

***Bacillus cereus* Strain BBS7 Kök Bakterisi İzolatının Kuraklık Stresi Altında Domateste Isı Şok Genlerinin İfadesi Üzerine Etkileri**

Macide Elif GÜÇLÜER¹ 

Birsen ÇAKIR AYDEMİR^{2*} 

¹Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, İzmir/TÜRKİYE

²Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, İzmir/TÜRKİYE

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7660-5880> ² <https://orcid.org/0000-0003-4268-8547>

*Corresponding author (Sorumlu yazar): birsencakir@hotmail.com

Received (Geliş tarihi): 25.04.2025

Accepted (Kabul tarihi): 02.06.2025

ÖZ: Kuraklık stresi, bitkilerin fizyolojik işlevlerinde meydana gelen değişimler nedeniyle tarımsal üretimde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Tarım sektöründe stratejik bir öneme sahip olan domates bitkisi de bu stres koşullarından en fazla etkilenen türler arasında yer almaktadır. Bitki gelişimini artıran kök bakterilerinin hücresel, fizyolojik ve morfolojik mekanizmaları etkileyerek bitkilerin kuraklık toleransını artırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, domates tohumları *Bacillus cereus* strain BBS7 kök bakterisi ile sardırıldıktan sonra torfortamına ekilmiştir. Fideler 2-3 gerçek yapraklı döneme ulaştıktan sonra su kültürüne alınmış ve 7 gün boyunca kontrol uygulamasında tutulduktan sonra PEG 6000 ile kuraklık stresine tabi tutulmuştur. Kuraklık stresinin etkisi ($\Psi_s = -1.0$ MPa) kademeli olarak artırılarak ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ ve tam doz) uygulanmış, her bir doz artışı 48 saatlik aralıklarla gerçekleştirilmiştir. Stres uygulamasının ardından 2. ve 12. saatlerde alınan bitki örneklerinde, kuraklık stresine yanıt olarak üretilen HSP21, HSP70 ve HSFA gibi ısı şok protein genlerinin ekspresyon seviyeleri qPCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Sonuçlar, *B. cereus* strain BBS7 kök bakterisinin bu genlerin ekspresyon profillerini düzenleyerek domates bitkilerinde kuraklık direncini artıran etkili bir PGPR türü olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Solanum lycopersicum* L., kuraklık stresi, mRNA ifadesi, *Bacillus cereus*, eş zamanlı PCR.

Effects of Bacillus cereus strain BBS7 Rhizobacterium Isolate on the Expression of Heat Shock Genes in Tomato Under Drought Stress

ABSTRACT: Drought stress causes significant economic losses in agricultural production due to disruptions in the physiological functions of plants. Tomato plants, which have strategic importance in the agricultural sector, are among the species most severely affected by these stress conditions. Research has demonstrated that root bacteria promoting plant growth enhance drought tolerance by influencing cellular, physiological, and morphological mechanisms. In this study, seeds of tomato were inoculated with *Bacillus cereus* strain BBS7 and planted in a peat medium. Seedlings at the 2-3 true leaf stage were transferred to a hydroponic system and maintained under control conditions for 7 days before being subjected to drought stress simulated using PEG 6000. The drought stress intensity was gradually increased ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, and full dose) every 48 hours until the target water potential ($\Psi_s = -1.0$ MPa) was achieved. Plant samples were collected at the 2nd and 12th hours after stress application, and the expression levels of heat shock protein genes (HSP21, HSP70, and HSFA), produced in response to drought stress, were analyzed via qPCR. The results indicate that *B. cereus* strain BBS7 acts as an effective PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacterium) by regulating the expression profiles of these genes, thereby enhancing drought resistance in tomato plants.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., drought stress, mRNA expression, *Bacillus cereus*, real-time PCR.

GİRİŞ

Abiyotik stres bitki büyüme ve verimliliğini olumsuz yönde etkileyerek tarımsal kayıplara neden olmaktadır (Ye ve ark., 2017). Bitkilerin büyümesini ve uyum yeteneğini zayıflatan stresler arasında su fazlalığı/eksikliği, iyon toksisitesi/eksikliği, düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık ve tuzluluk bulunmaktadır. Çeşitli ürün üretim modelleri, öncelikle iklim değişikliği nedeniyle gelecekte önemli tarım

ürünlerinin veriminde bir azalma öngörülmektedir (Rosenzweig ve ark., 2014).

Bitkiler, sedanter yapıları nedeniyle olumsuz çevre koşullardan kaçamadıklarından bu çevresel değişimlerle başa çıkmak için güçlü savunma mekanizmalarına ihtiyaç duyarlar (Kaldenhoff ve Fischer 2006). Kuraklık ve ısı stresi gibi başlıca abiyotik faktörler tek başına etkili olduğu gibi birlikte

de hareket edebilirler. Bitkiler, bu zorluklara karşı koymak için etkili koruyucu mekanizmalar geliştirmişlerdir (Zandalinas ve ark., 2018). Bitkilerdeki temel tolerans mekanizmaları, hücrel ve moleküler tepkiler aracılığıyla farklı stresler tarafından düzenlenen genlerin aktivasyonunu içerir (Latif ve ark., 2016).

Bitkiler, hücrel homeostazı sağlamak ve uyum sağlamak için hücrelere yardımcı olan çeşitli yollarla çevresel etmenlere tepki verirler (Jones ve ark. 2006). Homeostazı sürdürmede ve bitkilerde stres direnci kazandırmada kritik rol oynayan birçok farklı protein tanımlanmıştır (Pérez-Clemente ve ark. 2013). Strese toleranslı çeşitlerin geliştirilmesinde, stresle indüklenen genlerin transgenik yöntemlerle aşırı ifadesi, en yaygın ve pratik yaklaşımlardan biridir (Guerra ve ark. 2015). Kuraklık ve ısı stresi direnciyle ilişkili çok sayıda gen analiz edilmiş ve doğrulanmıştır (Wang ve ark. 2014). Hücrel proteinler, sinyalizasyon ve transkripsiyonel düzenleme ile ilişkilidir; bunlar arasında ozmotinler, dehidrinler, LEA proteinleri ve NAM, ATF, CUC (NAC) transkripsiyon faktörleri gibi protein aileleri bulunur. Bu proteinlerin stres toleransında rol oynadığı araştırmalarla desteklenmiştir (Nouri ve Komatsu 2013; Vishwakarma ve ark. 2017).

Bitkilerde ısı şok transkripsiyon faktörü (HSF) ailesi, en çok çalışılan transkripsiyon faktörü ailesinden biridir (Udvardi ve ark., 2007). HSF'lerin abiyotik stres toleransındaki çok yönlü rollerini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Güncel bulgular, HSF'lerin kombinasyon streslerden ziyade, tek stres koşullarına yanıt vermede baskın rol oynadığını göstermektedir (Sewelam ve ark., 2014). Bitkilerdeki HSF'ler, DNA'ya bağlanma bölgesi (DBD) içeren modüler yapılar olup, hedef bölgelerdeki ısı stresi cis-elementleri ile etkileşime girerler (Lata ve Prasad 2011). HSF'ler, sinyal iletim yollarında son basamak görevi görür ve çeşitli stres yanıtı genlerin transkripsiyonel yukarı regülasyonunu sağlar (Baniwal ve ark., 2004).

Isı şok proteinleri (HSP'ler), hem optimal hem de stresli büyüme koşullarında hücrel stabiliteyi korumadaki rolleri nedeniyle moleküler şaperonlar olarak işlev görür (Wang ve ark., 2014). HSP'ler, hücrel metabolizma sırasında protein katlanmasına yardımcı olur (Wang ve ark., 2004), zar proteinlerini stabilize eder ve stres altında proteinlerin yeniden katlanmasını sağlar (Wahid ve ark., 2007). Ayrıca, HSP'lerin geniş

bir kategorisi, stres kaynaklı üç boyutlu protein katlanması veya bozulması sırasında şaperon aktivitesi sergiler (Kotak ve ark. 2007).

HSP'ler, moleküler ağırlıklarına göre Hsp60, Hsp70 (DnaK), Hsp90, Hsp100 (Clp), şaperoninler (GroEL) ve küçük HSP (sHsp) ailesi olarak beş yüksek korunmuş alt aileye ayrılır (Kotak ve ark. 2007). HSP'lerin işleyişi benzersizdir; hedef substratlara kovalent bağ oluşturmada özgün şekilde bağlanırlar (Wahid ve ark., 2007). sHsp ailesi hariç, bitkilerin abiyotik stres tepkilerinde HSP'lerin/şaperonların işlevselliğine sınırlı düzeyde odaklanılmıştır (Kregel, 2002). Hsp60, Hsp70 ve Hsp90, aktivitelerini düzenleyerek özgün substrat proteinlerin birleşimine yardımcı olan çeşitli ko-şaperonlarla etkileşerek stres koşullarında moleküler kalkan görevi görür (Liberek ve ark., 2008). Genom analizleri, *A. thaliana*'da yaklaşık 13 sHsp, 7 Hsp60, 18 Hsp70, 7 Hsp90 ve 8 Hsp100 üyesi olduğunu ortaya koymuştur (Zhang ve ark. 2015).

Mısır ve buğday gibi bitki türleri de abiyotik stres koşullarında HSP'leri ifade eder (Kumar ve ark. 2012). HSP'lerin genetik yapısı değiştirilerek yeni stres toleranslı çeşitler tasarlanabilir; örneğin, *Arabidopsis* ve pirinçte Hsp101'in aşırı ifadesi, aşırı sıcaklıklara karşı tolerans sağlamıştır (Katiyar-Agarwal ve ark. 2003). Hsp70'in yukarı regülasyonu, transgenik bütün bitkilerinde kuraklık ve ısı toleransı kazandırmıştır. Bu bitkilerde, NtHSP70'in aşırı ifadesi, hem ısı hem de kuraklık direncini artırmıştır (Udvardi ve ark. 2007). Su stresine maruz kalan ayçiçeklerinin kök ve gövdelerinde HaHsp17.6 ve HaHsp17.9 genlerinin sentezinin tetiklendiği bildirilmiştir (Tuteja ve Gill, 2016).

Bitki gelişimini artıran kök bakterileri (PGPR)'ler doğrudan ve dolaylı mekanizmalarla bitki gelişimini teşvik etmektedirler (Dejordjevic vd., 1987; Ferreira vd., 1987). Ayrıca, mikroorganizmaların biyotik ve abiyotik stres yönetimindeki rolü giderek önem kazanmaktadır. Rizobakterilerin bitkilerde kuraklık toleransını sağlaması Absisik asit (ABA), giberellik asit, sitokinin ve indol-3-asetik asit (IAA) gibi fitohormon üretimi, köklerde etilen seviyesini azaltan ACC deaminaz aktivitesi, bakteriyel bileşiklerle indüklenmiş sistemik tolerans, bakteriyel ekzopolisakkaritler mekanizmalarını içerir (Yang ve ark., 2009; Dimkpa ve ark., 2009; Timmusk ve Nevo, 2011; Kim ve ark., 2013; Timmusk ve ark., 2014).

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR), bitkilerde kuraklık stresinin hafifletilmesinde önemli bir rol oynarlar. Bu faydalı mikroorganizmalar, bitkilerin rizosfer/endo-rizosfer bölgelerini kolonize ederek ekzopolisakkarit (EPS) üretimi, bitki hormonları salgılama, 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaz enzimi üretimi, uçucu bileşikler sentezleme, ozmolitlerin ve antioksidanların birikimini tetikleme, strese yanıt veren genlerinin yukarı veya aşağı regülasyonu, mekanizmaları ile kuraklığa karşı toleransı sağlarlar (Vurukonda ve ark. 2016).

Bu çalışmada Kök Bakterilerinin (KB) domateste kuraklık stresine etkilerinin moleküler düzeyde analiz edilmesi amaçlanmıştır. *Bacillus cereus* strain BBS7 kök bakterisi ile sardırılmış olan MSC-50 domates çeşidine ait genç bitkilerde kuraklık stresi altında *HSP* genlerinden *HSP21*, *HSP70*, *HSFA* genlerinin ifade profilleri qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada, 1170126 nolu TUBİTAK projesi çerçevesinde tanımlanmış olan domates bitkilerinin kuraklık stresine toleransını artırmada etkili olduğu saptanan *Bacillus cereus* strain BBS7 kök bakterisi izolatı ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin ettiğimiz kurağa duyarlı MSC-50 domates çeşidi kullanılmıştır (Gul ve ark., 2021, Altunlu ve ark. 2024).

Metot

Kuraklık Stresi uygulamaları

Kök bakterileri ile inokulasyon Sarma ve Saikia (2014) 'a göre tohum bakterizasyonu şeklinde gerçekleştirilmiştir. Tohum ekimi torf (Klasmann TS1) ile doldurulan fide viyollerine yapılmıştır. Fideler 2-3 gerçek yapraklı aşamada su kültürüne alınmıştır. Her bir plastik kaba 6 adet bitki yerleştirilmiş ve bitki kökleri besin çözeltisi içerisinde olacak şekilde kaplar 1 litre besin çözeltisi [$\frac{1}{2}$ Hoagland çözeltisi (pH:6.5, EC :1.2 mS/cm)] ile doldurulmuştur. Besin çözeltisi havalandırması akvaryum pompaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kuraklık stresi Altunlu (2011)'ya göre gerçekleştirilmiştir. Fideler 7 gün boyunca kontrol uygulamasında (tam sulama) tutulduktan sonra PEG 6000 ile kuraklık stresine tabi tutulmuştur. Kuraklık stresinin etkisi ($\Psi_s = -1.0$ MPa) kademeli olarak artırılarak ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ ve tam doz) uygulanmış, her bir doz artışı 48 saatlik aralıklarla gerçekleştirilmiştir. Stres

uygulanmasının ardından 2. ve 12. saatlerde örnekler alınmış ve sıvı azotta -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

Toplam RNA İzolasyonu

Bitki köklerinden alınan örnekler, sıvı azot içinde havanda öğütülerek toz haline getirilmiştir. RNA izolasyonu için Bray (1988) protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Buna göre 300 mg bitki örneği üzerine 500 μL ekstraksiyon solüsyonu (50 mM Tris pH:9, 150 mM LiCl, 5 mM EDTA, %5 SDS) ilave edilerek tüpler 15 saniye vortekslenildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz alınarak 1:1 oranında fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) eklenmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir. Bu işlem sonrasında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10.600 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Üst faz tekrar alınarak aynı fenol:kloroform:izoamil alkol işlemi tekrarlanmış ve santrifüj adımı yinelenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanın yarısı hacminde 10 M LiCl eklenmiş ve karışım el ile alt üst edilerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 11.000 rpm'de 40 dakika santrifüjlenmiş, üst faz dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine %70'lik etanol eklenerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10.600 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmış ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Pellet kurutulduktan sonra 30 μL DEPC'li su ile çözündürülmüş ve elde edilen RNA örnekleri -20°C 'de saklanmıştır. RNA kalitesi ve miktarı agaroz jel elektroforezi ile doğrulandıktan sonra genomik DNA kontaminasyonunu gidermek için DNase I RNase-Free (Thermo Scientific) enzimi kullanılmıştır. Enzim uygulamasında üretici protokolüne uyulmuştur.

qPCR ile Gen İfade Analizi

Her bir reaksiyon için, 500 ng toplam RNA ve 1 μL oligo(dT)18 primeri kullanılmıştır. cDNA sentezi ters transkriptaz kiti (Thermo-cDNA Synthesis Kit) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı PCR analizi için total hacim 25 μL olacak şekilde, Maxima SYBER Green qPCR Master Kit içerikleri ile üretici firmanın protokolü izlenerek ABI 7300 cihazında (Applied Biosystems) gerçekleştirilmiştir.

Aktin geni endojen kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 1' de verilmiştir. PCR amplifikasyonu, 95°C 'de 15 saniyelik denatürasyon, 60°C 'de 30 saniyelik bağlanma ve 72°C 'de 30 saniyelik uzama olmak üzere 40 döngü boyunca devam etmiştir. PCR ürünlerinin erime eğrisi

analizi ve standart eğri analizleri ABI kullanıcı bülteni izlenerek gerçekleştirilmiştir. Ct değerleri kullanılarak

2- $\Delta\Delta$ CT metoduna göre relatif ifade (relative ekspresyon) değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 1. Primer listesi.
Table 1. Primer list.

Gen Adı/Gene name	Gen ID/Gene ID	5' primer	3' primer
<i>HSP21</i>	544024	5'- ACGAGGATGGCGCTTGATGT-3'	5'- TGAATGTCCCATGGAGTGCGT-3'
<i>HSP70</i>	100134914	5'- AGGCGGTGAGGCAAAGGTTTC-3'	5'- CAGACGGCGTCGTTCTTTGC-3'
<i>HsfA1a</i>	101263626	5'- GAGCGCCAATGTTGCAGACG-3'	5'-TCCGGAGGATCCCCAAACCACA-3'
<i>LeActin</i>	AB199316	5'- GCCGGGCGTGATCTTACTGA-3'	5'-AGCTACTCCTGGCGGTCTCC-3'

BULGULAR VE TARTIŞMA

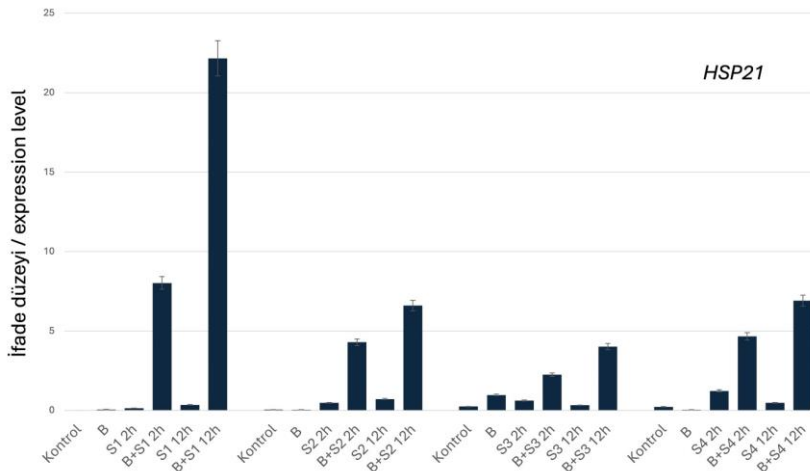
Bu çalışmada, kök bakterilerinden *Bacillus cereus* strain BBS7 nin kuraklık stresinde oynadığı rolün belirlenmesi için, *Bacillus cereus* strain BBS7 KB ile sardırılmış hassas MSC-50 domates çeşidinin kuraklık stresinde *HSP21*, *HSP70*, *HSFA* genlerinin ifade profilleri qPCR analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Transkripsiyon düzeyinde, PGPR (Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rizobakteri) inokülasyonu ile bitkilerin kuraklık toleransının arttığı gözlemlenmiştir. Örneğin, *Paenibacillus polymyxa* B2 suşu ile inoküle edilen *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde kuraklık direnci artmıştır (Timmusk ve Wagner, 1999). Kuraklık tepkisi genlerinden *ERD15* (EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION15) geninin transkripsiyonunun inoküle edilen bitkilerde, kontrol grubuna kıyasla arttığını göstermiştir (Timmusk ve Wagner, 1999).

Diğer bir çalışmada, kuraklık stresindeki biber bitkilerinde *Bacillus licheniformis* K11 ile inoküle edilen bitkilerde altı farklı stres proteininin ifade olduğu belirlenmiştir (Lim ve Kim, 2013). Bu proteinlerden *Cadhn*, *VA*, *sHSP* ve *CaPR-10* genlerinin ekspresyonu, kontrol grubuna göre 1.5 kat daha yüksek bulunmuştur (Lim ve Kim, 2013).

Yapılmış olan bir başka çalışmada kullanılan *Bacillus cereus* strain BBS7'in, kuraklık stresindeki domates bitkilerinde bitki büyümesini, yaprak pigment içeriğini, antioksidan enzim aktivitelerini ve askorbik asit seviyesini arttırdığı ancak malondialdehit seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (Altunlu ve ark. 2022). Ayrıca bu bakterilerin verimi, su stresinde olmadığı %10,6, su stresinde ise %59,9 oranında arttırdığı tespit edilmiştir (Altunlu ve ark., 2022).

Bu çalışmada, *HSP21* geninin ifade profiline göre, S1, S2, S3 ve S4 PEG stres uygulamaları *HSP21* geninin ifadesini (2h ve 12h) hiç uygulama yapılmamış kontrol bitkilerine göre artırmıştır. KB sardırılmış bitkilerde tüm stres uygulamalarında (S1, S2, S3, S4) her iki 2. ve 12. saatte *HSP21* geninin ifadesi sadece stres uygulanmış ve sadece bakteri sardırılmış bitkilere göre artış göstermiştir. Ayrıca KB ile sardırılmış ve S1 PEG stres uygulaması yapılmış 2. saat örneğinde 8 kat ve 12. saat örneğinde ise ifade hiçbir uygulama yapılmamış örneklerle kıyasla 20 kat artarak en yüksek düzeye ulaşmıştır. *HSP21* gen ifadesi profiline göre, sadece PEG uygulaması genin ifadesinde bir miktar artışa neden olurken, bakteri+PEG uygulamasının gen ifadesinde önemli artışlara neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. HSP ailesine ait *HSP21* geninin qPCR analizine göre ifadesi. B:Bakteri, S1: 0,25 PEG, S2: 0,50 PEG, S3: 0,75 PEG, S4: 1 PEG.

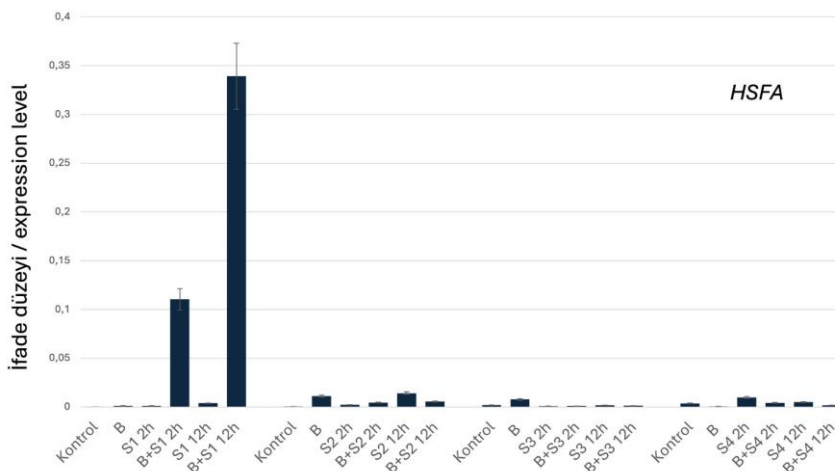
Figure 1. Expression of *HSP21* gene of HSP family genes by qPCR analysis. B:Bacteria, S1: 0,25 PEG, S2: 0,50 PEG, S3: 0,75 PEG, S4: 1 PEG.

Mikrodizin analizi kullanılarak, kuraklık stresi altındaki *Pseudomonas chlororaphis* O6 ile kolonize edilen *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde bir dizi kuraklık sinyal geninin aşağı regüle olduğu tespit edilmiştir. Kolonize bitkilerde jasmonik asit işaretçi genler (*VSP1* ve *PDF-1.2*), salisilik asit ile regüle olan *PR-1* ve ile regüle olan *HEL* genine ait transkript seviyeleri artmış, ancak bu genlerin kuraklık stresine yanıtları farklılık göstermiştir (Cho ve ark., 2013).

Bitkilerde kuraklık stresinde rol oynayan genler arasında, şaperon olarak görev yapan ve birçok stres faktörüne maruz kaldığında yukarı regüle olan ısı

şoku proteinleridir (Wahid ve ark. 2007; Priya ve ark. 2019).

Bu çalışmada, *HSFA* geninin ifadesi genel olarak düşük düzeyde seyretmiştir. Tüm stres uygulamaları (S1, S2, S2, S3, S4) *HSFA* geninin ifadesine (2. ve 12. saatte) etkisi önemli bulunmamıştır. Ancak KB ile sardırılmış bitkilere yapılan kuraklık stresi uygulamalarında (S1) *HSFA* geninin ifadesi 2. ve 12. saatte en yüksek düzeyde bulunmuştur (Şekil 2). Diğer stres (S2, S3, S4) uygulamalarının, sadece bakteri veya KB ile sardırılmış bitkilerde *HSFA* geninin üzerinde bir etkisi olmamıştır. *HSFA* geninin düşük dozda PEG uygulaması ile düzenlendiği gözlemlenmiştir.



Şekil 2. HSP ailesine ait *HSFA* geninin qPCR analizine göre ifadesi . B:Bakteri, S1: 0,25 PEG, S2: 0,50 PEG, S3: 0,75 PEG, S4: 1 PEG.

Figure 2. Expression of *HSFA* gene of HSP family genes by qPCR analysis . B:Bacteria, S1: 0,25 PEG, S2: 0,50 PEG, S3: 0,75 PEG, S4: 1 PEG.

En korunmuş protein ailelerinden biri olarak bilinen HSP70, protein katlanması, taşınması, denatüre proteinlerin parçalanması ve stres altında bitki büyümesinin düzenlenmesi gibi işlevlere sahiptir. Şaperon proteinler veya ko-şaperonlarla etkileşime girerek, HSP70 doğru protein katlanmasını destekler ve protein agregasyonunu önler. Bu, yanlış katlanmış veya hasarlı proteinlerin seçici olarak parçalanması için kritik önem taşır (Bukau ve Horwich, 1998; Leborgne-Castel ve ark., 1999; Sable ve Agarwal, 2018).

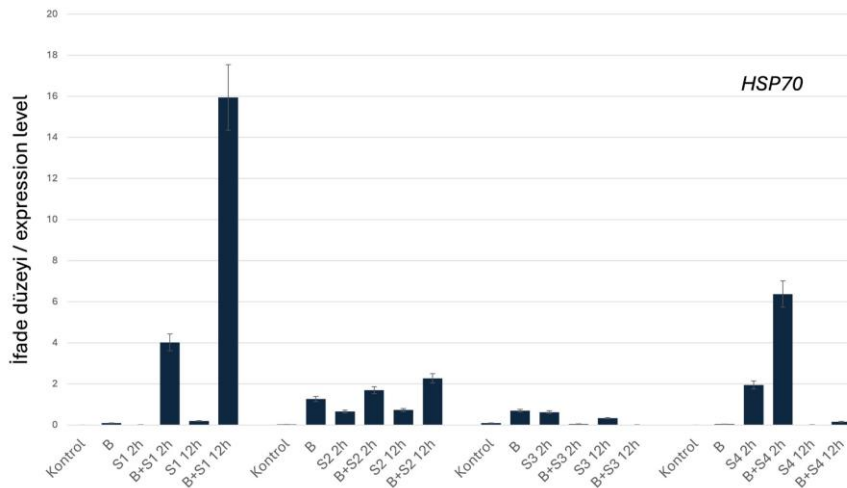
Abiyotik streslerdeki rollerinin yanı sıra, konukçu hücrenin viral enfeksiyonu sonrasında, HSP70'lerin virüs aktivitelerini düzenlemek üzere devreye girdiği rapor edilmiştir. Bu aktiviteler arasında viral proteinlerin replikasyonu, sentezi ve katlanması yer almaktadır (Aranda ve ark., 1996; Peremyslov ve ark., 1999). Ayrıca, HSP70'lerin konak bitkinin stres tepkilerinin düzenlenmesinde rol oynadığı ve bitki bağışıklık sistemini enfeksiyona karşı tetikleyebildiği gösterilmiştir. HSP70, ısı stresi tepki genlerinin ana düzenleyicileri olan ısı şoku transkripsiyon faktörleri (HSF'ler) ile etkileşime girerek aktivitelerini düzenler ve bitkilerin termotoleransını modüle eder (Ul Haq ve ark. 2019). HSP70'nin abiyotik stres altında absisik asit (ABA) sinyal yolak proteinlerinin aktivitesini düzenlediğini kanıtlanmıştır. ABA reseptör proteinleri

ile etkileşime girerek bunların parçalanmasını kolaylaştırdığı ve böylece ABA sinyalizasyonunu ve bitkinin stres tepkisini kontrol ettiği gösterilmiştir (Sarkar ve ark., 2013).

Ayrıca, HSP70 reaktif oksijen türleri (ROS) enzimlere bağlanabilir. Bu etkileşim, enzim aktivitesini artırarak oksidatif hasarın önlenmesine yardımcı olur (Mittler ve ark., 2012; Fragkostefanakis ve ark., 2015).

Bu çalışmada HSP70 geninin ifade profiline göre, kontrol bitkilere oranla S3 dışındaki tüm stres uygulamalarının HSP70 geninin ifadesini artırdığı tespit edilmiştir. Bitkilere yapılan B+S4 uygulamalarında, HSP70 geninin ifadesi 12. saatte en yüksek düzeye ulaşmıştır (Şekil 3). KB ile sardırılmış bitkilerde S4 stres uygulamasının indüklediği HSP70 geninin ifadesi 2. saatte artmışken 12. saatte baskılanmıştır. Literatür ile uyumlu olarak, HSP70 geninin ifadesi bakteri ile inoküle edilmiş ve stres uygulanmış bitkilerde yükselmiştir.

Bu veriler ışığında, *Bacillus cereus* bakterilerinin ısı şok protein (HSP) ailesine ait genlerin, ifade profillerini düzenleyerek domates bitkilerinin kuraklık stresine karşı toleransında rol oynadığı belirlenmiştir.



Şekil 3. HSP ailesine ait HSP70 geninin qPCR analizine göre ifadesi . B:Bakteri, S1: 0,25 PEG, S2: 0,50 PEG, S3: 0,75 PEG, S4: 1 PEG.

Figure 3. Expression of HSP70 gene of HSP family genes by qPCR analysis. B:Bacteria, S1: 0,25 M PEG, S2: 0,50 M PEG, S3: 0,75 M PEG, S4: 1 M PEG.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan kök Bakterileri ile sardırılmış domates bitkileri” Domates Bitkilerinin Kuraklık Stresine Toleransını Artırmada Kök Bakterilerinin Etkileri” başlıklı 117O126 numaralı TÜBİTAK

projesinden elde edilmiştir. Bu çalışma, Macide Elif Güçlüer’in Yüksek Lisans tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: FYL-2021-22622).

LİTERATÜR LİSTESİ

- Altunlu, H. 2011. Aşılamanın Domateste Kuraklık Stresi Üzerine Etkileri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı (Basılmamış) Doktora tezi. İzmir-Türkiye. 206 s.
- Altunlu, H., G. Aydoner Coban, A. Gul, H. Ozaktan. 2024. Effect of Rhizobacteria On Drought Stress Tolerance of Tomato Plants at Vegetative and Fruiting Growth Stages. Journal of Crop Health 76: 195–208. <https://doi.org/10.1007/s10343-023-00941-1>.
- Altunlu, H., G. Aydoner Çoban, ve A. Gül. 2022. Domates genotiplerinin kuraklık stresine tolerans açısından tohum çimlendirme ve vegetatif gelişme aşamalarında hızlı taranmasına uygun testlerin optimizasyonu. Journal of Agriculture Faculty of Ege University 59(4): 697-707. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.1117366>
- Aranda, M.A., M. Escaler, D. Wang, A.J. Maule. 1996. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. Proc Natl Acad Sci. 93:15289–15293.
- Baniwal, S.K., K. Bharti, K.Y. Chan *et al.* 2004. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. J Biosci. 29:471–487
- Bray, E. A. 1988. Drought- and ABA-Induced Changes in Polypeptide and mRNA Accumulation in Tomato Leaves. Plant Physiology. 88(4): 1210- 1214. doi: 10.1104/pp.88.4.1210
- Bukau, B., A.L. Horwich. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92(3):351–366.
- Cho, S.M., R. Beom, K. Yong, Y. Ang, C. oung, K. Heol. 2013. Transcriptomeanalysis of induced systemic Drought Tolerance Elicited by *Pseudomonaschlororaphis* O6 in Arabidopsis thaliana. Plant Pathol J. 29: 209–220.
- Dimkpa, C., T. Weinand, F. Asch. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviateabiotic stress conditions. Plant Cell Environ. 32: 1682–1694.
- Djordjevic, MA., DW. Gabriel, BG. Rolfe. 1987. Rhizobium the Refined Parasite of Legumes. Annual review of phytopathology 25(1): 145-168.
- Ferreira MCB, MS. Fernandes, J. Döbereiner. 1987. Role of Azospirillum Brasilense Nitrate Reductase in Nitrate Assimilation by Wheat Plants. Biology and fertility of soils 4(1): 47-53.
- Fragkostefanakis, S., S. Roth, E. Schleiff, K.D. Scharf. 2015. Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks. Plant Cell Environ. 38: 1881–1895.
- Guerra, D., C. Crosatti, H.H. Khoshro, A. M. Mastrangelo, E. Mica, Mazzucotelli, E. 2015. Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: a spider’s web of mechanisms. Front Plant Sci. 6:57.
- Gul, A., H. Ozaktan, L. Yolageldi, H. Altunlu, G. Aydoner Coban , G. Eryigit, O. Unay. 2021. In vitro selection of rhizobacteria for increasing drought tolerance of tomato plants. 1320:429-436. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1320.57>.
- Jones, H.G. 2006. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. J Exp Bot. 58:119–130.
- Kaldenhoff, R. and M. Fischer. 2006. Aquaporins in plants. Acta Physiol. 187:169–176.
- Katiyar-Agarwal, S., M. Agarwal, and A. Grover. 2003. Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101 . Plant Mol Biol 51:677–686. <https://doi.org/10.1023/A:1022561926676>
- Kim, Y.C., B. Glick, Y. Bashan, C.M. Ryu. 2013. Enhancement of plant drought tolerance by microbes. In: Aroca, R. (Ed.), Plant Responses to Drought Stress.Springer Verlag, Berlin.
- Kotak, S., J. Larkindale, U Lee, P. von Koskull-Döring, E. Vierling, K. D. Scharf. 2007. Complexity of the heat stressresponse in plants. Curr Opin Plant Biol. 10:310–316.
- Kregel, K.C. 2002. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J Appl Physiol. 92:2177–2186.
- Kumar, R.R., S. Goswami, S.K. Sharma, K. Singh, K. A. Gadpayle, N, Kumar, G. K. Rai, M. Singh, R. D. Rai. 2012 Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H2O2 and transcript of heat shock protein. Int J. Plant Physiol Biochem. 4:83–91.

- Lata, C., and M. Prasad. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J Exp Bot.* 62:4731–4748.
- Latif, F., F. Ullah, S. Mehmood, A. Khattak, A. Khan, S. Khan, I. Husain. 2016. Effects of salicylic acid on growth and accumulation of phenolics in *Zea mays* L. under drought stress. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci.* 66:325–332.
- Leborgne-Castel, N., E.P. Jelitto-Van Dooren, A.J. Crofts, J. Denecke. 1999. Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell.* 11:459–470.
- Liberek, K., A. Lewandowska, S. Ziętkiewicz. 2008. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J.* 27:328–335.
- Lim, J.H., S.D. Kim. 2013. Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in Pepper. *Plant Pathol. J.* 29, 201–208.
- Mittler, R., A. Finka, P. Goloubinoff. 2012. How do plants feel the heat? *Trends Biochem Sci.* 37: 118–125.
- Nouri, M.Z., S. Komatsu. 2013. Subcellular protein overexpression to develop abiotic stress tolerant plants. *Front Plant Sci.* 4:2.
- Peremyslov, V.V., Y. Hagiwara, V.V. Dolja. 1999. HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci.* 96:14771–14776.
- Pérez-Clemente, R.M., V. Vives, S.I. Zandalinas et al 2013. Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *Biomed Res Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/654120>
- Priya, M., O.P. Dhanker, K.H.M. Siddique, B. Hanumantha Rao, R.M. Nair, S. Pandey, S. Singh, R.K. Varshney, P.V.V. Prasad, H. Nayyar. 2019. Drought and heat stress-related proteins: an update about their functional relevance in imparting stress tolerance in agricultural crops. *Theor Appl Genet.* 132(6):1607-1638. doi: 10.1007/s00122-019-03331-2. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30941464.
- Rosenzweig, C., J. Elliott, D. Deryng, A.C. Ruane, C. Müller, A. Arneth, K.J. Boote, C. Folberth, M. Glotter, N. Khabarov, K. Neumann, F. Piontek, T.A. Pugh, E. Schmid, E. Stehfest, H. Yang, J.W. Jones. 2014. Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *Proc Natl Acad Sci.* 111:3268–3273.
- Sable, A., and S.K. Agarwal. 2018. Plant heat shock protein families: essential machinery for development and defense. *Int J Biol Sci.* 4:51–64.
- Sarkar, N.K., P. Kundnani, A. Grover. 2013. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*). *Cell Stress Chaperones.* 18: 427–437.
- Sarma, R. K., and R. Saikia. 2014. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21, *Plant and Soil*, 377(1): 111-126. doi: 10.1007/s11104-013-1981-9.
- Sewelam, N., Y. Oshima, N. Mitsuda, M. OHME-TAKAGI. 2014. A step towards understanding plant responses to multiple environmental stresses: a genome-wide study. *Plant Cell Environ.* 37:2024–2035.
- Timmusk, S., A. Islam, D. Abd El, C. Lucian, T. Tanilas, A. Kannaste, L. Behers, E. Nevo, G. Seisenbaeva, E. Stenström, Ü. Niinemets. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS One* 9:1–13.
- Timmusk, S., and E. Nevo. 2011. Plant root associated biofilms. pp. 285–300. *In: Maheshwari, D.K.(Ed.). Bacteria in Agrobiolgy. Plant Nutrient Management 3.* Springer Verlag, Berlin,
- Timmusk, S., and E.G. Wagner. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant Microb. Interact.* 12: 951.
- Tuteja, N., and S.S. Gill. 2016. Abiotic stress response in plants. *Environmental Science, Biology, Agricultural and Food Sciences* Wiley, Hoboken. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:90643900>
- Udvardi, M.K., K. Kakar, M. Wandrey, O. Montanari, J. Murray, A. Andriankaja, J-Y. Zhang, V. Benedito, J.M.I. Hofer, F. Chueng, D. 2007. Christopher. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiol.* 144:538–549.
- ul Haq, S., A. Khan, A. M. Khattak, W. X. Gai, H. X. Zhang, Z. H. Gong. 2019. Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 20(21): 5321-5352.
- Vishwakarma, K., N. Upadhyay, N. Kumar, G. Yadav, J. Singh, R.K. Mishra, V. Kumar, R. Verma, R.G. Upadhyay, M. Pandey, S. Sharma. 2017. Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Front Plant Sci.* 8:161.
- Vurukonda S. S. K. P., S. Vardharajula, M. Shrivastava, A. SkZ. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria, *Microbiological Research* 184: 13-24. ISSN 0944-5013, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>.

- Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf, M.R. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ Exp Bot* 61:199–223
- Wang, J., N. Sun, T. Deng, L. Zhang, K. Zuo. 2014. Genome-wide cloning, identification, classification and functional analysis of cotton heat shock transcription factors in cotton (*Gossypium hirsutum*). *BMC Genom* 15:961
- Wang, W., B. Vinocur, O. Shoseyov, A. Altman. 2004. Role of plant heatshock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9:244–252.
- Yang, J., J.W. Kloepper, C.M. Ryu. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14: 1–4.
- Ye, Y., Y. Ding, Q. Jiang, F. Wang, J. Sun, C. Zhu. 2017. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Rep.* 36:235–242.
- Zandalinas, S.I., R. Mittler, D. Balfagón, V. Arbona, A. Gómez-Cadenas. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol Plant.* 162:2–12.
- Zhang, J., Y. Li, H-X Jia, J.B. Li, J. Huang, M.Z. Lu, J.J. Hu. 2015. The heat shock factor gene family in *Salix suchowensis*: a genome-wide survey and expression profiling during development and abiotic stresses. *Front Plant Sci* 6:74.