitch E. 2016. The rhizospherezoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil*, 321:189-212.
- [2] Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., Bakker P.A.H.M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17: 478-86.
- [3] Vorholt J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Review Microbiology*, 10: 828-40.
- [4] Doornbos R.F., Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. *Agronomy for Sustainable Development*, 32: 227-243.
- [5] Pieterse C.M.J., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C.M., Bakker P.A.H.M. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347-375.
- [6] Espinosa-Urgel M., Salido A., Ramos J.L. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of Bacteriology*, 182: 2363-2369.
- [7] Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M.C., Garcia J.M., Wyke L., Ramos J.L. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 315-321.
- [8] Weller D.M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97: 250-256.
- [9] Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V.A.P., Brinkac L. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4: 799-808.
- [10] Jiménez J.I., Miñambres B., García J. L., Díaz E. 2002. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4: 824-841.
- [11] Wu X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W., Ramos J., Van der., Lelie D. 2010. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35: 299-323.
- [12] Matilla Miguel A., Ramos J.L., Bakker P.A., Doornbos R., Badri D.V., Vivanco J.M., Ramos-González M.I. 2010. *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environmental Microbiology Reports*, 2 (3): 381-388.
- [13] Neal A.L., Ton J. 2013. Systemic defense priming by *Pseudomonas putida* KT2440 in maize depends on benzoxazinoid exudation from the roots. *Plant Signaling & Behaviour*, 8: e22655.
- [14] Koornneef M., Meinke D. 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61 (6): 909-921.
- [15] Dodds P.N., Rathjen J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11: 539-548.
- [16] MacLean A.M., Sugio A., Makarova O.V., Findlay K.C., Grieve V.M., Tóth R., Nicolaisen M., Hogenhout S.A. 2011. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, 157: 831-841.
- [17] Ouibrahim Laurence and Carole Caranta. 2013. Exploitation of natural genetic diversity to study plant-virus interactions: what can we learn from *Arabidopsis thaliana*? *Molecular plant pathology*, 14 (8): 844-854.
- [18] Windram, O., Penfold, C.A. Denby K.J. 2014. Network modeling to understand plant immunity. *Annual review of phytopathology*, 52.
- [19] Pieterse C.M.J., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C.M., Bakker P.A.H.M. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbe. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347-375.
- [20] Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-497.
- [21] Zannoni D., Venturoli G., Daldal F. 1992. The role of the membrane bound cytochromes of b- and c-type in the electron transport chain of *Rhodobacter capsulatus*. *Archives of Microbiology*, 157: 367-374.

- [22] Batool M. 2018. Determination of interaction between *Arabidopsis thaliana* and putative endophytic bacterium associated with fraser photinia. Gebze Technical University, Department of Molecular Biology and Genetics, Master Thesis, 64 pages, Kocaeli.
- [23] Ishiga Y., Ishiga T., Uppalapati S.R., Mysore, K.S. 2011. Arabidopsis seedling flood-inoculation technique: a rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions. *Plant Methods*, 7: 32.
- [24] Akkaya, Ö., Arslan E., Özden Çiftçi Y. 2018. Influence of *Pseudomonas putida* on in vitro germination and seedling growth of *Arabidopsis thaliana*, 2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), Page 47, June 26-30, Podgorica, Montenegro.