

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDOFİT BAKTERİ İZOLATLARININ TÜM GENOM DİZİLEMESİ VE
POLİFAZİK KARATERİZASYONU İLE BİYOAKTİF METABOLİT ÜRETME
POTANSİYELLERİNİN AÇIĞA ÇIKARILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tülay ORUÇ
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

VAN – 2024

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDOFİT BAKTERİ İZOLATLARININ TÜM GENOM DİZİLEMESİ VE
POLİFAZİK KARATERİZASYONU İLE BİYOAKTİF METABOLİT ÜRETME
POTANSİYELLERİNİN AÇIĞA ÇIKARILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tülay ORUÇ

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
FYL-2023-10550 No'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN – 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN danışmanlığında, Tülay ORUÇ tarafından sunulan “Endofit Bakteri İzolatlarının Tüm Genom Dizilemesi ve Polifazik Karakterizasyonu ile Biyoaktif Metabolit Üretme Potansiyellerinin Açığa Çıkarılması” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 29/04/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Koca ÇAYDAŞI

İmza:

Üye: Prof. Dr. Mehtap YILDIZ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun /.... /..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Tülay ORUÇ



ÖZET

ENDOFİT BAKTERİ İZOLATLARININ TÜM GENOM DİZİLEMESİ VE POLİFAZİK KARAKTERİZASYONU İLE BİYOAKTİF METABOLİT ÜRETME POTANSİYELLERİNİN AÇIĞA ÇIKARILMASI

ORUÇ, Tülay

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN

Nisan 2024, 54 sayfa

Endofitler, bitkilerin doku aralarında/içlerinde yaşayan ancak konukçusunda gözle görülen bir hastalık belirtisine neden olmayan bakteriyel veya fungal mikroorganizmaları kapsar. Bu çalışmada çeşitli tek yıllık bitkilerden izole edilmiş ve daha önceki çalışmalarda bitki büyümesini teşvik edici (PGP) markörler yönünden kayda değer sonuçlar üretmiş G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 kodlu endofit izolatlarının yeni nesil dizileme yolu ile tüm genom dizilemesi ve biyokimyasal karakterizasyonları ortaya konmuştur. Ayrıca izolatların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları standart disk metodu yolu ile test edilmiştir. Illumina HiSeq platformu kullanılarak yapılan tüm genom dizilemesi sonucunda G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 kodlu endofit izolatlarının taslak genom boyutlarının sırasıyla 4.2 Mb (4277605 bp), 4.5 Mb (4582803 bp), 4.8 Mb (4794802 bp) ve 3.9 Mb (3886939 bp) olarak belirlenmiştir. G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 izolatlarının genomlarının G+C içeriğinin ise sırasıyla %45.8, %66, %55.2 ve %65.7 olduğu tespit edilmiştir. G56Y1 izolatı tüm genom tabanlı filogenetik analizinde %88.7 dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değeri ile *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42; G106K1 izolatı %61.8 dDDH değeri ile *Stenotrophomonas lactitubi* M15; G119Y2T izolatı %29.7 dDDH değeri ile *Arthrobacter gandavensis* JCM 13316 ve G129K1-1 izolatı %88.8 dDDH değeri ile *Pantoea agglomerans* NBRC 102470 ile örtüşmüşlerdir. dDDH değerleri göz önüne alındığında, %61.8 ve %29.7 değerleriyle G106K1 ve G119Y2T izolatlarının sırası ile *Stenotrophomonas* ve *Arthrobacter* cinslerine ait yeni türler olabileceği hipotezi ağırlık kazanmıştır. Yapılan genom analizlerinde izolatların terpen, tiyopeptid, siderofor, betalakton, metelofor ve arilpolien gibi biyoteknolojik öneme sahip sekonder metabolitleri kodlayan gen/gen kümelerine sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatların antibiyotik duyarlılığı sonuçlarına göre ampisilin, penisilin G, florfenikol, eritromisin, nitrofurantoin ve klindomisine tam direnç gösteren G106K1 en dirençli izolat olarak göze çarpmıştır. Bu izolatı penisilin G, rifampin, eritromisin, nitrofurantoin ve klindamisine tam direnç gösteren G129K1-1 izolemiştir. G119Y2T izolatı sadece sefepim antibiyotiğine tam direnç gösterirken, G56Y1 izolatı da sadece rifampin antibiyotiğine karşı tam direnç gösterebilmiştir.

Anahtar kelimeler: Endofit bakteriler, Sekonder metabolit, Tüm genom analizi



ABSTRACT

ELUCIDATION OF BIOACTIVE METABOLITE PRODUCTION POTENTIAL OF ENDOPHYTE BACTERIAL ISOLATES BY WHOLE GENOME SEQUENCING AND POLYPHASIC CHARACTERISATION

ORUÇ, Tülay

M.Sc. Thesis, Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Bilgin TAŞKIN

April 2024, 54 pages

Endophytes include bacterial or fungal microorganisms that live between/inside plant tissues but do not cause visible signs of disease in their host. In this study, whole genome sequencing by next generation sequencing and biochemical characterization of endophyte isolates G56Y1, G106K1, G119Y2T and G129K1-1, which were isolated from various annual plants and produced remarkable results in terms of plant growth promoter (PGP) markers in previous studies, were carried out. In addition, the susceptibilities of the isolates to various antibiotics were tested by standard disc method. As a result of whole genome sequencing using the Illumina HiSeq platform, the draft genome sizes of G56Y1, G106K1, G119Y2T and G129K1-1 coded endophyte isolates were determined as 4.2 Mb (4277605 bp), 4.5 Mb (4582803 bp), 4.8 Mb (4794802 bp) and 3.9 Mb (3886939 bp), respectively. The G+C content of the genomes of G56Y1, G106K1, G119Y2T and G129K1-1 isolates was 45.8%, 66%, 55.2% and 65.7%, respectively. As a result of whole genome based phylogenetic analysis, isolate G56Y1 matched with *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 with a digital DNA-DNA hybridization (dDDH) value of 88.7%; G106K1 isolate matched with *Stenotrophomonas lactitubi* M15 with a dDDH value of 61.8%; G119Y2T isolate matched with *Arthrobacter gandavensis* JCM 13316 with a dDDH value of 29.7% and G129K1-1 isolate matched with *Pantoea agglomerans* NBRC 102470 with a dDDH value of 88.8%. Considering the dDDH values, it was hypothesised that isolates G106K1 and G119Y2T with values of 61.8% and 29.7% could be new species belonging to the genera *Stenotrophomonas* and *Arthrobacter*, respectively. Genome analyses revealed that the isolates have gene/gene clusters encoding secondary metabolites of biotechnological importance such as terpene, thiopeptide, siderophore, betalactone, metelophore and arylpolyene. According to the antibiotic susceptibility results of the isolates, the most resistant isolate was G106K1 which showed complete resistance to ampicillin, penicillin G, florfenicol, erythromycin, nitrofurantoin and clindamycin. This isolate was followed by G129K1-1 which showed complete resistance to penicillin G, rifampin, erythromycin, nitrofurantoin and clindamycin. Isolate G119Y2T showed complete resistance only to cefepime antibiotic, while isolate G56Y1 showed complete resistance only to rifampin antibiotic.

Keywords: Endophyte bacteria, Secondary metabolite, Whole genome analysis



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, yoğun temposuna rağmen vakit ayırarak yardımlarını esirgemeyen, beni her zaman çalışmaya teşvik eden danışmanım ve hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bilgin TAŞKIN' a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez kapsamındaki çalışmalar, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından FYL-2023-10550 numaralı ve “Endofit Bakteri İzolatlarının Tüm Genom Dizilemesi ve Polifazik Karakterizasyonu ile Biyoaktif Metabolit Üretme Potansiyellerinin Açığa Çıkarılması” isimli proje ile desteklendiğinden Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

2024

Tülay ORUÇ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1 Endofit Bakteriler	3
2.2 Endofit Bakterilerin Biyoteknolojideki Önemi	3
2.3 Primer Metabolitler	4
2.4 Sekonder Metabolitler	4
2.5 Yaygın Sekonder Metabolitler	5
2.5.1 Steroidler	5
2.5.2 Tanenler	5
2.5.3 Saponinler	5
2.5.4 Alkaloidler	5
2.6 Sekonder Metabolitlerin Önemi	6
2.7 Tüm Genom Dizilemesi	7
2.8 Dizileme Teknolojileri	8
2.8.1 Birinci Nesil Dizileme Teknolojileri.....	8
2.8.2 İkinci Nesil Dizileme Teknolojileri	9
2.8.3 Üçüncü Nesil Dizileme Teknolojileri	9
2.9 Genom Dizilemesinin Önemi	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1 Bakteri İzolatları.....	11
3.2 İzolatların Geliştirilmesi.....	11
3.3 Biyokimyasal Karakterizasyon.....	12
3.4 Ekstraselüler Enzim Aktivitesi Belirlenmesi	12
3.4.1 Proteaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi	12
3.4.2 Amilaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi	12
3.4.3 Lipaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi.....	13
3.4.4 Selülaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi	13
3.4.5 Ksilinaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi	14

3.4.6	Pektinaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi	14
3.5	Tolerans Testleri.....	14
3.6	Antibiyotik Duyarlılık Testi	15
3.7	Tüm Genom Dizileme ve Analizi	15
4.	BULGULAR.....	17
4.1	Biyokimyasal Karakterizasyon.....	17
4.2	Ekstraselüler Enzim Aktivite Testleri	19
4.3	Tolerans Testleri.....	21
4.3.1	Tuz Tolerans Testi	21
4.3.2	Polyethylene Glycol (PEG1000) Tolerans Testi.....	21
4.4	Antibiyotik Duyarlılık Testi	22
4.5	Tüm Genom Dizileme ve Analizi	24
4.5.1	G56Y1'in Genom Özellikleri ve Filogenetik Analizi.....	24
4.5.2	G106K1'in Genom Özellikleri ve Filogenetik Analizi.....	27
4.5.3	G119Y2T'in Genom Özellikleri ve Filogenetik Analizi	30
4.5.4	G129K1-1'in Genom Özellikleri ve Filogenetik Analizi	33
4.6	Biyoaktif Sekonder Metabolit Analizi	36
4.6.1	Biyoaktif Sekonder Metabolitler için İzolatlar'ın Biyosentetik Potansiyeli.....	36
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	39
	KAYNAKLAR.....	47
	ÖZ GEÇMİŞ.....	55

ÇİZELGELER LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Kullanılan izolat, konukçu ve izole edilen organ.....	11
Çizelge 3.2 İzolatların geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar besi ortamı bileşimi.	11
Çizelge 4.1 G56Y1 bakteri izolatının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite	17
Çizelge 4.2 G106K1 bakteri izolatının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite	18
Çizelge 4.3 G119Y2T bakteri izolatının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite	18
Çizelge 4.4 G129K1-1 bakteri izolatının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite	19
Çizelge 4.5 İzolatların ekstraselüler enzim aktiviteleri. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite.....	19
Çizelge 4.6 Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'ne uygun olarak disk difüzyon duyarlılık testi ile belirlenen zon çapları (mm cinsinden) ölçümlerinin ortalama değerleri. S: Duyarlı, I: Ortalama Dirençli, R: Dirençli. Staph.: <i>Staphylococcus</i> spp. Enterococ.: <i>Enterococcus</i> spp. Enterobac.: <i>Enterobacteriales</i> spp.....	24

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 4.1 G156Y1, G106K1, G129K1-1 ve G119Y2T bakteri izolatlarının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla API ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen test sonuç fotoğrafı	20
Şekil 4.2 Bakteri izolatlarının ekstraselüler enzim aktivite testlerini gösteren örnek fotoğraflar. A) Amilaz, B) Proteaz, C) Pektinaz, D) Ksilinaz	20
Şekil 4.3 G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 izolatlarının %0, %2.5, %5, %7.5 ve %10 (w/v) NaCl içeren NB sıvı besi ortamlarında 30°C, 24 saat inkübasyon sonrası ortaya koydukları büyüme profil eğrileri. (Ölçümler OD ₆₀₀ nm dalga boyu kullanılarak alınmıştır).	21
Şekil 4.4 G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 izolatlarının %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 (w/v) PEG1000 içeren NB sıvı besi ortamlarında 30 °C, 24 saat inkübasyon sonrası ortaya koydukları büyüme profil eğrileri. (Ölçümler OD ₆₀₀ nm dalga boyu kullanılarak alınmıştır).	22
Şekil 4.5 İzolatların standart disk difüzyon yöntemiyle yapılmış antibiyotik duyarlılık testi örnek fotoğrafları.....	23
Şekil 4.6 G56Y1 izolatının genom dizisi anotasyonun RAST (https://rast.nmpdr.org/) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak oluşturulmuş protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri özeti	25
Şekil 4.7 G56Y1 izolatının genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir.	26
Şekil 4.8 G106K1 izolatının genom dizisi anotasyonun RAST (https://rast.nmpdr.org/) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak oluşturulmuş protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri özeti	28
Şekil 4.9 G106K1 izolatının genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom	

tabanlı izolat filogenetik ağacı Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir.	29
Şekil 4.10 G119Y2T izolatının genom dizisi anotasyonun RAST (https://rast.nmpdr.org/) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak oluşturulmuş protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri özeti	30
Şekil 4.11 G119Y2T izolatının genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir.	32
Şekil 4.12 G129K1-1 izolatının genom dizisi anotasyonun RAST (https://rast.nmpdr.org/) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak oluşturulmuş protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri özeti	33
Şekil 4.13 G129K1-1 izolatının genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir.	35
Şekil 4.14 G56Y1 izolatının taslak genomunda belirlenmiş ikincil metabolit bölgeleri	36
Şekil 4.15 G106K1 izolatının taslak genomunda belirlenmiş ikincil metabolit bölgeleri	37
Şekil 4.16 G119Y2T izolatının taslak genomunda belirlenmiş ikincil metabolit bölgeleri	37
Şekil 4.17 G129K1-1 izolatının taslak genomunda belirlenmiş ikincil metabolit bölgeleri	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

CaCl₂	Kalsiyum klorür
CMC	Karboksimetil selüloz
KCl	Potasyum klorür
K₂HPO₄	Dipotasyum fosfat
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
MgSO₄	Magnezyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaNO₃	Sodyum nitrat
NaOCl	Sodyum hipoklorit
PEG	Polietilen glikol

Kısaltmalar

Açıklama

ABI	Applied Biosystem
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
NA	Nutrient Agar
NGS	Yeni Nesil Dizileme
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SOLID	Oligonükleotid Ligasyonu ve Tespiti ile Sıralama
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



1. GİRİŞ

Bir endofit, yaşam döngüsünün en azından bir kısmı boyunca bir bitkinin içinde ikamet eden, genellikle bir bakteri veya mantar olan bir endosimbionttur. Endofitik mikroorganizmalar, sağlıklı konak bitki dokularını kolonize ettikten sonra asemptomatik olarak yaşarlar ve hemen hemen tüm bitkilerde mevcuttur (Hallman vd., 1997). Neredeyse her bitki türünün bir veya daha fazla endofitik mikroorganizma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Gezegenimizde yaklaşık 3.000.000 bitki türünün var olduğu bilinmektedir; ancak bu bitki türlerinden yalnızca birkaçı ilgili endofitik biyolojileri açısından derinlemesine incelenmiştir. Dünya çapında farklı bitkilerle deneysel olarak ilişkilendirilen yaklaşık bir milyon endofitik türün sadece küçük bir yüzdesi kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Dutta vd., 2014; Strobel, 2018).

Endofitik mikroorganizmalar, bitki büyümesini teşvik edebilen veya metabolik yolları ve hatta abiyotik veya biyotik strese yanıt olarak gen ekspresyonunu modüle edebilen hormonlar ve ikincil metabolitler gibi kimyasal olarak çeşitli varlıklar sentezleyerek bitki fizyolojisi üzerinde etki gösterirler. Endofitlerin, konukçu bitkilerine önemli ekolojik faydalar sağlayan ikincil metabolitler ürettikleri bilinmektedir; ayrıca birçok endofitin kanser ve bulaşıcı hastalıkların tedavisi için güçlü farmakolojik ajanlar ürettiği de gösterilmiştir (Sharma vd., 2020).

Mikroorganizmalar, çok çeşitli biyoaktif metabolitlerin başlıca üreticileridir. Bakteri ve mantarlar, çok çeşitli biyoaktiviteye ve uygulamaya sahip metabolitlerin üretiminde ön plandadır. Endofitler, çok sayıda farklı biyolojik mikro ortamda, yani hem atmosferik hem de zorlu koşullar altında büyüyen bitkilerde yaşama potansiyelleri nedeniyle çeşitli doğal kaynakların olağanüstü bir kaynağıdır. Tıbbi kullanımlar için doğal biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve taranması, biyoaktif bileşiklerin keşfedilmesinin yolunu açmıştır. Endofitler, bitkilerin kendilerini patojenlere karşı savunmalarına yardımcı olan biyoaktif bileşikler üretir ve bu bileşikler yeni ilaçların keşfedilmesine yol açabilir. Bu nedenle, ürettikleri biyoaktif bileşiklerin hem bitki hem de insan sağlığı sektörlerinde uygulama alanı bulması oldukça beklenen bir durumdur (Agrawal ve Bhatt, 2023). Endofitlerin çok faydalı oldukları, bitkiler, çevre ve insanlar üzerinde çeşitli şekillerde olumlu etkileri olduğu tartışmasız bir şekilde kanıtlanmıştır. Örneğin endofitik mikroorganizmalar biyoaktif metabolitler ve endüstriyel açıdan

önemli enzimler sentezleyebilir, bitki büyümesini teşvik edebilir, biyotransformasyon süreçlerini gerçekleştirebilir ve fitoremediasyon veya biyoremediasyon süreçlerini hızlandırabilir (Kuzniar vd., 2019).

Çok sayıda bakteri suşunun genomlarının dizilemesi hem genomik hem de biyokimyasal düzeylerde karşılaştırmalı çalışmalar yapılmasını sağlar. Bu karşılaştırmalı çalışmalar, belirli bir sekonder metabolit türünü üretme potansiyellerine ilişkin olarak organizmalarda bulunan / bulunmayan genlere dayalı biyosentetik yolların karakterizasyonuna izin vermiştir (Choque vd., 2018). Temmuz 1995'te Fleischmann vd tarafından *Haemophilus influenzae* genom dizisinin tamamının yayınlanmasından bu yana, mikrobiyoloji alanı, bu başarıyı mümkün kılan genomik ve hesaplamalı biyolojideki atılımlardan en çok faydalanan alanlardan biri olmuştur. Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojileri, hibridizasyon yoluyla dizileme ve sentez yoluyla dizileme (SBS) olmak üzere iki gruba ayrılır. Sentezle dizileme (SBS) aslında Illumina dizileme teknolojisidir ve dünyadaki dizileme verilerinin %90'ını üreten en popüler yaklaşımdır (Pervez vd., 2022).

Bu çalışmada çeşitli tek yıllık bitkilerden izole edilmiş ve daha önceki çalışmalarda bitki büyümesini teşvik edici (PGP) markörler yönünden kayda değer sonuçlar üretmiş G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 kodlu endofit izolatlarının Illumina HiSeq platformu kullanılarak tüm genom taslak dizilemesi ve biyokimyasal karakterizasyonları ortaya konmuştur. Ayrıca izolatların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları standart disk metodu yolu ile test edilmiştir. G56Y1 izolatı tüm genom tabanlı filogenetik analizinde %88.7 dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değeri ile *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42; G106K1 izolatı %61.8 dDDH değeri ile *Stenotrophomonas lactitubi* M15; G119Y2T izolatı %29.7 dDDH değeri ile *Arthrobacter gandavensis* JCM 13316 ve G129K1-1 izolatı %88.8 dDDH değeri ile *Pantoea agglomerans* NBRC 102470 ile örtüşmüşlerdir. dDDH değerleri göz önüne alındığında, %61.8 ve %29.7 değerleriyle G106K1 ve G119Y2T izolatlarının sırası ile *Stenotrophomonas* ve *Arthrobacter* cinslerine ait yeni türler olabileceği hipotezi ağırlık kazanmıştır. Elde edilen taslak tüm genom dizi verileri karşılaştırmalı genom analiz metodları kullanılarak gen/gen kümeleri içerikleri açısından incelenmiş ve potansiyel uygulama alanlarına sahip ikincil metabolit gen kümeleri açığa çıkarılmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1 Endofit Bakteriler

Endofit bakteriler, bitki dokularında yetişen, konakçı bitkiye herhangi bir zarar vermeden çoğalan bakteriler olarak tanımlanmıştır (Bascom-Slack ve Strobel, 2012). Endofit bakterilerin azot fiksasyonu gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla bitki büyümesini teşvik ettiği bilinmektedir. Fitopatojenlere karşı biyolojik kontrol, büyümenin düzenlenmesi, bitki hormonlarının ve antimikrobiyal bileşiklerin üretimini sağlamaktadır (Lodewyckx vd., 2002). Endofitler, ilaç, tarım ve kozmetik endüstrisi gibi çeşitli sektörlerde yaygın olarak kullanılan yeni doğal ürünlerin potansiyel kaynaklarıdır (Bacon ve White, 2000; Strobel ve Daisy, 2003; Kumar ve Sagar, 2007). Şifalı bitkilerle ilişkili bakteriyel endofitlerin, bitki büyümesinin iyileştirilmesinde, bitkiye fayda sağlayan sekonder metabolitlerin üretiminde ve sürdürülebilir mahsul üretimi için kullanılabilecek önemli roller sağladığı bilinmektedir (Hassan, 2017).

Genel olarak, en çok belgelenen baskın bakteriyel endofitler *Proteobakteria* (α , β ve γ -*Proteobakteria*) filumuna aittir, diğerleri ise *Firmicutes* ve *Actinobacteria* filumunu içerir (Santoyo vd., 2016). Daha az kaydedilen filumlar arasında *Bacteroidetes*, *Asidobakteriler*, *Planctomycetes* ve *Verrucomicrobia* yer alır (Santoyo vd., 2016). En yaygın olarak bulunan bakteriyel endofit cinsleri arasında *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Microbacterium* yer alır (Hallmann vd., 1997; Sturz vd., 2000; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Sun vd., 2008; Marquez Santacruz vd., 2010; Romero vd., 2014; Santoyo vd., 2014). Endofitik yaşam tarzlarının özelliklerini ve endofitlerin diğer bitki mikrobiyomlarıyla arasındaki etkileşimleri anlamak zordur (Santoyo vd., 2016). Bunun nedeni sıcaklık, rakım, bitki büyüme aşaması, beslenme durumu, nem ve toprak pH'ı gibi birçok faktörden etkilenmeleridir (Hardoim vd., 2008). Örneğin, bakteriyel beslenme gereksinimlerine bağlı olarak, spesifik kimyasal kaynaklar, endofit ile bitki konakçısı arasındaki etkileşimin spesifikliği açısından belirleyici olabilir (Hardoim vd., 2015)

2.2 Endofit Bakterilerin Biyoteknolojideki Önemi

Tarım sektörü dünyanın en eski ekonomik sektörlerinden biridir ve temel olarak verimli toprak ve istikrarlı çevresel ve biyotik koşullar gibi faktörlere bağlıdır. Ancak son yıllarda bu sektör, su ve toprak kalitesini, ekolojik dengeyi ve biyolojik çeşitliliğin

korunmasını etkileyen ekonomik çerçevesi ve kullandığı teknikler sayesinde çevre kirliliğine büyük ölçüde katkıda bulunmuştur (Sturz, 2000; Yadav, 2017). Modern tarım sektöründe gübre uygulamasıyla toprağın verimliliği korunur ve çeşitli tarım kimyasalları kullanılarak hem patojenler hem de zararlılar azaltılmaktadır. Bunlar, hem suyu kirleterek hem de sızıntı yaparak hedef dışı organizmaların sağlığına ve çevreye olumsuz katkıda bulunmaktadır (Hurek ve Reinhold-Hurek, 2003). Bu nedenle endofitler, kimyasal pestisitlerin uygun alternatifleri olarak değerlendirilmektedir (De Silva vd., 2019).

Endofitik biyokontrol ajanlarına ilişkin araştırma faaliyetlerinin çoğu kontrollü ortamlarda (laboratuvarlarda) yürütülmüştür (De Silva vd., 2019). Endofitlerin hem bitki konakçılarıyla hem de çevresel koşullarla ilişkili olduğu görülmektedir (Murphy vd., 2018; De Silva vd., 2019). Endofitlerin antagonistik aktiviteleri hem antibiyotik aktivitelerini hem de hastalığın gelişiminin direncini veya inhibisyonunu içermektedir. (De Silva vd., 2019). Ek olarak bitki büyümesini teşvik etmekte ve bitkiyi biyotik ve abiyotik streslere karşı koruyabilmektedir (Waller vd., 2005; Baltruschat vd., 2008; Berendsen vd., 2012; Marella, 2014; Santoyo vd., 2016). Bitki gelişimi için gerekli besinleri sağlamak amacıyla biyogübre olarak kullanılabilir.

2.3 Primer Metabolitler

Primer metabolitler büyüme ve gelişmeden sorumlu olan bileşiklerdir. Bitkinin metabolik faaliyetleri ve bitkinin hayatta kalması için gereklidir. Primer metabolitlere; proteinler, nükleotidler, yaygın yağ asitleri, klorofil ve şeker gibi metabolitler örnek olarak verilmektedir (Ibraheem ve Maimako, 2014; Hannah ve Krishnakumari, 2015).

2.4 Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler primer metabolizmanın ürünleridir ve metabolik faaliyetlere doğrudan katılmamaktadırlar. Bitkinin daha ziyade tozlaştırıcıları çekmek veya onlara karşı savunmak gibi belirli işlevlere hizmet ettiği bilinmektedir. Sekonder metabolitler; tanenler, alkaloidler, flavonoidler, steroidler, saponinler ve glikozitler olarak bilinmektedir (Hoffmann, 1951; Hannah ve Krishnakumari, 2015).

2.5 Yaygın Sekonder Metabolitler

2.5.1 Steroidler

Steroidler, bir steroid çekirdeği (birleşik dört halkalı bir karbon iskeleti) içeren, terpenoid lipidler olarak sınıflandırılan organik bileşiklerdir ve bunların farklı biyolojik etkileri, ortak çekirdeğe bağlı çeşitli gruplar tarafından belirlenmektedir (Bhawani vd., 2010; Çitoğlu ve Acıkara, 2010). Çoğu steroid, metabolizmayı kontrol eden ve gelişime yardımcı olan hormonlar olarak işlev görmektedir (Kintzios ve Barberaki, 2004; Bhawani vd., 2010).

2.5.2 Tanenler

Tanenler, orta büyüklükte bir molekülde, bir fenil halkası üzerinde iki veya üç fenolik hidroksil grubu içeren polifenolik bileşiklerdir (Okuda ve Ito, 2011). Tanenler, içerdikleri toksinler nedeniyle otçulların büyümesini ve hayatta kalmalarını azaltarak bitki savunma mekanizmalarında işlev görür (Wina, 2010; Mazid vd., 2011; Ashok ve Upadhyaya, 2012). Tanenlerin büzücü ve hemostatik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu polifenolik biyomoleküller, hidrolize edilebilmektedir (Ahmad, 2007).

2.5.3 Saponinler

Saponinler glikozile edilmiş metabolitler olarak bilinmektedir (Podolak vd., 2010; Saxena vd., 2013). Saponinler hem polar hem de polar olmayan alanları içerir ve bu nedenle amfipatik glikozitler olarak adlandırılır, burada aglikon (glikozit içermeyen) sapogenin olarak adlandırılırlar ve polar değildirler (Negi vd., 2013). Bitkilerin çoğunda saponinlerin bitki büyümesine ve gelişmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (James ve Dubery, 2009).

2.5.4 Alkaloidler

Alkaloidler, heterosiklik nitrojen atomları içeren ancak amino asit olmayan, organik bazlı nitrojenli bileşiklerdir ve hem bitkilerde hem de hayvanlarda mevcuttur (Saxena vd., 2013; Kumar ve Roy, 2017). Çoğu alkaloid renksiz, kristalimsi bir malzeme olarak görünür ve acı bir tada sahiptir (Saxena vd., 2013). Doughari (2012) ve Olufunke (2012), alkaloidlerin toksik olduğu, bitkilerde otçullara ve patojenlere karşı savunma bileşikleri olarak görev

yaptığı bildirilmiştir. Biyolojik aktivite, kimyasal yapı ve biyosentetik yollar gibi faktörler, alkaloidleri indol, izokinolin, izoksazol, fenetilamin, purin, pirrolidin ve piperidin, kinolizidin ve tropan gibi farklı biyokimyasal gruplara ayırır (Saxena vd., 2013).

2.6 Sekonder Metabolitlerin Önemi

Sekonder metabolitlerin, yırtıcı hayvanlara ve mikrobiyal patojenlere karşı koruma, abiyotik strese karşı savunma, ayrıca tozlayıcı çekiciler olarak performans gösterme ve bitkiler ile mikroplar arasındaki sinyal iletişimini de içeren, konakçı bitkiler için hayati işlevleri yerine getirdiği bilinmektedir (Mazid vd., 2011; Yang, 2018). Bitki sekonder metabolitleri, antioksidatif, antikarsinojenik ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olabilen farmakolojik aktivitelere sahip biyoaktif bileşiklerdir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Afrika nüfusunun %80'inin temel sağlık ihtiyaçları için şifalı bitkiler şeklindeki geleneksel tıba bağımlı olduğunu, bunun da tıbbi bitkilerin aşırı kullanımına ve aşırı hasatına yol açtığını bildirmektedir (WHO, 2002). Sekonder metabolitlerin elde edilmesine yönelik bu yüksek talep nedeniyle tıbbi bitkilerin büyümesi için belirli bir doğal ortama ihtiyaç duyması nedeniyle tıbbi bitkiler, ticari kullanım ve yok olması biyolojik çeşitliliği tehdit etmektedir (Jain ve Pundir, 2017; Ramesh vd., 2017; Bengal vd., 2018; Van Wyk ve Prinsloo, 2018). Tıbbi bitkilerin aşırı kullanımını sınırlamak için doku kültürü, mikro çoğaltma ve sentetik tohum teknolojisinin kullanımını içeren biyoteknolojik yaklaşımlar kullanılmıştır (Chen vd., 2016). Ne yazık ki bu yaklaşımlar, düşük seviyelerde biyoaktif bileşik üretebildikleri, uzun büyüme dönemleri gerektirebildikleri ve biyoaktif sekonder metabolitlerin, primer metabolitler gibi diğer bitki kaynaklı metabolitlerden geri kazanılmasında zorluk olduğu için her zaman uygulanabilir değildir (Venieraki vd., 2017). Strobel (2003) bitkilerde yaşayan çoğunlukla mantar ve bakterilerden oluşan mikroorganizmaların, sekonder metabolitleri, kısa nesil süreleri, biyoreaktörlerde iyi kullanım özellikleri ve yüksek büyüme oranları nedeniyle tıbbi bitkiler için ideal bir alternatif haline gelmekte ve yüksek biyokütle üretimi sağlamaktadır (Ludwig-Muller, 2015). Çoğu endofitin kendi genomik DNA'sının parçalarını konakçı bitkininkiyle değiştirdiğine ve bunun endofitlerin konakçı bitkiye benzer bazı fitokimyasalları sentezlemesine izin verdiğine inanılmaktadır. Endofitler bunu, konakçı bitkinin kimyasını taklit ederek ve aynı biyoaktif metabolitleri üreterek başarmaktadır (Baker ve Satish, 2012; Santos ve Ferraris, 2012; Bedi vd., 2017; Venieraki vd., 2017; Uzma vd., 2018). Şu anda dünya çapındaki bilim insanları,

tıbbi potansiyelleri nedeniyle endofitleri ve bunların sekonder metabolitlerini incelemektedir (Strobel, 2003).

Endofitler, bitki büyümesini teşvik eden, bitki hastalığının şiddetini azaltan ve bitkinin (veya bitki dokularının) hem mikrobiyal patojenlere, böcek zararlılarına hem de diğer patojenlere karşı önlenmesine ve savunulmasına yardımcı olan sekonder metabolitler üretmektedirler (Abdalla ve Matasyoh, 2014). Bu sekonder metabolitler antimikrobiyal, antifungal, antikarsinojen, immün baskılayıcı veya antioksidan aktivitelere sahiptir (Zhang vd., 2006; Kusari vd., 2012; Abdalla ve Matasyoh, 2014). Bu nedenle alternatif olarak tarım ve tıpta kimyasal kontrol ajanlarına yönelik olarak değerlendirilmektedir.

Endofitler, konakçı bitkilerle aynı veya benzer sekonder metabolitleri üretebilmektedir (Zhang vd., 2006; Martinez-Klimova vd., 2017). Bu nedenle şifalı bitkilerle simbiyotik olarak ilişkili endofitler, ilaç geliştirme için alternatif kaynaklar olarak bilinmektedir.

Endofitlerin ürettiği çeşitli bileşikler, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip yeni bileşikler sundukları için araştırmacıları yeni endofitler aramaya yöneltmiştir (Strobel, 2003; Martinez-Klimova vd., 2017). Alkaloidler, peptidler gibi yeni ve bilinen metabolitlerin antimikrobiyal, sitotoksik, antimalaryal, antiviral, larvisidal ve antidiyabetik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle tıbbi bitkinin seçimi, büyük değere sahip biyoaktif bileşikler üreten endofitik türlerin izolasyonuna yol açabileceğinden önemli olmaktadır (Martinez Klimova vd., 2017).

2.7 Tüm Genom Dizilemesi

Genom yapısı, işlevi ve evrimi hakkındaki bilgilerimizin çoğu dizi verilerine bağlı olmaktadır. Farklı türler için artan çeşitlilikte yüksek kaliteli referans genom dizilerinin mevcudiyeti genetik çeşitliliği benzeri görülmemiş bir ölçekte incelemek için yeni bir fırsat sağlamıştır (Goodwin vd., 2016). Bütün genomlar, bölgeler veya genler birden fazla bireyde yeniden sıralanabilmektedir. Her bireyden alınan dizi verileri uygun referansa göre hizalanmakta ve farklı örnekler arasındaki genetik varyantlar, yüksek güvenilirliğe sahip dizi farklılıkları olarak tespit edilebilmektedir. Benzer şekilde, RNA örneklerinden elde edilen dizi verileri, yeni RNA türlerini keşfetmek, gen ekspresyon düzeylerini ölçmek ve dolayısıyla farklı hücre veya dokuların transkripsiyonel durumunu incelemek için kullanılabilir (Bentley, 2006). Bu inceleme, insan genetiği ve tıbbi uygulamalara odaklanarak yeni teknolojiler kullanılarak tüm genomun yeniden dizilenmesine yönelik olasılıkları araştırmaktadır.

Yeni nesil dizileme (NGS), genom biliminde devrim yaratarak genom yapısı, fonksiyonu ve dinamiği hakkındaki bilgimizi genişletmektedir. Bu çığır açan teknoloji, kapsamlı araştırmalara olanak sağlamakta ve bilim insanlarının genetik bilginin karmaşıklığını benzeri görülmemiş şekillerde keşfetmesine olanak sağlamaktadır. Yüksek üretim kapasitesi ve maliyet etkinliği ile NGS, temel biyolojiden klinik teşhise kadar çeşitli disiplinlerdeki araştırmacılar için temel bir araç haline gelmiştir (Goodwin vd., 2016). NGS yalnızca kapsamlı genom dizilimini sağlamakla kalmamış, aynı zamanda transkriptomik, epigenomik, metagenomik ve diğer omik çalışmaları da kolaylaştırmıştır (Levy ve Myers, 2016).

2.8 Dizileme Teknolojileri

DNA dizilerini “okumaya” yönelik teknolojiler son yirmi yılda hızla gelişmiştir (Metzker, 2005). Bu hızlı ilerleme, DNA dizileme alanında önemli atılımların yolunu açarak üç nesil dizileme teknolojisinin ortaya çıkmasına yol açmıştır.

2.8.1 Birinci Nesil Dizileme Teknolojileri

Sanger ve Maxam-Gilbert dizileme teknolojileri, 1977 yılında yayınlanmalarıyla DNA dizileme alanını başlatan Birinci Nesil Dizileme Teknolojisi olarak sınıflandırılmıştır (Holley vd., 1965; Salk vd., 2018).

Bu teknik, replikasyon sırasında DNA şeritlerinin zincir uzamasını sonlandıran dideoksinükleotidler kullanmakta ve uzunluğu birkaç yüz nükleotide kadar olan dizi okumalarının üretilmesine izin vermektedir. Sanger'in yöntemi geniş çapta benimsenmiştir ve DNA ve RNA'nın hızlı dizilenmesine olanak sağlayarak moleküler biyoloji alanında devrim yaratmıştır (Heather ve Chain, 2016). 1987 yılında, ilk ticari otomatik sıralama makinesi olan Applied Biosystems ABI 370, Amerika Birleşik Devletleri'nde piyasaya sürülmüştür. Bu makine, Sanger dizileme yöntemini otomatikleştirmek için floresan etiketli dideoksinükleotidler ve kılcal elektroforez kullanmış ve DNA dizilemesinin hızını ve doğruluğunu önemli ölçüde arttırmıştır (Barba vd., 2013). ABI 370 hızlı bir şekilde endüstri standardı haline gelmiş ve teknolojiadaki müteakip gelişmeler, daha uzun okumalar üretebilen daha yüksek verimli sıralayıcıların geliştirilmesine yol açmıştır (Schuster, 2008). Birinci nesil teknolojinin yerini büyük ölçüde daha yeni, daha yüksek verimli dizileme teknolojileri almış olsa da dizileme tekniklerinin geliştirilmesinde önemli bir tarihi kilometre taşı olmayı

sürdürmektedir. DNA ve RNA'yı dizileme yeteneği, biyoloji ve tıbbın pek çok alanında devrim yaratmış ve genetik ile moleküler biyolojinin anlaşılmasında çok sayıda keşif ve ilerlemeye yol açmıştır.

2.8.2 İkinci Nesil Dizileme Teknolojileri

İkinci nesil dizileme yöntemleri, binlerce ile milyonlarca DNA parçasının eşzamanlı dizilenmesine olanak sağlayarak DNA dizilemesinde devrim yaratmıştır. Bu yöntemler, paralel sıralama gerçekleştirme yetenekleri açısından geleneksel Sanger dizilemesinden farklıdır. Yaygın olarak kullanılan birçok ikinci nesil dizileme platformu ortaya çıkmıştır; bunlardan biri, DNA şablonuna nükleotidler eklendiğinde pirofosfat salınımının tespit edilmesiyle dizinin belirlendiği, pirosekansa dayalı Roche'un 454 dizileme yöntemidir. Başka bir platform, diziye belirlemek için DNA sentezi sırasında hidrojen iyonlarının salınmasını tespit eden İyon Torrent dizilimidir. Yaygın olarak kullanılan Illumina sıralama platformu, tersinir boya sonlandırıcılara dayalı bir sentez yoluyla sıralama yöntemini kullanmaktadır. Gelişmekte olan bir teknoloji olarak bilinen SOLiD dizilimi (Oligonükleotid Ligasyonu ve Tespiti ile Sıralama), DNA dizisini belirlemek için tersinir sonlandırıcılar kullanan ligasyon bazlı bir yaklaşım kullanmaktadır. Bu ikinci nesil dizileme teknolojileri, DNA dizilemenin verimini ve hızını önemli ölçüde artırmıştır (Pervez vd., 2022).

Bu platformlar tüm genom dizilimini, transkriptom analizini ve hedefe yönelik dizilimi mümkün kılarak genetik çeşitlilikte, hastalık araştırmalarında ve kişiselleştirilmiş tıpta çığır açan gelişmelere yol açmıştır.

2.8.3 Üçüncü Nesil Dizileme Teknolojileri

Daha önce tartışılan ikinci nesil dizileme teknolojileri, DNA analizinde devrim yaratmış ve birinci nesil dizileme teknolojilerine kıyasla en yaygın kullanılan teknolojiler olmuştur. Bununla birlikte, SGS teknolojileri genellikle yürütme süresi açısından uzun bir prosedür olan ve sıralama fiyatı açısından kapsamlı olan PCR amplifikasyon adımını gerektirmektedir. Ayrıca, genomların çok sayıda tekrarlanan bölgeye sahip olması sebebiyle karmaşık olduğu, SGS teknolojilerinin bunları çözemediği ve nispeten kısa okumaların genom birleştirmeyi daha zor hale getirdiği ortaya çıkmıştır. SGS teknolojilerinin neden olduğu sorunlara çözüm bulmak için bilim insanları, "üçüncü nesil sıralama" adı verilen yeni nesil bir sıralama geliştirmiştir. Bu üçüncü nesil dizileme, SGS teknolojilerinden çok daha hızlı bir

uygulama süresinde, PCR amplifikasyonuna ihtiyaç duymadan düşük dizileme maliyeti ve kolay numune hazırlama olanağı sunma yeteneğine sahiptir. Buna ek olarak TGS, karmaşık genomların tekrarlayan bölgeleri ve montaj sorununun çözümü için birkaç kilobazı aşan uzun okumalar üretebilmektedir (Satam vd., 2023).

2.9 Genom Dizilemesinin Önemi

Genom dizisi, temel mekanizmada yer alan genleri tanımlamak ve karakterize etmek için gerekmektedir. Endofit-bitki konakçı yaşam tarzının fizyolojik yönü (Kaul vd., 2016), endofitik ekoloji ve evrimin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır (Kaul vd., 2016; Megias vd., 2016). Ayrıca çeşitli biyoaktiviteleri etkileyen genetik özellikler ve kolonizasyon tercihleri; antibiyotik direnci ve üretimi, bitki büyümesi ile ilgili genler, endofitin salgı sistemi, yüzeye bağlanma ve yerleştirme elemanları, taşıma sistemi ve diğer ilgili metabolik mekanizmalar birkaç endofit bakteride belgelenmiştir.

Birçok bakteriyel endofitin tam genomu, bitki mikrobiyom ve mikrop-mikrop çalışmaları arasındaki simbiyoz ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda model sistemler olarak kabul edilmektedir (Kaul vd., 2016). Bireysel bir genomdan, metaomik (proteomik, metagenomik ve transkriptomik) gibi çalışmalarda faydalanılmaktadır. Örneğin, çoklu genom çalışmaları, yakın veya benzer akraba türlerin hem genetik hem de metabolik çeşitliliğini anlamaya yardımcı olmaktadır. Örneğin, bir türde hem saprotropizm hem de biyotropizm yaşam tarzıyla ilgili temel genlerin keşfi nedeniyle (Zuccaro vd., 2011), endofitik ve patojenik yaşam tarzları arasındaki seçimin dış faktörlerden etkilendiği öne sürülmüştür. Genom analizi aynı zamanda salgı proteini, integrin, transpozaz ve suşlar arasında fajla ilgili genler, bir mikrobiyomun üyeleri arasındaki metabolik çeşitliliği anlamak, metabolik mühendisliğinde kullanılabilecek değerli bilgilere yol açmak açısından önemlidir (Kaul vd., 2016). Ayrıca endofitizmin genetik belirleyicilerinin yakından gözlemlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Medlini vd., 2005; De Maayer vd., 2014). Bu da endofit adaptasyonu ve evriminden sorumlu olan çeşitli genlerin tanımlanmasına yol açmaktadır (Kaul vd., 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bakteri İzolatları

Bu çalışmada, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan, Van ili ve civarında bazı kültür ve yabancıl tahıl bitkilerinden (*Poaceae* familyası) izole edilmiş G156Y1, G106K1, G129K1-1 ve G119Y2T kod numaralı endofit bakteri izolatları kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Kullanılan izolat, konukçu ve izole edilen organ

İzolat No	İzolat Kodu	Konukçu	İzolasyon Yapılan Organ
1	G56Y1	İki sıralı arpa	Yaprak
2	G106K1	Buğday	Kök
3	G129K1-1	Çayır arpası	Kök
4	G119Y2T	Çipil	Yaprak

3.2 İzolatların Geliştirilmesi

Yüzde 20 gliserol içeren nutrient sıvı besiyerinde -80°C’de muhafaza edilen saf kültürlerin geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar (NA) besi ortamının içeriği Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 İzolatların geliştirilmesi için kullanılan nutrient agar besi ortamı bileşimi

Besiyeri	Bileşen	Miktar (1 L, pH 7.5)
Nutrient Agar	Et Özütü	1 g
	Maya Özütü	2 g
	NaCl	5 g
	Pepton	5 g
	Agar	15g

3.3 Biyokimyasal Karakterizasyon

Çalışmada besiyeri ortamında izole edilen bakteri izolat kültürlerinin fenotipik (biyokimyasal) özellikleri API ticari kitleri (GNA-GNB) kullanılarak belirlenmiştir. Besiyerinde 25°C’de 24 saat inkübasyonun ardından McFarland 0.5 optik dansiteye ayarlanan bakteriler, kit içerisindeki küpüllere inoküle edilerek 25°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrasında mikrogen ve API firmasının okuma tablosuna göre sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.4 Ekstraselüler Enzim Aktivitesi Belirlenmesi

Tüm ölçüm deneyleri dörder tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3.4.1 Proteaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Proteaz aktivitesi Carrim vd. (2006)’nin bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Proteaz enzimi üretimi için %1 (g/l) yağsız süt tozu içeren Nutrient Agar hazırlanmıştır. Bunun için süt tozu dışındaki besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra, ortam 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Süt tozu (10 g/100 ml) ayrıca 110°C’de 5 dakika 2 defa sterilize edilerek ve 45 °C’ye kadar soğutulup, temel besi ortamına aseptik koşullarda ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra eşit hacimlerde (20 ml) steril petrilere dökülerek katılaşması beklenmiştir. Çözünabilir süt tozu içeren proteaz ortamlarına nokta şeklinde ekilen izolatlar, 25°C’de 2-3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Koloni etrafında şeffaf bir zon oluşumu proteaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.4.2 Amilaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Amilaz aktivitesi Hankin ve Anagnostakis (1975)’in bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Amilaz enzimi üretimi için %1 çözünabilir nişasta içeren Nutrient Agar hazırlanmıştır. Çözünabilir nişasta içeren amilaz ortamlarına nokta şeklinde ekilen izolatlar 25°C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petriye lügol çözeltisi (%1’lik iyot çözeltisi) dökülerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Amilaz aktivitesine sahip izolatlarda koyu mavi zemin üzerinde koloni çevresinde şeffaf bir zon oluşumu amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.4.3 Lipaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipaz aktivitesi Hankin ve Anagnostakis (1975)'in bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Öncelikle lipaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla lipaz ortamı hazırlanmıştır. Lipaz ortamı şu içeriklerden oluşmuştur (g/l): Nutrient Broth 8 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, agar 15 g, pH 6.0 ve 20 ml Tween 20. Lipaz ortamı 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra besiyeri içeriklerinden ayrı olarak sterilize edilen Tween 20 lipaz ortamlarına ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan bu besiyerleri petrilere yaklaşık 20 ml olacak şekilde dökülmüştür. İzolatların lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla lipaz ortamlarına nokta ekimi yapılmış ve izolatlar gelişme sıcaklığında 2-3 gün inkübe edilmiştir. Koloni çevresinde açık renkte opak zon oluşumu lipaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.4.4 Selüloz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Selüloz aktivitesi Amore vd. (2015)'nin bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Öncelikle selüloz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla selüloz ortamı hazırlanmıştır. Selüloz ortamı şu içeriklerden oluşmuştur (g/l): NaNO_3 1 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 1 g, MgSO_4 0.5 g, yeast extract 0.5 g, glucose 1 g, Karboksimetilselüloz (CMC) 5 g, Agar 15 g. Selüloz ortamında yer alan bileşenlerin distile suda tamamen çözülmesinden sonra ortam 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra hazırlanan besi ortamları eşit hacimlerde (20 ml) steril petrilere dökülmüştür. İzolatların selüloz aktivitesinin belirlenebilmesi için selüloz ortamına nokta ekimi yapılmış ve 25°C'de 5-8 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilere önce %0.2'lik (w/v) Kongo kırmızısı çözeltisi dökülerek 20 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Daha sonra ise petrilere 5 M NaCl çözeltisi ilave edilerek yıkanmış ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Kırmızı zemin üzerinde, koloni çevresinde açık sarı renk zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.4.5 Ksilanaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Ksilanaz aktivitesi Amore vd. (2015)'nin bildirmiş olduğu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Öncelikle ksilanaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ksilanaz ortamı hazırlanmıştır. Ksilanaz ortamı şu içeriklerden oluşmuştur (g/l): NaNO_3 1 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 1 g, MgSO_4 0.5 g, yeast extract 0.5 g, glucose 1 g, agar 15 g, Ksilan 5 g. Ksilanaz ortamının bileşenleri distile suda çözüldükten sonra, ortam 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra aseptik koşullarda steril petrilere 20'şer ml dökülerek katılaşması beklenmiştir. İzolatlar ksilan içeren besiyerine ekildikten sonra 2-4 gün 25°C 'de inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon sonunda petriye %0.1' lik (w/v) kongo kırmızısı çözeltisi dökülerek 20 dakika süreyle boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyama süresinin sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması için petriye 5 M NaCl çözeltisi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kırmızı zemin üzerinde koloni çevresinde açık renkte zon oluşan izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.4.6 Pektinaz Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

Pektinaz aktivitesi Kobayashi vd. (1999)'nin bildirmiş olduğu yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle pektinaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla pektinaz ortamı hazırlanmıştır. Pektinaz ortamı şu içeriklerden oluşmuştur (g/l): Maya ekstraktı 2 g, Amonyumsülfat 2 g, Na_2HPO_4 6 g, KH_2PO_4 3g, Pektin 5 g, Agar 15 g. Pektinaz ortamının içerikleri distile suda çözüldükten sonra, ortam 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Steril besiyeri aseptik koşullarda petrilere 20'şer ml dökülerek katılaşması beklenmiştir. İzolatların nokta ekimleri yapıldıktan sonra 25°C 'de 3 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Petriye %1'lik setiltrimetil amonyum bromit (CTAB) çözeltisi eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmişlerdir. Süre sonunda koloni çevresinde şeffaf zon oluşumu meydana gelen izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.5 Tolerans Testleri

Test izolatlarının in vitro NaCl toleransını belirlemek için %0, %2.5, %5, %7.5 ve %10 NaCl içeren NB sıvı besi ortamları hazırlanmıştır. Besi ortamında 30°C 'de 24 saat inkübasyonun ardından McFarland 0.5 optik densiteye ayarlanan bakteri kültürlerinden 100 μl

alınarak hazırlanan besi ortamlarına inoküle edilmiş ve izolatların gelişimi OD600 nm dalga boyunda abzorban değerleri ölçülerek belirlenmiştir.

Test izolatlarının in vitro kuraklık toleransını belirlemek için %0, %5, %10, %15 ve %20 Polyethylene Glycol (PEG1000) içeren NB sıvı besi ortamları hazırlanmıştır. Besiyerinde 30°C'de 24 saat inkübasyonun ardından McFarland 0.5 optik densiteye ayarlanan bakteri kültürlerinden 100 µl alınarak hazırlanan besi ortamlarına inoküle edilmiş ve izolatların gelişimi OD₆₀₀ nm dalga boyunda abzorban değerleri ölçülerek belirlenmiştir.

3.6 Antibiyotik Duyarlılık Testi

İzolatların antibiyotik duyarlılığı Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2020) protokolüne göre test edilmiştir. Tryptic Soy Broth Agar (TSBA) petrileri sonuçların belirlenmesinden önce 30°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Antibiyotik disklerinin her birinin etrafındaki büyüme inhibisyon bölgeleri milimetre olarak ölçülmüştür. Her bir antibiyotik diskinin zon çapları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2020) tarafından yayınlanan kriterler kullanılarak yorumlanmıştır. Antibiyotik diskleri (OxoidTM antimikrobiyal duyarlılık diskleri); enrofloksasin (5 µg/disk), ampisilin (10 µg/disk), florfenikol (30 µg/disk), oksitetrasiklin (30 µg/disk), penisilin G (10 U/disk), siprofloksasin (10 µg/disk), rifampin (5 µg/disk), eritromisin (15 µg/disk), kanamisin (30 µg/disk), sefepim (30 µg/disk), klintomisin (2 µg/disk) ve nitrofurantoin (300 µg/disk) kullanılmıştır.

3.7 Tüm Genom Dizileme ve Analizi

İzolatların tüm genom dizilemesi hizmet alımı yolu ile gerçekleştirilmiştir (MicrobesNG, <https://microbesng.com/>). Tüm genom Illumina HiSeq 2500 yeni nesil dizileme platformu kullanılarak hizmet alımı ile dizilenmiştir. Tüm genom dizi verisi BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center) (<https://www.bv-brc.org/>) sunucusunda birleştirildikten sonra NCBI veri tabanına yüklenerek erişim numarası alınmıştır. Genom dizisinin anotasyonu RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri belirlenmiştir. Biyosentetik gen kümelerinin tahminleri antiSMASH versiyon 6.0'da (Blin vd., 2021), antibiyotik dirençliliği ile ilişkili genlerinin tespiti ARTS sunucusunda (<https://arts.ziemertlab.com/analyze>) (Mungan vd. 2020) yapılmıştır. Daha kapsamlı bir filogenetik analiz için, izolatların genom dizileri Type Strain Genome Server'a (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>) (Meier-Kolthoff vd.,

2019) yüklenerek tüm genom dizisine dayanan bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ayrıca, tüm genom dizisi kullanılarak izolatların veritabanlarındaki mikroorganizmalarla olan uzaklığı dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) (<https://ggdc.dsmz.de/>) analizi ve ortalama nükleotid özdeşlik değeri (ANI) hesaplanmasıyla (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) tespit edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Karakterizasyon

Çalışmada, G156Y1, G106K1, G129K1-1 ve G119Y2T kod numaralı endofit bakteri izolatları kültürlerinin biyokimyasal karakterizasyonu amacıyla API ticari kitleri (GNA-GNB) kullanılarak fenotipik (biyokimyasal) özellikleri belirlenmiştir. Besiyerinde 30°C’de 24 saat inkübasyonun ardından McFarland 0.5 optik densiteye ayarlanan bakteriler kit içerisindeki küpüllere inoküle edilerek 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 4.1). İnkübasyon sonrasında mikrogen ve API firmalarının okuma tablosuna göre sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4).

Çizelge 4.1 G56Y1 bakteri izolatının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite

Biyokimyasal Testler	GNA Strip	Biyokimyasal Testler	GNB Strip
Lysine	-	Gelatin	+
Ornithine	-	Melibiose	-
H ₂ S	-	Inositol	-
Glucose	-	Sorbitol	-
Mannitol	-	Rhamnose	-
ONPG	-	Sucrose	-
Indole	-	Arabinose	-
Urease	-	VP	+
TDA	-	Arginine	-
Citrate	-	Amygdalin	-

Çizelge 4.2 G106K1 bakteri izolatının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite

Biyokimyasal Testler	GNA Strip	Biyokimyasal Testler	GNB Strip
Lysine	-	Gelatin	+
Ornithine	-	Melibiose	-
H ₂ S	-	Inositol	-
Glucose	-	Sorbitol	-
Mannitol	-	Rhamnose	-
ONPG	-	Sucrose	-
Indole	-	Arabinose	-
Urease	-	VP	-
Citrate	+	Amygdalin	-
TDA	-	Arginine	-
Nitrogen dioxide (NO ₂)	-	Nitrogen (N ₂ ⁺)	+

Çizelge 4.3 G119Y2T bakteri izolatının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite

Biyokimyasal Testler	GNA Strip	Biyokimyasal Testler	GNB Strip
Lysine	-	Gelatin	+
Ornithine	-	Melibiose	-
H ₂ S	-	Inositol	-
Glucose	-	Sorbitol	-
Mannitol	-	Rhamnose	-
ONPG	-	Sucrose	-
Indole	-	Arabinose	-
Urease	-	VP	-
Citrate	-	Amygdalin	-
TDA	-	Arginine	-
Nitrogen dioxide (NO ₂)	+	Nitrogen (N ₂ ⁺)	-

Çizelge 4.4 G129K1-1 bakteri izolatının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen fenotipik (biyokimyasal) test sonuçları. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite

Biyokimyasal Testler	GNA Strip	Biyokimyasal Testler	GNB Strip
Lysine	-	Gelatin	+
Ornithine	-	Melibiose	+
H ₂ S	-	Inositol	-
Glucose	+	Sorbitol	+
Mannitol	+	Rhamnose	+
ONPG	+	Sucrose	+
Indole	-	Arabinose	-
Urease	-	VP	+
Citrate	-	Amygdalin	+
TDA	-	Arabinose	+
Nitrogen dioxide (NO ₂)	+	Nitrogen (N ₂ ⁺)	-

4.2 Ekstraselüler Enzim Aktivite Testleri

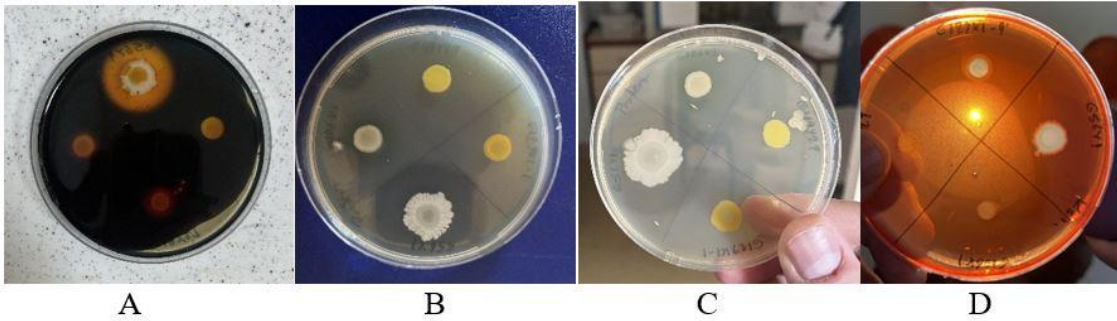
Bakteri izolatları proteaz, lipaz, amilaz, pektinaz, ksilanaz ve selüloz enzimlerini üretebilme yetenekleri açısından nitel olarak incelenmiştir. G119Y2T izolatının ilgili ayırt edici besi ortamlarında test edilen enzimlerin hiçbirini üretmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2, Çizelge 4.5). G106K1 izolatı sadece lipaz aktivitesi göstermiştir. G56Y1 izolatı ise ksilanaz dışında tüm enzimlerde aktivite göstermiştir. G129K1-1 izolatında ksilanaz aktivitesi zayıf olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.5 İzolatların ekstraselüler enzim aktiviteleri. (+): Pozitif Aktivite, (-): Negatif Aktivite

İzolat	Amilaz	Proteaz	Selüloz	Ksilanaz	Pektinaz	Lipaz
G56Y1	+	+	+	-	+	+
G106K1	-	-	-	-	-	+
G119Y2T	-	-	-	-	-	-
G129K1-1	-	-	-	+	-	-



Şekil 4.1 G156Y1, G106K1, G129K1-1 ve G119Y2T bakteri izolatlarının biyokimyasal karakterizasyon amacıyla API ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak gerçekleştirilen test sonuç fotoğrafı

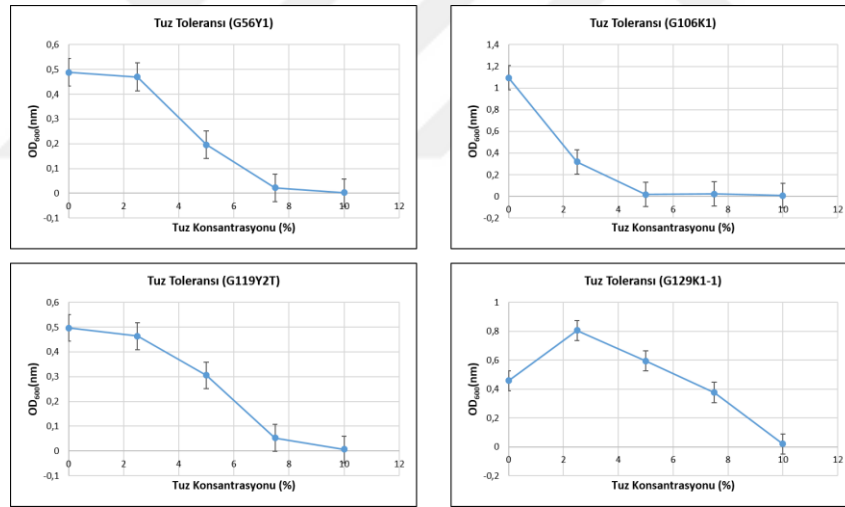


Şekil 4.2 Bakteri izolatlarının ekstraselüler enzim aktivite testlerini gösteren örnek fotoğraflar
A) Amilaz, B) Proteaz, C) Pektinaz, D) Ksilinaz

4.3 Tolerans Testleri

4.3.1 Tuz Tolerans Testi

Test izolatlarının in vitro NaCl toleransını belirlemek için %0, %2.5, %5, %7.5 ve %10 NaCl içeren NB sıvı besi ortamları hazırlanmıştır. Besi ortamında 30 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından McFarland 0.5 optik densiteye ayarlanan bakteriler kültürlerinden hazırlanan besi ortamlarına 100 µl inoküle edilen izolatların gelişimi OD₆₀₀ nm dalga boyunda abzorban değerleri ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.3). G129K1-1 izolatı %7.5 (w/v) NaCl içeren NB besi ortamında vermiş olduğu yüksek abzorban değeri ile tuza en dayanıklı izolat olarak göze çarpmıştır. G56Y1 ve G119Y2T izolatları %5 NaCl içeren besi ortamlarında iyi bir gelişme profili ortaya koymuş, %7.5 NaCl içeren besi ortamlarında zayıf da olsa büyümelerini sürdürmüşlerdir. G106K1 izolatı ise en fazla %2.5 NaCl tuz konsantrasyonunda büyüme gösterebilmiş ve izolatlar içerisinde tuza en hassas büyüme profilini göstermiştir.

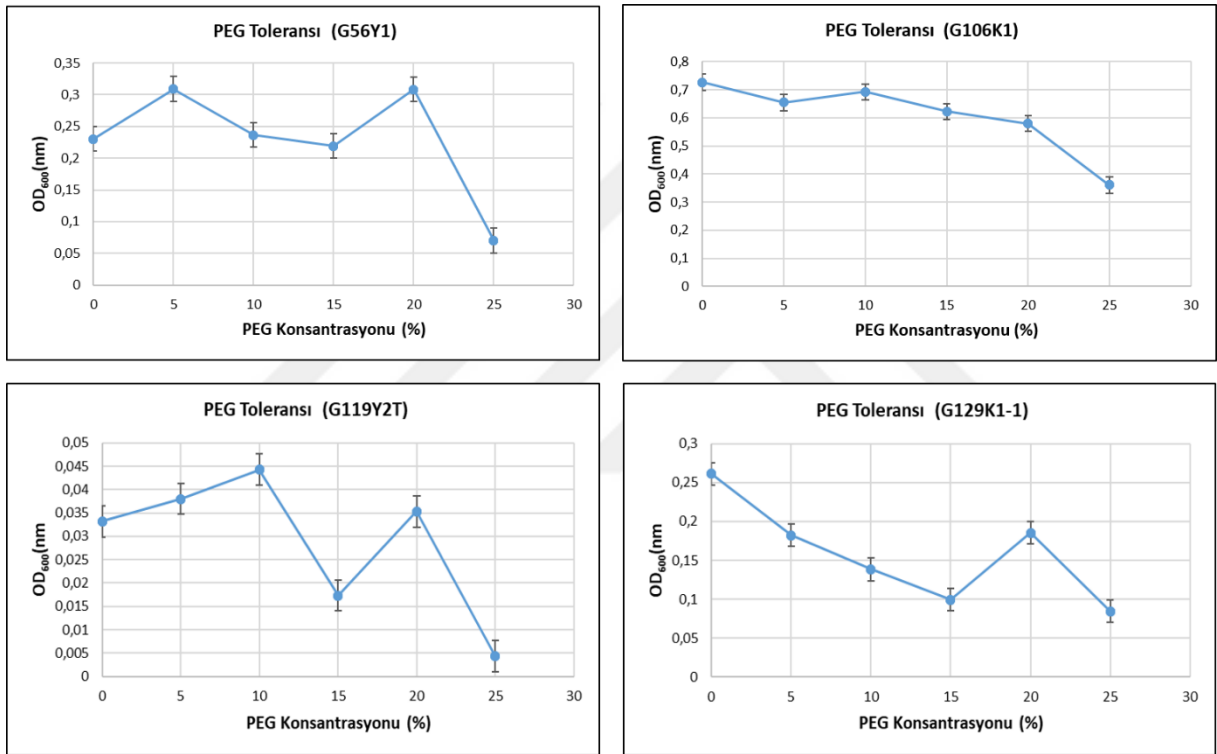


Şekil 4.3 G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 izolatlarının %0, %2.5, %5, %7.5 ve %10 (w/v) NaCl içeren NB sıvı besi ortamlarında 30°C, 24 saat inkübasyon sonrası ortaya koydukları büyüme profil eğrileri (Ölçümler OD₆₀₀ nm dalga boyu kullanılarak alınmıştır)

4.3.2 Polyethylene Glycol (PEG1000) Tolerans Testi

Test izolatlarının in vitro kuraklık toleransını belirlemek için %0, %5, %10, %15 ve %20 Polyethylene Glycol (PEG1000) içeren NB sıvı besi ortamları hazırlanıp kullanılmıştır. Besiyerinde 30°C'de 24 saat inkübasyonun ardından McFarland 0.5 optik densiteye ayarlanan

bakteriler kültürlerinden hazırlanan besi ortamlarına 100 µl inoküle edilen izolatların gelişimi OD₆₀₀ nm dalga boyunda abzorban değerleri ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.4). G106K1 izolatı tüm PEG konsantrasyonlarında güçlü bir büyüme profili ortaya koyarak in vitro koşullarda kuraklık stresine en iyi cevap veren izolat olmuştur. G56Y1 %25 PEG içeren besi ortamı hariç diğer PEG konsantrasyonlarında iyi bir büyüme profili ortaya koymuştur. G119Y2T ve G129K1-1 izolatları ise genel olarak farklı PEG konsantrasyonlarında inişli çıkışlı bir büyüme profili ortaya koyarak kuraklık stresine göreceli olarak daha zayıf tolerans göstermişlerdir.

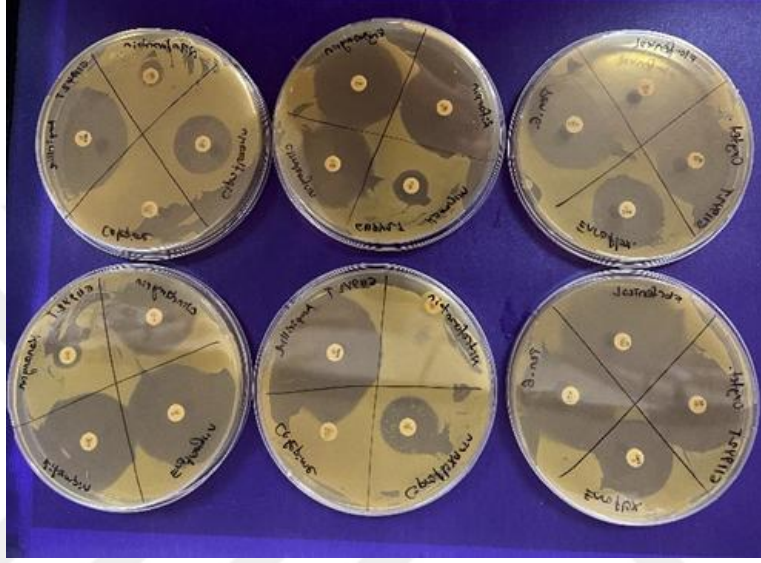


Şekil 4.4 G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 izolatlarının %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 (w/v) PEG1000 içeren NB sıvı besi ortamlarında 30 °C, 24 saat inkübasyon sonrası ortaya koydukları büyüme profil eğrileri (Ölçümler OD₆₀₀ nm dalga boyu kullanılarak alınmıştır)

4.4 Antibiyotik Duyarlılık Testi

İzolatların antibiyotik duyarlılığı Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2020) protokolüne göre test edilmiştir. Tryptic Soy Broth Agar (TSBA) petrileri sonuçların belirlenmesinden önce 30°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Antibiyotik disklerinin her birinin etrafındaki büyüme inhibisyon bölgeleri milimetre olarak ölçülmüştür. Her bir antibiyotik diskinin zon çapları Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2020)

tarafından yayınlanan kriterler kullanılarak yorumlanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, ampisilin, penisilin G, florfenikol, eritromisin, nitrofurantoin ve klindomisine tam direnç gösteren G106K1 en dirençli izolat olarak göze çarpmıştır. Bu izolatı penisilin G, rifampin, eritromisin, nitrofurantoin ve klindamisine tam direnç gösteren G129K1-1 izlemiştir. G119Y2T izolatı sadece sefepim antibiyotiğine tam direnç gösterirken, G56Y1 izolatı da sadece rifampin antibiyotiğine karşı tam direnç gösterebilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.5).



Şekil 4.5 İzolatların standart disk difüzyon yöntemiyle yapılmış antibiyotik duyarlılık testi örnek fotoğrafları

Çizelge 4.6 Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'ne uygun olarak disk difüzyon duyarlılık testi ile belirlenen zon çapları (mm cinsinden) ölçümlerinin ortalama değerleri. S: Duyarlı, I: Ortalama Dirençli, R: Dirençli. Staph.: *Staphylococcus* spp. Enterococ.: *Enterococcus* spp. Enterobac.: *Enterobacterales* spp.

Antibiyotik	G56Y1	G106K1	G119Y2T	G129K1-1	Değerlendirme Aralıkları
Ampicillin	23	0	34	15	R: ≤13, I:14-17, S: ≥18 (Other) R: <28, I: -, S: >29 (Staph.)
Enrofloxacin	40	33	25	35	R: ≤16, I:17-20, S: ≥21 (<i>E. coli</i>)
Penicillin G	30	0	34	0	R: <28, I: -, S: >29 (Staph.) R: <14, I: -, S: >15 (Enterococ.)
Florfenicol	25	0	40	20	R: ≤14, I:15-18, S: ≥19 (<i>E. coli</i>)
Ciprofloxacin	34	35	20	37	R: ≤13, I: -, S: ≥14 (Staph.) R: ≤16, I: 17-19, S: ≥20 (Enterococ.)
Rifampin	16	8	35	0	R: ≤23, I: 24-29, S: ≥30 (Staph.) R: ≤16, I: 17-19, S: ≥20 (Enterococ.)
Oxytetracycline	20	20	35	22	R: ≤14, I: 15-18, S: ≥19 (Staph.) R: ≤14, I: 15-18, S: ≥19 (Enterococ.)
Erythromycin	24	0	35	0	R: ≤13, I: 14-22, S: ≥23 (Staph.) R: ≤13, I: 14-22, S: ≥23 (Enterococ.)
Kanamycin	18	19	14	10	R: ≤13, I:14-17, S: ≥18 (General)
Nitrofurantoin	20	0	10	0	R: ≤14, I: 15-16, S: ≥17 (Staph.) R: ≤14, I: 15-16, S: ≥17 (Enterococ.)
Cefepime	20	15	0	25	R: ≤14, I: 15-17, S: ≥18 (Staph.) R: ≤18, I: 19-24, S: ≥25 (Enterobac.)
Clindamycin	20	0	30	0	R: ≤14, I: 15-20, S: ≥21 (Staph.) R: ≤15, I: 16-18, S: ≥19 (Streptococ.)

4.5 Tüm Genom Dizileme ve Analizi

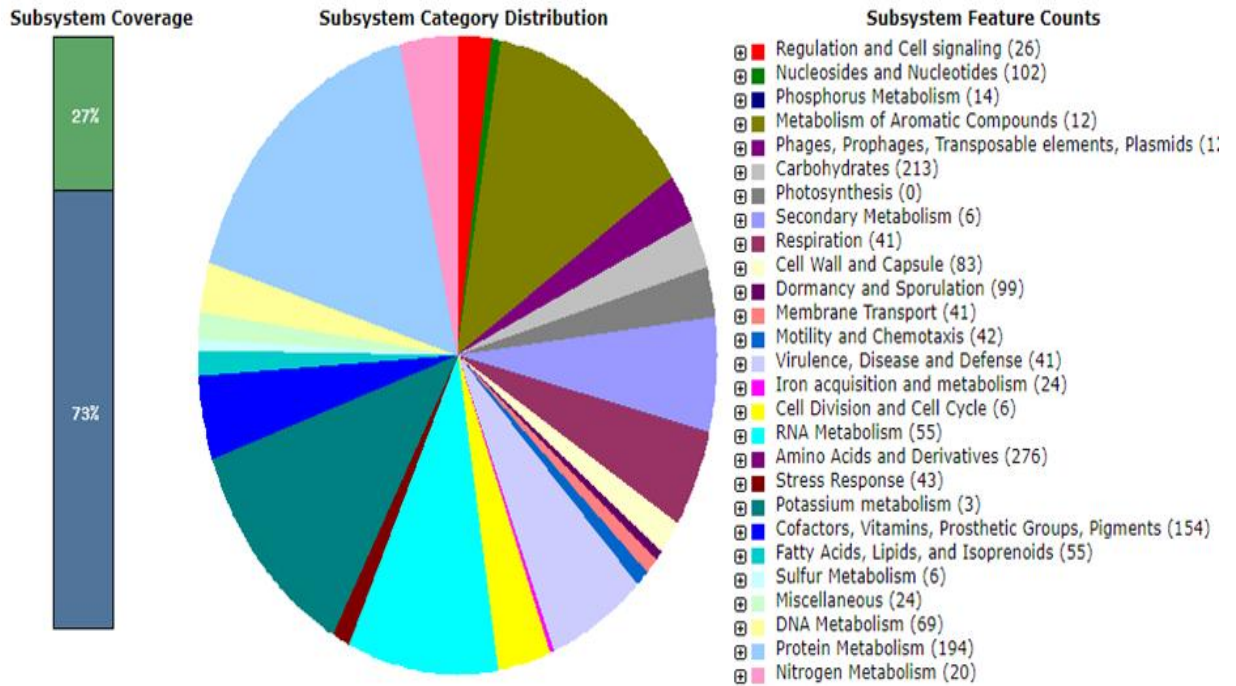
4.5.1 G56Y1'in Genom Özellikleri ve Filogenetik Analizi

G56Y1 izolatının tüm genom verileri GenBank'a JBBKYB000000000 erişim numarası altında yüklenmiştir. Genom verilerinin açılması (annotation) RAST sunucusunda gerçekleştirilmiştir (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Genom boyutunu ve genom G+C içeriği sırasıyla 4.27 Mb (4277605 bp) ve %45.8 olarak belirlenmiştir. İzolatın tamamlanan genomunun 4505 protein ve 92 adet RNA kodladığı ortaya konmuştur. Genomda 276 gen kümesinin amino asitlerinin/türevlerinin sentezi/metabolizmasına yönelik genleri kodladığı görülürken, 213 gen bölgesinin karbonhidrat metabolizması ile ilişkili olduğu

görülmüştür. İzolat virülans, hastalık ve antibiyotiklere ve toksik bileşiklere direnç dahil savunma özelliklerinden sorumlu 41 geni kodladığı görülmüştür. İzolat genomunun, kofaktörler, vitaminler, prostetik gruplar ve pigmentler için 154 geni kodladığı, ayrıca genomun, izolatın farklı ortamlara dayanıklılık ve adaptasyon potansiyelini gösteren stres yanıtıyla ilgili 43 adet gen içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).

Tüm genom tabanlı ve 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçlar, TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) kullanılarak oluşturulmuştur. Tüm genom tabanlı filogenetik ağaçta (Şekil 4.7), G56Y1, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, *Bacillus velezensis* NRRL B-41580 ve *Bacillus methylotrophicus* KACC 13105 ile birlikte kümelendiği görülmüştür. Benzer bir şemayı 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçta yansıtmaktadır.

İzolat ile yakın filogenetik komşuları arasındaki dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değerleri TYGS kullanılarak belirlenmiştir. İzolatın *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 suşu ile vermiş olduğu dDDH değeri %88.7 olup, bu veri G56Y1 izolatının *Bacillus* cinsi içerisinde yer aldığını göstermektedir.



Şekil 4.6 G56Y1 izolatının genom dizisi anotasyonunun RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak oluşturulmuş protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri özeti

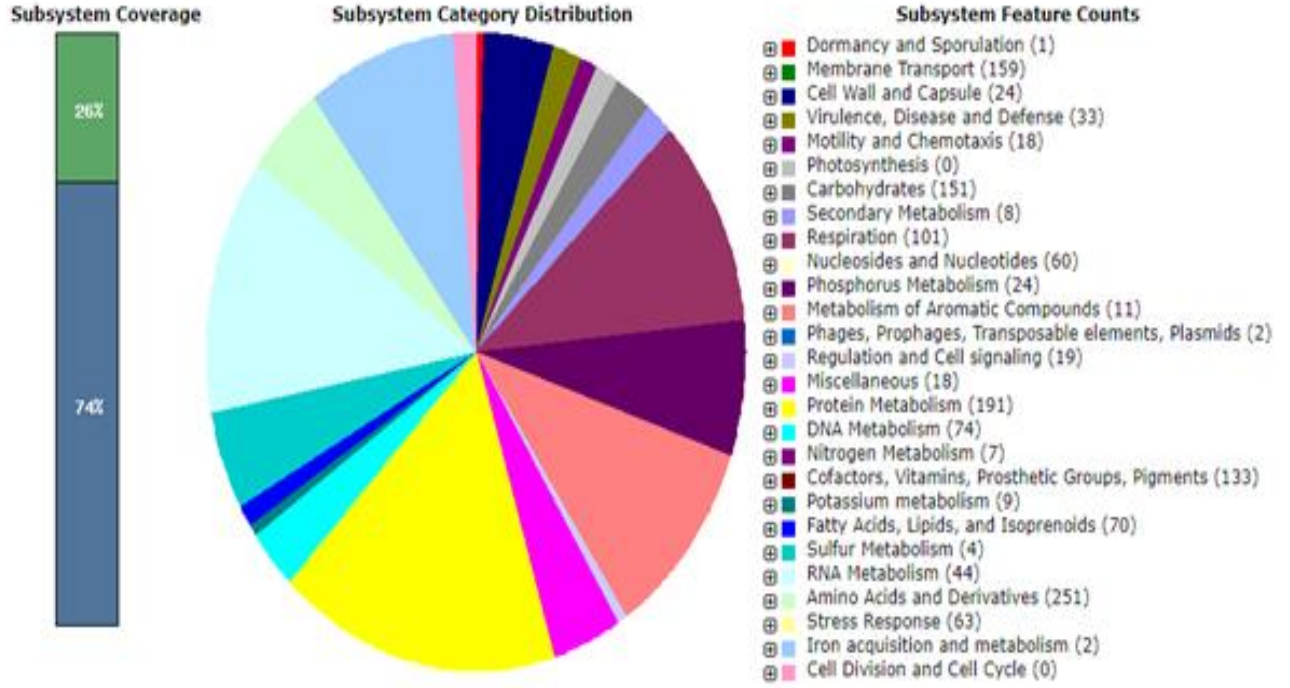


Şekil 4.7 G56Y1 izolatının genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir

4.5.2 G106K1'in Genom Özellikleri ve Filogenetik Analizi

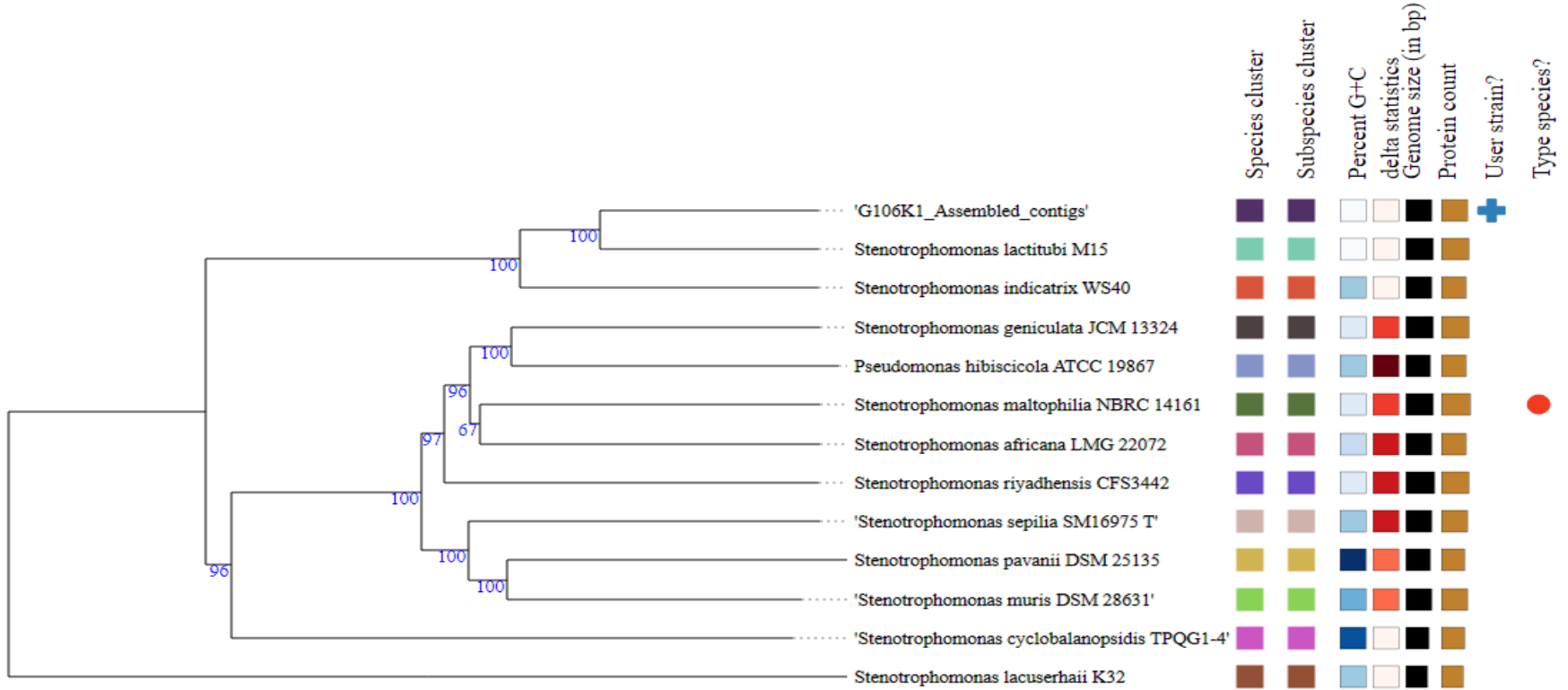
G106K1 izolatının tüm genom verileri GenBank'a JBBPFR000000000 erişim numarası altında yüklenmiştir. Genom verilerinin açılması (annotation) RAST sunucusunda gerçekleştirilmiştir (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Genom boyutunu ve genom G+C içeriği sırasıyla 4.58 Mb (4582803 bp) ve %66 olarak belirlenmiştir. İzolatın tamamlanan genomunun 4259 protein ve 70 adet RNA kodladığı ortaya konmuştur. Genomda 251 gen kümesinin amino asitlerinin/türevlerinin sentezi/metabolizmasına yönelik genleri kodladığı görülürken, 151 gen bölgesinin karbonhidrat metabolizması ile ilişkili olduğu görülmüştür. İzolat virülans, hastalık ve antibiyotiklere ve toksik bileşiklere direnç dahil savunma özelliklerinden sorumlu 33 geni kodladığı görülmüştür. İzolat genomunun, kofaktörler, vitaminler, prostetik gruplar ve pigmentler için 133 geni kodladığı, ayrıca genomun, izolatın farklı ortamlara dayanıklılık ve adaptasyon potansiyelini gösteren stres yanıtıyla ilgili 63 adet gen içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.8).

Tüm genom tabanlı ve 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçlar, TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) kullanılarak oluşturulmuştur. Tüm genom tabanlı filogenetik ağaçta (Şekil 4.9), G106K1, *Stenotrophomonas lactitubi* M15 ve *Stenotrophomonas indicatrix* WS40 ile birlikte kümелendiği görülmüştür. Benzer bir şemayı 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçta yansıtmaktadır.



Şekil 4.8 G106K1 izolatının genom dizisi anotasyonun RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak oluşturulmuş protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri özeti

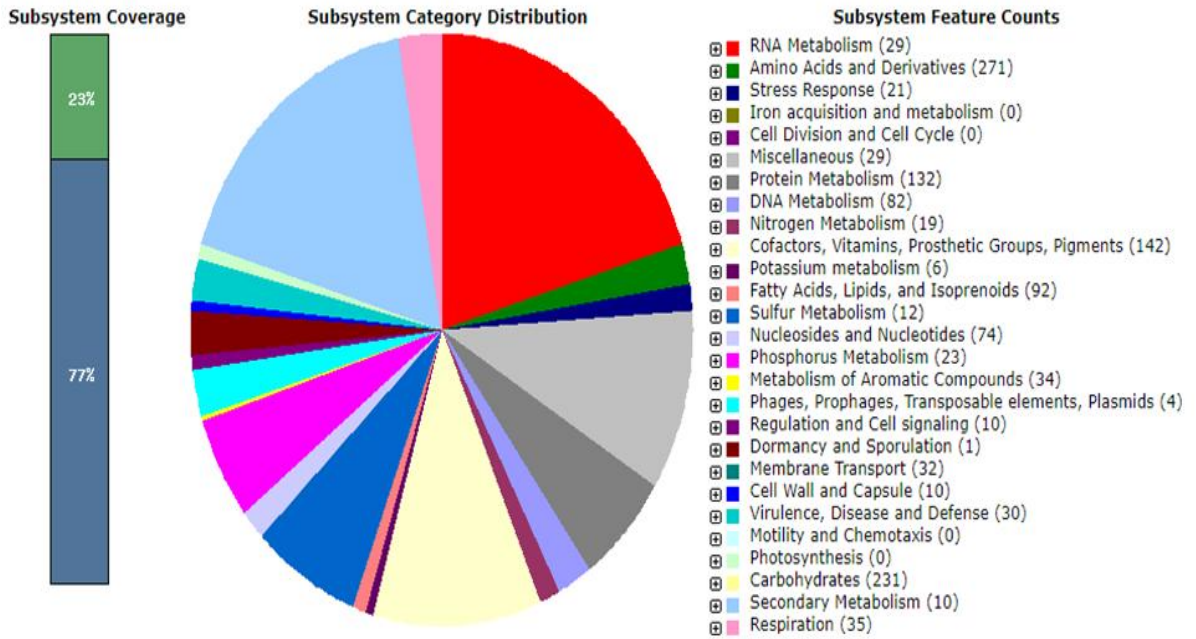
İzolat ile yakın filogenetik komşuları arasındaki dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değerleri TYGS kullanılarak belirlenmiştir. İzolatın *Stenotrophomonas lactitubi* M15 suşu ile vermiş olduğu dDDH değeri %61.8 olup, bu veri G106K1 izolatının *Stenotrophomonas* cinsi içerisinde yer alan yeni bir tür olma olasılığını güçlendirmektedir.



Şekil 4.9 G106K1 izolatının genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir

4.5.3 G119Y2T'in Genom Özellikleri ve Filogenetik Analizi

G119Y2T izolatının tüm genom verileri GenBank'a JBBPFS000000000 erişim numarası altında yüklenmiştir. Genom verilerinin açıklaması (annotation) RAST sunucusunda gerçekleştirilmiştir (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Genom boyutunu ve genom G+C içeriği sırasıyla 3.88 Mb (3886939) ve %65.7 olarak belirlenmiştir. İzolatın tamamlanan genomunun 3662 protein ve 57 adet RNA kodladığı ortaya konmuştur. Genomda 271 gen kümesinin amino asitlerinin/türevlerinin sentezi/metabolizmasına yönelik genleri kodladığı görülürken, 231 gen bölgesinin karbonhidrat metabolizması ile ilişkili olduğu görülmüştür. İzolat virülans, hastalık ve antibiyotiklere ve toksik bileşiklere direnç dâhil savunma özelliklerinden sorumlu 30 geni kodladığı görülmüştür. İzolat genomunun, kofaktörler, vitaminler, prostetik gruplar ve pigmentler için 142 geni kodladığı, ayrıca genomun, izolatın farklı ortamlara dayanıklılık ve adaptasyon potansiyelini gösteren stres yanıtıyla ilgili 21 adet gen içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10).



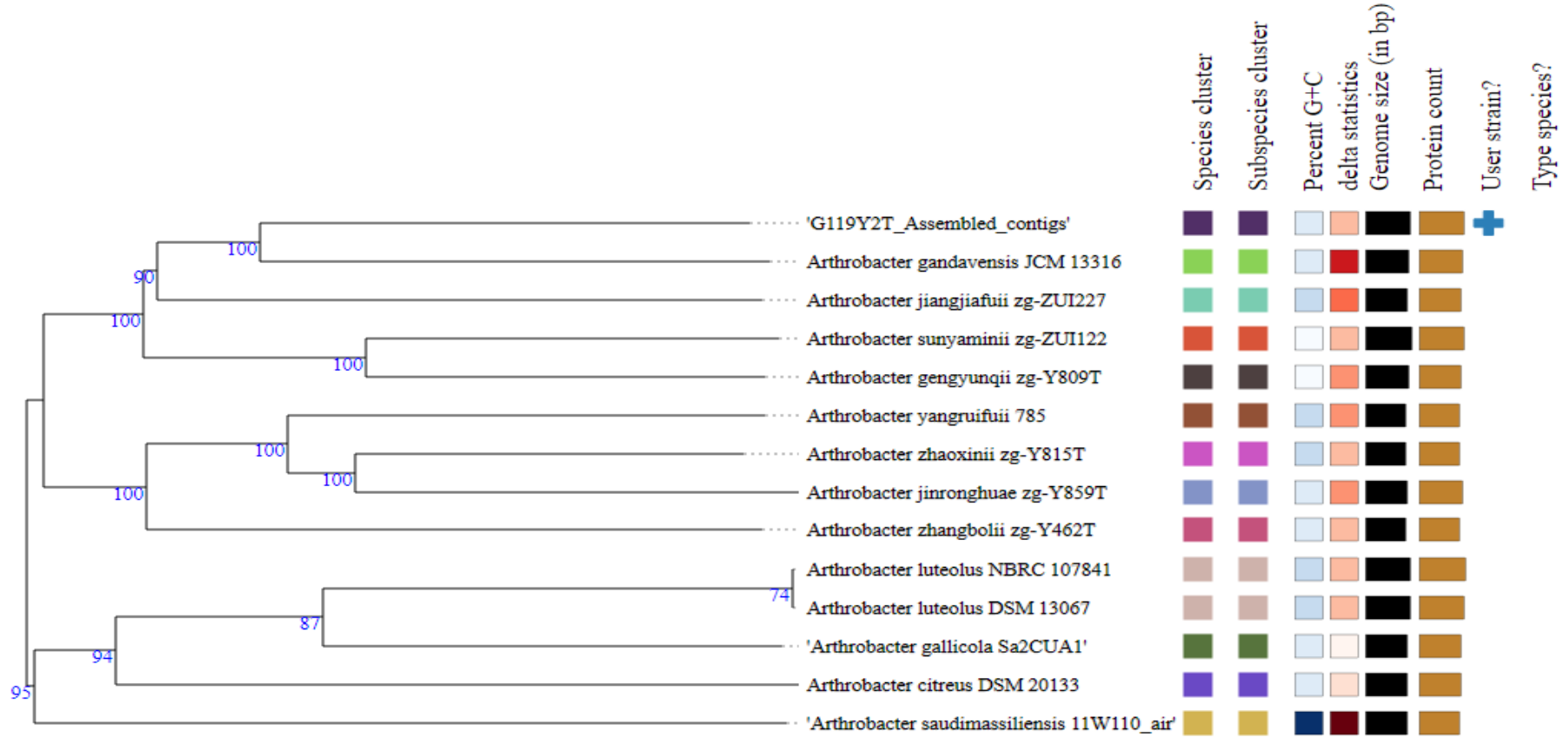
Şekil 4.10 G119Y2T izolatının genom dizisi anotasyonunun RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak oluşturulmuş protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri özeti

Tüm genom tabanlı ve 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçlar, TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) kullanılarak oluşturulmuştur. Tüm genom tabanlı filogenetik ağaçta (Şekil 4.11), G119Y2T, *Arthrobacter gandavensis* JCM 13316, *Arthrobacter jiangjiafuii* zg-

ZUI227, *Arthrobacter gengyunqii* zg-Y809T ve *Arthrobacter sunyaminii* zg-ZUI122 ile birlikte kümелendiđi görölmüştür. Benzer bir şemayı 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçta yansıtmaktadır.

İzolat ile yakın filogenetik komşuları arasındaki dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değeri de TYGS kullanılarak belirlenmiştir. İzolatın *Arthrobacter gandavensis* JCM 13316 suşu ile vermiş olduğu dDDH değeri %29.7 olup, bu veri G119Y2T izolatının *Arthrobacter* cinsi içerisinde yer alan yeni bir tür olma olasılığını güçlendirmektedir.



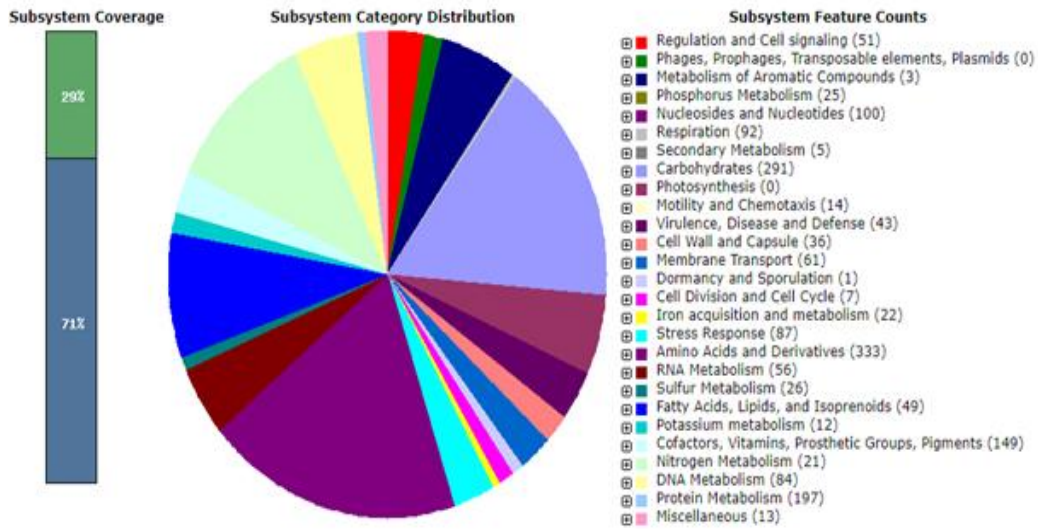


Şekil 4.11 G119Y2T izolatının genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir

4.5.4 G129K1-1'in Genom Özellikleri ve Filogenetik Analizi

G129K1-1 izolatının tüm genom verileri GenBank'a JBBKYC000000000 erişim numarası altında yüklenmiştir. Genom verilerinin açıklaması (annotation) RAST sunucusunda gerçekleştirilmiştir (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Genom boyutunu ve genom G+C içeriği sırasıyla 4.79 Mb (4794802) ve %55.2 olarak belirlenmiştir. İzolatın tamamlanan genomunun 4587 protein ve 81 adet RNA kodladığı ortaya konmuştur. Genomda 333 gen kümesinin amino asitlerinin/türevlerinin sentezi/metabolizmasına yönelik genleri kodladığı görülürken, 291 gen bölgesinin karbonhidrat metabolizması ile ilişkili olduğu görülmüştür. İzolat virülans, hastalık ve antibiyotiklere ve toksik bileşiklere direnç dahil savunma özelliklerinden sorumlu 43 geni kodladığı görülmüştür. İzolat genomunun, kofaktörler, vitaminler, prostetik gruplar ve pigmentler için 149 geni kodladığı, ayrıca genomun, izolatın farklı ortamlara dayanıklılık ve adaptasyon potansiyelini gösteren stres yanıtıyla ilgili 87 adet gen içerdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12).

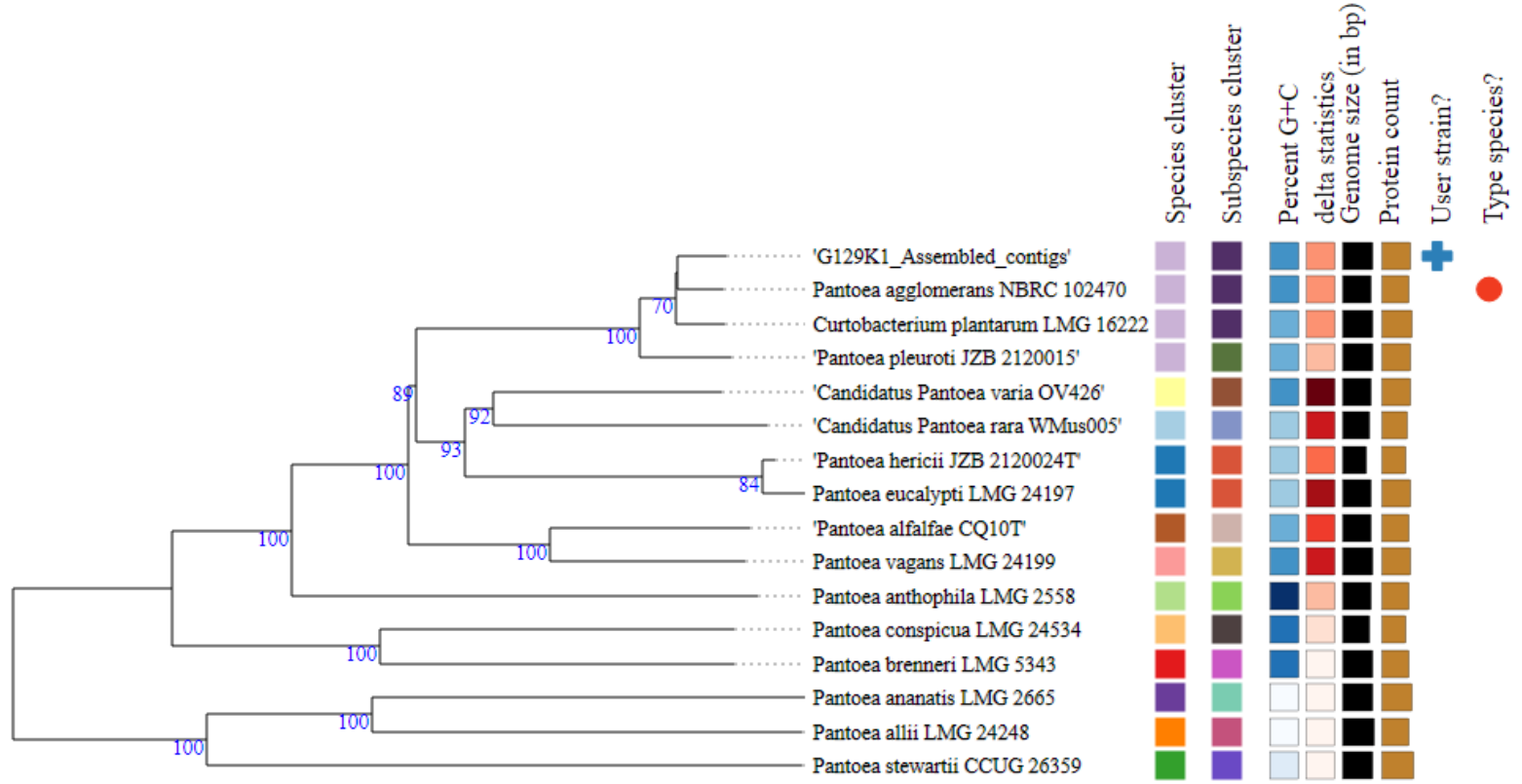
İzolat ile yakın filogenetik komşuları arasındaki dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değerleri de TYGS kullanılarak belirlenmiştir. İzolatın *Pantoea agglomerans* NBRC 102470 suşu ile vermiş olduğu dDDH değeri %88.8 olup, bu veri G129K1-1 izolatının *Pantoea* cinsi içerisinde yer aldığını göstermektedir.



Şekil 4.12 G129K1-1 izolatının genom dizisi anotasyonun RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz vd., 2008) sunucusunda yapılarak oluşturulmuş protein ve işlevsel RNA kodlayan dizileri özeti

Tüm genom tabanlı ve 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçlar, TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>) kullanılarak oluşturulmuştur. Tüm genom tabanlı filogenetik ağaçta (Şekil 4.13), G129K1-1, *Pantoea agglomerans* NBRC 102470, *Curtobacterium plantarum* LMG 16222 ve *Pantoea pleuroti* JZB 2120015 ile birlikte kümелendiği görülmüştür. Benzer bir şemayı 16S rRNA gen tabanlı filogenetik ağaçta yansıtmaktadır.





Şekil 4.13 G129K1-1 izolatının genom verilerinden çıkarılan GBDP mesafelerinden FastME 2.1.6.1 (Lefort vd., 2015) algoritması ile oluşturulan tüm genom tabanlı izolat filogenetik ağacı Dal (branch) uzunlukları, GBDP mesafe formülü d5 cinsinden ölçeklendirilmiştir. Dalların üzerindeki sayılar, ortalama dal desteği %89.1 olan ve %60' tan büyük (100 tekrar) GBDP pseudo-bootstrap değerleridir

4.6 Biyoaktif Sekonder Metabolit Analizi

4.6.1 Biyoaktif Sekonder Metabolitler için İzolatlar'ın Biyosentetik Potansiyeli

Biyoaktif ikincil metabolit kodlayan gen kümelerini belirlemek için izolat genomları antiSMASH versiyon 6.0 (Blin vd., 2021) algoritması kullanılarak analiz edilmiştir. G56Y1 izolat genomu, nonribozomal peptidler, poliketidler, terpenler, metaloforlar gurubundan basilisin, difisidin, makrolaktin gibi sekonder gen metabolitleri kodlayan gen kümelerine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.14). G106K1 izolat genomu, ribozomal olarak sentezlenmiş ve translasyon sonrası modifiye edilmiş peptitler (RIPPs) gurubuna dahil tanımlanmamış bir gen kümesi, metalofor ile bakteriler tarafından üretilen, oksidatif strese karşı koruma sağlayan ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunan sarı pigmentler olarak bilinen aril polienler gurubundan gen kümesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). G119Y2T genomunun beta lakton, hidrojen siyanid, terpen, siderofor, RiPP tanıma elemanı (RRE) ve Tip 3 poliketid setetaz (T3PKS) enzim gen kümelerine sahip olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.16). G129K1-1 izolatının ise homoserinlakton, aril polien, terpen, siderofor ve metalofor gruplarına ait metabolitleri sentezleme potansiyeline sahip olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.17).

Select genomic region:

Overview 1.1 1.2 2.1 3.1 3.2 4.1 5.1 5.2 7.1 7.2 8.1 9.1 13.1

Identified secondary metabolite regions using strictness 'relaxed'

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	NRPS	189,338	257,767		
Region 1.2	other	462,732	504,150	bacilysin	Other 100%
Region 2.1	transAT-PKS	561,899	621,130	difficidin	Polyketide 60%
Region 3.1	transAT-PKS, NRPS, T3PKS	1	107,111	bacillaene	Polyketide+NRP 100%
Region 3.2	transAT-PKS	331,640	419,861	macrolactin H	Polyketide 100%
Region 4.1	NRPS	149,398	214,805	surfactin	NRP:Lipopeptide 91%
Region 5.1	PKS-like	63,461	104,705	butirosin A/butirosin B	Saccharide 7%
Region 5.2	terpene	187,439	208,179		
Region 7.1	terpene	42,360	64,243		
Region 7.2	NRPS, betalactone, transAT-PKS, RiPP-like	87,250	225,066	fengycin	NRP 100%
Region 8.1	NRP-metallophore, NRPS, RiPP-like	98,685	150,476	bacillibactin	NRP 100%
Region 9.1	transAT-PKS-like	132,047	178,680	difficidin	Polyketide 53%
Region 13.1	T3PKS	1	28,037		

Şekil 4.14 G56Y1 izolatının taslak genomunda belirlenmiş ikincil metabolit bölgeleri

Select genomic region:

Overview 1.1 13.1 23.1

Identified secondary metabolite regions using strictness 'relaxed'

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	RiPP-like	162,089	172,964		
Region 13.1	aryl polyene	78,766	122,374	APE Ec	Other 42%
Region 23.1	NRP-metallophore, NRPS	6,943	55,304	2,3-dihydroxybenzoylserine	NRP 94%

Şekil 4.15 G106K1 izolatının taslak genomunda belirlenmiş ikincil metabolit bölgeleri

Select genomic region:

Overview 1.1 1.2 2.1 7.1 8.1 9.1

Identified secondary metabolite regions using strictness 'relaxed'

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	betalactone	49,798	76,597	microansamycin	Polyketide 7%
Region 1.2	hydrogen-cyanide	514,662	527,653	aborycin	RiPP 21%
Region 2.1	terpene	72,701	93,612	carotenoid	Terpene 66%
Region 7.1	NI-siderophore	66,687	96,654	desferrioxamine E	Other 100%
Region 8.1	RRE-containing, LAP, thiopeptide	69,849	103,640	kanamycin	Saccharide 5%
Region 9.1	T3PKS	19,598	60,854		

Şekil 4.16 G119Y2T izolatının taslak genomunda belirlenmiş ikincil metabolit bölgeleri

Select genomic region:

Overview 1.1 1.2 1.3 3.1 3.2 4.1 4.2

Identified secondary metabolite regions using strictness 'relaxed'

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	thiopeptide	495,254	521,510	O-antigen	Saccharide 14%
Region 1.2	hserlactone, aryl polyene	587,475	647,315	aryl polyenes	Other 94%
Region 1.3	redox-cofactor	1,061,917	1,084,083	lankacidin C	NRP+Polyketide 13%
Region 3.1	terpene	20,353	43,914	carotenoid	Terpene 100%
Region 3.2	NI-siderophore	228,463	258,817	desferrioxamine E	Other 100%
Region 4.1	NRP-metallophore, NRPS	162,658	216,349	frederiksenibactin	NRP 84%
Region 4.2	hserlactone	306,731	327,369		

Şekil 4.17 G129K1-1 izolatının taslak genomunda belirlenmiş ikincil metabolit bölgeleri



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma dahilinde endofit bakteri kütüphanemizdeki izolatlar içerisinde, laboratuvarımızda yürütülmüş olan daha önceki çalışmalar dahilinde fosfat çözünürlüğü, indol asetik asit üretimi, siderofor üretimi, azot fiksasyonu gibi PGP (bitki gelişimini destekleyici) markörler açısından kayda değer sonuçlar veren 4 adet izolat belirlenerek, tüm genom dizilemeleri, biyokimyasal karakterizasyonları, *in vitro* tuz/kuraklık testleri ve antibiyotik duyarlılık testleri tamamlanmıştır.

Endofitler, sağlıklı bitkilerin farklı dokularının içlerinde/doku aralarında yaşamlarının bir kısmını/tamamını geçiren mikroorganizmalardır (bakteri ya da fungus) (Hallman vd., 1997). Bitki ile simbiyotik bir ilişki kurarak her iki tarafa da fayda sağlamaktadır. Bitki besin ve korunaklı bir ortam sağlarken, endofit mikroorganizmalar bitkinin büyümesine, strese toleransına ve patojenlere karşı savunmasına katkıda bulunmaktadır (Saikkonen vd., 2004; Reinhold-Hurek ve Hurek, 2011).

RAST sunucusunda gerçekleştirilen (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) genom veri açılması sonucunda izolatlardan G56Y1'in yakın filogenetik komşuları arasındaki dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) değerleri sonucunda, izolatın *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 suşu ile vermiş olduğu dDDH değeri %88.7 olup, bu veri G56Y1 izolatının *Bacillus* cinsi içerisinde yer aldığını göstermiştir. *Bacillus amyloliquefaciens*, bir Gram-pozitif bakteri olarak, endüstri, tıp ve tarım gibi çeşitli alanlarda önemli uygulamalara sahip çok yönlü bir mikroorganizma olarak ortaya çıkmaktadır (Zalila-Kolsi vd., 2023). *B. amyloliquefaciens*, bir dizi enzim ve antimikrobiyal bileşik üretme kabiliyeti nedeniyle çeşitli endüstrilerde büyük öneme sahip çok yönlü ve faydalı bir bakteridir. Tarımda bitki büyümesini teşvik eden ve mahsulleri patojenlerden koruyan bir biyokontrol ajanıdır. Amilaz, proteaz ve lipaz gibi enzimler üretme kabiliyeti, fermantasyon, fırınlama ve bira yapımı gibi süreçlere katkıda bulunarak gıda ve içecek alanında yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. Ayrıca *B. amyloliquefaciens*, heterolog proteinler üretmek için bir konakçı olarak ve değerli biyomoleküllerin kaynağı olarak kullanıldığı biyoteknolojide de uygulamalara sahiptir. *B. amyloliquefaciens*'in çeşitli uygulamaları, birçok sektörde sürdürülebilir ve çevre dostu çözümlerin geliştirilmesindeki önemini vurgulamaktadır (Ngalimat vd., 2021; Luo vd., 2022; Sabaté ve Brandán, 2022; Zalila-Kolsi vd., 2023).

Yapılan genom analizinde G56Y1 izolatının, nonribozomal peptidler, poliketidler, terpenler, metaloforlar gurubundan basilisin, difisidin, makrolaktin gibi sekonder gen metabolitleri kodlayan gen kümelerine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.14). Bacilycin, bazı *Bacillus* türleri tarafından üretilen doğal bir antibiyotiktir. Bu madde, bakteriler arasında rekabeti artırarak ve diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleyerek bitkilerin hastalıklara karşı korunmasına yardımcı olur. Bacilycin genellikle tarımda biyopestisit olarak kullanılır ve çeşitli patojenlere karşı etkilidir (İslam vd., 2022). Difisidin ilk olarak *B. subtilis* ATCC 39320'nin fermantasyon broth'unda tespit edilmiş bir antibiyotiktir (Zimmerman vd., 1987). Bakteriyel yanıklık ve bakteriyel yaprak çizgisi, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ve *X. oryzae* pv. *oryzicola* bakterilerinin neden olduğu, ekonomik olarak zarar veren ciddi pirinç hastalıklarıdır. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42'nin difficidin ve bacilysin antibiyotik bileşiklerini üreterek bu *Xanthomonas* suşlarına karşı biyokontrol aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Wu vd., 2015). Makrolaktinler ise, anti-kanser, anti *Staphylococcus aureus* ve antiviral aktiviteler gibi klinik olarak önemli birçok biyolojik aktivite gösterdiği bildirilen etkili bir antimikrobiyal bileşik grubudur (Romero-Tabarez vd., 2006; Park vd., 2014). Makrolaktinler, çoğunlukla deniz kaynaklı mikroorganizmalar tarafından üretilen, 24 üyeli lakton doğal ürünler grubudur. Güçlü antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanser, anti-inflamatuvar, anti-anjiyojenik ve diğer aktiviteler sergileyen makrolaktinler, potansiyel ilaç bileşikleri olarak kabul edilmektedir (Wu vd., 2020). G56Y1 izolat genomunda bulunan bir diğer sekonder metabolit geni olan sürfaktin, *Bacillus* cinsine ait mikrobiyal türler tarafından üretilen lipopeptit bazlı bir biyoaktif maddedir. En etkili biyoyüzey aktif maddelerden biri olarak kabul edilen sürfaktin, hem hidrofilik hem de hidrofobik ortamlara dayanabilen amfifilik bir yapıya sahiptir ve antimikrobiyal etkisi için dikkate değer bir kapasiteye sahiptir (Zhen vd., 2023). Yapılan çalışmalar, sürfaktinin bitkiyle ilişkili *Bacillus spp.* türleri arasında kök kolonizasyonunda ve biyofilm oluşumunda ve ayrıca hücre dışı matris oluşumu sırasında (bir sinyal molekülü olarak) kilit rolünü göstermektedir. Çok çeşitli konukçu bitkiler için, düşük konsantrasyonlardaki sürfaktinin, fitopatojenlere karşı indüklenen sistemik direncin karmaşık bir savunma mekanizması kademesinin aktivasyonu için başlangıç sinyali olduğu gösterilmiştir (Kisil vd., 2023). G56Y1 izolat genomunda yer alan bir diğer sekonder metabolit olan fengisin, yine *Bacillus* türleri tarafından üretilen

ve tarımda fungusit olarak kullanılan bir siklik lipopeptittir. Mantar enfeksiyonlarına karşı bir bağışıklık yanıtı olarak sentezlenir ve hedefin hücre zarına zarar vererek işlev görür. Geniş spektrumlu antifungal aktiviteye sahip olan fengycin, düşük verimi nedeniyle ticari uygulamalarını sınırlamaktadır (Sur vd., 2018; Gao vd., 2022). Bacillibactin, *Bacillus* cinsine ait üyeler tarafından salgılanan ve *Bacillus anthracis* ve *Bacillus subtilis* dahil olmak üzere çeşitli türlerde bulunan katekol bazlı bir siderofordur. Çevreden ferrik demir (Fe +3) şelasyonunda rol alır ve daha sonra ABC taşıyıcıları kullanılarak bakteriyel sitoplazmaya aktarılır (Nalli vd., 2023). Tüm bu potansiyel sekonder metabolitleri sentezleyebilme potansiyeli, *B. amyloliquefaciens* olarak tanımlanan G56Y1 izolatının başta tarım olmak üzere pek çok alanda uygulama potansiyelini ortaya koymaktadır.

Tüm genom tabanlı filogenetik ağaçta (Şekil 4.9), G106K1, *Stenotrophomonas lactitubi* M15 ve *Stenotrophomonas indicatrix* WS40 ile birlikte kümelendiği görülmüştür. Ancak izolatın *Stenotrophomonas lactitubi* M15 suşu ile vermiş olduğu dDDH değeri %61.8 olup, bu değer %70 in altında olduğu için G106K1 izolatının *Stenotrophomonas* cinsi içerisinde yer alan yeni bir tür olma olasılığını güçlendirmiştir (Richter ve Rosselló-Móra, 2009; Auch vd., 2010). *Stenotrophomonas* spp. cinsi içerisinde bazı fırsatçı insan patojenlerinin varlığına rağmen, esas olarak patojenik olmayan, bitki probiyotik bakteriler olarak rapor edilmişlerdir. *S. maltophilia* türü, çeşitli insan enfeksiyonlarına neden olan, aynı zamanda bitki rizosferleri ile ilişkili olan ve kükürt ve azot biyojeokimyasal döngüsüne katkıda bulunan düşük virülansa sahip bir grup fırsatçı patojeni içerir (Deng vd., 2022). Daha önce çeşitli nişlerden çok sayıda farklı *Stenotrophomonas* türü tanımlanmıştır (Ryan vd., 2009). Bu cinse ait *S. maltophilia* ilk olarak 1961 yılında *Pseudomonas* cinsinde, daha sonra 1983 yılında *Xanthomonas* cinsinde sınıflandırılmıştır. 1993 yılından bu yana *Stenotrophomonas* cinsinin on beşten fazla türünden biri olmuştur (Bourdin vd., 2023).

Stenotrophomonas bakteri cinsi, siderofor üretme kapasitesi, fosfatı çözme yeteneği ve fitohormon ve spermidin üretimi nedeniyle avantajlı etkilere sahip potansiyel bir PGPR olarak anılmaktadır (Ulrich vd., 2021). G106K1 izolat genomu, ribozomal olarak sentezlenmiş ve translasyon sonrası modifiye edilmiş peptitler (RIPPs) gurubuna dahil tanımlanmamış bir gen kümesi, metalofor ve bakteriler tarafından üretilen, oksidatif strese karşı koruma sağlayan ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunan

sarı pigmentler olarak bilinen aril polienler gurubundan gen kümesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Birçok bakteri siderofor adı verilen düşük ağırlıklı moleküllere sahiptir ve bunlar Fe'yi çevreden toplayarak hücreye geri getirir. Bununla birlikte, bazılarının 'metaloforlar' olarak adlandırılan diğer metalleri bağlamak da dahil olmak üzere ek rollere sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle, 'metalofor' terimi, çeşitli farklı metallere afinitesi olan bu ikincil metabolitleri ifade etmek için ortaya atılmıştır (Skeba vd., 2023).

G119Y2T izolatı, *Arthrobacter gandavensis* JCM 13316, *Arthrobacter jiangjiafuii* zg-ZUI227, *Arthrobacter gengyunqii* zg-Y809T ve *Arthrobacter sunyaminii* zg-ZUI122 ile birlikte kümelenmiş ve *Arthrobacter gandavensis* JCM 13316 suşu ile vermiş olduğu dDDH %29.7 değeri bu izolatı da yeni bir tür olarak desteklemiştir (Şekil 4.11). *Arthrobacter* cinsi *Micrococcaceae* familyasına aittir ve *Actinobacteria* filumunun içerisinde yer alır. Bu bakteriler genellikle toprakta bulunur ve biyokimyasal döngülerde ve biyoremediasyonda önemli rol oynarlar. *Arthrobacter* türleri toprak, insan klinik örnekleri, su, buzul kriyokoniti, kanalizasyon ve buzul buzu dahil olmak üzere dünya çapında çeşitli ortamlardan izole edilmiştir (Han vd., 2021). Örneğin *Arthrobacter* sp. PAMC25564'ün tam genom dizisi aydınlatıldığı çalışmada genomu, 4.170.970 baz çifti uzunluğunda ve %66.74 GC içeriğine sahip dairesel bir kromozomdan oluştuğu ortaya konmuştur. Protein kodlayan genler, psödogenler, rRNA kodlayan genler ve tRNA kodlayan genler dahil olmak üzere 3.829 gen içerdiği gösterilmiştir (Han vd., 2021). G119Y2T izolatının genel genom analizi bu veriler ile paralellik göstermektedir. *Arthrobacter* türlerinde glikojen metabolizması ve soğuk adaptasyon mekanizmalarının anlaşılması, düşük sıcaklık biyoteknolojisinde daha ileri araştırma ve uygulamaların önünü açabilecek niteliktedir. Özetle, *Arthrobacter* cinsi metabolik olarak çok yönlüdür ve soğuk bölgeler de dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda hayatta kalmasını sağlayan adaptasyonlar sergiler (Busse ve Wieser, 2014).

G119Y2T izolatını sahip olduğu sekonder metabolit gen kümeleri içerisinde yer alan microansamysin birçok Gram-pozitif ve bazı Gram-negatif bakteriye karşı antimikrobiyal aktiviteleri ile bilinen bir bakteriyel ikincil metabolit ailesidir ve rifamisinler, geldanamisinler ve ansamitosinler gibi değişen aromatik kısımlara sahip türevleri mevcuttur (Wang vd., 2018). Bir diğer sekonder metabolit olan aborycin ilk

olarak *Streptomyces* sp. 9440'dan izole edilen tip I kement peptitlerinin bir temsilcisi olarak G119Y2T genomunda yer almaktadır (Shao vd., 2019). Aspartik proteinaz ailesine ait olan HIV-1 proteaz gp41 ile bazı dizi örtüşmesine sahip olması aborysinin HIV-1 replikasyonunu inhibe etmesini sağlar. Aborycin'in ilgi çekici yapısı ve antibakteriyel özellikleri, onu daha fazla araştırma ve potansiyel terapötik uygulamalar için umut verici bir molekül olarak konumlandırmaktadır (Li vd., 2023). G119Y2T izolatının genom analizinde göze çarpan bir diğer sekonder metabolit olan desferrioksamin, başta *Actinomycetes* ailesine mensup bakteriler tarafından üretilen bir siderofordur. Desferrioksamin E'nin tıpta geniş bir biyoteknolojik uygulaması vardır, ancak güçlü 'Fe' şelasyon özelliği nedeniyle tarımsal araştırmalarda kullanılması faydalıdır (Mahajin vd., 2021).

Son olarak G129K1-1, *Pantoea agglomerans* NBRC 102470, *Curtobacterium plantarum* LMG 16222 ve *Pantoea pleuroti* JZB 2120015 ile birlikte kümelenmiş ve *Pantoea agglomerans* NBRC 102470 suşu ile %88.8 dDDH değeri vermiştir (Şekil 4.12). Bu izolatın taslak genom verisinde O-antijen, aril polien, lankasidin, karatenoid, desferrioksamin E, frederiksenibactin sekonder gen kümeleri bulunmuştur (Şekil 4.17). O-antijeni, Gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunan lipopolisakkaritlerin (LPS) önemli bir bileşenidir. LPS moleküllerinin yapısal heterojenliğinin çoğu O-antijen polisakaritinde bulunur. Bu yapısal varyasyon bakterilerin patojenite, simbiyosis ve biyofilm oluşumu gibi pek çok özelliğinde rol alır (Lerouge ve Vanderleyden, 2002). Lankasidinler, umut verici antimikrobiyal aktivite sergileyen, *Streptomyces* spp.'den izole edilen bir poliketid sekonder ürün sınıfıdır (Cai vd., 2020). Fırsatçı bir patojen *Yersinia frederiksenii* ATCC 33641'in genomunda ilişkili ancak farklı bir gen kümesi tanımlanmış ve yeni bir siderofor olan frederiksenibactin (FSB) olarak adlandırılmıştır (Stow vd., 2021). Bu açıdan bu gen kümesinin *Pantoea* cinsinin bir üyesi olarak tanımlanan G129K1-1 genomunda ilk defa görülmesi önemlidir.

Tuz stresi, bitki büyümesini ve gelişimini ciddi şekilde sınırlayan ve dünya çapında tarımsal üretimi tehdit eden en olumsuz abiyotik stres faktörlerinden biridir. Doğal olarak meydana gelen toprak tuzlanmasına ek olarak, aşırı kimyasal gübre kullanımı ve toprak değişiklikleri, yanlış sulama uygulamaları ve deniz suyuna maruz kalmanın etkisiyle durum daha da kötüleşmektedir (Munns ve Tester, 2008). Tuz stresi

bitki büyümesinin engellenmesine, anormal gelişime ve metabolik bozukluklara neden olmaktadır (Van Zelm vd., 2020). Literatür çalışmaları, bitki mikrobiyotasının bitkilerde tuzlu toprağa adaptasyonu ve direncinde hayati bir rol oynadığını göstermektedir (Ha-Tran vd., 2021). Özellikle, bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) ve endofitik bakteriler de dahil olmak üzere kökle ilişkili çok sayıda mikrop grubu, bitkinin yüksek tuzluluğa toleransını artırmak için gereklidir (Vives-Peris vd., 2018; Xiao ve Zhou, 2023). PGPR, esas olarak iyonik homeostazı düzenleyerek, ozmolitleri biriktirerek, antioksidan kapasiteyi aktive ederek ve temel besin alımını artırarak bitkiler üzerindeki tuz stresinin toksisitesini hafifletir (Shabaan vd., 2022). Örneğin, yakın zamanda yapılan bir çalışma, *E. cloacae* PM23 bakteri türünün bitki fizyolojisini, antioksidan savunmayı ve uyumlu solüt birikimini modüle ederek mısırdaki tuz toleransına aracılık ettiğini öne sürmüştür (Ali vd., 2022). Çalışmamızda %5 NaCl içeren besi ortamlarında iyi bir gelişme profili ortaya koyan, %7.5 NaCl içeren besi ortamlarında ise zayıfta olsa büyüme gösteren G56Y1 ve G119Y2T izolatları iklim odalarında gerçekleştirilecek tuz stresine karşı in vivo bitki uygulamaları denemeleri için potansiyel endofit adayları olarak öne çıkmaktadır (Şekil 4.3).

Kuraklık (su stresi) en önemli abiyotik streslerden biridir ve düşük yağış, tuzluluk, yüksek ve düşük sıcaklıklar ve yüksek ışık yoğunluğu gibi çeşitli nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Kuraklık stresi çok boyutlu bir streştir ve bitkilerde fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerde değişikliklere neden olmaktadır. Birçok bitki, kuraklık stresini tolere etmek için direnç mekanizmalarını geliştirmiştir ancak bu mekanizmalar çeşitlidir ve bitki türlerine hatta genotiplerine bağlıdır (Salehi-Lisar ve Bakhshayeshan-Agdam, 2016). Mikroorganizmalar ayrıca kuraklık stresinin olumsuz etkilerinin azaltılmasında ve dolayısıyla bitki verimliliğinin artırılmasında hayati bir rol oynamaktadır. Farklı çevresel stresler altında yetiştirilen bitkilerdeki oksidatif hasar mikroorganizmalar aracılığıyla azaltılabilir ve tahılların kuraklık koşullarıyla başa çıkması sağlanabilir. Bunlar arasında, bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) kuru ortamlarda kuraklık stresi etkisinin azaltılmasından sorumludur (Niu vd., 2018; Khan vd., 2020). Bitkilere PGPR aşılması, bu ürünlerin kuraklığa toleransını artırabilir, çünkü bu PGPR kök bölgelerinde koloniler oluşturur ve farklı koşullar altında bitki büyümesini artırır. Ayrıca çeşitli mikro besin maddelerini çözündürerek bitkinin alımına uygun hale getirebilirler (Gontia-Mishra vd., 2016). Tüm

PEG konsantrasyonlarında güçlü bir büyüme profili ortaya koyarak *in vitro* koşullarda kuraklık stresine en iyi cevap veren izolat olan G106K1 kuraklık stresine karşı *in vivo* bitki uygulamaları denemeleri için potansiyel endofit adayı olarak öne çıkmaktadır (Şekil 4.4).

Bitki gelişimini destekleyen bakteriler (PGPB), konakçı bitkiler için faydalı olabilecek çeşitli özelliklere sahiptir. Kimyasal girdilerin kullanımını azaltmak, toprak verimliliğini artırmak ve bitkilerin sağlığını geliştirmek için yeşil teknoloji yaklaşımına doğru sayısız kapı açtıkları yadsınamaz bir gerçektir. Bununla birlikte, bu PGPB'lerin çoğu antibiyotik direnç genleri (ARG'ler) barındırmaktadır. ARG'lerini doğal toprak mikrobiyal topluluklarına ve hayvanlar, sular ve insanlar dahil olmak üzere diğer çevresel rezervuarlara aktarabilme olasılığına daha az odaklanılmıştır (Mahdi vd., 2022). Örneğin, rizosferdeki yüksek mikrobiyal yoğunluğun bakteri türleri arasında yatay gen transferini (HGT) artırdığı bildirilmiştir. HGT'nin bakteriyel evrimdeki başlıca mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir (Popa ve Dagan, 2011). Bu aktarılabilir genetik unsurlar, insan sağlığı açısından risk oluşturabilecek ARG'leri ve virülans faktörlerini barındırabilir. Sonuçlar incelendiğinde, ampisilin, penisilin G, florfenikol, eritromisin, nitrofurantoin ve klindomisine tam direnç gösteren G106K1 en dirençli izolat olarak göze çarpmıştır. Bu izolatu penisilin G, rifampin, eritromisin, nitrofurantoin ve klindamisine tam direnç gösteren G129K1-1 izlemiştir. G119Y2T izolatu sadece sefepim antibiyotiğine tam direnç gösterirken, G56Y1 izolatu da sadece rifampin antibiyotiğine karşı tam direnç gösterebilmiştir (Çizelge 4.6). Bu nedenlerden dolayı bitkisel tarım sistemlerinde ve özellikle biyo-gübre uygulanan sistemlerde antibiyotik rezistomu hakkında bilgi sahibi olma ihtiyacı kritik önem taşımaktadır. Dolayısı ile bu çalışma dahilinde tanımlanan izolatlar içerisinde en az sayıda antibiyotik direnci gösteren ya da hiç gösteremeyen endofit bakterileri izolatlarının *in vivo* uygulamalarda kullanılması daha isabetli olacaktır.

Sonuç olarak, tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1) Laboratuvarımızda gerçekleştirilen başka çalışmalarda PGPR (Bitki Gelişimini Teşvik Edici) markörler açısından da kayda değer veriler ortaya koyan G56Y1, G106K1, G119Y2T ve G129K1-1 kod numaralı endofit bakteri izolatlarının tüm genom dizilemesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve taslak tüm genom verisi

ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bu izolatların sekonder metabolit üretme potansiyelleri analiz edilerek ortaya konmuştur.

2) İzolaların biyokimyasal karakterizasyonu ve çeşitli hidrolitik enzim üretme kabiliyetleri incelenmiştir.

3) Bu izolatların günümüzün en önemli abiyotik streslerinden olan tuz ve kuraklık streslerine karşı cevapları in vitro olarak incelenmiştir.

4) Ayrıca tüm izolatların farklı sınıflarda toplam 12 adet antibiyotiğe karşı antibiyotik hassasiyet testleri tamamlanmış ve kayda değer sonuçlar bulgular kısmında paylaşılarak tartışılmıştır.



KAYNAKLAR

- Agrawal, S., Bhatt, A. (2023). Microbial endophytes: emerging trends and biotechnological applications. *Current Microbiology*, 80(8), 249. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03349-2>
- Ali, B., Wang, X., Saleem, M. H., Sumaira, Hafeez, A., Afridi, M. S., Khan, S., Zaib-Un-Nisa, Ullah, I., Amaral Júnior, A. T. D., Alatawi, A., Ali, S. (2022). PGPR-mediated salt tolerance in maize by modulating plant physiology, antioxidant defense. *Compatible Solutes Accumulation And Bio-Surfactant Producing Genes*, 11(3), 345. <https://doi.org/10.3390/plants11030345>
- Amore, A., Parameswaran, B., Kumar, R., Birolo, L., Vinciguerra, R., Marcolongo, L., Ionata, E., La Cara, F., Pandey, A., Faraco, V. (2015). Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), 573-581.
- Auch, A. F., Von Jan, M., Klenk, H. P., Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in Genomic Sciences*, 2, 117-134.
- Aziz R. K., Bartels D., Best A. A., De Jongh M., Disz T., Edwards R. A., Formsma K., Gerdes S., Glass E. M., Kubal M., Meyer F., Olsen G. J., Olson R., Osterman A. L., Overbeek R. A., McNeil L. K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G. D., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. (2008). The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *Bio Med Central (BMC) Genomics*, 9(75), 1-15.
- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B.D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K.H., Schafer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., Skoczowski, A. (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol*, 180, 501-510.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M., Bakker, P.A. (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*, 17, 478–486.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., Weber, T. (2021). AntiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29–W35.
- Bourdin, T., Benoit, M. È., Bédard, E., Prévost, M., Quach, C., Déziel, E., Constant, P. (2023). High-throughput short sequence typing schemes for *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* pure culture and environmental DNA. *Microorganisms*, 27(12), 48.
- Cai, L., Yao, Y., Yeon, S. K., Seiple, I. B. (2020). Modular Approaches to Lankacidin Antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, 142(35), 15116–15126. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c06648>
- Carrim, A. J. I., Barbosa, E. C., Vieira, J. D. G., (2006). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3), 353-359.
- Choque, E., Klopp, C., Valiere, S., Raynal, J., Mathieu, F. (2018). Whole-genome sequencing of *Aspergillus tubingensis* G131 and overview of its secondary metabolism potential. *BMC genomics*, 19(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4574-4>.

- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal. Biol. Rev.* 33, 133 -148.
- Deng, Y., Han, X. F., Jiang, Z. M., Yu, L. Y., Li, Y., Zhang, Y. Q. (2022). Characterization of three *Stenotrophomonas* strains isolated from different ecosystems and proposal of *Stenotrophomonas mori* sp. nov. and *Stenotrophomonas lacuserhaii* sp. nov. *Front Microbiol*, 15(13), 1056762. [10.3389/fmicb.2022.1056762](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1056762)
- Dutta, D., Puzari, K. C., Gogoi, R., Dutta, P. (2014). Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 57, 621-629. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402043>
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J.F., Dougherty, B. A., J M Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), 469-512. [10.1126/science.7542800](https://doi.org/10.1126/science.7542800)
- Gao, G. R., Hou, Z. J., Ding, M. Z., Bai, S., Wei, S. Y., Qiao, B., Xu, Q. M., Cheng, J. S., Yuan, Y. J. (2022). Improved Production of Fengycin in *Bacillus subtilis* by Integrated Strain Engineering Strategy. *ACS Synthetic Biology*, 11(12), 4065-4076. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00380>
- Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Sharma, A., Tiwari, S. (2016). Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 18(6), 992–1000. <https://doi.org/10.1111/plb.12505>
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol*, 43, 895-914.
- Han, S. R., Kim, B., Jang, J. H., Park, H., Oh, T. J. (2021). Complete genome sequence of *Arthrobacter* sp. PAMC25564 and its comparative genome analysis for elucidating the role of CAZymes in cold adaptation. *BMC Genomics*, 22(1), 403. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07734-8>.
- Hankin, L., Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologie*, 67, 597-607.
- Hardoim, P., Van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 293-320.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol*, 16, 463-471.
- Ha-Tran, D. M., Nguyen, T. T. M., Hung, S. H., Huang, E., Huang, C. C. (2021). Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (pgpr) in stimulating salinity stress defense in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B. (2003). *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol*, 106, 169-178.
- Islam, T., Rabbee, M. F., Choi, J., Baek, K. H. (2022). Biosynthesis, molecular regulation, and application of bacilysin produced by *Bacillus* species. *Metabolites*, 12(5), 397.
- Khan, N., Bano, A., Curá, J. A. (2020). Role of beneficial microorganisms and salicylic acid in improving rainfed agriculture and future food safety. *Microorganisms*, 8(7), 1-22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071018>.

- Kisil, V., Trefilov, S., Sadykova, S., Zvereva, E., Kubareva, A. (2023). Surfactin: its biological activity and possibility of application in agriculture. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 59(1), 1-13.
- Kobayashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T. (1999). Purification and properties of a low-molecular weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 72-75.
- Kuźniar, A., Włodarczyk, K., Wolińska, A. (2019). Agricultural and other biotechnological applications resulting from trophic plant-endophyte interactions. *Agronomy*, 9(12), 779. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120779>.
- Lerouge, I., Vanderleyden, J. (2002). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 17–47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x>
- Li, J. Y., Liang, J. Y., Liu, Z. Y., Yi, Y. Z., Zhao, J., Huang, Z. Y., Chen, J. (2023). Multicopy chromosome integration and deletion of negative global regulators significantly increased the heterologous production of aborycin in *Streptomyces coelicolor*. *Marine Drugs*, 21(10), 534. <https://doi.org/10.3390/md21100534>
- Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, 127016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- Mahajan, S. G., Nandre, V. S., Kodam, K. M., Kulkarni, M. V. (2021). Desferrioxamine e produced by an indigenous salt tolerant *Pseudomonas stutzeri* stimulates iron uptake of *Triticum aestivum* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102057. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102057>
- Mahdi, I., Fahsi, N., Hijri, M., Sobeh, M. (2022). Antibiotic resistance in plant growth promoting bacteria: A comprehensive review and future perspectives to mitigate potential gene invasion risks. *Frontiers In Microbiology*, 13, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.999988>
- Marella, S. (2014). Bacterial endophytes in sustainable crop production: applications, recent developments and challenges ahead. *Int. J. Life Sci. Res.*, 2, 46-56.
- Marquez-Santacruz, H.A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M.C., Velazquez-Sepulveda, I., Santoyo G. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Gen. Mol. Res.*, 9, 2372-80.
- Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1), 2182.
- Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Of Plant Biology*, 59, 651–681.
- Murphy, B.R., Doohan, F.M., and Hodkinson, T.R. (2018). From concept to commerce: Developing a successful fungal endophyte inoculant for agricultural crops. *J. Fungi*, 4(1), 24-35.
- Nalli, Y., Singh, S., Gajjar, A., Mahizhaveni, B., Dusthacker, V. N. A., Shinde, P. B. (2023). Bacillibactin class siderophores produced by the endophyte *Bacillus subtilis* NPROOT3 as antimycobacterial agents. *Letters in Applied Microbiology*, 76(2), ovac026. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac026>

- Ngalimat, S., Yahaya, R., Baharudin, M. M. A., Yaminudin, S. M., Karim, M., Ahmad, S. A., Sabri, S. (2021). A review on the biotechnological applications of the operational group bacillus amyloliquefaciens. *Microorganisms*, 9(3), 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030614>
- Niu, X., Song, L., Xiao, Y., Ge, W. (2018). Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02580>
- Park, S., Regmi, S. C., Park, S. Y., Lee, E. K., Chang, J. H., Ku, S. K., Kim, D. H., Kim, J. A. (2014). Protective effect of 7-o-succinyl macrolactin a against intestinal inflammation is mediated through P13-kinase/akt/mtor and nf-kb signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 735, 184–192.
- Pervez, M. T., Hasnain, M. J. U., Abbas, S. H., Moustafa, M. F., Aslam, N., Shah, S. S. M. (2022). A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. *Biomed Research International*, 29, 3457806.
- Popa, O., Dagan, T. (2011). Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion In Microbiology*, 14(5), 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.027>
- Raza, W., Wang, J., Wu, Y., Ling, N., Wei, Z., Huang, Q., Shen, Q. (2016). Effects of volatile organic compounds produced by Bacillus amyloliquefaciens on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen Ralstonia solanacearum. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 7639–7650. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7584-7>
- Richter, M., Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)*, 106, 19126–19131.
- Romero, F.M., Marina, M. and Pieckenstain, F.L. (2014). The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS. Microbiol. Lett*, 351, 187-194.
- Romero-Tabarez, M., Jansen, R., Sylla, M., Lünsdorf, H., Häussler, S., Santosa, D. A., Timmis, K. N., Molinari, G. (2006). 7-O-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from Bacillus subtilis active against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of Burkholderia cepacia. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 50(5), 1701–1709. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1701-1709.2006>
- Rosenblueth, M., Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microb. Interact*, 19, 827-837.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., Van der Lelie, D., Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus Stenotrophomonas. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(7), 514–525. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>
- Sabaté, D. C., Brandán, C. P. (2022). Bacillus amyloliquefaciens strain enhances rhizospheric microbial growth and reduces root and stem rot in a degraded agricultural system. *Rhizosphere*, 22, 100544.
- Salehi-Lisar, S. Y., Bakhshayeshan-Agdam, H. (2016). Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. *Drought stress tolerance in plants*, 1: Physiology And Biochemistry, 1-16.

- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., Glick, B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.*, 183, 92–99.
- Shabaan, M., Asghar, H. N., Zahir, Z. A., Zhang, X., Sardar, M. F., Li, H. (2022). Salt-Tolerant PGPR Confer Salt Tolerance to Maize Through Enhanced Soil Biological Health, Enzymatic Activities, Nutrient Uptake and Antioxidant Defense. *Frontiers In Microbiology*, 13, 901865. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.901865>
- Shao, M., Ma, J., Li, Q., Ju, J. (2019). Identification of the anti-infective aborycin biosynthetic gene cluster from deep-sea-derived *streptomyces* sp. scs10 zs0098 enables production in a heterologous host. *Marine Drugs*, 17(2), 127. <https://doi.org/10.3390/md17020127>
- Sharma, A., Malhotra, B., Kharkwal, H., Kulkarni, G. T., Kaushik, N. (2020). Therapeutic agents from endophytes harbored in Asian medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19, 691-720. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09683-8>
- Skeba, S., Snyder, M., Maltman, C. (2023). Metallophore Activity toward the Rare Earth Elements by Bacteria Isolated from Acid Mine Drainage Due to Coal Mining. *Microorganisms*, 11(11), 2672.
- Stow, P. R., Reitz, Z. L., Johnstone, T. C., Butler, A. (2021). Genomics-driven discovery of chiral triscatechol siderophores with enantiomeric Fe(III) coordination. *Chemical Science*, 12(37), 12485–12493.
- Strobel G. (2018). The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. *Journal of Fungi*, 4(2), 57. <https://doi.org/10.3390/jof4020057>
- Sturz, A. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant. Sci*, 19, 1-30.
- Sun, H., Gao, T., Chen, X., Hitchings, M.D., Li, S., Chen, T., Zhang, H., An, L. and Dyson, P. (2016). Complete genome sequence of a psychrotrophic *Arthrobacter* strain A3 (CGMCC 1.8987) a novel long-chain hydrocarbons producer. *J. Biotechnol.*, 222, 23–24.
- Sur, S., Romo, T. D., Grossfield, A. (2018). Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide, from molecular dynamics. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 122(8), 2219–2226. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11889>
- Ulrich, K., Kube, M., Becker, R., Schneck, V., Ulrich, A. (2021). Genomic analysis of the endophytic *Stenotrophomonas* strain 169 reveals features related to plant-growth promotion and stress tolerance. *Frontiers In Microbiology*, 12, 687463. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687463>
- Van Zelm, E., Zhang, Y., Testerink, C. (2020). Salt tolerance mechanisms of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 403–433.
- Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A., Pérez-Clemente, R. M. (2018). Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp., *Plant Cell Reports*, 37(11), 1557–1569. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2328-z>
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K.H. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 102, 386–13.

- Wang, J., Li, W., Wang, H., Lu, C. (2018). Pentaketide ansamycin microansamycins a-1 from *micromonospora* sp. reveal diverse Post-Pks modifications. *Organic Letters*, 20(4), 1058–1061. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b04018>
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 5, 12975. <https://doi.org/10.1038/srep12975>
- Wu, T., Xiao, F., Li, W. (2020). Macrolactins: biological activity and biosynthesis. *Marine Life Science & Technology*, 3(1), 62–68. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00068-6>
- Xiao, F., Zhou, H. (2023). Plant salt response: Perception, signaling, and tolerance. *Frontiers In Plant Science*, 13, 1053699. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1053699>
- Yadav, A.N. (2017). Agriculturally important microbiomes: Biodiversity and multifarious PGP attributes for amelioration of diverse biotic stresses in crops for sustainable agriculture. *Biomed. J. Sci. & Tech. Res*, 1, 861-864.
- Zalila-Kolsi, I., Ben-Mahmoud, A., Al-Barazie, R. (2023). *Bacillus amyloliquefaciens*: harnessing its potential for industrial, medical, and agricultural applications-a comprehensive review. *Microorganisms*, 11(9), 2215.
- Zhen, C., Ge, X. F., Lu, Y. T., Liu, W. Z. (2023). Chemical structure, properties and potential applications of surfactin, as well as advanced strategies for improving its microbial production. *AIMS Microbiology*, 9(2), 195–217. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2023012>
- Zimmerman, S. B., Schwartz, C. D., Monaghan, R. L., Pelak, B. A., Weissberger, B., Gilfillan, E. C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S. A., Tejera, E. (1987). Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. *The Journal of Antibiotics*, 40(12), 1677–1681. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.1677>

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Tülay ORUÇ

Eğitim Bilgileri

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üniversite : Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fakülte : Ziraat Fakültesi
Bölüm : Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı : 2013





VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih 07/05/2024

Tez Başlığı: Endofit Bakteri İzolatlarının Tüm Genom Dizilemesi ve Polifazik Karakterizasyonu ile Biyoaktif Metabolit Üretim Potansiyellerinin Açığa Çıkarılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 52 (elli iki) sayfalık kısmına ilişkin, 07/05/2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı %12 (on iki) tür.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Tülay ORUÇ
Öğrenci No: 21910001194
Anabilim Dalı: Tarımsal Biyoteknoloji
Programı:
Statüsü: (X) Yüksek lisans () Doktora

DANIŞMAN
UYGUNDUR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR