



**MELATONİN İLE ENDOFİTİK BAKTERİ
UYGULANMASININ GAZAL BOYNUZU (*Lotus
corniculatus*) BİTKİSİNDE TUZ STRESİ TOLERANSI
ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro* ŞARTLARDA
ARAŞTIRILMASI**

Oğuzhan ERTÜFEKÇİ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU**

**2025
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MELATONİN İLE ENDOFİTİK BAKTERİ UYGULANMASININ GAZAL
BOYNUZU (*Lotus corniculatus*) BİTKİSİNDE TUZ STRESİ TOLERANSI
ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro* ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI**

Oğuzhan ERTÜFEKÇİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2025

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**MELATONİN İLE ENDOFİTİK BAKTERİ UYGULANMASININ GAZAL
BOYNUZU (*Lotus corniculatus*) BİTKİSİNDE TUZ STRESİ TOLERANSI
ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro* ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU danışmanlığında, Oğuzhan ERTÜFEKÇİ tarafından hazırlanan bu çalışma 29 / 05 / 2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (3/3)** kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Ökkeş ATICI	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Murat TURAN	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması tarafından nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

29 / 05 / 2025

İmza

Oğuzhan ERTÜFEKÇİ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELATONİN İLE ENDOFİTİK BAKTERİ UYGULANMASININ GAZAL BOYNUZU (*Lotus corniculatus*) BİTKİSİNDE TUZ STRESİ TOLERANSI ÜZERİNE ETKİSİNİN *in vitro* ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan ERTÜFEKÇİ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Bitkisel stres yanıtlarının iyileştirilmesinde melatonin gibi doğal antioksidanların ve bitki büyümesini teşvik eden endofitik bakterilerin kullanımı, sürdürülebilir tarım için umut verici stratejiler arasında yer almaktadır. Melatonin ve endofitik bakterilerin birlikte uygulanmasının, *Lotus corniculatus* (gazal boynuzu) bitkisinde tuz stresi toleransı üzerine etkilerini *in vitro* şartlarda araştırmak amaçlanmıştır. Steril koşullarda yetiştirilen *L. corniculatus* bitkileri, 1 ve 5 mM melatonin, 75 ve 100 mM NaCl ile birlikte kaktüslerden izole edilen endofitik bakteri uygulamaları ve bunların kombinasyonlarına tabi tutulmuştur. Bitkilerde morfolojik-fizyolojik parametreler (kök ve gövde uzunluğu, taze ve kuru biyokütle) ve biyokimyasal yanıtlar (malondialdehid, indirgen şeker, H₂O₂ ve prolin düzeyleri) analiz edilmiştir. Buna ek olarak, stres yanıtıyla ilişkili NAC ve SOS1 genlerinin ekspresyon düzeyleri, gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemiyle belirlenmiştir. Melatonin ve endofitik bakteri kombinasyon uygulaması, bitkisel büyümeyi ve antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirmiştir. Elde edilen bulgular, melatonin ve endofitik bakteri kombinasyonunun, *L. corniculatus* gibi yem bitkilerinde tuz stresine karşı etkili bir biyolojik koruma stratejisi olabileceğini ortaya koymaktadır.

2025, 75 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Lotus corniculatus*, Melatonin, Endofitik bakteri, Tuz stresi.

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MELATONIN AND ENDOFITHIC BACTERIA ADMINISTRATION ON SALT STRESS TOLERANCE IN GAZAL NECK (*Lotus corniculatus*) PLANTS IN VITRO CONDITIONS

Oğuzhan ERTÜFEKÇİ

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

The use of natural antioxidants such as melatonin and plant growth-promoting endophytic bacteria in improving plant stress responses is among the promising strategies for sustainable agriculture. This study aimed to investigate the effects of combined application of melatonin and endophytic bacteria on salt (NaCl) stress tolerance in *Lotus corniculatus* (bird's-foot trefoil) under in vitro conditions. *L. corniculatus* plants, grown under sterile conditions, were subjected to treatments including 1 and 5 mM melatonin, 75 and 100 mM NaCl, endophytic bacteria isolated from cacti, and combinations of these treatments. Morphological and physiological parameters (root and shoot length, fresh and dry biomass) as well as biochemical responses (malondialdehyde, reducing sugar, H₂O₂, and proline levels) were analyzed. In addition, the expression levels of stress-related NAC and SOS genes were determined using real-time PCR (RT-PCR). The combined application of melatonin and endophytic bacteria enhanced plant growth and strengthened antioxidant defense mechanisms. The findings suggest that the combination of melatonin and endophytic bacteria may serve as an effective biological protection strategy against salt stress in forage crops such as *L. corniculatus*.

2025, 75 page

Keywords: *Lotus corniculatus*, Melatonin, Endophytic bacteria, Salt stress.

TEŞEKKÜR

Bu tezin yapılması sırasında her an bilgisi ve tecrübesiyle bana yardımcı olan her türlü desteği sağlayan danışman hocam sayın Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar ortamında çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Büşra YAZICILAR ve Merve ŞİMŞEK GEYİK hocalarıma, Halit ŞİMŞEK'e ve Dr. Pınar UYSAL'a ayrıca teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden başlayarak yüksek lisans eğitimim sırasında da devam eden her an yanımda olan her türlü adımı birlikte atmaktan büyük mutluluk duyduğum en zorlu zamanlarımda desteğini her zaman hissettiğim kardeşim Abdulkadir METE'ye tüm destekleri için teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın en başından bugüne kadar bana koşulsuz şartsız destek sağlayan, bugünlere gelmemde ki en büyük itici gücüm olan sonsuz inançları ve güvenleri ile arkamda duran sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından düzenlenen 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile, tez sürecim boyunca maddi destek almamı sağlayan, Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ediyorum.

Saygılarımla,

Oğuzhan ERTÜFEKÇİ
Mayıs 2025

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Yem Bitkileri.....	1
1.2. Bitkilerde Tuz Stresi	2
1.1.1. SOS Sinyal yolu ve aktivasyonu	10
1.1.2. ROS.....	10
1.1.3. NAC transkripsiyon faktörü.....	12
1.3. Lotus corniculatus	12
1.4. Melatonin	14
1.4.1. Melatoninin bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki etkisi	16
1.4.2. Melatoninin antioksidan özelliği.....	17
1.4.3. Melatonin, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenler.....	17
1.5. Endofitik Bakteriler.....	18
1.5.1. Habitata dayalı bitki tuz toleransı	19
1.5.2. Tarımsal ürünlerde tuz stresine karşı endofitik bakterilerin adaptasyondaki rolü	20
1.5.3. Endofitik PGPB, bitki büyümesini ve kalitesini iyileştirir	22
1.5.4. Niallia Nealsonii.....	23
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM	30
3.1. Standart MS Ortamı Hazırlama.....	30
3.1.1. MS ortamı hazırlanışı.....	31
3.2. Tohum Sterilizasyonu	31
3.3. NaCl Stresi İçin Konsantrasyon Belirlenmesi	31
3.4. Tohum Ekimi	32

3.5. Tohumlara Bakteri Uygulaması	33
3.6. Bakteri DNA İzolasyonu.....	34
3.7. Bakterilerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması	34
3.8. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektrophorezi	35
3.9. 16S rRNA Gen Bölgeleri Sekans Analizi	35
3.10. Çözülebilir Şeker Tayini	36
3.10.1. Deney yapılışı.....	36
3.11. Çözülebilir Şeker Tayini İçin Standart Grafik Hazırlanışı.....	37
3.12. Prolin İçeriğinin Belirlenmesi	37
3.12.1. Deney yapılışı.....	38
3.13. MDA İçeriğinin Belirlenmesi	38
3.13.1. Deney yapılışı.....	38
3.14. H ₂ O ₂ İçeriğinin Belirlenmesi	39
3.14.1. Deney yapılışı.....	39
3.15. Trizol ile RNA İzolasyonu	40
3.16. cDNA Sentezi.....	40
3.17. RT-PCR.....	41
3.18. Kaktüslerden Endofitik Bakteri İzolasyonu	43
3.19. Bakterinin PGPB Özellikleri Açısından Değerlendirilmesi.....	43
3.19.1. Gram reaksiyon testi	43
3.19.2. Bakterinin siderofor üretme potansiyellerinin belirlenmesi.....	44
3.19.3. Bakterinin azot fiksasyonu kapasitelerinin belirlenmesi.....	44
3.19.4. Bakterinin ACC deaminaz aktivite testi.....	44
3.19.5. Bakterinin IAA hormonu üretme potansiyeli.....	45
3.19.6. Bakteri izolatların katalaz ve oksidaz aktivitesi testleri	45
3.19.7. Bakteri izolatların moleküler tanımlanması	46
3.20. İstatiksel Analiz.....	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	47
4.1. Çözülebilir Şeker İçin Standart Grafik.....	47
4.1.1. Çözülebilir şeker miktarları.....	47
4.2. Prolin Standart Grafiği	48
4.2.1. Prolin miktarına ait bulgular	49
4.3. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA olarak)	51

4.4. H ₂ O ₂ Standart Grafiği	53
4.4.1. Uygulamaların H ₂ O ₂ iđeriđi üzerine etkileri	53
4.5. Yaş ve Kuru Ağırlık	56
4.6. Bitki Gövde Uzunluğu	59
4.7. Bitki Kök Uzunluğu	60
4.8. SOS1 Geni ve NAC Transkripsiyon Faktörü İfadelerindeki Değişikliğin RT qPCR ile Değerlendirilmesi	61
4.8.1. SOS1 gen ekspresyonu	61
4.8.2. NAC gen ekspresyonu	61
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	63
5.1. Genel Değerlendirme	63
5.2. Öneriler	64
KAYNAKLAR	65
EKLER	73
EK 1	73
EK 2	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
dS m ⁻¹	Desimetre
g	Gram
m ²	Metrekare

Kısaltmalar

¹ O ₂	Singlet oksijen
ABA	Absisik Asit
APX	Askorbat Peroksidaz
Ca ²⁺	Kalsiyum iyonu
CAT	Katalaz
Cl ⁻	Klorür iyonu
DNA	Deoksiribonükleik Asit
GI	GIGANTEA
GSH	Glutatyon
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat iyonu
HKT	Yüksek Affinite Potasyum Taşıyıcısı
K ⁺	Potasyum iyonu
Mg ²⁺	Magnezyum iyonu
Na ⁺	Sodyum iyonu
NaCl	Sodyum klorür
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH ⁻	Hidroksil radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SO ₄ ²⁻	Sülfat iyonu

SOD	Süperoksit Dismutaz
SOS	Bitkilerde tuz stresine karşı toleransı düzenleyen sinyal yolu
TF	Transkripsiyon Faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tuz stresinde ROS rolü (Zhao ve ark., 2021).....	11
Şekil 4.1. Çözülebilir şeker için standart grafik.....	47
Şekil 4.2. Çözülebilir şeker miktarları grafiği	48
Şekil 4.3. Prolin standart grafiği	48
Şekil 4.4. Uygulamaların prolin içeriği üzerine etkileri	50
Şekil 4.5. Uygulamaların MDA içeriği üzerine etkileri.....	52
Şekil 4.6. H ₂ O ₂ standart grafiği	53
Şekil 4.7. Uygulamaların H ₂ O ₂ içeriği üzerine etkileri.....	54
Şekil 4.8. Uygulamaların bitki yaş ağırlığına etkileri	57
Şekil 4.9. Uygulamaların bitki kuru ağırlığına etkileri	57
Şekil 4.10. Uygulamaların bitki gövde uzunluğuna etkileri	59
Şekil 4.11. Uygulamaların bitki kök uzunluğuna etkileri	60
Şekil 4.12. Uygulamaların NAC ve SOS1 gen ifadeleri üzerindeki etkileri	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Standart MS için gerekli olan malzeme ve kullanılacak miktarlar.....	30
Çizelge 3.2. Çözülebilir şeker tayini için gerekli olan solüsyonlar, miktar ve hazırlanışı.....	36
Çizelge 3.3. Prolin içeriğinin belirlenmesi için gerekli olan solüsyonlar, miktar ve hazırlanışı.....	37
Çizelge 3.4. MDA içeriğinin belirlenmesi için gerekli olan solüsyonlar, miktar ve hazırlanışı.....	38
Çizelge 3.5. H ₂ O ₂ içeriğinin belirlenmesi için gerekli olan solüsyonlar, miktar ve hazırlanışı.....	39
Çizelge 3.6. cDNA sentezi için gerekli olan solüsyonlar ve miktarları.....	41
Çizelge 3.7. 2X sybr green qPCR mix protokolü	42
Çizelge 3.8. Tavsiye edilen termal döngü koşulları.....	42
Çizelge 4.1. Farklı tuz konsantrasyonlarında melatonin ve <i>N. nealsonii</i> bakteri uygulamalarının <i>Lotus corniculatus</i> bitkisinin DNSA (µg/mg) ve Prolin (mg/g) değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	51
Çizelge 4.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında melatonin ve <i>N. nealsonii</i> bakteri uygulamalarının <i>Lotus corniculatus</i> bitkisinin Lipid Peroksidasyonu (µg/g) ve H ₂ O ₂ (µg/mg) değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.	55
Çizelge 4.3. Farklı tuz konsantrasyonlarında melatonin ve <i>N. nealsonii</i> bakteri uygulamalarının <i>Lotus corniculatus</i> bitkisinin Yaş Ağırlık (g/bitki) ve Kuru Ağırlık (g/bitki) değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.	58

1. GİRİŞ

1. GİRİŞ

1.1. Yem Bitkileri

Tarımsal faaliyetler içinde önemli bir yere sahip olan yem bitkileri tarımı ile sürdürülebilir ve güvenli bir yem üretimi sağlanmaktadır. Yem bitkileri tarımı, sürekli ve güvenli kaba yem üretiminin en önemli yoludur (Akman ve ark., 2007). Üretilen yem bitkileri ile öncelikle hayvanların sağlıklı beslenmesi sağlanmaktadır. Hayvanların sağlıklı beslenmesinin bir sonucu olarak, insanların beslenmesi için vazgeçilmez bir nokta olan et ve süt ürünleri karşılanmaktadır. Ayrıca yem bitkilerinin ucuz bir kaynak olmasıyla birlikte, hayvanların mide yapısındaki doğal mikro denge için gerekli olan maddeleri içermesi ve mineral ile vitamin bakımından hayvanların ihtiyaçlarını karşılayan bir besin olması, yem bitkisi tarımının önemini artırmaktadır. Hayvan besini olarak doğrudan, insan besini olarak ise dolaylı biçimde önemli olan yem bitkileri tarımının bir diğer özelliği, nadas alanlarının azalmasını sağlayarak erozyon miktarının da azalmasına katkıda bulunmasıdır. Yem bitkilerinin önemli etkileri şu şekilde sıralanabilir:

- a. Toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin düzenlenmesi,
- b. Organik madde miktarının yüksek seviyede kalmasının sağlanması,
- c. Yağış rejimine uyumun kolaylaştırılması,
- d. Erozyonu önlenmesi,
- e. Verimin artırılması,
- f. Drenaja katkı sağlanması,
- g. Tarım için kullanılan toprak sürekliliğinin sağlanması,
- h. Yabancı otlar ile mücadelenin sağlanması (Yolcu & Tan, 2008).

Arazi bozulumu, inorganik gübrelerin uygunsuz kullanımı, atmosferik kirlilik, toprak verimliliği ve biyoçeşitlilik ile ilgili artan endişeler, organik geri dönüşüm uygulamalarına olan küresel ilgiyi artırmıştır.

1. GİRİŞ

Aslında toprak organik maddesi, toprağın fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini iyileştirmesi nedeniyle toprak verimliliğinin sürdürülmesinde ve dolayısıyla sürdürülebilir tarımsal üretimde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle baklagil yem bitkilerinin kullanıldığı yeşil gübreleme yolu ile ana bitkinin ihtiyacı olan azot gereksiniminin neredeyse tamamı veya önemli bir bölümü karşılanabilmektedir (Açıkgöz ve ark., 2005).

1.2. Bitkilerde Tuz Stresi

Toprakların ve tatlı su kaynaklarının, doğal süreçler ve/veya insan faaliyetleri sonucunda tuzlanması, çevresel hizmetleri ve sosyoekonomik ilişkileri etkileyen, giderek artan bir sorun haline gelmiştir. Ayrıca, tuzlanma tarımsal ekosistemleri tehlikeye atmakta; çoğu ekili bitkide besin eksikliği, pH ve oksidatif stres, biyokütle azalması gibi tuz stresine yol açmakta ve doğrudan gıda üretiminin hem kalitesini hem de miktarını olumsuz etkilemektedir. Tuz ya da stres türüne (alkali veya pH nötr) bağlı olarak, durumu yerinde iyileştirmek amacıyla belirli yaklaşımlar ve çözümler uygulanmalıdır. Bu kapsamda, çeşitli tarımsal-hidrotenik (toprak ve su koruma, azaltılmış toprak işleme, malçlama, yağmur suyu hasadı, sulama ve drenaj, deniz suyu girişinin kontrolü), biyolojik (tarımsal ormancılık, çoklu ekim, tuza dayanıklı türlerin yetiştirilmesi, bakteri aşılması, mikoriza teşviki, tuza dayanıklı anaçlarla aşılama), kimyasal (organik ve mineral katkı maddeleri, fitohormon uygulamaları), biyo-ekolojik (ıslah, tuzdan arındırma, nano bazlı ürün uygulamaları, tohum biyoprimer) ve/veya kurumsal çözümler (tuzluluk izleme, entegre ulusal ve bölgesel stratejiler) tuzluluğa ve tuz stresine karşı oldukça etkilidir. Tuz stresi altında, yüksek konsantrasyonlardaki sodyum iyonu (Na^+), bitki hücrelerinde birikerek toksik seviyelere ulaşır ve bu da iyon homeostazının bozulmasına yol açar (Horie ve ark., 2012). Bilgisayar bilimindeki gelişmeler (örneğin yapay zeka, makine öğrenmesi), iklim değişikliği dahil olmak üzere çeşitli senaryolar altında, tarladan küresel ölçeğe kadar tuzlanma süreçlerinin hızlı tahminini mümkün kılmaktadır. Bu nedenle, söz konusu gelişmeler; tuzlanmayı önleme ve kontrol altına alma, tuz stresinin yol açtığı zararları en aza indirme açısından çok disiplinli bir yaklaşım için kapsamlı bir sonuç ve araç seti sunmaktadır.

1. GİRİŞ

Tuz stresi ve buna bağı olumsuz çevresel etkilerin, özellikle küresel iklim değişikliğinin etkisiyle (örneğin, ısı stresleriyle birlikte daha sık ve belirgin kuraklık dönemleri, artan buharlaşma talepleri, yükselen ortalama hava sıcaklıkları, deniz seviyesinin yükselmesi, yeterince arıtılmamış ve yeniden kullanılan gri su üretiminin artması gibi) daha da kritik hale geleceği öngörülmektedir. Buna göre, mevcut projeksiyonlar, toplam ekili arazi alanlarının yaklaşık %20'sinin 2030 yılına kadar %47'ye kadar sulanamaz hale gelebileceğini göstermektedir.

Tarımsal ekosistemlerdeki tuz stresi; ozmotik stres, azalan besin alımı ve büyüme gibi birincil etkilerin yanı sıra, proteinlere, membran lipidlerine, karbonhidratlara ve DNA'ya zarar verebilecek reaktif oksijen türleri ve radikallerin oluşumu gibi daha karmaşık ikincil fizyolojik dengesizliklere de yol açmaktadır (Ondrasek ve ark., 2022). Sulamaya bağı tuz birikiminin ürün verimliliğini tehdit etmesi nedeniyle, bitkilerin tuzluluğa karşı geliştirdiği stres tepkilerinin ve bazı bitkilerin tuzlu koşullarda gelişmesini sağlayan mekanizmaların anlaşılması üzerine çalışmalar yapılmıştır (Balasubramaniam ve ark., 2023) . Ozmolitler, ozmoprotektanlar, radikal detoksifikasyonu, iyon taşıma sistemleri ve hormon seviyeleri ile hormon destekli sinyal iletimindeki değişikliklere ek olarak, "Tuza Aşırı Duyarlı" (SOS) yolunun da tuz stresine karşı önemli bir savunma mekanizması olduğu ortaya konmuştur. Ancak, SOS yolunun bileşenlerinin tuzluluk stresine karşı bitki genelinde toleransı nasıl düzenlediği hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır. Son dönem araştırmalar, GIGANTEA (GI) adlı bir proteinin, bitkilerde sirkadiyen ritmin (yani biyolojik saatin) düzenlenmesinde ve çiçeklenme zamanlamasının kontrolünde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. GI proteininin bu süreçlerde görev almasının anlaşılmasıyla, bitkisel gelişim ve çevresel yanıtların daha önce bilinenden daha karmaşık ve üst düzey bir şekilde kontrol edildiği görülmüştür. Yani GI'nin keşfi, bitkilerdeki zamanlama ve gelişimle ilgili düzenlemelerin sadece basit sinyallerle değil, oldukça sofistike bir ağ tarafından yönetildiğini göstermektedir (Mizoguchi ve ark., 2005; Nohales ve ark., 2019). GIGANTEA (GI) işlevinin kaybı, SOS yolunun bileşenleriyle etkileşimi aracılığıyla bitkilerde tuz stresine karşı yüksek düzeyde tolerans sağlamaktadır. GI ile SOS yolu arasındaki bu ilişki, bitki büyümesi ve stres toleransının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilir.

1. GİRİŞ

Fotosentezin ve bitki büyümesinin sürdürülebilmesi için yeterli su temini, hem doğal ekosistemlerde hem de tarımsal üretim sistemlerinde yüksek verim elde edilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Sulama suyundaki tuz miktarı düşük olsa da, ekonomik olarak geri kazanımı mümkün olmayan tuzların zamanla yeraltı sularına sızması ve toprakta birikmesi kaçınılmazdır.

Toprakta biriken sodyum iyonlarına (Na^+) karşı tolerans, bitki türleri arasında önemli farklılıklar gösterir. Örneğin, narenciye, domates ve avokado düşük Na^+ toleransına sahipken; pamuk ve arpa gibi türler daha yüksek tolerans gösterir. Tarımsal ürünlerin büyük çoğunluğu glikofit olup, bu bitkiler tatlı suya ihtiyaç duyar ve genellikle düşük (milimolar düzeyde) Na^+ konsantrasyonlarından bile olumsuz etkilenir. Çoğu bitki, deniz suyunun NaCl konsantrasyonunun yaklaşık dörtte birine karşılık gelen 100 mM NaCl seviyelerinde yaşamını sürdüremez, meyve vermez ya da tohum oluşturmaz (Flowers, 2004; Maas & Hoffman, 1977; Zhu, 2001).

Buna karşın, "halofit" olarak adlandırılan bazı bitkiler doğal olarak yüksek NaCl içeren ortamlarda (örneğin, 200 mM NaCl) yetişebilir ve hatta bu tür koşullara bağımlı hale gelmiştir. Tuz stresi, çoğu bitkinin büyüme aşamalarını olumsuz etkileyerek gelişimsel süreçlerde değişikliklere neden olur. Özellikle çimlenme ve fide gelişimi dönemlerinde iyon dengesizlikleri oldukça zararlıdır. Bu zarar, vejetatif büyüme sırasında görece daha az, çiçeklenme evresinde ise daha belirgin hale gelir; tohum oluşumu sırasında ise etkisi yeniden azalır.

Tuz şoku genellikle deneysel çalışmalarda tercih edilen bir yöntem olsa da, doğal ortamlarda tuz konsantrasyonları genellikle kademeli olarak artar. Tuz stresine eşlik eden absisik asit (ABA) biyosentezi ve bitki genelinde taşınması, stomatal kapanma gibi pek çok fizyolojik tepkiyi tetikler. Ancak ABA'ya bağımlı olmayan mekanizmalar da bu süreçte etkilidir. Sonuç olarak; transpirasyon ve fotosentez oranlarında azalma, fotoinhibisyon ve oksidatif stres düzeylerinde artış gözlemlenir. Bu tür stresler, hormon düzeylerindeki değişiklikler tarafından uyarılan reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı geliştirilen savunma mekanizmalarıyla dengelenmeye çalışılır.

1. GİRİŞ

Uzun vadede, bu stres koşulları yaprak ve kök büyüme oranlarında belirgin bir azalmaya neden olabilir. Bitkiler, tuz stresiyile başa çıkabilmek amacıyla Na^+ iyonlarının hücrelere alınması, hücre dışına atılması, bitki dokuları arasında taşınması ve genellikle yaşlanan dokularda ya da özel hücrelerde bulunan vakuollerde depolanması gibi çeşitli mekanizmalar için özgül proteinler üretir (Zhu, J. K., 2003).

Gen ifadesindeki ve metabolizmadaki iyon dengesizliği değişikliklerine yanıt olarak, tür ve duruma özgü bir dereceye kadar iyonik zorluklara ve ozmotik olarak yeni bir dengeye uyum sağlayabilir. NaCl bitki hücrelerinde biriktikçe, özellikle büyüyen hücrelerin vakuollerinde depolanır. Bu birikim zamanla hücre yapısını olumsuz etkileyebilir ve bunun sonucunda hasar belirtileri genellikle ilk olarak yaşlı yapraklarda, birkaç gün ya da hafta içinde gözlemlenebilir. Daha sonra, daha genç yapraklar hasar görür, fotosentetik performans azalır, ardından çiçeklenme gecikir ve sonunda hassas bitkilerde tohum olgunlaşması etkilenir. Ancak, değişen gelişme ve çiçeklenme, bitkilerde biriken zararlı tuz konsantrasyonlarının bir sonucu olarak basitçe anlaşılamaz. Bitkilerin tuzluluk stresine duyarlılığı, gelişimi etkileyen moleküler proglrardaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Arabidopsis'te, daha önce pirinçte gözlemlendiği gibi, NaCl stresi çiçeklenmeyi geciktirir, ancak bu davranış tüm türlerde görülmez ve bu da gecikmiş çiçeklenmenin genetik olarak kontrol edildiğini güçlü bir şekilde düşündürür (Park ve ark., 2016).

Bitkilerdeki tuz stresi mekanizmalarının incelenmesi, modern tarımsal kalkınma, iklim değişikliği ve küresel gıda krizi için önemli bir konu haline gelmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı bitki tepkisi karmaşık ve kapsamlıdır; doğru bir şekilde koordine edilmesi gereken birçok farklı süreci içerir. Aşırı tuz konsantrasyonlarının bitkiler üzerindeki etkisi ozmotik stresle sonuçlanır ve Cl^- ve özellikle Na^+ gibi toksik iyonların birikmesi nedeniyle iyonik bir dengesizlik yaratır. Tuz stresi ayrıca mineral homeostazı, özellikle de Ca^{2+} ve K^+ üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Transkriptomik, genomik ve moleküler biyolojideki son teknolojik ilerlemeler, bitkilerin tuz stresi altında verdiği tepkilerin moleküler temellerine dair önemli bilgiler sağlamış ve bu stres koşullarına yanıt olarak regüle edilen yeni gen ailelerinin keşfini mümkün kılmıştır.

1. GİRİŞ

Bu gelişmeler, özellikle transkripsiyon faktörleri, iyon taşıyıcıları ve sinyal iletim yollarında yer alan proteinlerin yanı sıra, tuz stresine özgü adaptif tepkilerde rol oynayan bazı genlerin de tanımlanmasına olanak tanımıştır. Örneğin, *High-affinity potassium transporters (HKT)*, *Salt Overly Sensitive (SOS)* yolakları ve bazı *NAC* transkripsiyon faktörleri gibi genler, tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarında önemli roller üstlenmektedir (Deinlein ve ark., 2014; Roy ve ark., 2014).

Dünyadaki gıda talebini karşılamak için su ve toprak kaynaklarının daha da azalması, insanlığın en önemli sorunlarından biridir. Tarımsal ürünlere olan yüksek talep, gelecekte önemli ölçüde artacaktır. Bu nedenle, gıda ürünlerine olan yüksek talep, öncelikle ekili arazilerden elde edilen verimliliğin artırılması ve marjinal arazilerin tarımsal üretim için kullanılması yoluyla karşılanmalıdır. Örneğin, dünyada 800 milyon hektardan fazla arazi yüksek düzeyde tuzluluktan etkilenmektedir. Bu alan, toplam arazi yüzeyinin %6'sından fazlasını kaplamaktadır. Tuzlu toprakların bitkiler için zehirliliği, tarımda verimliliği sınırlandıran ana faktördür. Yaklaşık 5,7 milyon hektar tarım arazisi aşırı tuzluluktan muzdariptir. Bu miktar, 2050 yılında 17 milyon hektara kadar yükselebilir. Dünya buğday üretiminin neredeyse %69'u, yüksek toprak tuzluluğunun olumsuz etkilerinden muzdariptir. Yüksek tuzluluk, tohum çimlenme seviyesini etkilemektedir. Kuraklık ve yüksek tuz konsantrasyonları, bitkilerde benzer fizyolojik ve biyokimyasal stres tepkilerine yol açar. Her iki stres türü de bitkilerde su potansiyelini azaltarak hücrede ozmotik stres oluşturur; bu da hücre turgorunun kaybına, büyümenin durmasına, fotosentez hızının azalmasına ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olur. Sonuç olarak, bu stresler bitkilerde ortak savunma mekanizmalarının (örneğin, ozmoprotektanların üretimi, antioksidan sistemlerin aktive edilmesi, ABA artışı) devreye girmesine yol açar (Zhu, 2002; Verslues ve ark., 2006).

Tuz stresi, kök sistemi tarafından mineral elementlerin ve suyun emilimini engeller. Bu nedenle hem kuraklık koşullarında hem de yüksek toprak tuzluluğu altında, bitkiler tarafından su ve mineral besin maddelerinin alımı olumsuz etkilenir. Topraktaki tuz konsantrasyonunun artması, özellikle bitki fidelerinin gelişimini olumsuz yönde etkiler. Çok yıllık bitkilerin çoğu, tek yıllıklara göre tuza daha toleranslıdır.

1. GİRİŞ

Birçok durumda, toprak tuzluluğu bitkilerde toksik etkilere neden olmakta ve bitkiler için gerekli olan besin maddelerinin dengeli bir şekilde alımını engelleyerek büyüme üzerinde olumsuz bir etki yaratmaktadır. Dünya genelindeki tarımsal ürün üretimi ile toprak tuzluluğu seviyesi arasında açık bir negatif korelasyon mevcuttur. Tarımsal bitki türlerinin büyük çoğunluğu glikofit olup, bu nedenle toprak tuzluluğuna karşı oldukça hassastırlar. Toprakta yüksek tuz konsantrasyonu koşulları altında, tarımsal üretkenlik; yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı yeni çeşitlerin ıslah edilmesi ve tarımsal üretime kazandırılması yoluyla potansiyel olarak artırılabilir. Ana toksik iyonların (özellikle Na^+ ve Cl^-) bitki tarafından alımı, taşınması, dağılımı ve farklı bölgelere yönlendirilmesi süreçlerinin anlaşılması, başlıca tarım ürünlerinin tuz toleransının geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu süreçlerin moleküler mekanizmalarının ve ilgili membran taşıma proteinleri arasındaki karmaşık etkileşimlerin araştırılması, bu alandaki gelişmeleri büyük ölçüde kolaylaştırabilir. Toprak tuzluluğu, kaynaklarına göre birincil ve ikincil olmak üzere ikiye ayrılır. Tuzların doğal süreçlerle uzun bir zaman diliminde birikmesi birincil tuzluluk olarak adlandırılır. Örneğin, deniz tuzunun rüzgarlar veya sular yoluyla taşınarak birikmesi ya da kayaların doğal erozyonu yoluyla tuzların salınımı bu gruba girer. İkincil tuzluluk ise insan faaliyetlerinden kaynaklanır ve en yaygın örneklerinden biri tarımsal sulamadır.

Toprak tuzluluğu, suda çözünebilen iyonların (sodyum [Na^+], klorür [Cl^-], kalsiyum [Ca^{2+}], magnezyum [Mg^{2+}], sülfat [SO_4^{2-}] ve bikarbonat [HCO_3^-]) toprakta aşırı birikmesi sonucunda, bitki büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkiler. Topraktaki sodyum düzeyinin aşırı yüksek olması ve bu durumun kalsiyum ile magnezyum düzeyleriyle dengelenmemesi halinde, toprak yapısı da zarar görebilir. Pozitif yüklü sodyum katyonları, topraktaki negatif yüklü kil minerallerini çekerek nemli koşullarda toprak partiküllerinin birbirine yapışmasına neden olur. Bu durum, kuru ortamda toprağın sertleşmesine ve kök sisteminin toprağa nüfuz etmesini zorlaştırarak bitki gelişimini sınırlandırmasına yol açar. Toprağın elektriksel iletkenliği 4 dS m^{-1} 'nin üzerine çıktığında, toprak "tuzlu" olarak sınıflandırılır (Nawaz ve ark., 2010).

Üç ana tuzlu toprak türü vardır: tuzlu, asidik ve asidik-tuzlu topraklar. Bu sınıflandırma; topraktaki çözünebilir tuzların toplam miktarı, elektriksel iletkenlik, pH

1. GİRİŞ

değeri ve toprak çözeltisindeki değiş tokuş edilebilir sodyum yüzdesi gibi parametrelere dayanmaktadır. Toprakta yüksek tuz iyonu konsantrasyonları, bitkilerde hiperosmotik şok ve iyonik dengesizlik gibi birincil stresleri tetikler. Bu stresler, beslenme dengesizlikleri ve oksidatif stres gibi ikincil streslere ve çeşitli fizyolojik patolojilere yol açabilir. Bitkilerdeki direnç mekanizmaları genel olarak iki ana grupta değerlendirilebilir: tuz stresine karşı ozmotik stresi ve iyon dengesizliğini azaltan mekanizmalar ve bu birincil etkiler sonucu ortaya çıkan ikincil etkileri sınırlayan mekanizmalar. İkincil etkiler, genellikle bitki beslenmesinin bozulması ve oksidatif stres oluşumu ile ilişkilidir. Tuzlu çözeltilerin neden olduğu su potansiyeli dengesizlikleri, bitki hücrelerinde turgor basıncının azalmasına yol açar ve bu durum büyümeyi ciddi şekilde sınırlar. Na^+ katyonları, bitkilerde tuz stresinin ana zararlı faktörlerinden biridir ve Cl^- anyonlarının homeostazının düzenlenmesi önemlidir. Özellikle soya fasulyesi, turuncgiller ve üzüm gibi bitkilerde klor (Cl^-) anyonlarının etkisi, bitkinin sürgün dokularında birikme eğiliminde olması nedeniyle fotosentetik aktivite üzerinde olumsuz sonuçlar doğurur. Bu birikim, kloroplast yapısında bozulmalara, klorofil kaybına ve genel olarak yaprakların yaşlanma sürecinin hızlanmasına neden olabilir (Munns & Tester, 2008). Ayrıca, ortamdaki Na^+ ve Cl^- iyonlarının fazlalığı toprak çözeltisinin ozmotik potansiyelinin düşmesine yol açarak bitkilerin kök sistemi tarafından su emilimini engeller. Na^+ ve Cl^- iyonları oldukça etkili ozmolitler olmalarına rağmen yüksek sitotoksositeye sahip olduklarından, ozmotik basıncın hücre tarafından dengelenmesi doğrudan apoplasttan tonoplasta doğru gerçekleşir. Bu hareket iyon membran taşıma sistemlerinin faaliyetleri ile sağlanır. Aynı zamanda, tuz stresinin etkilerini azaltmak için bitkiler, bitki metabolizması için daha az önemli olan ve onları yüksek tuz konsantrasyonlarının etkisine daha az duyarlı hale getiren dokularda bu sitotoksik iyonların aşırı miktarını biriktirir. Yüksek tuz seviyeleri, bitkiler üzerinde çeşitli sınırlamalara yol açar. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde, toksik iyonların vakuollerde depolanması (vakuolar sekestrasyon) büyük önem taşır. Eğer bu iyonlar yeterli miktarda vakuollere alınamazsa, sitozolde biriken toksik iyonlar hayati hücresel aktiviteleri olumsuz etkileyebilir.

Özellikle Na^+ iyonları, bitkide K^+ iyonlarının alım ve taşınmasında görevli sistemlerle rekabet halindedir. Fizikokimyasal benzerliklerinden dolayı Na^+ ve K^+ iyonları arasında da doğrudan rekabet oluşur. Sitozolik K^+/Na^+ oranının yüksek tutulması, bitkilerin tuz toleransını artıran önemli bir faktördür. Oksidatif stres, tuzluluk kaynaklı

1. GİRİŞ

stresin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve bitkiler bu strese karşı çeşitli savunma mekanizmaları geliştirir. Bu mekanizmalar arasında hücre duvarı biyosentezi, protein sentezi ve hücre büyümesinin düzenlenmesi yer alır. Yüksek tuz konsantrasyonları, bitkilerde oksidatif stresin bir göstergesi olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini teşvik eder. Bu artış, hücre bileşenlerine zarar verme potansiyeline sahip ROS'ların, bitkinin savunma sistemini aktive ederek başta süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi çeşitli detoksifikasyon enzimleri aracılığıyla nötralize edilmesini gerektirir (Mittler, 2002; Hasanuzzaman ve ark., 2013). Bitkiler, tuz stresine karşı bir yanıt olarak osmoregülasyon sağlayan moleküller (örneğin şekerler ve amfipatik bileşikler) üretir. Bu osmoregülatör moleküller, hücrelerin su dengesini koruyarak tuzun neden olduğu osmotik baskıyı hafifletir. Bu sürece osmotik regülasyon adı verilir. Ayrıca, sodyum (Na^+) ve klorür (Cl^-) iyonlarını hücre dışında tutarak veya özel bölgelerde biriktirerek toksik etkilerin azaltılmasını sağlarlar. Bu süreç ise iyon dengeleme olarak adlandırılır. Tuz stresine karşı gelişen bir diğer savunma ise, antioksidan sistemlerin aktive edilmesidir. Bitkiler, ROS birikimini azaltmak amacıyla süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidan enzimler ve moleküller üretir. Bunun yanında, hücre duvarlarının güçlendirilmesi ve yapısal değişikliklerle hücre hasarının önlenmesi de önemli bir savunma stratejisidir. Tuz stresine yanıt olarak, bitkiler büyüme hormonlarının (auksinler, sitokininler, giberellinler ve absisik asit) sentezini ve etkilerini düzenler. Bu hormonlar, bitki gelişimi ve stres tepkilerinin koordinasyonunda kilit rol oynar.

- a. **Oksinler:** Kök ve sürgün gelişimini etkiler ve tuz stresine karşı adaptasyonu teşvik eder.
- b. **Absisik Asit (ABA):** Tuz stresinin neden olduğu su kaybını kontrol eder ve stres yanıtını koordine eder.
- c. **Gen İfadesi ve Adaptasyon:** Tuz stresine maruz kalan bitkiler, bu stresi yönetmek için gen ekspresyonunu değiştirir. Tuz stresi altında, stresle başa çıkmak için çeşitli genler aktive edilir:

1. GİRİŞ

- d. **Stres Yanıtı Genleri:** Bu genler, stres yanıtını düzenleyen proteinlerin üretimini artırır, örneğin, stres proteinleri ve osmoregülasyon proteinler (Isayenkov, 2012).

1.1.1. SOS Sinyal yolu ve aktivasyonu

SOS sinyal yolu, bitkilerin tuz stresine yanıt olarak aktive edilen bir hücresel sinyal yolağıdır. Bu yolak, sodyum iyonlarının hücre içindeki seviyelerini düzenlemek ve tuz stresinin olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla çeşitli biyokimyasal ve genetik süreçleri koordine eder (Zhu, 2001). SOS1 geni, sodyum iyonlarının hücre dışına atılmasında kritik bir rol oynar. SOS1, sodyum iyonlarını hücre dışına pompalayan bir plazma membranı antiportörüdür.

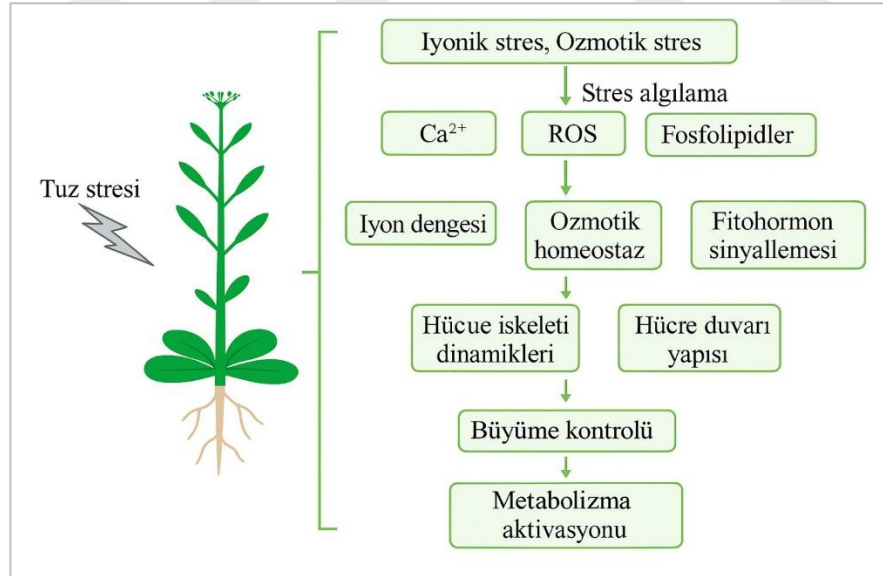
Tuz stresine yanıt olarak SOS1'in ekspresyonu ve aktivitesi artar; böylece hücre içindeki Na^+ konsantrasyonu azaltılarak iyon dengesizliği önlenir (Shi ve ark., 2000). SOS2, bir serin/treonin kinazdır ve SOS1'in aktivitesini düzenler. Tuz stresi koşullarında, SOS2 kinazı, diğer proteinleri fosforile ederek sinyal yolunu aktive eder. Bu fosforilasyon, SOS1'in etkinliğini artırır ve sodyum iyonlarının hücre dışına atılmasını teşvik eder. SOS3, bir kalsiyum bağlayan protein olup SOS2'nin aktivitesini düzenler. Tuz stresine yanıt olarak hücre içindeki kalsiyum seviyeleri artar ve bu durum SOS3'ün aktivasyonunu sağlar. Aktive olmuş SOS3, SOS2'nin fosforilasyonunu ve dolayısıyla SOS1'in etkinliğini artırır (Zhao ve ark., 2021).

1.1.2. ROS

Bitkilerin tuz stresine maruz kalması, H_2O_2 (hidrojen peroksit), O_2^- (süperoksit anyonu), $^1\text{O}_2$ (singlet oksijen) ve OH^- (hidroksil radikali) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırabilir. Aşırı düzeyde ROS üretimi, lipid peroksidasyonu, protein bozulması ve DNA mutasyonu gibi fitotoksik reaksiyonlara neden olur. Bitki hücrelerinde ROS, özellikle H_2O_2 , süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), sitozol, kloroplast, mitokondri ve apoplastik boşlukta üretilir. Bu türler, çevresel stres koşulları sırasında hücrelerde oksidatif hasara neden olma potansiyeline sahiptir. Son

1. GİRİŞ

çalışmalar, ROS'un bitkilerde patojen enfeksiyonlarına, çevresel stres koşullarına, programlanmış hücre ölümüne ve gelişimsel uyarılara verilen tepkilere aracılık eden sinyal iletim molekülleri olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Tuz stresinin neden olduğu membran hasarı, oldukça toksik olan ROS üretiminin artmasıyla ilişkilidir. ROS üretimindeki artış, stoma kapanması sonucunda kloroplast içindeki CO₂ konsantrasyonunun azalmasına yol açabilir. Bu durum, NADP⁺ düzeylerinde bir azalmaya ve dolayısıyla ROS üretiminin artmasına neden olur. Artan ROS konsantrasyonu, PS II'nin D1 proteinine zarar vererek fotoinhibisyona yol açabilir. Stres koşullarında artan fotorespirasyon ve NADPH aktivitesi, tiyol gruplarının oksidasyonu yoluyla enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilen H₂O₂ birikiminin artmasına katkı sağlar. H₂O₂'nin toksisitesi doğrudan kendi reaktivitesinden değil, tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilme kapasitesine sahip olan hidroksil radikalini (OH·) oluşturmak için bir metal indirgen varlığı gerektirmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, mısır yapraklarının genişleme bölgesinde tuzlulukla ilişkili uzama azalmaları, düşük ROS seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir ve bu azalmalar, dışarıdan ROS takviyesiyle hafifletilebilmektedir (Isayenkov, 2012).



Şekil 1.1. Tuz stresinde ROS rolü (Zhao ve ark., 2021)

1. GİRİŞ

1.1.3. NAC transkripsiyon faktörü

Bitkiler, çevresel stres faktörlerine ve gelişimsel süreçlere karşı çok sayıda gen düzenleyici mekanizma geliştirmiştir. Bu düzenleyici ağların merkezinde yer alan transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonunun kontrol edilmesinde kilit bir rol oynamaktadır. NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) transkripsiyon faktörleri, bitkilere özgü büyük bir transkripsiyon faktörü ailesi olup, adını ilk olarak keşfedilen üç genin (NAM, ATAF1/2 ve CUC2) baş harflerinden almıştır (Souer ve ark., 1996).

NAC proteinleri, N-terminalde oldukça korunan bir DNA-bağlayıcı bölgeye ve C-terminalde ise değişken bir transkripsiyon düzenleyici bölgeye sahiptir. Bu yapı, onların hem spesifik DNA dizilerine bağlanmalarını hem de çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu aktive etmelerini veya baskılamalarını sağlar (Ooka ve ark., 2003). Bu özellikleri sayesinde NAC transkripsiyon faktörleri; organ gelişimi, hücre bölünmesi, yaşlanma (senesans), abiyotik stres tepkileri (kuraklık, tuzluluk, soğuk) ve biyotik streslere karşı savunma gibi birçok önemli biyolojik süreçte görev almaktadır (Puranik ve ark., 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalar, NAC ailesi üyelerinin özellikle abiyotik stres toleransında genetik mühendislik için umut vadeden adaylar olduğunu göstermektedir. Örneğin, *Arabidopsis thaliana*'da ANAC072 (RD26) geni, kuraklık ve tuzluluk stresine yanıt olarak indüklenmekte ve stres toleransını artırmaktadır (Fujita ve ark., 2004).

Benzer şekilde, çeşitli tahıl ve sebze türlerinde NAC transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu, verim ve stres dayanıklılığında artış ile ilişkilendirilmiştir (Nuruzzaman ve ark., 2013).

1.3. *Lotus corniculatus*

L. corniculatus'un muhtemelen *L. tenuis* veya prototipinin bir ototetraploidi olarak ortaya çıktığı sonucuna daha önce Dawson (1941) tarafından varılmıştır. Ancak, *L. tenuis*'in yapay bir ototetraploidinin *L. corniculatus*'tan farklı olduğu ve onunla çaprazlanmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, önerilen ototetraploidlerin (*L. corniculatus* dahil) türler arası melez kökenli olduğu düşünülmektedir. Araştırmalar ayrıca, *L. alpinus*

1. GİRİŞ

ve *L. corniculatus*'un birbirlerine daha çok benzediğini ve *L. corniculatus*'un *L. alpinus*'un otopoliploid formu olabileceğini öne sürmüştür. Bununla birlikte, *L. tenuis*'in *L. corniculatus*'un kökeninde yer almadığı da belirtilmiştir. Sonuç olarak, *L. corniculatus*'un kökeni hâlâ tartışmalıdır ve bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Azarafshan & Abbaspour, n.d.).

Tuzluluk, dünyanın birçok bölgesinde tarım ürünlerinin ve doğal bitkilerin verimini azaltan temel ve yaygın bir stres faktörüdür. Her ne kadar tüm topraklar bitkisel üretim için gerekli olan az miktarda çözünebilir tuz içeriyor olsa da, bu tuzların miktarı bitkiler için zararlı seviyelere ulaştığında çeşitli sorunlar ortaya çıkmaktadır (Teimouri ve ark., 2005). *Lotus corniculatus*, Papilionaceae familyasının bir üyesidir ve bir mera baklagili olarak düşük tanen konsantrasyonu nedeniyle otlatıcı hayvanlar için uygun ve lezzetli bir yem kaynağıdır. Ayrıca bu bitkinin polenlerinden yüksek kaliteli bal elde edilebilmektedir. Bununla birlikte, *L. corniculatus* düşük kaliteli toprakların canlandırılması ve verimliliğinin artırılması amacıyla da kullanılmaktadır (Teimouri ve ark., 2005). Ek olarak, bu bitkinin sürgünleri antispazmodik, antiinflamatuvar ve sedatif gibi çeşitli tıbbi özelliklere sahiptir (Q. Li & Hill, 1989).

Lotus corniculatus L. (Bird's-foot trefoil, kısaca BFT olarak da bilinir) dahil olmak üzere baklagiller familyası üyeleri, birçok kültür bitkisi ve/veya mahsulde olduğu gibi tuzluluktan olumsuz etkilenmektedir. Çok yıllık bir baklagil yemi olan *L. corniculatus*, düşük verimli ve asidik ortamlarda yetişebilme yeteneği ile tanen içeriğine bağlı şişkinlik önleyici özellikleri de dahil olmak üzere birçok tarımsal avantaja sahiptir. Bu nedenle, tarım açısından önemli bir yem bitkisi olarak kabul edilmekte ve yol kenarlarında erozyonun önlenmesi amacıyla da sıklıkla kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2021).

Dünyanın ılıman bölgelerinde, *L. corniculatus* zamanla beyaz yonca (*Trifolium repens*) ve yoncanın (*Medicago sativa*) yerini alabilecek potansiyele sahiptir. Ancak tüm bu önemli özelliklerine rağmen, *L. corniculatus*'un çoğu genotipi tuzluluğa karşı hassastır. Tuz stresi koşulları altında, tohum çimlenme davranışı bitkiden bitkiye, hatta

1. GİRİŞ

aynı tür içinde çeşitten çeşide önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir (Ross & Jones, 1985).

1.4. Melatonin

Bitki büyüme düzenleyicileri (PGR'ler), bitki büyüme ve gelişimini düzenleyen, düşük konsantrasyonlarda etkili olan küçük organik bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitki fizyolojisi üzerinde derinlemesine etkiler yaratarak çeşitli biyolojik süreçleri modüle eder. Son yıllarda, melatonin (Mel) adlı bir PGR'nin çok yönlü işlevleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Melatonin; fotosentetik verimliliği artırma, stoma açıklığını düzenleme, kök mimarisini şekillendirme, organ gelişimini etkileme ve yaşlanma (senesans) süreçlerini geciktirme gibi birçok fizyolojik olayda görev alır (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015). Ayrıca melatonin, çevresel stres koşulları altında bitkilerin adaptif tepkilerini düzenlemede de önemli bir role sahiptir. Bu düzenleyici etki, büyük ölçüde melatoninin antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Melatonin, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) gibi zararlı molekülleri etkili bir şekilde nötralize ederek hücrel redoks dengesinin korunmasına yardımcı olur (Reiter ve ark., 2015).

Böylece, oksidatif stresin neden olduğu hücrel hasarın önlenmesinde ve bitkilerin stres toleransının artırılmasında kritik bir molekül olarak işlev görmektedir. Melatonin, bitkilerde hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanların aktivitelerini artırdığı gibi, stresle ilişkili genler ile strese duyarlı transkripsiyon faktörlerinin transkript düzeylerini de düzenlemektedir (Arnao & Hernández-Ruiz, 2014). Bu yönüyle Mel, bitkilerde çeşitli fizyolojik süreçlerin modülasyonunda ve stres tepkilerinin yönetilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Melatonin, özellikle tuz stresi koşullarında bitki toleransını artırarak büyüme ve adaptif yanıtları olumlu yönde etkilemektedir. Mel uygulaması veya Mel genlerinin aşırı ekspresyonu, bitki büyüme performansını ve tuz stresine karşı adaptasyon süreçlerini sistematik bir şekilde düzenlemektedir (Zhang ve ark., 2015). Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalar, Mel'in metabolik ve fizyolojik fonksiyonları modüle ederek genel büyüme performansını iyileştirdiğini ve tuz stresinin engelleyici etkilerini hafiflettiğini göstermiştir. Bu etkiler; iyon homeostazı, osmotik dengeleme, antioksidan savunma sistemlerinin aktivasyonu ve

1. GİRİŞ

stresle ilişkili genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Li ve ark., 2017).

Melatonin, bitkilerde doğal olarak bulunan ve hem tek çenekli hem de çift çenekli bitkilerde endojen olarak sentezlenen bir bileşiktir. Bitkilerdeki Mel konsantrasyonu genellikle gr doku başına pikogr ile mikrogr arasında değişmekte olup, özellikle üreme organları olan çiçek ve tohumlarda daha yüksek düzeylerde bulunur (Tan ve ark., 2012). Mel biyosentezi, amino asit triptofandan başlamakta ve bu süreç; triptofan dekarboksilaz, triptofan hidroksilaz, triptamin-5-hidroksilaz, serotonin N-asetiltransferaz, N-asetilserotonin metiltransferaz ve kafeik asit O-metiltransferaz gibi enzimler tarafından katalizlenen dört temel basamaktan oluşmaktadır (Back ve ark., 2016). Bununla birlikte, alternatif biyosentetik yolların varlığı da öne sürülmektedir. Melatonin bitkilerde genellikle düşük düzeylerde bulunmakla birlikte, çevresel stres koşulları –özellikle tuz stresi– bu molekülün seviyesini artırabilmektedir. Bu da onun bir stres sinyal molekülü olarak önemli rol oynadığını desteklemektedir (Manchester ve ark., 2015). Bitkilerde Mel biyosentezi ve fonksiyonları ile ilgili daha kapsamlı bilgiler için son dönemde yapılmış detaylı inceleme çalışmaları önerilmektedir (Arnao & Hernández-Ruiz, 2020).

Örneğin, arpa (*Hordeum vulgare*) ve acı bakla (*Lupinus albus*) bitkileri üzerine uygulanan tuz stresi, melatonin konsantrasyonunun artmasına neden olabilir. Benzer şekilde, tuz stresine maruz kalan ayçiçeği (*Helianthus annuus*) bitkilerinde de Mel düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Bu artışın, antioksidan enzimlerin aktivasyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Ayrıca, pamuk (*Gossypium hirsutum*) ve buğday (*Triticum aestivum*) gibi diğer bitki türlerinde de tuz stresi altında Mel birikiminin arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, Mel biyosentezinden sorumlu enzimlerin tuz stresine yanıt olarak yukarı yönde düzenlendiğini ve bu sayede bitkilerin stresle başa çıkma yeteneğinin desteklendiğini ortaya koymaktadır (Khan ve ark., 2022). Tuzluluğun bitkiler üzerindeki olumsuz etkileri, büyük ölçüde ROS aşırı üretimi ile ilişkilidir. Eksojen melatonin uygulamasının, tuzluluk kaynaklı ROS seviyelerini azalttığı ve özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunu düşürdüğü rapor edilmiştir. Bu etki, melatoninin antioksidan enzimleri aktive etmesi ve ROS'ları doğrudan temizlemesiyle gerçekleşmektedir. Melatonin, geniş spektrumlu antioksidan

1. GİRİŞ

özellikleri sayesinde süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi çeşitli serbest radikalleri etkisiz hale getirir ve klasik antioksidanlardan farklı bir etki mekanizması ile çalışır.

Eksojen melatonin uygulamasının kolza (*Brassica napus*), turp (*Raphanus sativus*), salatalık (*Cucumis sativus*), pirinç (*Oryza sativa*), mısır (*Zea mays*), karpuz (*Citrullus lanatus*), kivi (*Actinidia deliciosa*) ve *Malus hupehensis* gibi birçok bitki türünde etkili olduğu gösterilmiştir. Melatonin ile muamele edilen bitkilerde, kontrol gruplarına kıyasla antioksidan enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu ve askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi önemli antioksidan bileşiklerin konsantrasyonlarının arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, melatonin, tuz stresi altındaki bitkilerde antioksidan savunma sistemini güçlendirerek ROS seviyelerini düşürmekte ve bitkisel stres toleransını artırmaktadır.

1.4.1. Melatoninin bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki etkisi

Yapısal olarak melatonin, IAA ile benzer bir yapıya sahiptir ve bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde benzer etkilere sahiptir. Melatonin, kanarya otu, arpa, buğday, yulaf, *Arabidopsis thaliana* ve acı baklada etkili olduğu bilinmektedir (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015). Melatonin seviyesi düşük olan bitkilerde, eksojen melatonin uygulaması büyüme ve gelişim üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin, melatonin uygulamasının, plazma membranını ve endojen melatonin konsantrasyonunu arttırdığı görülmüştür. Buna benzer olarak, eksojen melatonin uygulaması soya fasulyesinde bitki büyümesini ve tohum verimini teşvik edebildiği gösterilmiştir (Wei ve ark., 2015). Bitkilere eksojen melatonin uygulanırken, uygun bir konsantrasyon kullanılması önemlidir. Örneğin, *Arabidopsis thaliana* fidelerinde orta düzeyde bir melatonin konsantrasyonu bitki büyümesini ve gelişimini desteklerken, düşük ve yüksek konsantrasyonlar üzerinde olumsuz etkiler görülmüştür (Shi ve ark., 2015).

1. GİRİŞ

1.4.2. Melatoninin antioksidan özelliği

Tuz stresi, bir yandan hücre hasarına neden olan, diğer yandan ise koruyucu savunma tepkilerini tetikleyen ROS artışa yol açar. Bitkilerdeki ROS temizleme sistemi, enzimatik olmayan ve enzimatik antioksidanlardan oluşur. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında melatonin, C vitamini, E vitamini ve glutatyon yer alırken; enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktazı (GR) içerir. Bu sistemler, tuz stresi altındaki bitkilerde genellikle artış gösterir ve düzeyleri bitkinin tuz toleransı ile doğrudan ilişkilidir. Melatonin, diğer enzimatik olmayan antioksidanlara kıyasla daha güçlü bir antioksidan kapasitesi sergilemektedir (Reiter ve ark., 2000). Endojen olarak üretilen ve ekzojen olarak uygulanan melatoninin, reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oluşturulan oksidatif hasarı etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Tan ve ark., 2007). Melatoninin, kademeli reaksiyon mekanizması yoluyla ROS'u temizlediği tahmin edilmektedir. Çalışmalar, melatonin uygulanan bitkilerin, uygulanmayanlara kıyasla daha düşük H₂O₂ düzeyine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Bu nedenle, melatoninin antioksidan işlevi dikkat çekmiş ve ana rolünün doğrudan ROS temizliği olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar, melatonin uygulaması yapılmış fidelerin, uygulanmamış fidelere göre daha yüksek antioksidan enzim aktivitelerine sahip olduğunu göstermiştir (Zhan ve ark., 2019). Ek olarak, melatonin mitokondriyal elektron taşıma zincirinin verimliliğini artırdığı, böylece elektron sızıntısını düşürdüğü ve bu yolla serbest radikallerin oluşumunu azalttığı gösterilmiştir.

1.4.3. Melatonin, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenler

Melatoninin bitkilerin tuz toleransını düzenlemesinin temel yollarından biri, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini modüle etmektir. Melatoninle aktive edilen transkripsiyon faktörleri, abiyotik streslere direnmek için strese yanıt veren genlerin transkripsiyonunu düzenler. Ayrıca, pirinçteki melatoninin bir metaboliti olan 2-hidroksimelatonin, çeşitli abiyotik streslere yanıt olarak Myb4 ve AP37 transkripsiyon faktörlerinin ekspres seviyelerini artırmıştır. Bu nedenle, melatonin bitki yapraklarının yaşlanmasını yavaşlatmada önemli roller oynar. Benzer sonuçlar, melatoninin bazı

1. GİRİŞ

önemli transkripsiyon faktörleri (örneğin *MYB*, *WRKY*, *NAC* ve *ERF*) dahil olmak üzere 77 farklı şekilde ifade edilen geni yukarı düzenlediği NaCl stresi altındaki salatalık (*Cucumis sativus*) köklerinde de gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2017).

Bu transkripsiyon faktörlerinin yukarı düzenlenmesi, salatalığın tuz toleransı ile yakından ilişkilidir. Bu sonuçlar, melatoninin ilgili transkripsiyon faktörlerinin ifadesini yukarı düzenleyerek bitkilerin tuz toleransını artırabileceğini göstermektedir. Ancak, hiçbir çalışma melatoninin benzersiz sinyal yolunu bildirmemiştir. Bu nedenle, gelecekteki çalışmaların odak noktası melatoninin sinyal yolunu açıklamak olacaktır (J. Li ve ark., 2019).

1.5. Endofitik Bakteriler

Bitkilerde tuz stresi toleransının artırılmasına yönelik olarak fizyolojik, biyokimyasal, genetik ve moleküler düzeyde çok sayıda çalışma ve uygulama yürütülmüş olmasına rağmen, bu girişimlerin tarımsal üretkenliğe olan katkıları, sınırlı finansal kaynaklar ve zaman kısıtlılığı gibi faktörler nedeniyle istenilen düzeye ulaşamamıştır. Dolayısıyla, sürdürülebilir tarım hedefleri doğrultusunda bu stres tolerans mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılması ve bu bilgilerin verim artırıcı stratejilere dönüştürülmesi için disiplinler arası yaklaşımların benimsenmesi ve uzun vadeli yatırım planlarının hayata geçirilmesi gerekmektedir (Mittler & Blumwald, 2010). Günümüzde, bitki stres toleransının artırılmasına yönelik araştırmalarda, habitat kaynaklı çevresel koşullarla şekillenen ve rizosferik ile endofitik bitki ile ilişkili mikrobiyal topluluklar tarafından yönlendirilen mekanizmalara olan ilgi giderek artmaktadır. Bu mikroorganizmaların bitki fizyolojisi, besin alımı, hormon düzenlemesi ve stresle ilişkili gen ekspresyonu üzerindeki olumlu etkileri; onları, biyotik ve abiyotik stres koşulları altında bitki performansını iyileştirmeye yönelik sürdürülebilir ve çevre dostu biyoteknolojik araçlar olarak ön plana çıkarmaktadır (Vurukonda ve ark., 2016). Bu nedenle, tarımda bitki büyümesini teşvik eden mikroorganizmaların kullanımı, tuzlu topraklarda ürün verimliliğini artırmaya yönelik düşük maliyetli ve çevre dostu bir biyoteknolojik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Egamberdieva ve ark., 2017).

1. GİRİŞ

Endofitik bakterilerin osmolitleri, anti-oksidanları ve fitohormonal sinyalleri iyileştirmek ve bitkinin besin alım verimliliğini artırmak gibi konukçu işlevlerine hizmet ettiğine dair somut kanıtlar vardır. Endofitler üzerine yapılan daha fazla araştırma, kolonizasyon mekanizması ve bitkilerle etkileşimleri hakkında bilgi edinmemizi sağlamıştır. Yirmi birinci yüzyılda yetersiz beslenme en önemli küresel sorunlardan biridir ve bu nedenle sürekli artan nüfusu beslemek için sürdürülebilir tarımın artırılması gerekmektedir. Dünya nüfusunun % 36'sının gıda ve gelir kaynağı olarak tarıma bağlı olduğu tahmin edilmektedir. (Choudhary ve ark. 2017). İklim değişikliğinin tarım üzerindeki etkisi sıcaklık, hava durumu, yağış, atmosferik CO₂ ve benzeri birçok parametreye bağlı olup, düşük verime veya bitki kaybına neden olmaktadır.

1.5.1. Habitata dayalı bitki tuz toleransı

Günümüzde bitkiler, stres koşulları altında simbiyotik ilişkiler yoluyla beslenme yeteneklerini geliştirmiştir. Bu olgu, "habitata uyarlanmış simbiyoz" olarak tanımlanır. Örneğin, halofit bitkiler genellikle bağımsız organizmalar olarak değil; yaşamsal faaliyetlerine katkı sunan çeşitli simbiyotik mikrobiyal topluluklarla birlikte işlev görürler. Bu simbiyotik birliktelikler, rizosferik ya da endofitik kökenli bakteriler, arkealar ve mantarları içeren geniş bir mikrobiyal çeşitliliğe sahiptir. Bu mikroorganizmalar, stresli çevre koşullarına adapte olma yetenekleri sayesinde bitki büyümesini çeşitli mekanizmalarla destekleyebilirler. Bitki büyümesini teşvik eden bu bakterilerin etkileri hem doğrudan hem de dolaylı yollarla gerçekleşir. Doğrudan mekanizmalarda, bakteriler; fosfor, potasyum ve çinko gibi besin elementlerinin çözünürleştirilmesi, azot fiksasyonu ve siderofor üretimi gibi aktivitelerle bitkinin besin alımını artırır. Ayrıca, bitki dokularındaki fitohormon düzeylerini düzenleyerek (örneğin oksin, sitokinin, gibberellin ve absisik asit üretimi yoluyla) stres koşulları altında fizyolojik yanıtları iyileştirirler. Bazı bakteriler, etilenin biyosentezinde rol oynayan öncü bileşik ACC'yi (1-aminosiklopropan-1-karboksilat) parçalayan ACC-deaminaz enzimi üreterek, bitkilerdeki etilen düzeyini düşürür ve büyümeyi destekler.

Dolaylı mekanizmalarda ise mikroorganizmalar, fungal ve bakteriyel fitopatojenlerin gelişimini baskılayarak bitkileri patojenlere karşı korur. Bu biyokontrol

1. GİRİŞ

etkisi; antibiyotikler, hücre duvarı parçalayıcı enzimler ve uçucu organik bileşiklerin üretimi yoluyla gerçekleşir. Bu bileşiklerin, stres koşulları altında bitki büyümesini ve tolerans düzeylerini artırdığı da bildirilmektedir. Habitata uyarlanmış simbiyozda, endofitik bakteriler, genellikle rizosferik olanlara kıyasla daha etkilidir. Bunun nedeni, bitki dokularının içinde bulunmaları ve doğrudan bitki hücreleriyle etkileşim içinde olmalarıdır. Halofit bitkiler ve bazı yabani türlerin, düşük besin koşullarında ve zorlu habitatlarda başarıyla gelişebildiği bilinmektedir; ancak bu bitkilerle ilişkili mikrobiyal toplulukların tarımsal uygulamalardaki potansiyeli henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu nedenle, halofitlerle ilişkili endofitik bakterilerin tanımlanması ve konakçı bitkilerle etkileşim mekanizmalarının anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

Nitekim yapılan bir çalışmada, hipersalin koşullar altında yetiştirilen *Salicornia* bitkileriyle ilişkili bakteriyel mikrobiyomun, tuzluluk ve kuraklık gibi stres faktörlerine karşı direnç sağladığı ve bitki büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir. Endofitik bakteriler bu bağlamda, tarımda tuz stresine dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi için umut vaat eden PGPB kaynaklarıdır. Örneğin, Sorty ve arkadaşları (2016), halofitik bir tür olan *Psoralea corylifolia* L. ile ilişkili *Enterobacter* sp. suşunun, tuz stresi altındaki *Triticum aestivum* tohumlarının canlılık indeksini artırma potansiyelini ortaya koymuştur. Benzer şekilde, *Arthrobacter* spp. hem besin mobilizasyonunu sağlamış hem de çinko ve demir gibi mikro elementlerin kökten sürgün ve daha sonra tane dokularına translokasyonunu artırarak *T. aestivum* bitkisinde biyofortifikasyonda önemli rol oynamıştır. Bu tür bakteriler, aynı zamanda antibiyotikler ve hidrolitik enzimler gibi bileşikler üreterek patojenlerin büyümesini engellemekte ve bitki bağışıklığını indüklemektedir.

1.5.2. Tarımsal ürünlerde tuz stresine karşı endofitik bakterilerin adaptasyondaki rolü

Bakteriyel endofitler, tuzluluğun bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletmek ve stres koşullarında bitki büyümesini teşvik etmek amacıyla başarıyla kullanılmıştır. Endofitlerin sağladığı faydalar, ozmotik ayarlama, detoksifikasyon, fitohormon düzenlemesi ve besin alımı gibi mekanizmalar aracılığıyla tuz stresinin etkilerini azaltmaktadır (Vaishnav ve ark., 2019). Bitkiler, kendi tuz adaptasyon

1. GİRİŞ

mekanizmalarına ek olarak, rizosferik ve endofitik mikrobiyal topluluklarla kurdukları simbiyotik ilişkiler aracılığıyla tuz toleranslarını artırabilirler. Toprak tuzluluğu, rizosfer mikrobiyal toplulukları üzerinde seçim baskısı oluşturarak halotolerant bakterilerin baskın hale gelmesini sağlar. Bu bakteriler, hem toprak sağlığının hem de bitki fizyolojisinin iyileştirilmesinde önemli roller üstlenmektedir. Bakterilerin bitki dokularına girişleri genellikle kök korteksini parçalayan selüloz ve pektinaz gibi enzimlerin salgılanmasıyla ya da ikincil kök gelişimi sırasında doğal olarak oluşan açıklıklar ve fitopatojenlerin neden olduğu yaralanmalar yoluyla gerçekleşir. Bitki endofitlerinin tarımsal uygulamalarda kullanımı giderek artmaktadır. Endofitik bakteriler, bitki dokuları içerisinde yaşayarak konakçı bitkiye çeşitli faydalar sağlar.

Özellikle *Enterobacter* türleri, pektinesteraz ve selüloz enzimlerini kodlayarak bitki dokularına girişte rol oynar. Bu mikroorganizmalar, bitkiyi hem biyotik hem de abiyotik stres faktörlerine karşı korurken, besin elementlerinin kullanılabilirliğini artırır, bağışıklık sistemini güçlendirir ve büyümeyi teşvik eder. Son yıllarda, endofitik bakterilerin doğal biyogübre ve bitki koruyucu ajanlar olarak kullanımı üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle tuz stresine karşı dayanıklılığı yüksek halofitik bitkilerle ilişkili halotolerant bakterilerin izole edilip tarımsal sistemlere aşılınması, toprak tuzluluğunun olumsuz etkilerini azaltmaya yönelik umut vadeden bir yaklaşımdır. Örneğin, *Enterobacter* sp. ve *Pantoea* alhagi NX-11 suşlarının pirinç ve buğday bitkilerinde tuz toleransını artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, *Brassica napus* bitkisinde RSH gen ailesinin ifade analizine yönelik çalışmalar, tuz toleransı üzerine gelecekteki araştırmalar için potansiyel oluşturmaktadır (Slama ve ark., 2023). Endofitik bakteriler, bir yandan bitkilerin fosfor (P), potasyum (K), çinko (Zn), azot (N) ve demir (Fe) gibi besin maddelerini daha etkin almasını sağlarken; diğer yandan indol-3-asetik asit (IAA) ve sitokininler (CKs) gibi büyüme hormonlarının üretimini teşvik eder. Aynı zamanda, artan toprak tuzluluğuna bağlı olarak bitki tarafından üretilen abiyotik stres hormonları olan absisik asit (ABA), jasmonat (JA), gibberellin (GA) ve 1-aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) düzeylerini dengeleyerek bitki stres yanıtlarını düzenlerler (Ali ve ark., 2022).

1. GİRİŞ

1.5.3. Endofitik PGPB, bitki büyümesini ve kalitesini iyileştirir

Hayvancılığa yönelik artan küresel talep, otlakların bozulmasına ve çevre kirliliğine neden olarak önemli çevresel sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle, hayvancılık üretimini sürdürürken veya artırırken çevresel ve ekonomik sürdürülebilirliği sağlamak, günümüzde acil bir gereklilik hâline gelmiştir. Sürdürülebilir hayvancılık, toprak erozyonu, besin eksiklikleri, yabancı ot istilası ve çölleşmenin azaltılmasına yönelik uygulamaların benimsenmesiyle mümkün olabilir. Yoğun hayvancılık üretiminin çevresel etkilerini azaltmaya yönelik potansiyel çözümlerden biri, otlak sistemlerine yemlik baklagil bitkilerinin dâhil edilmesidir.

Bu uygulama, yalnızca toprak verimliliğini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda özellikle kuraklık koşullarında su ve besin maddelerinin verimli kullanımını teşvik ettiği için intercropping (birlikte ekim) sistemlerinin uygulanmasını desteklemektedir. Baklagiller, azot (N) gereksinimlerinin önemli bir kısmını simbiyotik biyolojik azot fiksasyonu yoluyla atmosferden sağlayabilirler. Bu süreç, toprakta azot dinamiklerini etkileyerek, “azot transferi” olarak bilinen bir mekanizma aracılığıyla, baklagilden çim bitkisine doğru N geçişini mümkün kılar. Azot transferinin etkinliği, baklagil tarafından salınan azot miktarına ve çim tarafından bu azotun alınabilmesine bağlıdır. Baklagil-çim karışımlarının avantajları, bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPB) aracılığıyla daha da artırılabilir ve bu da sentetik azot gübrelerinin kullanım oranlarını azaltmaya olanak tanır. PGPB’ler, simbiyotik veya ilişkisel azot fiksasyonu, besin çözünürlüğü ve mineralizasyonu (örneğin fosfor, potasyum, çinko), fitohormon sentezi (örneğin indoller, gibberellinler, sitokininler), 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) deaminaz üretimi, uçucu organik bileşik sentezi ve ozmolit birikiminin indüklenmesi gibi çeşitli mekanizmalarla bitki büyümesini iyileştirebilen mikroorganizmalardır. Bu kapsamda, PGPB özellikleri taşıyan iyi bilinen fakültatif endofitik bakteri cinslerinden biri *Azospirillum*’dur. Bu bakterinin yem bitkilerine aşılınması, yem üretimini artırırken aynı zamanda toprak bozulma risklerini azaltmaktadır. Benzer şekilde, azotu asimbiyotik olarak fiksleyebilen ve çeşitli fitohormonlar üretebilen bir diğer endofitik bakteri cinsi *Herbaspirillum*’dur. Bu cinsin, pirinç, mısır ve şeker kamışı gibi tarım ürünlerinde biyogübre olarak potansiyel taşıdığı gösterilmiştir (Jha ve ark., 2013).

1.5.4. *Niallia Nealsonii*

Mikroorganizmalar, çevresel dengenin sağlanması ve kirleticilerin giderilmesi gibi pek çok ekolojik işlevde temel roller üstlenmektedir. Bu mikroorganizmalar arasında yer alan *Niallia nealsonii* (eski adıyla *Bacillus nealsonii*), çevresel stres koşullarına karşı gösterdiği dayanıklılık ve endospor oluşturma yeteneği ile dikkat çeken Gr-pozitif bir bakteri türüdür (Garritty ve ark., 2001).

İlk olarak NASA'nın uzay aracı montaj tesisinde, steril temiz oda koşullarında izole edilen bu tür, gama radyasyonuna karşı yüksek direnç gösteren sporlar oluşturmaya nedeniyle bilimsel ilgi odağı hâline gelmiştir (Venkateswaran ve ark., 2003).

Filogenetik analizler ve genetik karakterizasyon çalışmaları, *Bacillus* cinsinin polifiletik yapısını ortaya koymuş; bu durum, modern mikrobiyal sınıflandırma yaklaşımlarının yeniden değerlendirilmesini gerekli kılmıştır. Bu bağlamda, *Bacillus nealsonii*, *Niallia* adı verilen yeni bir cinse dâhil edilmiş ve *Niallia nealsonii* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Patel & Gupta, 2020). Söz konusu taksonomik değişiklik, modern sınıflandırma yöntemlerinin mikrobiyal taksonomi üzerindeki dönüştürücü etkisini açıkça ortaya koymaktadır. *Niallia nealsonii*, yalnızca ekstrem çevre koşullarına karşı gösterdiği dirençle değil, aynı zamanda çevre kirliliğinin giderilmesine yönelik sunduğu potansiyel ile de ön plana çıkmaktadır.

Nitekim 2023 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, Cezayir'in Oum Ghellaz Gölü çevresinden izole edilen bir *N. nealsonii* suşunun, fenolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiği ve 500 mg/L fenolü 48 saat içinde %91,6 oranında uzaklaştırdığı gösterilmiştir (Hamida ve ark., 2023). Bu bulgu, *N. nealsonii* 'nin, fenol gibi toksik organik bileşiklerle kirlenmiş çevresel ortamların biyoremediasyonunda etkili bir biyolojik ajan olabileceğini göstermektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çalışmanın ana temasını oluşturan yem bitkileri, iklim değişikliği ile oluşan tuz stresi ve endofitik bakterilerle ilgili literatür taramasının sonuçları aşağıda sıralanmıştır:

Açıkgöz ve ark. (2005) çalışmasında, yem bitkisi üretiminde karşılaşılan başlıca zorluklara yönelik kapsamlı çözüm önerileri sunulmuştur. Araştırmada, daha dayanıklı ve yüksek verimli yem bitkisi çeşitlerinin geliştirilmesinin gerekliliği vurgulanırken; modern tarım tekniklerinin uygulanması, sürdürülebilir sulama yöntemlerinin benimsenmesi, biyoteknolojik gelişmelerin entegrasyonu ve çiftçilere yönelik eğitim programlarının önemine dikkat çekilmiştir. Çalışma, yem bitkilerinin üretiminde yalnızca biyolojik değil, aynı zamanda ekolojik ve ekonomik faktörlerin birlikte değerlendirilmesinin verimlilik açısından kritik rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, kaynak, yem bitkisi üretiminde sürdürülebilirliğe yönelik çok yönlü stratejilerin benimsenmesi gerektiğini savunmaktadır.

Budak & Budak, 2014 çalışmasında, Yem bitkilerinin kalitesi, özellikle hayvancılık sektöründe hayvanların beslenme ihtiyaçlarının karşılanmasında çok önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Kaliteli yem bitkileri, hayvanların sağlıklı gelişimini ve üretkenliğini artırdığı belirtilmiştir. Çalışmada, yem bitkilerinin kalitesini etkileyen temel faktörler detaylı bir şekilde incelenmektedir. Bu faktörler genel olarak şu başlıklarda toplanabilir; Genetik Faktörler: Yem bitkilerinin tür ve çeşit özellikleri, genetik yapıları, besin değerlerini ve verimliliklerini doğrudan etkiler. İyi bir genetik yapı, bitkilerin daha yüksek besin değerlerine sahip olmasını sağlar. Çevresel Koşullar: İklim, toprak yapısı, su durumu gibi çevresel faktörler yem bitkilerinin kalitesini önemli ölçüde etkiler. Özellikle sıcaklık, nem ve güneş ışığı, bitkilerin büyüme hızını ve besin içeriğini etkileyen unsurlardır. Tarım Uygulamaları: Gübreleme, sulama, hasat zamanı ve diğer tarımsal uygulamalar yem bitkilerinin kalite özelliklerini belirler. Örneğin, erken hasat yapılan yem bitkileri genellikle daha yüksek kaliteli olur. Ayrıca, organik gübrelerin kullanımı ve sürdürülebilir tarım yöntemleri kaliteyi artırabilir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hastalık ve Zararlılar: Yem bitkilerinin hastalıklar ve zararlılarla mücadelesi, kaliteyi etkileyen önemli faktörlerden biridir. Bu unsurlar, besin değerini düşürebilir ve bitkilerin verimliliğini azaltabilir. Hasat ve İşleme: Hasat edilen yem bitkilerinin işlenmesi, kurutulması ve depolanması süreci de kaliteyi etkileyen önemli aşamalardır. Uygun hasat ve işleme teknikleri, bitkilerin besin değerinin korunmasına yardımcı olur.

Montemurro ve ark. (2006), kompost organik gübrelerin yem bitkilerinin verimi ve kalite özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, kompost uygulamalarının bitki büyümesini teşvik ettiği, verimliliği artırdığı ve toprak sağlığını olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Kompostun, özellikle azot döngüsünü iyileştirerek toprakta besin maddesi dengesini sağladığı ve bu sayede bitki gelişimine katkı sunduğu vurgulanmıştır. Ayrıca, organik gübre kullanımının çevresel etkileri azaltarak sürdürülebilir tarım uygulamalarına destek verdiği ifade edilmiştir. Bu bağlamda, kompostun yem bitkisi üretiminde hem verim hem de çevresel sürdürülebilirlik açısından önemli bir araç olduğu sonucuna varılmıştır.

Perevedentsev ve Vasil'ev (2023), iklim değişikliğinin tarım üretimi, gıda güvenliği ve çiftçilik uygulamaları üzerindeki etkilerini kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Çalışmada, artan sıcaklıklar, değişen yağış rejimleri ve aşırı hava olayları gibi iklimsel değişkenlerin tarımsal verimlilik, sulama gereksinimleri, hastalık ve zararlı yayılımı ile toprak sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri vurgulanmaktadır. Bu durumun, özellikle gıda üretimi ve güvenliği açısından ciddi tehditler oluşturduğu belirtilmiştir. Yazarlar, bu olumsuzluklara karşı etkili uyum stratejilerinin geliştirilmesinin zorunlu olduğunu ifade etmektedir. Bu stratejiler arasında iklim koşullarına dayanıklı bitki çeşitlerinin kullanılması, su kaynaklarının etkin yönetimi, tarımsal çeşitliliğin artırılması ve sürdürülebilir tarım uygulamalarının benimsenmesi yer almaktadır. Ayrıca, iklim değişikliğiyle mücadelede uluslararası iş birliğinin önemi de çalışmada altı çizilen temel unsurlar arasındadır.

Jehanzaib ve Kim (2020), iklim değişikliğine bağlı olarak artan kuraklıkların sulak alan ekosistemleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada, kuraklıkların sulak alanlara nasıl yayıldığı ve bu süreçlerin çevresel ile biyolojik sonuçları detaylı olarak ele

2. KAYNAK ÖZETLERİ

alınmıştır. Kuraklıkların sıklığı ve şiddetindeki artışın, sulak alanların su rejimini bozduğu, biyolojik çeşitliliği tehdit ettiği ve ekosistem hizmetlerinde aksamalara yol açtığı belirtilmiştir. Sulak alanların su döngüsü, habitat bütünlüğü ve canlı çeşitliliği açısından kritik öneme sahip olduğu vurgulanırken, bu sistemlerin kuraklığa karşı savunmasız yapıları nedeniyle iklim değişikliğinden ciddi şekilde etkilendiği ortaya konmuştur. Ayrıca, sulak alanların korunması ve sürdürülebilir şekilde yönetilmesinin, hem çevresel dengenin korunması hem de biyolojik çeşitliliğin sürdürülebilirliği açısından hayati öneme sahip olduğu ifade edilmiştir. Çalışma, bu ekosistemlerin iklim değişikliği karşısında dayanıklılığını artıracak acil ve etkili önlemlerin geliştirilmesi gerektiğine dikkat çekmektedir.

Park ve ark. (2016), bitkilerin tuz stresine karşı verdikleri tepkileri ve bu süreçte rol oynayan sinyal iletim mekanizmalarını ayrıntılı olarak incelemiştir. Çalışmada, tuz stresinin bitkilerde büyüme geriliği, su kaybı, hücre içi iyon dengesizlikleri ve besin maddesi yetersizliği gibi olumsuz etkilere neden olduğu vurgulanmaktadır. Bitkiler, bu tür çevresel streslere karşı hayatta kalabilmek için çeşitli biyokimyasal, genetik ve fizyolojik tepkiler geliştirir. Araştırma, bu tepkilerin temelinde yer alan sinyal iletim yollarını ortaya koymayı amaçlamaktadır. Özellikle kalsiyum (Ca^{2+}) sinyalizasyonu, absisik asit (ABA) hormonunun rolü, iyon kanallarının düzenlenmesi ve gen ekspresyonundaki değişiklikler ön plana çıkarılmıştır. Çalışma, bu mekanizmaların anlaşılmasının, tuz stresine dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik önemli bir adım olduğunu belirtmektedir. Bu bağlamda, bitkilerin stres koşullarına karşı verdiği moleküler ve hücresel yanıtların anlaşılması, tarımsal üretimde verimliliğin artırılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Zhao ve ark. (2021), bitkilerin tuz stresine karşı geliştirdiği yanıtları ve bu yanıtların genetik ile biyokimyasal düzeydeki düzenlenme süreçlerini incelemiştir. Tuz stresinin, bitkilerde su kaybına, hücre içi iyon dengesinin bozulmasına ve metabolik fonksiyonlarda aksamalara neden olduğu vurgulanmaktadır. Çalışmada, bitkilerin bu stres koşullarına karşı gösterdiği fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tepkiler ayrıntılı biçimde ele alınmıştır. Bu yanıtları düzenleyen mekanizmaların anlaşılması, özellikle tuz stresine dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesi açısından önemli bilgiler sunmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Elde edilen bulgular, tarımsal üretimin tuzlu toprak koşullarında da sürdürülebilir bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için strateji geliştirme sürecine katkı sağlamaktadır. Çalışma, tuz stresine karşı dayanıklılık mekanizmalarının aydınlatılmasının, tarımda verimliliği artırmaya yönelik önemli bir adım olduğunu ortaya koymaktadır.

Büyükyıldız ve ark. (2023), *Lotus corniculatus* (yazlık yonca) bitkisinin tuz stresi altındaki büyüme ve fizyolojik parametrelerini incelemiştir. Çalışmada, bitkinin tuz stresine karşı verdiği yanıtların, büyüme süreci, su dengesi ve metabolik işleyiş üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, *Lotus corniculatus* bitkisinin tuzlu koşullar altında belirli bir düzeye kadar tolerans geliştirebildiğini ortaya koymaktadır. Bitkinin tuz stresine karşı gösterdiği fizyolojik ve morfolojik yanıtlar detaylı biçimde analiz edilmiş; bu yanıtların, bitkinin hayatta kalma ve adaptasyon kapasitesiyle ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Çalışma, tuz stresine dayanıklı bitki türlerinin belirlenmesi ve tarımsal üretimde tuzlu toprakların verimli bir şekilde değerlendirilmesi açısından önemli bir bilimsel temel sunmaktadır.

Beyaz ve Kazankaya (2024), sodyum klorür (NaCl) ile indüklenen tuz stresinin *Lotus corniculatus* 'Leo' çeşidinde çimlenme ve fide gelişimi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmanın amacı, tuz stresinin bitki gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerini değerlendirmek ve bitkinin bu koşullara karşı gösterdiği adaptasyon tepkilerini belirlemektir. Farklı NaCl konsantrasyonlarında yürütülen deneyler sonucunda, tuz stresinin tohum çimlenme oranını düşürdüğü ve çimlenme sürecini geciktirdiği tespit edilmiştir. Yüksek NaCl düzeylerinde çimlenme oranlarında belirgin bir azalma gözlenmiş; bazı durumlarda ise tohumlar hiç çimlenmemiştir.

Fide gelişimi açısından ise tuz stresinin, özellikle kök ve gövde büyümesinde yavaşlamaya ve biyokütlede azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Artan tuz konsantrasyonları bu olumsuz etkileri daha da şiddetlendirmiştir. Ayrıca, çalışmada *Lotus corniculatus* 'Leo' çeşidinin tuz stresine karşı sınırlı düzeyde adaptasyon gösterebildiği ve yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı toleransının düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, tuzlu toprak koşullarında bu çeşidin kullanım potansiyelinin sınırlı olabileceğini ortaya koymaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

J. Li ve ark. (2019), melatoninin bitkilerde tuz stresine karşı oynadığı rolü incelemiştir. Melatonin, yalnızca hayvanlarda değil, aynı zamanda bitkilerde de çeşitli biyolojik işlevlere sahip önemli bir molekül olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışma, melatoninin bitkilerde tuz stresine karşı gelişen fizyolojik ve moleküler yanıtları nasıl düzenlediğini ve bu stresle başa çıkmada nasıl koruyucu bir etki sağladığını araştırmıştır. Elde edilen bulgular, melatoninin tuz stresine karşı bitkilerde belirgin bir koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Melatonin uygulaması, oksidatif stresi azaltarak, osmoregülasyonu iyileştirerek ve bitki büyümesini teşvik ederek bitkilerin tuz stresine tolerans geliştirmelerine yardımcı olmuştur. Çalışma, melatoninin, tuzlu toprak koşullarında bitki verimliliğini artırmak amacıyla tarımda biyolojik bir strateji olarak kullanılabileceğini önermektedir.

Khan ve ark. (2022), bitkilerde melatoninin tuz stresine karşı gösterdiği etkileri ve bu etkilerin altında yatan mekanizmaları incelemiştir. Melatonin, bitkilerde stres yanıtlarını düzenleyen önemli bir molekül olarak son yıllarda giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Bu çalışma, melatoninin tuz stresine karşı sağladığı koruyucu etkileri daha ayrıntılı biçimde ele almakta ve bu sürecin moleküler düzeyde nasıl işlediğine dair yeni bilgiler sunmaktadır. Araştırma, melatoninin bitkilerdeki çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal yanıtları düzenleyerek tuz stresinin olumsuz etkilerini hafiflettiğini ortaya koymuştur. Melatonin; oksidatif stresin azaltılması, iyon dengesinin korunması, osmoregülasyonun desteklenmesi ve büyümenin teşvik edilmesi gibi yollarla bitki stres toleransını artırmaktadır.

Çalışma, melatoninin bitkilerde tuz stresine karşı etkili bir düzenleyici olduğunu ve tarımda stres koşullarına dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde potansiyel bir biyolojik araç olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Vaishnav ve ark. (2019), bitkilerin tuz stresine karşı dayanıklılıklarının artırılmasında endofitik bakterilerin rolünü incelemiştir. Endofitik bakteriler, bitki dokuları içerisinde, özellikle köklerde ve diğer iç yapılarında yaşayan mikroorganizmalardır. Bu bakteriler, bitkilerle simbiyotik ilişkiler kurarak çevresel streslere karşı tolerans mekanizmalarının güçlenmesine katkıda bulunabilir. Çalışma,

2. KAYNAK ÖZETLERİ

endofitik bakterilerin bitkilerde tuz stresine karşı oluşturduğu yanıtları nasıl iyileştirdiğini ve bu alanda yapılan çeşitli araştırmalarda elde edilen bulguları detaylandırmaktadır. Endofitik bakterilerin, tuz stresi altındaki bitkilerde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeylerde olumlu etkiler gösterdiği vurgulanmıştır. Bu mikroorganizmaların, tuz stresine dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde büyük bir potansiyele sahip olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, endofitik bakterilerin biyoteknolojik uygulamalarda ve sürdürülebilir tarım stratejilerinde önemli bir araç olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. Bu bakteriler sayesinde, tuzlu topraklarda bitki üretiminin artırılması mümkün olabilir ve bu durum, gelecekte tarım sektörü açısından önemli katkılar sağlayabilir.

Slama ve ark. (2023), tuz stresinin bitkilerin kök bölgesi (rizosfer) ve genel bitki sağlığı üzerindeki etkilerini incelemekte, ayrıca endofitik bakterilerin bu stresin hafifletilmesindeki rolünü vurgulamaktadır. Tuzlu ortamlar, bitkiler için önemli bir çevresel stres kaynağı olup, büyüme, gelişme ve verimlilik üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Çalışma, endofitik bakterilerin tuz stresine karşı bitkilerin dayanıklılığını nasıl artırdığını araştırmaktadır. Tuz stresi, rizosferdeki mikrobiyal toplulukların yapısını ve işlevlerini olumsuz etkileyebilir; bu durum mikrobiyal çeşitliliğin azalmasına, faydalı bakterilerin sayısının düşmesine ve genel biyolojik aktivitelerin sınırlanmasına yol açmaktadır. Bu değişiklikler, bitkilerin kök sistemleri aracılığıyla su ve besin alımını zorlaştırmakta ve büyümeyi olumsuz etkilemektedir. Araştırma, endofitik bakterilerin rizosferdeki stres koşullarını hafifleterek, tuzlu ortamlarda bitkilerin daha sağlıklı bir şekilde gelişmesini desteklediğini ortaya koymaktadır.

Çalışmada, bu bakterilerin biyoteknolojik potansiyeline dikkat çekilmekte ve tuzlu topraklarda tarımsal verimliliği artırmak amacıyla biyolojik bir çözüm sunduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca, endofitik bakterilerin tarımsal uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılabilmesi için bu mikroorganizmaların tuz toleransını artırıcı mekanizmalarının daha ayrıntılı şekilde araştırılması gerektiği belirtilmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Standart MS Ortamı Hazırlama

Çizelge 3.1. Standart MS için gerekli olan malzeme ve kullanılacak miktarlar

Gerekli Malzemeler ve Kimyasallar **Kullanılacak Miktar (1 L)**

Şeker	30 gr
Demir Şelat	10 mL
Agar	8 gr
C Vitamini	1 mL
MS	1 mL
Makroelement	50 mL
Mikroelement	1 mL

Makroelement ve Mikroelement İçerikleri

Makroelement		Mikroelement	
Kimyasallar	Miktar (mg/l)	Kimyasallar	Miktar (mg/l)
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ EDTA.2 H ₂ O veya Na ₂ EDTA	40,946 veya 37,26
MgSO ₄ .7 H ₂ O veya MgSO ₄	370 veya 180,7	Fe ₂ (SO ₄).7H ₂ O	27,8
CaCl ₂ .2H ₂ O veya CaCl ₂	439,6 veya 332,2	MnSO ₄ .H ₂ O veya MnSO ₄	16,9 veya 15,1
KNO ₃	1900	KI	0,83
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6,2
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.1. MS ortamı hazırlanışı

Bir L besiyeri için sırasıyla; 50 mL makroelement, 1 mL mikroelement, 10 mL Demir şelat ve 30 gr şeker 1 L'lik erlene eklendikten sonra üzeri 800 mL kadar dH₂O ile tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı da karıştırıldıktan sonra pH metre ile pH=5.8'e ayarlanmıştır. Ardından 8 gr agar eklenerek besiyeri 1 L'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda agarında karışması sağlanarak otoklavda 121 °C'de 1 atmosfer basınçta yaklaşık 90 dk olacak şekilde sterilizasyon yapılmıştır. Sterilizasyon sonunda besiyeri steril şekilde soğumaya bırakılmıştır.

Soğuyan besiyeri Class II Biyogüvenlik Kabini (ESCO NordicSafe) içerisinde steril koşullarda 1 mL MS vitamini ve 1 mL C vitamini filtreden geçirilerek besiyerine eklenmiştir. En son aşamada besiyeri, steril petri kaplarına (IsoLab) yaklaşık 15-20 mL olacak şekilde dökülmüştür. Ardından agarın donması beklendikten sonra ekim yapılmak üzere steril ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2. Tohum Sterilizasyonu

Lotus corniculatus (Sarı Yıldız) bitkisine ait tohumlar, öncelikle %70'lik etanol (EtOH) içerisinde yaklaşık 5 dk süreyle sterilize edilmiştir. Sterilizasyonun ardından, etanolün uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla tohumlar otoklavlanmış su ile en az üç kez yıkanmıştır. Daha sonra, %22'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisi ile 20 dk süreyle yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Bu işlemin ardından, Class II Biyogüvenlik Kabini (ESCO NordicSafe) içerisinde steril koşullarda, tohumlar tekrar otoklavlanmış su ile en az üç kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin tamamlanmasıyla birlikte tohumlar, ekim için hazır hale getirilmiştir.

3.3. NaCl Stresi İçin Konsantrasyon Belirlenmesi

Ön deneme çalışmaları kapsamında, tuz stresine karşı bitkilerin tepkilerini değerlendirebilmek amacıyla dört farklı NaCl konsantrasyonu içeren besiyerleri hazırlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu konsantrasyonlar sırasıyla 100, 150, 200 ve 250 mM NaCl şeklinde belirlenmiştir. Melatonin uygulamaları için ise, 1 ve 5 mM konsantrasyonları tercih edilmiştir. Her bir tuz stresi düzeyi için, melatonin uygulamaları hem tek başına hem de kombine şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda yapılan kombinasyonlar şu şekildedir: 100 mM NaCl + 1 mM Melatonin, 100 mM NaCl + 5 mM Melatonin, 150 mM NaCl + 1 mM Melatonin, 150 mM NaCl + 5 mM Melatonin, 200 mM NaCl + 1 mM Melatonin, 200 mM NaCl + 5 mM Melatonin, 250 mM NaCl + 1 mM Melatonin, 250 mM NaCl + 5 mM Melatonin. Tuz stresleri için her bir konsantrasyonun hesaplaması; $M = \frac{m}{\frac{MA}{V}}$ formülüne göre yapılmıştır. Formüle göre sırasıyla;

- 100 mM NaCl için; $0.1 = \frac{\frac{m}{58.443}}{0.1} = 0.58 \text{ gr NaCl } 100 \text{ mL dH}_2\text{O}.$
- 150 mM NaCl için; $0.15 = \frac{\frac{m}{58.443}}{0.1} = 0.87 \text{ gr NaCl } 100 \text{ mL dH}_2\text{O}.$
- 200 mM NaCl için; $0.2 = \frac{\frac{m}{58.443}}{0.1} = 1.17 \text{ gr NaCl } 100 \text{ mL dH}_2\text{O}.$
- 250 mM NaCl için; $0.25 = \frac{\frac{m}{58.443}}{0.1} = 1.46 \text{ NaCl } 100 \text{ mL dH}_2\text{O}.$

Melatonin konsantrasyonu için 1 mL'ye 1 mL olacak şekilde melatonin uygulanmıştır.

3.4. Tohum Ekimi

Hazırlanan besiyerleri Class II Biyogüvenlik Kabini (ESCO NordicSafe) içerisine alınmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan tohumların ekimi alevli ortamda gerçekleştirilmiştir. Her bir konsantrasyon için petriler etiketlenmiştir. Parafilm ile kaplanan petriler tohumların çimlenmesi için çimlendirme kabinine alınmıştır. Burada 21 gün tohumların çimlenmesi gerçekleştirilmiştir. 21 gün sonunda en iyi çimlenen konsantrasyonlar belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlar ile deneye devam edilmiştir.

3.5. Tohumlara Bakteri Uygulaması

Belirlenen konsantrasyonlar için yeniden besiyeri hazırlama ve tohum sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir gruptan bakteri uygulanmasının gerçekleştirilmesi için de hazırlanmıştır. Kontrol grubu ve bakteri uygulanan grup olacak şekilde ayarlama yapıldıktan sonra hazırlanan besiyerleri uygun şekilde etiketlenmiştir.

- Standart MS
- 1 mM Melatonin
- 5 mM Melatonin
- 75 mM NaCl
- 100 mM NaCl
- 1 mM Melatonin 75 mM NaCl
- 5 mM Melatonin 75 mM NaCl
- 1 mM Melatonin 100 mM NaCl
- 5 mM Melatonin 100 mM NaCl

Bakteri uygulaması için LB Broth hazırlanarak *H11* bakterisi ile kültür başlatılmıştır. Kültür, 16 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, 8000 rpm’de 3 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası çöken bakteriler, 10 mL %0.9’luk NaCl çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Daha önce standart prosedüre uygun şekilde sterilize edilen tohumlar, Class II Biyogüvenlik Kabini içerisinde 10 mL’lik bakteri süspansiyonu içerisinde yaklaşık 1 saat bekletilmiştir. Tohumların şişmesi gözlemlendikten sonra, %33’lük NaOCl çözeltisi ile kabin içinde yeniden yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Sterilizasyonun ardından tohumlar saf su ile durulanmış ve ekim işlemi yapılmıştır. Ekim sonrasında petri kapları parafilm ile kapatılarak, 21 günlük çimlenme süreci için çimlendirme kabinine yerleştirilmiştir.

3.6. Bakteri DNA İzolasyonu

- ✓ 180 rpm'de 16 saat bekletilen overnight kültür 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Süpernatant atılmıştır. Pellete 1 mL Lysis Buffer eklendikten sonra pipetaj yapılarak pellet çözündürülmüştür.
- ✓ Çözödürölen pellet özerine 2 µL lizozim eklenerek 15 dk 37 °C'de bekletilmiştir.
- ✓ Steril 2 mL'lik eppendorf tüplere 1 mL çözünen ve 37 °C'de bekletilen pellet eklenerek moleküler boncuklar koyulmuştur.
- ✓ Homojenizatörde 50 vuruşluk 30 dk homojenize edilmiştir.
- ✓ Moleküler boncuklar çıkarılarak spin santrifüjde 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüpe alınmıştır.
- ✓ Süpernatant özerine 2 µL RNAase eklenmiştir. 15 dk 37 °C'de inkübe edilmiştir.
- ✓ İnkübasyon sonrasında 1:1 fenol kloroform eklenmiştir.
- ✓ 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra oluşın üç fazın en üstteki fazı alınmıştır. Sırasıyla diğör fazlar RNA ve Protein ile hücre kalıntılarıdır.
- ✓ Üst faz yeni tüpe alındıktan sonra 1:1 olacak şekilde -20°C'de bulunan EtOH eklenmiştir.
- ✓ -20 °C'de yaklaşık 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- ✓ İnkübasyon sonrasında 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır.
- ✓ Tekrar -20 °C'de bulunan EtOH'den 1 mL eklenerek DNA yıkanmıştır.
- ✓ Üç kez 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmıştır.
- ✓ Eppendorf kapağı açık şekilde hava da kuruması sağlanmıştır.
- ✓ Kuruyan pellet özerine 50 µL 1 X TE Buffer eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pellet çözüldükten sonra DNA izolasyonu sonlandırılmıştır.

3.7. Bakterilerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

16S rRNA gen bölgeleri, evrensel primerler, ileri primer olarak; 27F=5' AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG-3' ve geri primer olarak; 1492R=5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Amplikon sayısı ~1466 bp'dir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

PCR işleminde her bir örnek için, 10X PCR Buffer'dan 5 µl; dNTP mixinden 1 µl; ileri ve geri primerlerden 1'er µl; MgCl₂'dan (50 µM) 4 µl; 5 unit/µl Taq DNA polimerazdan 0,5 µl ve ddH₂O'dan 35,5 µl olacak şekilde toplam 48 µl reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon başına 2 µl template DNA eklenerek toplam hacim 50 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilerek, bir reaksiyon döngüsü, 95 °C'de 2 dk, 94 °C'de 1 dk, 53 °C'de 1 dk, 72 °C'de 90 s olarak programlanmıştır. PCR reaksiyonu 35 döngü ve final uzaması 72 °C'de 10 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR ürünleri jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Bu amaçla 1,0 g agaroz tartılarak 100 ml 1X TAE tamponu içerisinde çözündürülerek hazırlanan karışım mikrodalga fırında tamamen homojen hale gelinceye kadar kaynatılmış ve ardından sıcaklık yaklaşık 50 °C'ye gelinceye kadar bekletilerek içerisine konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan etidyum bromürden 3,5 µl eklenmiştir. %1'lik hazırlanan jel karışımı, dengelenerek tarakları takılmış olan jel kasetinin içerisine dökülmüş ve agarozun polimerleşmesi için yaklaşık 30 dk bekletilmiştir. 30 dk sonunda taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve çıkarılan jel, 1X TAE tamponu ile dolu olan elektroferez tankına alınmıştır. İlk kuyuya 1 kb DNA markırı (HyperLadder 1kb, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10037 bp), diğer kuyulara ise örnekler (5 µl) 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir. Jel sistemi güç kaynağına bağlanarak 90 voltta 50 dk yürütülmüş ve DNA bantları, jel görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmiştir (Görmez 2011).

3.9. 16S rRNA Gen Bölgeleri Sekans Analizi

16S rRNA gen bölgelerinin baz dizilimi analizleri hizmet ve arkımı ile gerçekleştirilmiştir. Plazmid örneklerinden 50 µl alınarak, Oligomer (Türkiye) firmasına gönderilmiş ve alınan sekans sonuçları BioEdit programı aracılığı ile analiz edilmiştir. Sekans dizileri ilk olarak Fasta formatına çevrilmiş ve vektöre ait diziler sekanstan çıkarılarak dizi anlamlı hale getirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Son olarak BLAST analizi yapılarak, Gen Bankasındaki dizilerle kıyaslanma yapılmış ve izole edilen bakterilerin tür seviyesinde analizi gerçekleştirilmiştir. Tanılaması yapılan bakteriler Genbank numaraları alınarak NCBI veri tabanına eklenmiştir (Adıgüzel vd. 2015).

3.10. Çözülebilir Şeker Tayini

Çizelge 3.2. Çözülebilir şeker tayini için gerekli olan solüsyonlar, miktar ve hazırlanışı

Gerekli Solüsyonlar	Miktar ve Hazırlanış
2M NaOH	10 mL için; 0,8 gr NaOH, 10 mL dH ₂ O içerisinde çözdürülmüştür.
Sodyum Potasyum Tartarat	30 gr
DNSA	1 gr DNSA ile 20 mL NaOH 45 dk karıştırılmıştır. 30 gr Sodyum Potasyum Tartarat (KNaCl ₄ H ₄ O ₆) ile 50 mL dH ₂ O yaklaşık 5 dk karıştırılmıştır. Her iki çözelti 100 mL dH ₂ O'ya tamamlandıktan sonra alüminyum folyaya sarılarak oda sıcaklığında saklanmıştır.
Glukoz	0.1 gr Glukoz 100 mL dH ₂ O ile karıştırılarak hazırlanmıştır.
2.5 N HCl	35 mL için 7.25 mL HCl ile 27.75 mL dH ₂ O karıştırılarak hazırlanmıştır. Burada suyun üzerine asit konulmasına dikkat edilmiştir. Hazırlanan çözelti +4 °C'de saklanmıştır.

3.10.1. Deney yapılışı

Örnekten 0.1 gr tartılarak sıvı azotta ezilmiştir. +4 °C'de bekletilen 2.5 N HCl çözeltisinden 5 mL eklenerek havan içerisinde karıştırılmıştır. 9000 g'de +4 °C'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatanttan 2 mL alınarak cam tüplere konulmuştur. Üzerine 2 mL DNSA eklenmiştir. DNSA miktarı süpernatant ile aynı olacaktır. 90 °C'de 20 dk su banyosunda bekletilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Buz üzerinde soğutulduktan sonra oluşan sarı renk gözlenmiştir. 96'lık well plate ile 3 tekrarlı olacak şekilde 200 mL eklenerek 550 nm'de ölçüm alınmıştır. Blank olarak 2 mL DNSA+13 mL dH₂O kullanılmıştır.

3.11. Çözünabilir Şeker Tayini İçin Standart Grafik Hazırlanışı

Suda çözünabilir şeker tayini, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde indirgen şeker tayini Krivorotova and Sereikaite 2014 protokolü modifiye yapıldı. Çözünabilir şeker tayini için önce bir standart grafik hazırlanmıştır. Standart grafik oluşturulmasında totalde 11 tüp kullanılıp 1 tüp (blank) blank olarak kullanılmıştır. Bu işlem için 1mg/1 mL glukoz çözeltisi hazırlanmıştır. 1 mg/mL glukoz çözeltisi 1 mL'den başlanarak 10 mL'ye kadar seyreltme işlemi yapılmıştır. Seyreltilme yapılan her tüpe 2 mL DNSA eklenmiştir. Daha sonra 90 oC su banyosunda 20 dk inkübe edilmiştir. Tüpler süre tamamlandıktan sonra buz banyosuna alınarak soğutulmuştur. Blank ve çözeltilerin absorbansı üç tekrar şeklinde spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda okundu. Daha sonra, absorbansların ortalamaları kullanılarak çözünabilir şeker tayini için bir standart grafik hazırlanmıştır.

3.12. Prolin İçeriğinin Belirlenmesi

Çizelge 3.3. Prolin içeriğinin belirlenmesi için gerekli olan solüsyonlar, miktar ve hazırlanışı.

Gerekli Solüsyonlar	Miktar ve Hazırlanış
%3'lük Sülfosalisilik Asit	3 gr Sülfosalisilik asit tartılarak 100 mL dH ₂ O içerisinde çözdürülmüştür.
Asit Ninhidrin	1.25 gr ninhidrin, 30 mL asetik asit içerisinde sıcaklık ile çözdürülmüştür. 20 mL fosforik asit ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4 °C'de saklanmıştır.
Toluen	4 mL

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.12.1. Deney yapılışı

Örnekten 0.5 gr tartılarak sıvı azotta ezilmiştir. %3'lük sülfosalisilik asitten 7.5 mL eklenerek havan içerisinde karıştırılmıştır. 6000 g'de +4 °C'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatanttan 2 mL alınarak cam tüplere konulmuştur. Üzerine 1 mL asetik asit ve 1 mL asit ninhidrin eklenmiştir. 100 °C'de 60 dk su banyosunda bekletilmiştir. Buz üzerinde soğutulmuştur. Soğuduktan sonra 4 mL toluen eklenerek tüpler vortekslenmiştir. Cam küvetler ile ölçüm alınmıştır. Cam küvetler ile ilk olarak 4 mL Toluene ile sıfırlanarak 520 nm'de ölçüm alınmıştır. Örneklerdeki prolin miktarı saf prolinle hazırlanan bir standart grafik üzerinden hesaplanmıştır (Ahmad ve ark. 2012).

3.13. MDA İçeriğinin Belirlenmesi

Çizelge 3.4. MDA içeriğinin belirlenmesi için gerekli olan solüsyonlar, miktar ve hazırlanışı.

Gerekli Solüsyonlar	Miktar ve Hazırlanış
% 0.1'lik TCA	0.1 gr TCA 100 mL dH ₂ O ile çözülürerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4 °C'de saklanmıştır.
% 20 TCA + % 0.5 TBA	0.5 gr TBA ve 20 gr TCA 100 mL dH ₂ O içerisinde çözülürerek hazırlanmıştır.

3.13.1. Deney yapılışı

Örnekten 0.2 gr tartılarak sıvı azotta ezilmiştir. % 0.1'lik TCA çözeltisinden 2 mL eklenerek havan içerisinde karıştırılmıştır. 15000 rpm'de +4 °C'de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatanttan 2 mL alınarak eppendorflara konulmuştur. Cam tüplere 1 mL % 20 TCA + % 0.5 TBA'dan konulmuştur. Üzerine 1 mL enzim eklenmiştir. 98 °C'lik su banyosunda 40 dk bekletilmiştir. Ardından buzlu su içerisinde soğutulmuştur. 96'lık well plate ile üçer tekrar olacak şekilde 200 µL eklenerek sırasıyla 532 nm ve 600 nm'de

3. MATERYAL ve YÖNTEM

ölçümler alınmıştır. Blank olarak 1 mL % 20 TCA + % 0.5 TBA ve 1 mL % 0.1'lik TCA kullanılmıştır. Hesaplama; $\frac{\Delta(A532nm-A600nm)}{1,56 \times 10^5}$ formülüne göre yapılmıştır (Carmak & Horst. 1991).

3.14. H₂O₂ İçeriğinin Belirlenmesi

Çizelge 3.5. H₂O₂ içeriğinin belirlenmesi için gerekli olan solüsyonlar, miktar ve hazırlanışı.

Gerekli Solüsyonlar	Miktar ve Hazırlanış
2 M'lık H ₂ SO ₄	40 mL % 98'lik H ₂ SO ₄ alınarak 160 mL dH ₂ O içerisine eklenerek hazırlanmıştır.
% 100'lük Aseton	2 mL
% 19'luk NH ₄ OH (Amonyum Hidroksit)	4.16 mL NH ₄ OH 20 mL dH ₂ O karışımı ile hazırlanmıştır.
% 5 'lik Ti(SiO ₄) ₂ (Titanyum Sülfat)	20 mL dH ₂ O içerisinde 1 gr Ti(SiO ₄) ₂ çözdürülerek hazırlanmıştır.

3.14.1. Deney yapılışı

Bunun için 0.2 gram örnek sıvı azotta homojenize edildikten sonra +4 C'de bekletilen soğuk %100'lük asetondan 2 mL eklenerek havan içerisinde karıştırılmıştır ve 10.000 g'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. 1.5 mL süpernatant üzerine 150 µL %5'lik Ti(SiO₄)₂ ve 0.3 mL %19'luk NH₄OH eklenmiştir. Çökelek oluşunca 10.000 g'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ eklenerek iyice karıştırılmıştır. Karışım küvet ile 415 nm'de ölçülmüştür. 1.5 mL aseton kullanılarak aynı işlemlerin yapılması ile blank oluşturulmuştur.

3.15. Trizol ile RNA İzolasyonu

- ✓ 0.3 gr doku sıvı azotla ezildikten sonra 500 µL trizol eklenerek 25 °C’de 5 dk bekletilmiştir.
- ✓ 100 µL kloroform eklenerek çalkalanmış ve şurup kıvamına gelince 3 dk 25 °C’de bekletilmiştir.
- ✓ +4 °C’de 12.000 rpm’de 15 dk santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Süpernatantta bulunan RNA yaklaşık 250 µL kadar başka bir tüpe alınır.
- ✓ Başka tüpe alınan RNA üzerine 250 µL izopropanol eklenerek 5-10 kez alt üst yapılmış ve 25 °C’de 10 dk bekletilmiştir.
- ✓ +4 °C’de 12.000 rpm’de 10 dk santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine -20 °C’de bulunan %70’lik EtOH’dan 1 mL eklenerek birkaç kez alt üst yapılmıştır.
- ✓ 7.500 rpm’de 5 dk santrifüj yapılmıştır.
- ✓ Dikkatli şekilde süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet kısmının tüpün kapağı açık bırakılarak havada kuruması sağlanmıştır.
- ✓ Kuruyan pellet kısmı 50 µL RNAaz free dH₂O eklenerek çözündürülmüştür.
- ✓ RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) belirlenmiştir (Ma ve ark. 2015).

3.16. cDNA Sentezi

- NAC (NAC-F (5-TGGCTTTAGATTTTCATCCAACTG-3), NAC-R (5-AATACCATTCATTCTCCCCAAAC-3) ve SOS1 (SOS1-F (5-ATATCCATCTCGCGTTGAGG-3), SOS1-R (5-CCCTTTGCTCTACCAACCAA-3) primerleri protokole göre çözündürülmüştür.
- Primerlere su eklendikten sonra 5000 rpm’de ve +4 C’de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Primerler; 10 µL primer ve 90 µL dH₂O olacak şekilde seyreltilmiştir.
- RNA konsantrasyonları ile $\frac{500}{\text{RNA konsantrasyonu}}$ formülüne göre hesaplama yapılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

- cDNA sentezi Ecotech cDNA kiti (cDNA mix, Primer, RNA ve dH₂O) kullanılarak üretici firmanın protokollerine göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. cDNA sentezi için gerekli olan solüsyonlar ve miktarları

İçeriği	Hacim
cDNA Mix	3 µL
Primer	1 µL
Su ve RNA (500 ng/L	Değişken
Total	20 µL

Kullanılacak su miktarı için hesaplama;

$16 - RNA\ Konsantrasyonu = Su\ Miktarı$ şeklinde yapılmıştır.

- Buz içerisinde etiketlenen tüplere önce cDNA Mix'ten 3 µL eklenmiştir.
- Sonra seyreltilen primerlerden 1 µL eklenmiştir.
- Daha sonra RNA'lar hesaplanan miktarınca eklenmiştir.
- En son hesaplanan su eklenerek PCR'a atılmıştır.
- PCR koşulları ise, 25 °C'de 10 dk, 50 °C'de 30 dk, 85 °C'de 5 dk toplam 47 dk tamamlanmıştır. PCR'dan sonra dimer oluşumu engellenmesi için 60 µL otoklavlanmış distile su ilave edilmiştir.

3.17. RT-PCR

- ❖ NAC transkripsiyon faktörü, SOS geni ve mt18S evrensel primer için RT-PCR uygulanmıştır.
- ❖ Her bir kontrol uygulaması ve bakteri uygulanan NaCl konsantrasyonlarında RT-PCR atılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

- ❖ RT-PCR, Hdrya'nın 2X SYBR GREEN qPCR Mix (ROX) kitinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. 2X sybr green qPCR mix protokolü

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
2X SYBR® Green qPCR Mix (ROX+)	10 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	0.8 µl	0.4 µM
Reverse Primer (10 µM)	0.8 µl	0.4 µM
Kalıp DNA	Değişken	10 pg -1 µg
50X ROX Referans Boyası	0.4 µl	1X
Su (nükleaz bulundurmayan)	20 µl'ye tamamlayacak şekilde	-

- ❖ Tüm bileşenler buz üzerinde eritilmiştir, hafifçe karıştırılmış ve kısa süre santrifüj edilmiştir.
- ❖ 20 µl'lik total reaksiyon hacmi için tavsiye edilen miktarlar kullanılmıştır.
- ❖ Hazırlanan qPCR örneği hafifçe karıştırılmıştır ve kısa süre santrifüj edilmiştir.
- ❖ Örnekler qPCR cihazına yerleştirilmiştir.
- ❖ Kit içerisinde tavsiye edilen termal döngü koşulları kullanılmıştır. İstenilen sonuçların çıkmaması durumunda primerlere özgü sıcaklıklar da denenmiştir.
- ❖ Her deney üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır ve ekspresyon seviyesindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak değerlendirilmiştir (Chen ve ark. 2005).

Çizelge 3.8. Tavsiye edilen termal döngü koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyon	95 °C	1 dk
40 Döngü	95 °C	15 saniye
	55-65 °C	15 saniye
	72 °C	45 saniye
Erime Eğrisi Analizi	60-95 °C	

3.18. Kaktüslerden Endofitik Bakteri İzolasyonu

Kaktüs bitkisinin kökleri ile yaprak/kladot yapıları kullanılarak endofitik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, steril fizyolojik su içerisinde laboratuvara taşınan kaktüs örnekleri, öncelikle steril saf su ile iyice yıkanmış ve ardından sırasıyla % 70'lik alkol içerisinde 5 dakika ve % 2'lik NaOCl içerisinde 5 dakika süreyle hafif çalkalanarak yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır (Eke ve ark. 2019).

3.19. Bakterinin PGPB Özellikleri Açısından Değerlendirilmesi

Bu aşamada çalışılacak endofitik bakterinin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlanması ve karakterizasyonları yapılmıştır (EK-2).

3.19.1. Gram reaksiyon testi

Öncelikle çalışacağımız bakterinin Gram (+) veya Gram (-) olup olmadıkları karakterizasyonları açısından önemlidir. Bakteri izolatlarının hücre duvarlarındaki farklılığına göre Gram (+) veya Gram (-) olup olmadıkları Chen vd. (2008) tarafından önerilen metoda göre belirlenmiştir. Bakteri kültüründen alınan örnek, temiz bir lam üzerine yayılır ve hava ile kurutulmuştur. Kuruyan preparat, alevde kısa süreli ısıtılarak fikse edilmiştir. Preparatın üzerine kristal violet çözeltisi damlatılmış ve 1 dk bekletilmiştir. Ardından, preparat su ile hafifçe yıkanmıştır. Preparatın üzerine Lugol iyot çözeltisi damlatılmış ve 1 dk bekletilmiştir. Sonrasında, preparat su ile yıkanmıştır. Preparatın üzerine alkol veya asetondan oluşan dekolorizan damlatılır ve 10-30 saniye bekletilmiştir. Hemen ardından, preparat su ile yıkanmıştır. Preparatın üzerine safranin çözeltisi damlatılır ve 30 saniye bekletilmiştir.. Son olarak, preparat su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Bu yöntemle, Gram-pozitif bakteriler mor renkte, Gram-negatif bakteriler ise pembe renkte gözlemlenmektedir. İnceleme sonucunda bakteriler mor renkte gözlenmiştir.

3.19.2. Bakterinin siderofor üretme potansiyellerinin belirlenmesi

Bakteriyel siderofor üretiminin belirlenmesi amacıyla, Schwyn ve Neilands (1987) tarafından geliştirilen Chrome Azurol S (CAS) agar yöntemi temel alınarak, Jimtha ve ark. (2014) tarafından önerilen modifiye yöntem uygulanmıştır. Bu kapsamda, CAS reaktifi hazırlanmak üzere öncelikle 121 mg CAS, 100 mL saf suda çözülmuş; 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi 10 mM HCl içerisinde hazırlanarak demir kaynağı sağlanmıştır. Ayrıca 729 mg hegzadesil trimetil amonyum bromür (HDTMA), 400 mL saf suda çözülerek yüzey aktif madde çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen bu üç çözelti belirli oranlarda karıştırılarak CAS reaktifi oluşturulmuş ve steril temel agar ortamı ile karıştırılarak CAS agar besiyeri hazırlanmıştır. Test edilecek bakteri izolatları, steril koşullarda hazırlanmış CAS agar plaklarına nokta inokülasyonu yöntemiyle ekilmiş ve plaklar 28–30 °C sıcaklıkta uygun süre boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda, bakteri kolonileri etrafında oluşan turuncu-sarı renkli halolar siderofor üretimini göstermiştir.

3.19.3. Bakterinin azot fiksasyonu kapasitelerinin belirlenmesi

Bakteriyel izolatların atmosferik azotu fiksasyon yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla, Han ve ark. (2005) tarafından önerilen metoda uygun olarak azotsuz (N-free) besiyeri kullanılmıştır. Bu yöntem, izolatların azot kaynağı içermeyen ortamlarda büyüme yeteneklerini test ederek biyolojik azot fiksasyon potansiyelini belirlemeye yöneliktir. Deneysel uygulama kapsamında, her bir bakteri izolatu, steril koşullarda hazırlanmış azotsuz besiyerine nokta inokülasyonu yöntemiyle ekilmiştir. İnokülasyon sonrası plaklar, 28–30 °C sıcaklıkta ve mikroaerobik koşullarda (yaklaşık %2 O_2) inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi boyunca, izolatların büyüme yetenekleri gözlemlenmiş ve azot fiksasyon yetenekleri niteliksel olarak değerlendirilmiştir.

3.19.4. Bakterinin ACC deaminaz aktivite testi

Bakteriyel izolatların 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) deaminaz aktivitesini belirlemek amacıyla, Penrose ve Glick (2003) tarafından önerilen yöntem

3. MATERYAL ve YÖNTEM

temel alınarak, Jasim ve ark. (2013) tarafından modifiye edilen yöntem uygulanmıştır. Bu kapsamda, Dworkin ve Foster (DF) tuzları minimal besiyeri hazırlanmış ve %0,2 oranında amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile zenginleştirilmiştir. Her bir bakteri izolatı, steril koşullarda hazırlanmış bu besiyerine nokta inokülasyonu yöntemiyle ekilmiş ve plaklar 28–30 °C sıcaklıkta 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, bakteri kolonilerinin büyümesi, izolatların ACC deaminaz üretme yeteneğini göstermiştir. Bu yöntem, bakterilerin ACC'yi azot kaynağı olarak kullanma kapasitelerini değerlendirmeye olanak sağlamıştır.

3.19.5. Bakterinin IAA hormonu üretme potansiyeli

Bakteriyel izolatların indol-3-asetik asit (IAA) üretim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla, Karakaş ve ark. (2022) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. Bu kapsamda, her bir izolat, 50 mL Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve ortama %0,1 oranında L-triptofan eklenmiştir. Kültürler, 28–30 °C sıcaklıkta 150 rpm hızında 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, kültürler 10.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlenerak süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatanta, eşit hacimde Salkowski reaktifi (1 mL 0,5 M FeCl_3 çözeltisi ve 50 mL %35'lik HClO_4 karışımı) eklenmiş ve karışım karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan pembe-kırmızı renk değişimi, IAA üretimini göstermiştir. Renk yoğunluğu, 530 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.19.6. Bakteri izolatların katalaz ve oksidaz aktivitesi testleri

Bakteriyel izolatların katalaz ve oksidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, Klement ve ark. (1990) ile Harley ve Prescott (2002) tarafından önerilen yöntemler uygulanmıştır.

Katalaz testi için, Nutrient Agar (NA) besiyerinde 24–48 saat süreyle inkübe edilen bakteri kolonilerinden bir miktar örnek alınarak temiz bir lam üzerine yerleştirilmiştir. Üzerine % 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinden birkaç damla

3. MATERYAL ve YÖNTEM

damlatılmıştır. Oluşan oksijen kabarcıkları, katalaz enziminin varlığını göstermiştir. Bu test, özellikle stafilokok ve streptokok türlerinin ayrımında önemli bir biyokimyasal parametre olarak kullanılmaktadır. Oksidaz testi için ise, % 1'lik tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür çözeltisi taze olarak hazırlanmış ve steril filtre kağıdı üzerine birkaç damla damlatılmıştır. Bakteri kolonileri steril bir öze yardımıyla bu reaktifin üzerine sürülmüştür. 30 saniye içerisinde mor-mavi renk oluşumu, sitokrom c tipi oksidaz enziminin varlığını ve dolayısıyla oksidaz pozitifliği göstermiştir. Renk değişiminin gözlenmemesi ise oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Her iki test de, izolatların temel biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde ve tür düzeyinde tanımlanmasında önemli rol oynamaktadır.

3.19.7. Bakteri izolatların moleküler tanımlanması

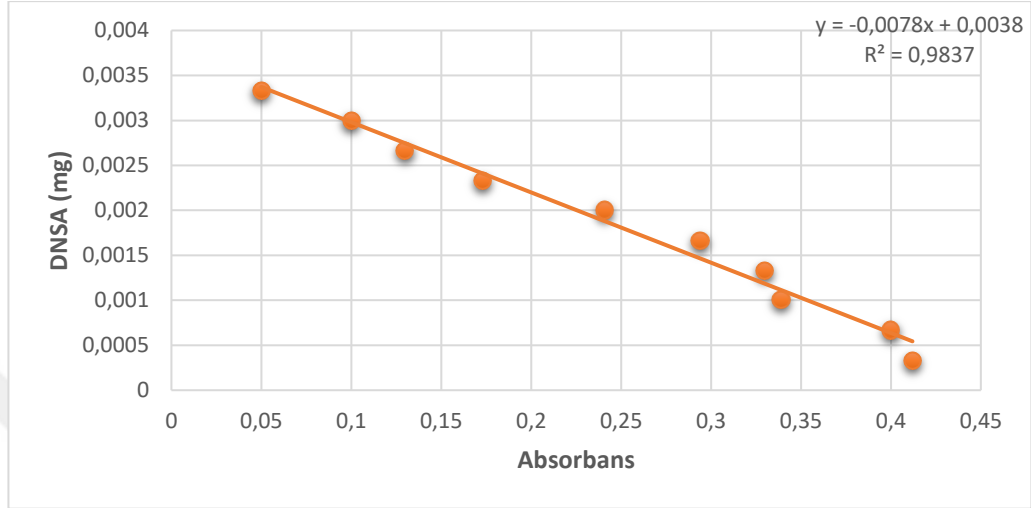
Simsek (2019) tarafından önerilen metoda göre belirlenmiştir. 16S rRNA gen bölgesine ait sekans analizleri BioEdit proramı kullanılarak değerlendirilmiştir. Gen Bankasındaki dizi analizleriyle karşılaştırılarak filogenetik ağaç çıkarılmıştır. Bakteriler tür seviyesinde belirlenerek GenBank numaraları alınmıştır (EK-1).

3.20. İstatiksel Analiz

Deneme planı, üç tekerrürlü olarak ve her bir uygulama için iki örnek alınacak şekilde tasarlanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, SPSS 22.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, çift yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA) ile değerlendirilmiş; anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde ise Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Çözülebilir Şeker İçin Standart Grafik



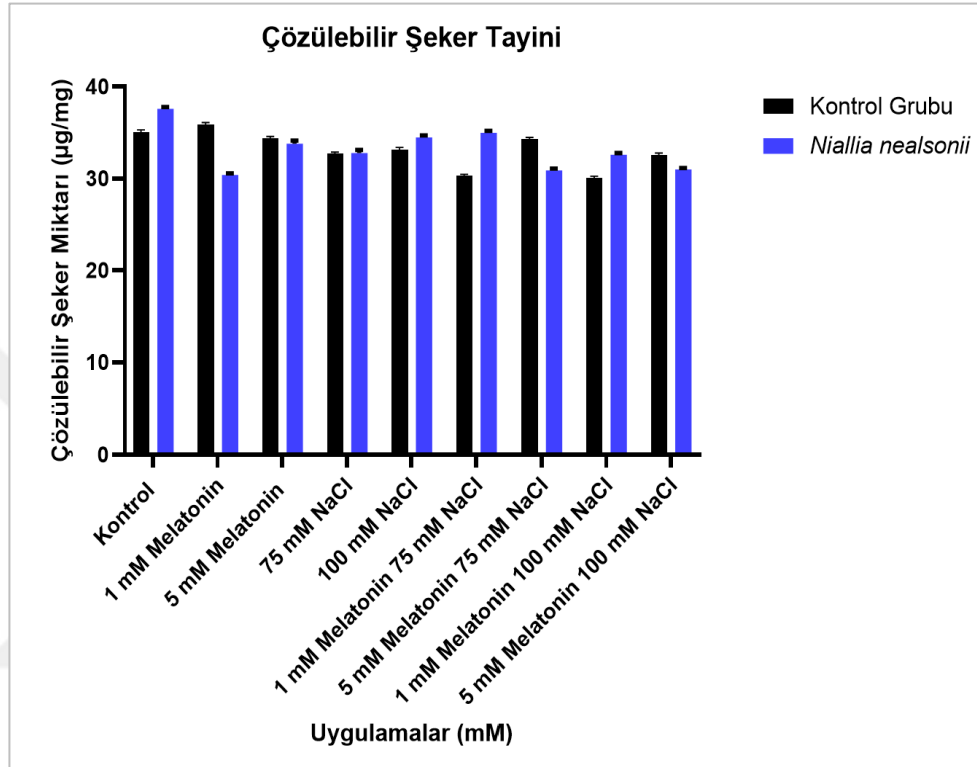
Şekil 4.1. Çözülebilir şeker için standart grafik

4.1.1. Çözülebilir şeker miktarları

Bu çalışmada, *Lotus corniculatus* bitkilerinde suda çözünür şeker miktarını ($\mu\text{g}/\text{mg}$) etkileyebilecek faktörler incelenmiştir (Şekil 4.2). DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen enzim deneyi kapsamında, bitkilere farklı melatonin konsantrasyonları (1 ve 5 mM), farklı tuz konsantrasyonları (75 ve 100 mM) ve bu uygulamaların kombinasyonları ile birlikte *N. nealsonii* bakterisi uygulanmıştır. Çalışmanın amacı, tuz stresi koşullarında melatonin ve bakterinin birlikte ya da ayrı ayrı şeker metabolizması üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Kontrol grubunda, standart MS ortamında $35,1 \mu\text{g}/\text{mg}$ düzeyinde çözünür şeker içeriği saptanmıştır. *N. nealsonii* uygulanan grupta ise, standart MS ortamında $37,6 \mu\text{g}/\text{mg}$ ile en yüksek çözünür şeker içeriği elde edilmiştir. Bu durum, bakterinin tek başına şeker metabolizmasını olumlu yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir (Nguyen ve ark., 2020). Melatonin uygulamalarında, standart MS ortamına benzer çözünür şeker düzeyleri gözlenmiştir. Bu durum, melatoninin tek başına şeker içeriğinde belirgin bir artış sağlamadığı, ancak şeker düzeyini stabilize ettiği şeklinde değerlendirilebilir.

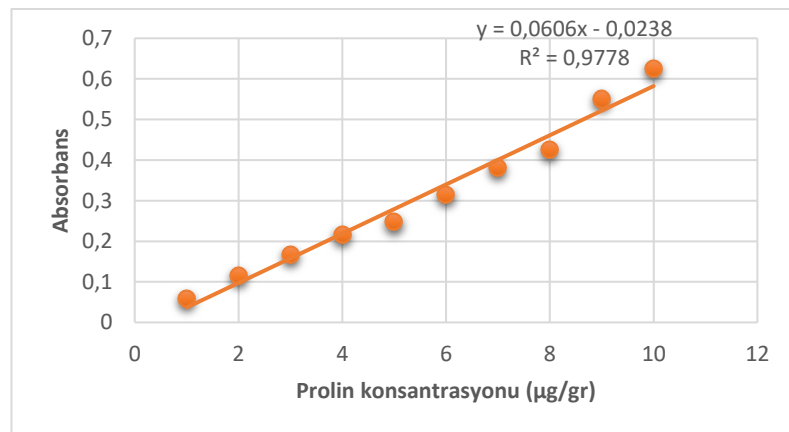
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

75 ve 100 mM NaCl uygulamaları ise tek başına uygulandıklarında (sırasıyla 32,7 ve 33,2 µg/mg), kontrol grubuna kıyasla şeker içeriğini bir miktar düşürmüştür. Bu da tuz stresinin şeker metabolizmasını olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir (Munns & Tester, 2008).



Şekil 4.2. Çözülebilir şeker miktarları grafiği

4.2. Prolin Standart Grafiği

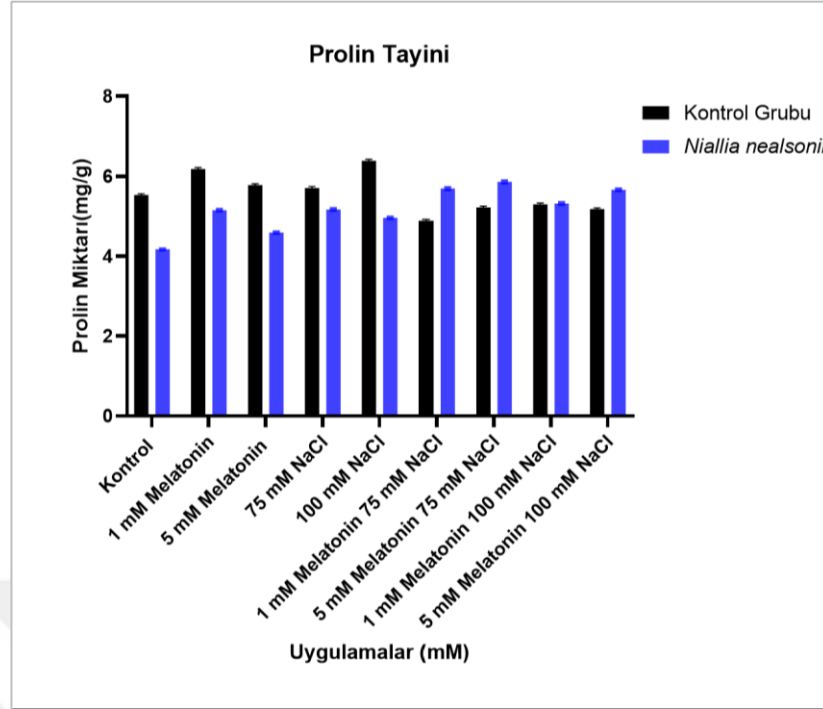


Şekil 4.3. Prolin standart grafiği

4.2.1. Prolin miktarına ait bulgular

Bu çalışmada, *Lotus corniculatus* bitkilerinde prolin (mg/g) içeriği belirlenmiş ve farklı uygulamaların tuz stresi altında bitkinin osmotik yanıtı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.4.). Çalışmada 1 ve 5 mM melatonin, 75 ve 100 mM NaCl ve bunların *N. nealsonii* bakterisi ile kombinasyonları kullanılmıştır (Şekil 4.4.). Kontrol grubu standart MS ortamında prolin miktarı 5,5 mg/g olarak belirlenmiştir. Bu değer, uygulamalarla karşılaştırıldığında orta seviyede bir prolin birikimini temsil etmektedir. Ayrıca 75 mM NaCl uygulamasıyla prolin miktarı 5,7 mg/g'ye çıkmış, 100 mM NaCl uygulamasıyla ise 6,4 mg/g'ye yükselmiştir. Bu sonuç, artan tuz konsantrasyonunun bitkide prolin birikimini anlamlı şekilde artırdığını göstermektedir (Parida & Das, 2005; Munns & Tester, 2008). Prolinin, osmotik dengeyi sağlamak ve hücre zararı riskini azaltmak için bir stres yanıtı olarak üretildiği bilinmektedir (Szabados & Saviouré, 2010; Ashraf & Foolad, 2007).

1 mM melatonin uygulaması 6,2 mg/g ile yüksek bir prolin seviyesine ulaşmıştır. 5 mM melatonin uygulaması ise 5,8 mg/g prolin birikimi göstermiştir. Melatonin uygulamalarının prolin düzeyini artırarak stres savunma mekanizmalarını aktive ettiği söylenebilir (Li ve ark., 2017; Arnao & Hernández-Ruiz, 2015). *N. nealsonii* bakterisi tek başına uygulandığında prolin seviyesi 4,2 mg/g ile en düşük değeri göstermiştir. Bu sonuç, bakterinin bitki üzerindeki stres seviyesini azalttığını ve bitkinin prolin biriktirme ihtiyacını düşürdüğünü göstermektedir (Vurukonda ve ark., 2016). Kombinasyon uygulamalarında prolin seviyeleri genellikle kontrol grubuna yakın veya biraz üzerinde kalmıştır. Bu durum, hem bakterinin hem de melatoninin birlikte çalışarak bitkiyi yüksek stres seviyelerine karşı koruduğunu ve aşırı prolin birikimini engellediğini göstermektedir.



Şekil 4.4. Uygulamaların prolin içeriği üzerine etkileri

DNSA ve prolin deneyleri sonucunda melatoninin bitkilerde tuz stresi gibi abiyotik stres faktörlerine karşı koruyucu bir rol üstlendiğini görülmüştür. Melatonin, antioksidan savunmayı artırarak, ozmotik dengeyi koruyarak ve stres kaynaklı hücre hasarı azaltarak bitkilerin hayatta kalma oranını artırmaktadır (Zhang ve ark., 2015). Benzer şekilde, prolin birikimi stres yanıtının önemli bir göstergesi olup, melatonin uygulamalarıyla prolin akümüülasyonunda artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2017). Öte yandan, bitki büyümesini destekleyen faydalı bakteri kullanımı, bitkilerde tuz stresine toleransı artırarak, iyon dengesini sağlamada ve su alımını optimize etmede etkili olmuştur (Yang ve ark., 2009). Özellikle *N. nealsonii* gibi bakterilerin, bitkilerin strese karşı adaptasyonunda rol oynayan mekanizmaları aktive ederek hem prolin üretimini düzenlediği hem de genel stres tepkisini azalttığı bilinmektedir (Vurukonda ve ark., 2016). Bu çalışmadaki bulgular, literatürde yer alan bu sonuçlarla paralellik göstermekte olup, melatonin ve bakteriyel uygulamaların birlikte kullanımının *Lotus corniculatus* gibi tarım bitkilerinde tuz stresine karşı koruyucu bir strateji olabileceğini desteklemektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Farklı tuz konsantrasyonlarında melatonin ve *N. nealsonii* bakteri uygulamalarının *Lotus corniculatus* bitkisinin DNSA ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ve Prolin (mg/g) değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.

UYGULAMALAR (mM)	DNSA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	PROLİN (mg/g)
Kontrol	35,11 $\pm$ 0,214 ^c	5,53 $\pm$ 0,031 ^f
1 mM Melatonin	35,89 $\pm$ 0,207 ^b	6,18 $\pm$ 0,035 ^b
5 mM Melatonin	34,36 $\pm$ 0,198 ^{ef}	5,78 $\pm$ 0,033 ^{cd}
75 mM NaCl	32,65 $\pm$ 0,188 ^{gh}	5,71 $\pm$ 0,032 ^{de}
100 mM NaCl	33,21 $\pm$ 0,191 ^g	6,39 $\pm$ 0,036 ^a
1 mM Melatonin 75 mM NaCl	30,33 $\pm$ 0,175 ^k	4,89 $\pm$ 0,028 ^j
5 mM Melatonin 75mM NaCl	34,27 $\pm$ 0,197 ^{ef}	5,22 $\pm$ 0,030 ^{hi}
1 mM Melatonin 100 mM NaCl	30,05 $\pm$ 0,173 ^k	5,30 $\pm$ 0,030 ^{gh}
5 mM Melatonin 100 mM NaCl	32,59 $\pm$ 0,188 ^h	5,18 $\pm$ 0,029 ⁱ
<i>N. nealsonii</i> Kontrol	37,64 $\pm$ 0,217 ^a	4,20 $\pm$ 0,024 ^l
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin	30,39 $\pm$ 0,175 ^{jk}	5,15 $\pm$ 0,029 ⁱ
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin	33,80 $\pm$ 0,338 ^f	4,59 $\pm$ 0,026 ^k
<i>N. nealsonii</i> 75 mM NaCl	32,80 $\pm$ 0,328 ^{gh}	5,17 $\pm$ 0,029 ⁱ
<i>N. nealsonii</i> 100 mM NaCl	34,46 $\pm$ 0,198 ^{de}	4,96 $\pm$ 0,028 ^j
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin 75 mM NaCl	34,97 $\pm$ 0,201 ^{cd}	5,69 $\pm$ 0,032 ^{de}
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin 75 mM NaCl	30,93 $\pm$ 0,178 ^{ji}	5,86 $\pm$ 0,033 ^c
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin 100 mM NaCl	32,59 $\pm$ 0,188 ^h	5,32 $\pm$ 0,030 ^g
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin 100 mM NaCl	30,97 $\pm$ 0,178 ⁱ	5,66 $\pm$ 0,032 ^e
Maksimum	38,0	6,46
Minimum	29,8	4,13
Ortalama	33,2	5,37
Değişim	8,3	2,33

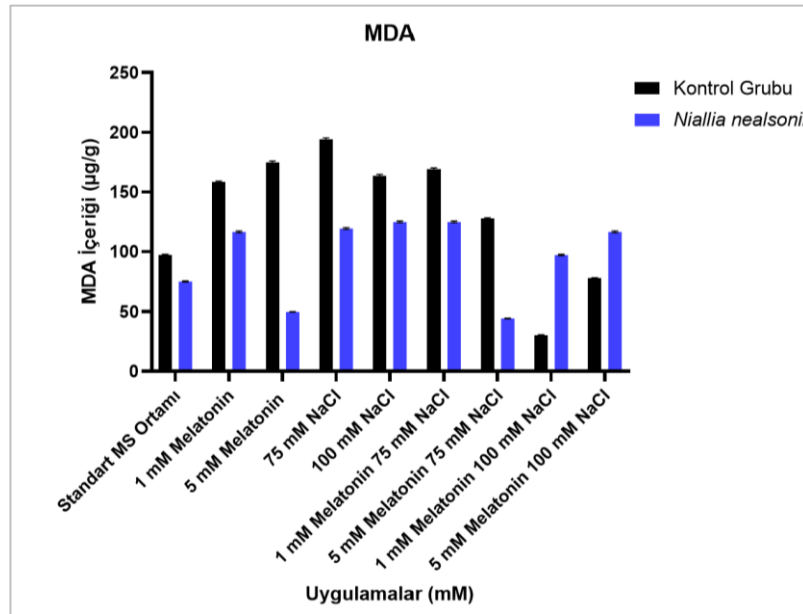
4.3. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA olarak)

Lipid peroksidasyon seviyesi, hücre zarlarında meydana gelen yapısal bozulmaların bir göstergesi olup, bitkilerde oksidatif stresin şiddetini yansıtan önemli bir biyokimyasal parametredir (Del Rio ve ark., 2005; Gill & Tuteja, 2010). Bu çalışmada, *Lotus corniculatus* bitkileri üzerinde farklı melatonin konsantrasyonları, tuz stres düzeyleri ve *N. nealsonii* bakteriyel uygulamalarıyla gerçekleştirilen lipid peroksidasyon seviyesi ölçümleri, uygulamaların oksidatif stres üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur (Şekil 4.5).

Elde edilen sonuçlara göre; 75 ve 100 mM NaCl uygulamaları, lipid peroksidasyon seviyelerini önemli ölçüde artırarak tuz stresinin hücresel zar yapısında

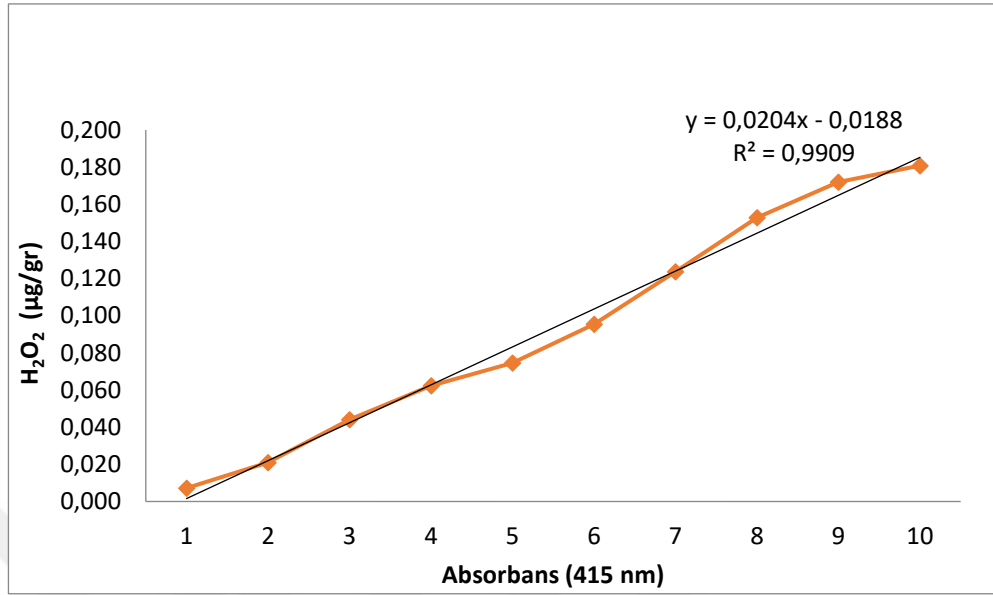
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

ciddi lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Özellikle yalnızca 75 mM NaCl uygulamasında lipid peroksidasyon değeri 194,3 µg/g, 100 mM NaCl uygulamasında ise 163,8 µg/g gibi oldukça yüksek seviyelere ulaşmıştır. Bu durum, tuz stresinin membran bütünlüğünü bozduğunu ve hücrede oksidatif hasarı artırdığını desteklemektedir (Mittler, 2002; Parida & Das, 2005). Öte yandan, melatonin uygulamaları, özellikle bakteriyel destekle birlikte gerçekleştirildiğinde, lipid peroksidasyon seviyelerinde belirgin bir düşüş sağlamıştır. Yalnızca 1 mM melatonin uygulamasında lipid peroksidasyon seviyesi 44,4 µg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, melatoninin güçlü bir antioksidan olarak serbest radikalleri temizlediğini ve lipid peroksidasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır (Tan ve ark., 2012). *N. nealsonii* bakterisinin tek başına uygulanması da lipid peroksidasyon seviyesinin düşük kalmasına katkı sağlamıştır. Bakteri ve melatonin kombinasyonlarının lipid peroksidasyon seviyelerini önemli ölçüde azaltması, her iki ajan arasındaki sinerjistik etkileşimi desteklemektedir. Bu kombinasyonlar, tuz stresi altında dahi zar yapısının korunmasına yardımcı olmuş ve oksidatif hasarı minimize etmiştir. Bu bulgular, melatoninin ve faydalı bakterilerin *Lotus corniculatus* gibi bitkilerde stres toleransını artırmada etkili bir strateji olabileceğini göstermekte ve literatürde melatoninin stres karşıtı rolünü destekleyen çalışmalarla (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015) uyumluluk sergilemektedir.



Şekil 4.5. Uygulamaların MDA içeriği üzerine etkileri

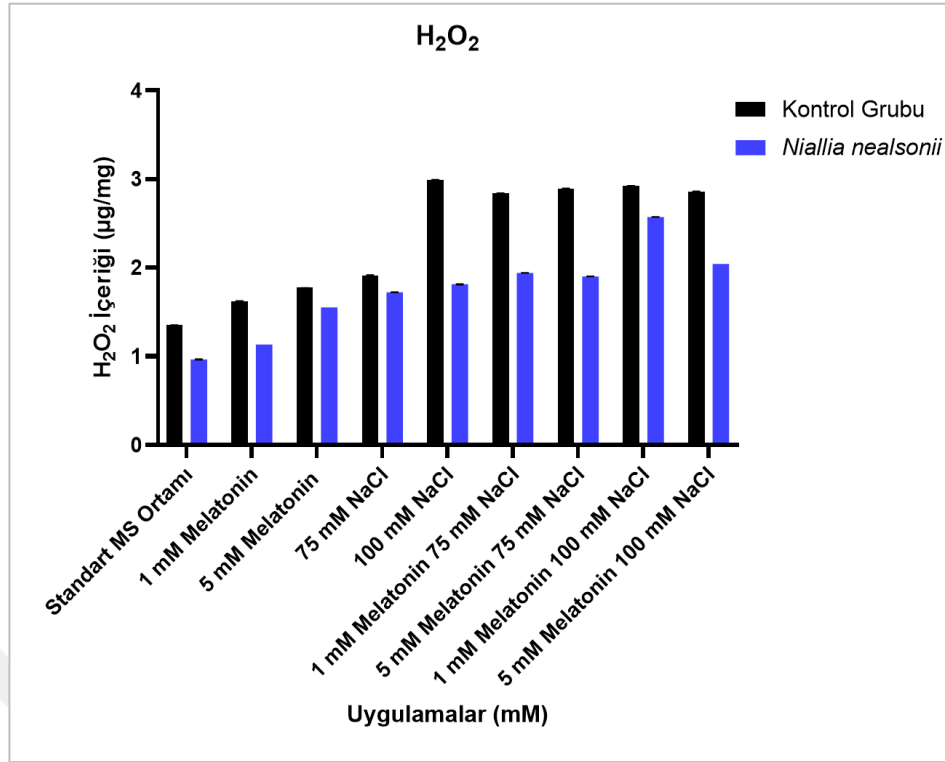
4.4. H₂O₂ Standart Grafiği



Şekil 4.6. H₂O₂ standart grafiği

4.4.1. Uygulamaların H₂O₂ içeriği üzerine etkileri

Çalışma da *Lotus corniculatus* bitkilerinde gerçekleştirilen H₂O₂ analizleri, tuz stresinin oksidatif hasarı artırdığını açıkça göstermiştir (Şekil 4.7.). Özellikle 100 mM NaCl uygulaması altında H₂O₂ birikimi en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu bulgu, tuz stresinin reaktif oksijen türleri üretimini tetiklediğini ve hücresel düzeyde oksidatif stres oluşturduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, melatonin ve *N. nealsonii* bakterisinin tekli veya kombine uygulamaları, H₂O₂ seviyelerinde anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Bu durum, melatoninin güçlü bir antioksidan olarak rol aldığını ve bakteriyel uygulamanın da bitki savunma mekanizmalarını aktive ederek reaktif oksijen türleri üretimini sınırlandırdığını göstermektedir. Ayrıca, sadece melatonin uygulamalarında H₂O₂ birikiminde azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalma, bakteriyel destekle yapılan kombinasyonlara göre daha sınırlıdır. Bu da, melatonin ve bakterinin sinerjik etkisinin *Lotus corniculatus*'un tuz stresine karşı daha etkili bir savunma yanıtı geliştirmesini sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.7. Uygulamaların H₂O₂ içeriği üzerine etkileri

Bu çalışmada *Lotus corniculatus* bitkilerine uygulanan tuz stresi, bitkilerdeki oksidatif stres belirteçleri olan lipid peroksidasyon seviyesi ve hidrojen peroksit birikimini önemli ölçüde artırmıştır. Elde edilen bulgular, daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir. Örneğin, Gill ve Tuteja (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonlarının bitkilerde reaktif oksijen türlerinin birikimini artırarak lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Melatonin ve *N. nealsonii* bakterisinin tekli ve kombine uygulamalarının etkileri incelendiğinde, her iki uygulamanın da lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit seviyelerinde azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. Bu durum, melatoninin güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olması ve bakteriyel uygulamanın bitki savunma sistemlerini aktive etmesi sayesinde oksidatif stresin hafifletildiğini göstermektedir. Arnao ve Hernández-Ruiz (2015), melatoninin bitkilerde antioksidan enzim aktivitelerini artırarak reaktif oksijen türlerinin seviyelerini düşürdüğünü ve böylece hücrel zararları koruduğunu belirtmiştir. Ayrıca, bu çalışmada elde edilen bulgular, bakteriyel uygulamaların bitkilerde oksidatif stres azaltmada önemli bir role sahip olduğunu da desteklemektedir. Vurukonda ve ark. (2016), bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin bitkilerde antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirerek çevresel stres faktörlerine

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

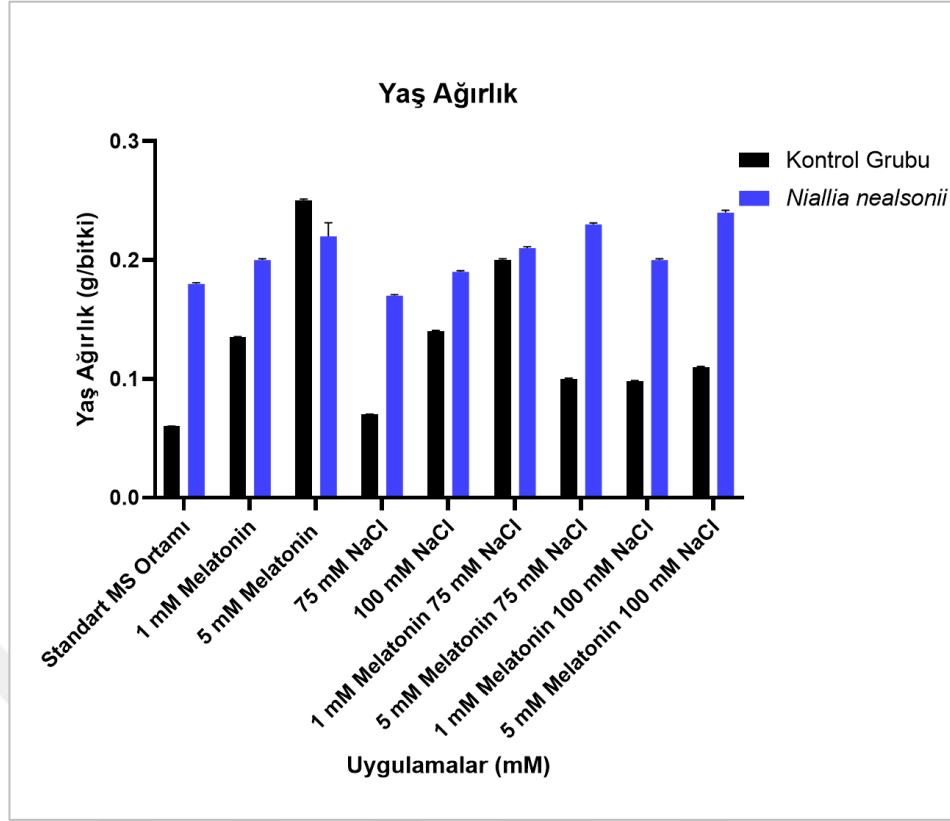
karşı toleransı artırdığını ifade etmişlerdir. Bu bağlamda, melatonin ve *N. nealsonii* bakterisinin sinerjik etkisinin, *Lotus corniculatus* bitkilerinin tuz stresine karşı direnç mekanizmalarını güçlendirdiği söylenebilir.

Çizelge 4.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında melatonin ve *N. nealsonii* bakteri uygulamalarının *Lotus corniculatus* bitkisinin Lipid Peroksidasyonu ($\mu\text{g/g}$) ve H_2O_2 ($\mu\text{g/mg}$) değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.

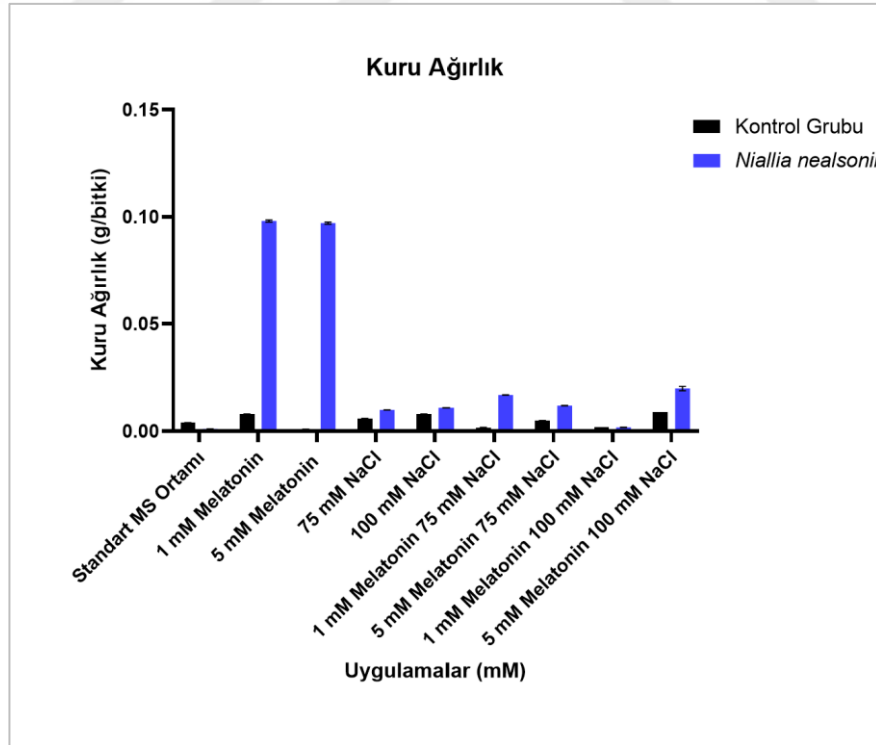
UYGULAMALAR (mM)	Lipid Peroksidasyonu ($\mu\text{g/g}$)	H_2O_2 ($\mu\text{g/mg}$)
Kontrol	97,15 $\pm$ 0,560 ^j	1,35 $\pm$ 0,001 ^p
1 mM Melatonin	158,22 $\pm$ 0,913 ^e	1,62 $\pm$ 0,002 ⁿ
5 mM Melatonin	174,88 $\pm$ 1,009 ^b	1,77 $\pm$ 0,001 ^l
75 mM NaCl	194,31 $\pm$ 1,121 ^a	1,91 $\pm$ 0,004 ⁱ
100 mM NaCl	163,77 $\pm$ 0,945 ^d	2,99 $\pm$ 0,003 ^a
1 mM Melatonin 75 mM NaCl	169,33 $\pm$ 0,977 ^c	2,84 $\pm$ 0,002 ^e
5 mM Melatonin 75mM NaCl	127,69 $\pm$ 0,737 ^f	2,89 $\pm$ 0,004 ^c
1 mM Melatonin 100 mM NaCl	30,53 $\pm$ 0,176 ^o	2,92 $\pm$ 0,003 ^b
5 mM Melatonin 100 mM NaCl	77,72 $\pm$ 0,448 ^k	2,86 $\pm$ 0,001 ^d
<i>N. nealsonii</i> Kontrol	74,95 $\pm$ 0,432 ^l	0,97 $\pm$ 0,004 ^s
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin	116,58 $\pm$ 0,673 ⁱ	1,13 $\pm$ 0,001 ^r
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin	49,96 $\pm$ 0,288 ^m	1,55 $\pm$ 0,001 ^o
<i>N. nealsonii</i> 75 mM NaCl	119,36 $\pm$ 0,689 ^h	1,72 $\pm$ 0,002 ^m
<i>N. nealsonii</i> 100 mM NaCl	124,91 $\pm$ 0,721 ^g	1,81 $\pm$ 0,005 ^k
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin 75 mM NaCl	124,91 $\pm$ 0,721 ^g	1,94 $\pm$ 0,001 ^h
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin 75 mM NaCl	44,41 $\pm$ 0,256 ⁿ	1,90 $\pm$ 0,002 ^j
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin 100 mM NaCl	97,15 $\pm$ 0,560 ^j	2,57 $\pm$ 0,001 ^f
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin 100 mM NaCl	116,58 $\pm$ 0,673 ⁱ	2,04 $\pm$ 0,001 ^g
Maksimum	196,3	3
Minimum	30,2	0,96
Ortalama	114,5	2,04
Değişim	166,0	2,03

4.5. Yaş ve Kuru Ağırlık

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre, yüksek NaCl konsantrasyonlarının (75 ve 100 mM), bitkilerde yaş ve kuru ağırlık değerlerinde belirgin düşümlere neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Özellikle yalnızca 75 mM NaCl uygulamasında yaş ağırlığın 0,07 g/bitki, kuru ağırlığın ise 0,004 g/bitki gibi oldukça düşük değerlere gerilediği gözlenmiştir. Bu sonuç, tuz stresinin bitkilerde su kaybı, hücresel metabolizma yavaşlaması ve genel büyüme geriliği oluşturduğunu destekler niteliktedir (Munns & Tester, 2008). Melatonin uygulamalarının, özellikle yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında, yaş ve kuru ağırlık üzerinde pozitif etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. 5 mM melatonin uygulaması yaş ağırlığını 0,25 g/bitki'ye yükseltmiş; kuru ağırlıkta ise 5 mM melatonin ve *N. nealsonii* kombinasyonu ile anlamlı bir artış sağlanmıştır. Bu bulgular, melatoninin bitkilerde ozmotik dengeyi koruyarak su kaybını minimize ettiği, fotosentetik etkinliği artırdığı ve stres koşullarında biyokütle üretimini desteklediğini göstermektedir (Liang ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2017). Ayrıca, *N. nealsonii* bakterisinin biyolojik katkısının; bitkilerde su alımının artırılması, iyon dengesinin korunması ve stresle indüklenen büyüme gerilemesinin önlenmesi yönünde etkili olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda, melatonin ve bakteri kombinasyonlarının yaş ve kuru ağırlık parametreleri üzerinde anlamlı farklılıklar yarattığı saptanmıştır ($p < 0,05$). Bu sonuçlar, hem melatonin hem de yararlı bakteri uygulamalarının, *Lotus corniculatus* gibi tarımsal öneme sahip türlerde tuz stresine karşı koruyucu stratejiler geliştirilmesinde etkili olabileceğini göstermektedir. Elde edilen yaş ve kuru ağırlık bulguları, daha önce yapılmış bazı çalışmaları destekler niteliktedir. Arnao ve Hernández-Ruiz (2015), melatoninin bitkilerde oksidatif stresi azaltarak büyümeyi teşvik ettiğini; Liang ve ark. (2015) ise melatonin uygulamasının, tuz stresine maruz kalan bitkilerde yaş ve kuru biyokütlede artış sağladığını rapor etmiştir. Ayrıca, Zhang ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada melatoninin, iyon homeostazını koruyarak Na^+ ve Cl^- birikimini azalttığı ve böylece bitki büyümesini desteklediği bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan *N. nealsonii* bakterisinin de tuz stresini koşullarında bitki performansını artırıcı etkiler gösterdiği gözlemlenmiş ve bu durum, literatürde bitki büyümesini teşvik eden bakteri uygulamalarının tuz stresini toleransını artırdığına yönelik çalışmalarla (Yang ve ark., 2009; Egamberdieva ve ark., 2017) paralellik göstermektedir.



Şekil 4.8. Uygulamaların bitki yaş ağırlığına etkileri



Şekil 4.9. Uygulamaların bitki kuru ağırlığına etkileri

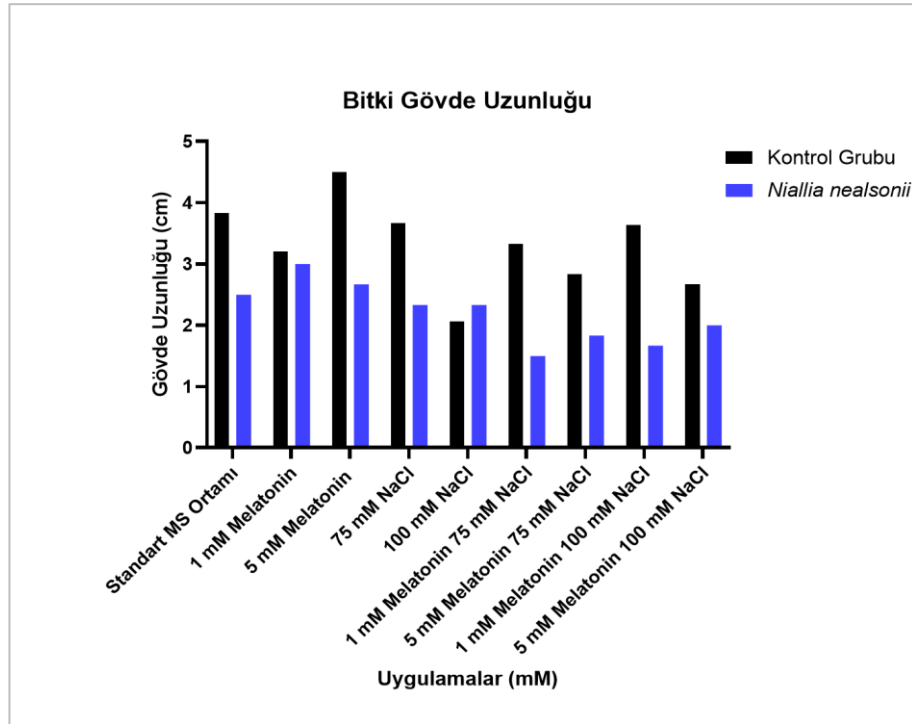
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.3. Farklı tuz konsantrasyonlarında melatonin ve *N. nealsonii* bakteri uygulamalarının *Lotus corniculatus* bitkisinin Yaş Ağırlık (g/bitki) ve Kuru Ağırlık (g/bitki) değerlerine ait ortalamaların Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.

UYGULAMALAR (mM)	YAŞ AĞIRLIK (g/bitki)	KURU AĞIRLIK (g/bitki)
Kontrol	0,06 ± 0,0003 ^k	0,004 ± 0,00002 ^m
1 mM Melatonin	0,135 ± 0,0007 ^l	0,008 ± 0,00004 ^j
5 mM Melatonin	0,250 ± 0,0014 ^a	0,010 ± 0,00003 ^h
75 mM NaCl	0,070 ± 0,0004 ^k	0,006 ± 0,00006 ^k
100 mM NaCl	0,140 ± 0,0008 ^l	0,008 ± 0,00005 ^j
1 mM Melatonin 75 mM NaCl	0,200 ± 0,0012 ^{ef}	0,017 ± 0,00009 ^e
5 mM Melatonin 75mM NaCl	0,100 ± 0,0006 ^j	0,005 ± 0,00003 ^l
1 mM Melatonin 100 mM NaCl	0,098 ± 0,0006 ^j	0,002 ± 0,00001 ⁿ
5 mM Melatonin 100 mM NaCl	0,110 ± 0,0006 ^j	0,009 ± 0,00005 ^l
<i>N. nealsonii</i> Kontrol	0,180 ± 0,0010 ^{gh}	0,011 ± 0,00006 ^g
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin	0,200 ± 0,0012 ^{ef}	0,098 ± 0,00051 ^b
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin	0,220 ± 0,0115 ^{cd}	0,097 ± 0,00049 ^a
<i>N. nealsonii</i> 75 mM NaCl	0,170 ± 0,0009 ^h	0,010 ± 0,00006 ^h
<i>N. nealsonii</i> 100 mM NaCl	0,190 ± 0,0011 ^{fg}	0,011 ± 0,00006 ^g
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin 75 mM NaCl	0,210 ± 0,0012 ^{de}	0,017 ± 0,00009 ^e
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin 75 mM NaCl	0,230 ± 0,0013 ^{bc}	0,012 ± 0,00007 ^f
<i>N. nealsonii</i> 1 mM Melatonin 100 mM NaCl	0,200 ± 0,0011 ^{ef}	0,018 ± 0,00009 ^d
<i>N. nealsonii</i> 5 mM Melatonin 100 mM NaCl	0,240 ± 0,0208 ^{ab}	0,020 ± 0,00100 ^c
Maksimum	0,3	0,098
Minimum	0,1	0,001
Ortalama	0,2	0,0197
Değişim	0,2	0,096

4.6. Bitki Gövde Uzunluğu

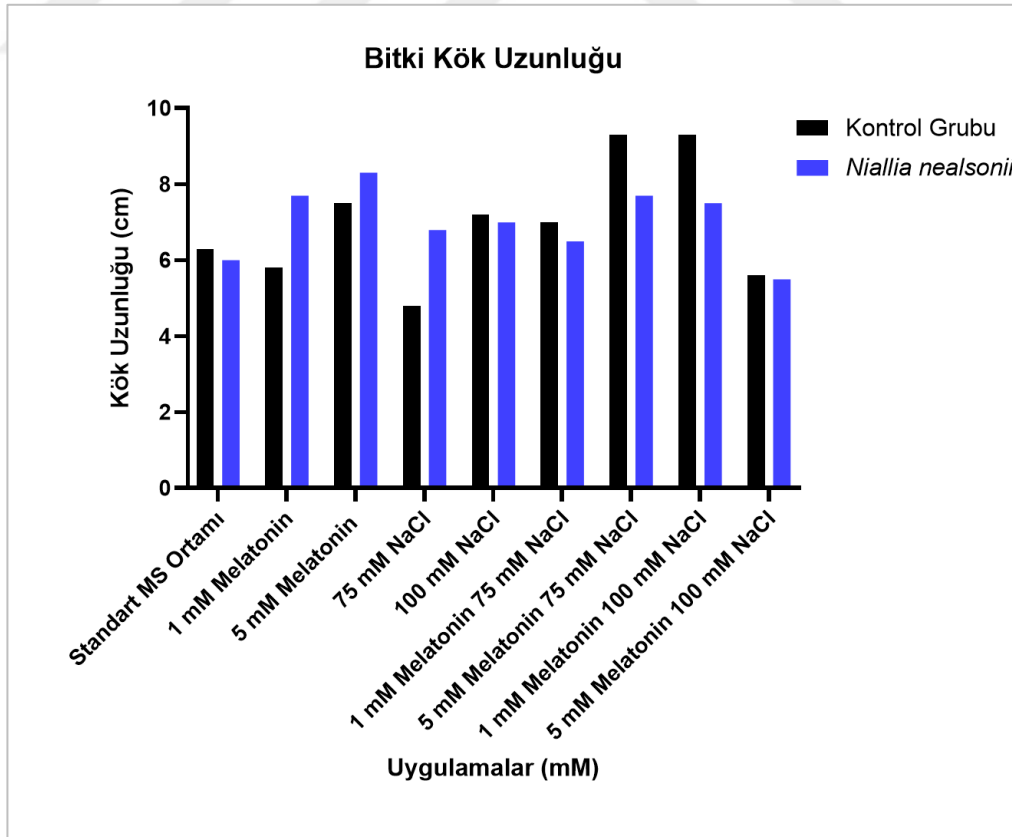
Çalışmada elde edilen verilere göre (Şekil 4.10), *Lotus corniculatus* bitkisinde farklı melatonin, tuz ve bakteri kombinasyonlarının gövde uzunluğu üzerine belirgin etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Genel olarak, tuz stresi (75 mM NaCl) uygulamasının tek başına bitkilerin gövde uzunluğunu anlamlı düzeyde azalttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, bakterisiz ve melatoninsiz kontrol grubunun da gövde uzunluğunun sınırlı kaldığı gözlemlenmiştir. Melatonin uygulamalarında, bitkilerde en yüksek gövde uzunluğu değerinin elde edildiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, yüksek konsantrasyonda uygulanan melatoninin, tuz stresinin olumsuz etkilerini hafifleterek bitki büyümesini teşvik ettiğini ortaya koymaktadır. Literatürde de benzer şekilde, melatoninin tuz stresinde bitki büyümesini destekleyici rolü olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2015). Bakteri uygulamaları ise tek başına gövde uzunluğu üzerinde sınırlı bir artış sağlamıştır. Ancak melatonin ile bakteri kombinasyonlarının kullanıldığı uygulamalarda, özellikle 5 mM melatonin ve *N. nealsonii* kombinasyonunda, daha iyi bir gelişim gözlenmiştir. Bu bulgular, melatonin ve bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin sinerjik etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir (Wang ve ark., 2016).



Şekil 4.10. Uygulamaların bitki gövde uzunluğuna etkileri

4.7. Bitki Kök Uzunluğu

Kök uzunluğu açısından değerlendirildiğinde (Şekil 4.11), tuz stresi (75 mM NaCl) uygulamasının kök gelişimini belirgin şekilde baskılamadığı, ancak kök uzunluğunun kontrol grubuna göre azalma gösterdiği tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, melatonin uygulamalarının tuz stresi altında kök uzunluklarını en yüksek seviyelere ulaştırdığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, düşük doz melatoninin uygun tuz stresi koşullarıyla birlikte uygulandığında kök sisteminde adaptif bir büyümeyi tetikleyebileceğini ortaya koymaktadır. *N. nealsonii* bakterisi uygulamalarında da kök uzunluğunda artış gözlenmiş; özellikle 5 mM melatonin ile bakteri kombinasyonunun 100 mM NaCl stresi altında uygulandığı grupta kök uzunluğu 8,3 cm ile en yüksek değer olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, bakteriyel inokülasyonun tuz stresine karşı kök sistemini desteklediğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, rizosfer bakterilerinin tuz stresi altında kök gelişimini artırabileceğini bildiren literatürle de örtüşmektedir (Yang ve ark., 2009).



Şekil 4.11. Uygulamaların bitki kök uzunluğuna etkileri

4.8. SOS1 Geni ve NAC Transkripsiyon Faktörü İfadelerindeki Değişikliğin RT qPCR ile Değerlendirilmesi

Bu çalışmada *Lotus corniculatus* bitkilerinde tuz stresi altında SOS (Salt Overly Sensitive) ve NAC (NAM, ATAF1/2 ve CUC2) transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyeleri RT-PCR analizi ile değerlendirilmiştir. Deneysel sonuçlar, farklı melatonin, tuz ve bakteri uygulamalarının gen ekspresyonları üzerinde belirgin etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur.

4.8.1. SOS1 gen ekspresyonu

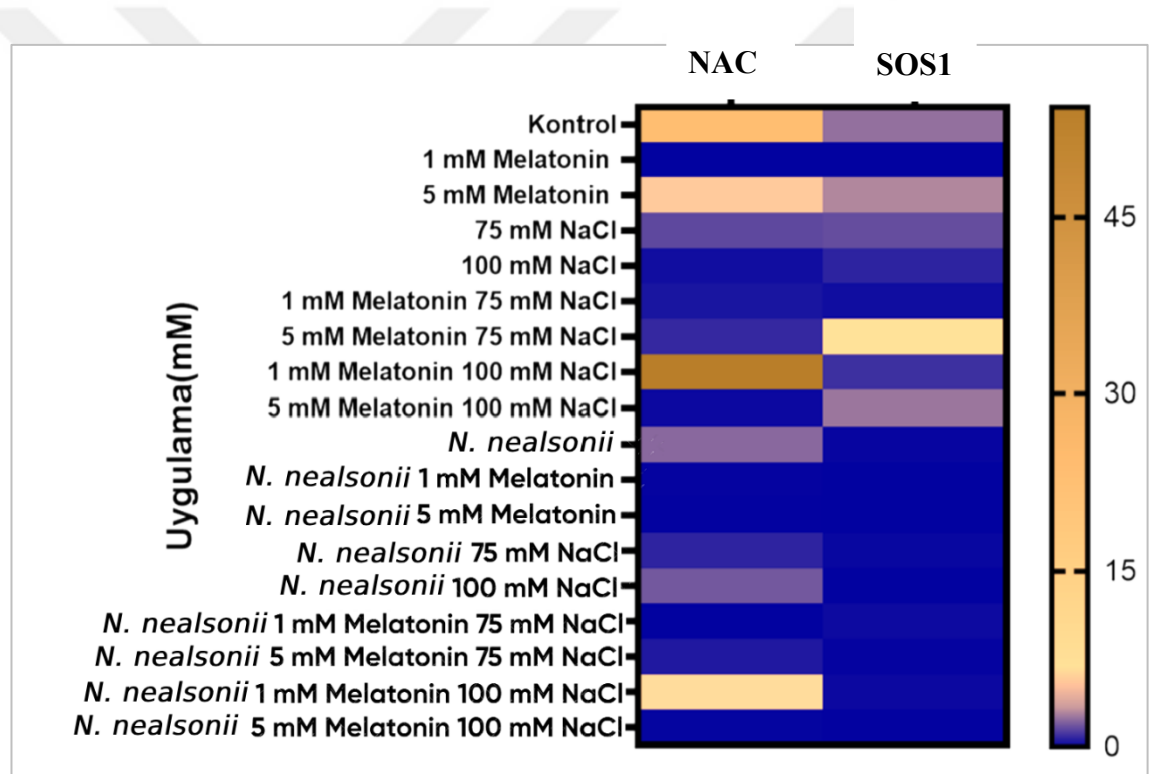
SOS geni, bitkilerde tuz stresine karşı iyon homeostazının sağlanmasında temel bir rol oynamaktadır (Zhu, 2002). Heatmap analizinde (Şekil 4.12.) SOS gen ekspresyonunun, özellikle kontrol grubunda ve melatonin uygulamalarında orta düzeyde aktif olduğu gözlenmiştir. Ancak 75 mM ve 100 mM NaCl uygulamaları sonrasında SOS gen aktivitesinde genel bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum, yüksek tuz konsantrasyonlarının, bitkilerde aşırı iyon yüklenmesi nedeniyle SOS yolaklarının doğal kapasitesini aşabileceğini düşündürmektedir (Zhu, 2016). Öte yandan, melatonin uygulamaları SOS ekspresyonunu artırmış ve tuz stresine karşı iyon dengesinin korunmasına katkı sağlamıştır. Melatoninin tuz stresi sırasında gen ekspresyon düzenleyici etkisi olduğu, önceki çalışmalarda da vurgulanmıştır (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015; Wei ve ark., 2015). Bakteriyel uygulamalarla birlikte yapılan melatonin tedavileri SOS gen ekspresyonunda daha dengeli bir profil sergilemiş, bu da bakterinin melatonin ile birlikte sinerjik bir etki yaratarak iyon homeostazını desteklediğini göstermektedir. Benzer şekilde, endofitik bakterilerinin bitkilerde iyon düzenleyici gen ekspresyonunu modüle edebildiği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2009).

4.8.2. NAC gen ekspresyonu

NAC transkripsiyon faktörleri, bitkilerde hem abiyotik streslere yanıt mekanizmalarında hem de hücre ölüm süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (Puranik ve ark., 2012). Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubunda NAC gen ekspresyonunun

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

oldukça yüksek olduğu, ancak tuz stresi uygulamalarıyla bu ekspresyonun belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Melatonin uygulamaları, özellikle 1 ve 5 mM melatonin uygulamalarının NaCl stresinde, NAC gen ekspresyonunu yeniden artırmıştır. Bu bulgu, melatoninin NAC ailesi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek tuz stresine karşı koruyucu mekanizmaları harekete geçirebileceğini göstermektedir (Zhang ve ark., 2019). Bakteriyel uygulamalarda NAC ekspresyonunun bir miktar azaldığı, ancak stres şiddetine göre daha stabil bir düzeyde seyrettiği görülmüştür. Bu durum, *N. nealsonii* bakterisinin bitki üzerindeki koruyucu etkisinin yalnızca iyon homeostazı değil, aynı zamanda transkripsiyonel stres yanıtlarını da kapsadığını düşündürmektedir (Vurukonda ve ark., 2016).



Şekil 4.12. Uygulamaların NAC ve SOS1 gen ifadeleri üzerindeki etkileri

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Genel Değerlendirme

N. nealsonii uygulanan parametrelerde çözülebilir şeker miktarı kontrol gruplarına yakın değerlerde çıkmıştır. Melatonin uygulaması tek başına şeker metabolizmasını ciddi ölçüde artırmamış, ancak stabilize edici bir etki göstermiştir. Bakteri ve melatonin kombinasyonlarının, tuz stresi altındaki bitkilerde şeker metabolizmasını koruma potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Prolin deneyi sonucunda, artan tuz konsantrasyonu (özellikle 100 mM NaCl) prolin birikimini anlamlı şekilde artırmıştır. Melatonin uygulamaları, özellikle düşük dozda (1 mM) uygulandığında prolin düzeyinde belirgin artışa neden olmuştur. Bakteri uygulaması tek başına stres yanıtını azaltmış ve prolin seviyelerini düşürmüştür. Melatonin ve bakterinin kombinasyonu, *Lotus corniculatus* bitkilerinde tuz stresine karşı etkili bir koruma mekanizması geliştirmiştir. Bu kombinasyonlar, prolin metabolizmasını dengeleyerek aşırı stres tepkisini hafifletmiştir. Tuz stresi uygulamaları hidrojen peroksit seviyesini artırarak oksidatif stres oluşturmuştur. Melatonin uygulamaları hidrojen peroksit seviyelerini azaltmış, bitkiyi oksidatif hasara karşı korumuştur. *N. nealsonii* bakterisinin varlığı, özellikle melatonin ile birlikte kullanıldığında, hidrojen peroksit düzeylerinde daha güçlü bir azalma sağlamıştır. Bu sonuçlar, melatonin ve *N. nealsonii* bakterisinin bitkilerde oksidatif stresi azaltarak tuz stresine tolerans geliştirilmesinde önemli biyolojik araçlar olduğunu desteklemektedir. *Lotus corniculatus* bitkilerinde tuz stresi altında yaş ve kuru ağırlık gibi büyüme parametrelerinin melatonin ve bakteri uygulamaları ile iyileştirilebileceğini göstermekte ve tarımsal uygulamalarda bu biyotik ajanların kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır. Genel olarak incelendiğinde, hem melatonin hem de *N. nealsonii* bakterisinin, tek başına ve özellikle birlikte uygulandığında, *Lotus corniculatus* bitkilerinin hem gövde hem de kök uzunluğunda tuz stresinin olumsuz etkilerini azalttığı ve bitki büyümesini desteklediği söylenebilir. Sonuç olarak, melatonin ve *N. nealsonii* bakterisinin *Lotus corniculatus* bitkilerinde SOS1 ve NAC gen ekspresyonu üzerinde düzenleyici etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Melatonin uygulamaları, özellikle tuz stresi altında, hem iyon dengesini düzenleyici hem de stres yanıtı geliştirici genlerin ekspresyonunu artırarak bitkilerin adaptasyon yeteneğini desteklemiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bakteriyel uygulamalar ise, melatonin ile kombine edildiğinde genetik stres yanıtlarında daha dengeli ve koruyucu bir etki oluşturmuştur. Bu bulgular, melatonin ve faydalı bakterilerin, bitkilerin genetik düzeyde tuz stresine adaptasyonunu artırabilecek potansiyel biyolojik ajanlar olduğunu göstermekte ve tarımsal uygulamalarda bu biyostimülanların kullanımını desteklemektedir.

5.2. Öneriler

Çalışmada melatonin ve bakterinin aynı anda kullanılmış olmasının sınırlayıcı etki oluşturduğu düşünülmektedir. Çalışmanın farklı kombinasyonlarla, elde edilen sonuçların desteklenmesi önerilmektedir. Elde edilen veriler ışığında özellikle iklim değişikliğinin neden olduğu tarımdaki verim kayıplarına karşı endofitik bakteri kullanımı hem çevre sağlığı hem de insan sağlığını koruyarak verim kaybına engel olabileceği düşünülmektedir. Farklı endofitik bakterilerin aynı stres koşullarında kullanılması önerilmektedir. Gen ekspresyonu sonuçları değerlendirildiğinde, melatonin ve faydalı bakterilerin, bitkilerin genetik düzeyde tuz stresine adaptasyonunu artırabilecek potansiyele sahip biyolojik ajanlar olduğunu göstermekte ve tarımsal uygulamalarda kullanımını desteklemektedir. Bu çalışmanın devamı olarak da in vivo şartlarda aynı uygulamaların ve kombinasyonların gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz, E., Hatipoğlu, R., Altınok, S., Sancak, C., Tan, A., & Uraz, D. (2005). Yem Bitkileri Üretimi ve Sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, Cetvel 1*, 503–518.
- Ali, B., Hafeez, A., Javed, M. A., Afridi, M. S., Abbasi, H. A., Qayyum, A., Batool, T., Ullah, A., Marc, R. A., Jaouni, S. K. A., Alkhalifah, D. H. M., & Selim, S. (2022). Role of endophytic bacteria in salinity stress amelioration by physiological and molecular mechanisms of defense: A comprehensive review. *South African Journal of Botany*, 151, 33–46.
- Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends in Plant Science*, 19(12), 789–797.
- Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of Pineal Research*, 59(2), 133–150.
- Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2020). Melatonin and its relationship to plant hormones. *Annals of Botany*, 121(2), 195–207.
- Arora, N. K. (2019). Impact of climate change on agriculture production and its sustainable solutions. *Environmental Sustainability*, 2(2), 95–96.
- Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216.
- Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51(2), 163–190.
- Azarafshan, M., & Abbaspour, N. (n.d.). *A r c of*.
- Back, K., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2016). Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. *Journal of Pineal Research*, 61(4), 426–437.
- Balasubramaniam, T., Shen, G., Esmaeili, N., & Zhang, H. (2023). Plants' Response Mechanisms to Salinity Stress. *Plants*, 12(12), 2253.
- Beyaz, R., & Kazankaya, A. (2024). Effect of NaCl-induced Salt Stress on Germination and Initial Seedling Growth of *Lotus corniculatus* L. cv. "Leo." *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 21(1), 24–34.
- Bouabdelli, S., Zeroual, A., Meddi, M., & Assani, A. (2022). Impact of temperature on agricultural drought occurrence under the effects of climate change. *Theoretical and Applied Climatology*, 148(1–2), 191–209.

- Budak, F., & Budak, F. (2014). Yem bitkilerinde kalite ve yem bitkileri kalitesini etkileyen faktörler. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 7(1), 1–6.
- Büyükyıldız, S., Yıldırım, M., & Kurt, A. N. (2023). The Effect of Salt Stress on the Germination and Seedling Growth Parameters in Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Black Sea Journal of Agriculture*, 6(2), 126–133.
- Carmak, I. and J.H. Horst. 1991. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.*, 83: 463-468.
- Chen, Y. G., Cui, X. L., Li, W. J., Xu, L. H., Wen, M. L., Peng, Q. and Jiang, C. L. 2008. "Salinicoccus salitudinis sp. nov., a new moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil sample". *Extremophiles*, 12, 197–203.
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6), 371–379.
- Del Rio, L. A., Pastori, G. M., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., Jiménez, A., López-Huertas, E., & Hernández, J. A. (2005). The activated oxygen role of peroxisomes in plant senescence. *Plant Physiology*, 116(4), 1195–1200.
- Egamberdieva, D., Wirth, S.J., Alqarawi, A.A., Abd-Allah, E.F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2104.
- Eke, P., Kumar, A., Sahu, K. P., Wakam, L. N., Sheoran, N., Ashajyothi, M., Fekam, F. B. 2019. "Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) ", *Microbiological research*, 228, 126302.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., ve ark. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant Journal*, 39(6), 863-876.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., & Lilburn, T. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
- Hamida, K., Chibane, Y., & HadjSadok, A. (2023). A novel *Niallia nealsonii* bacteria degrading phenol isolated from Oum Ghellaz lake shore soil in Oran in Algeria. *Ukrainian Journal of Ecology*, 13(2), 79–85.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y. and Song, W., 2005. "Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens". *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 66–76

- Harley, J. P., Prescott, L. M. 2002. "Laboratory Exercises in Microbiology 4th Edition". The McGraw-Hill Companies: New York.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2013). Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In *Crop stress and its management: Perspectives and strategies* (pp. 261–315).
- Isayenkov, S. V. (2012). Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytology and Genetics*, 46(5), 302–318.
- Jasim, B., John Jimtha, C., Jyothis, M., Radhakrishnan, E. K. 2013. "Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*". *Plant growth regulation*, 71(1), 1-11.
- Jehanzaib, M., & Kim, T. W. (2020). Exploring the influence of climate change-induced drought propagation on wetlands. *Ecological Engineering*, 149(March), 105799.
- Jha, P. N., Gupta, G., Jha, P., & Mehrotra, R. (2013). Association of Rhizospheric / Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable Agriculture. *Greener Journal of Agricultural Sciences*, 3(2), 73–84.
- Jimtha, J. C., Smitha, P. V., Anisha, C., Deepthi, T., Meekha, G., Radhakrishnan, E. K., Remakanthan, A. 2014. "Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 57-66.
- Karakaş, İ., Mustafa, A. Y., Öztürk, F., Selen, K., Hacıoğlu, N. 2022. "Nikelce Zengin Topraklardan (Çanakkale) İzole Edilen Bakterilerin Bitki Büyüme Teşvik Edici Potansiyellerinin Belirlenmesi". *Türk Tarım Ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 9(2), 424-431.
- Khan, A., Numan, M., Khan, A. L., & Lee, I. J. (2022). Melatonin: Awakening the defense mechanisms during plant oxidative stress. *Plants*, 11(2), 225.
- Khan, T. A., Saleem, M., & Fariduddin, Q. (2022). Recent advances and mechanistic insights on Melatonin-mediated salt stress signaling in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 188(August), 97–107.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. 1990. "Methods in Phytopathology", Akademiai Kiado, 153-180, Budapest.
- Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., & Roldán, A. (2006). Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify antioxidant activities in stressed plants. *Functional Plant Biology*, 33(2), 141-151.
- Li, C., Tan, D. X., Liang, D., Chang, C., Jia, D., Ma, F. (2017). Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 669–680.

- Li, C., Wang, P., Wei, Z., Liang, D., Liu, C., Yin, L., ... & Ma, F. (2017). The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*, 60(3), 291-302.
- Li, J., Liu, J., Zhu, T., Zhao, C., Li, L., & Chen, M. (2019). The role of melatonin in salt stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7).
- Li, Q., & Hill, M. J. (1989). Seed development and dormancy characteristics in *lotus corniculatus* l. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 32(3), 333-336.
- Liang, D., Ni, Z., Xia, H., & Lin, L. (2015). Melatonin regulates root architecture by promoting cell proliferation and cell differentiation in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 555.
- Manchester, L. C., Tan, D. X., Reiter, R. J., Park, W., Monis, K., Qi, W. (2015). High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue protection. *Life Sciences*, 72(20), 2261-2275.
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565-
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 443-462.
- Mizoguchi, T., Wright, L., Fujiwara, S., Cremer, F., Lee, K., Onouchi, H., Mouradov, A., Fowler, S., Kamada, H., & Coupland, G. (2005). Distinct roles of *GIGANTEA* in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(8), 2255-2270
- Montemurro, F., Maiorana, M., Convertini, G., & Ferri, D. (2006). Compost organic amendments in fodder crops: Effects on yield, nitrogen utilization and soil characteristics. *Compost Science and Utilization*, 14(2), 114-123.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). *Mechanisms of salinity tolerance*. Annual Review of Plant Biology, 59, 651-681.
- Nawaz, K., Hussain, K., Majeed, A., Khan, F., Afghan, S., & Ali, K. (2010). Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects. *African Journal of Biotechnology*, 9(34), 5475-5480.
- Nguyen, H. T., Meir, S., & Angelovici, R. (2020). The role of carbon metabolism in plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3867-3884.
- Nohales, M. A., & Kay, S. A. (2019). Multi-level modulation of light signaling by *GIGANTEA* regulates both the output and pace of the circadian clock. *Developmental Cell*, 49(6), 840-851.

- Nuruzzaman, M., Sharoni, A.M., & Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology*, 4, 248.
- Ondrasek, G., Rathod, S., Manohara, K. K., Gireesh, C., Anantha, M. S., Sakhare, A. S., Parmar, B., Yadav, B. K., Bandumula, N., Raihan, F., Zielińska-Chmielewska, A., Meriño-Gergichevich, C., Reyes-Díaz, M., Khan, A., Panfilova, O., Fuentealba, A. S., Romero, S. M., Nabil, B., Wan, C., ... Horvatinec, J. (2022). Salt Stress in Plants and Mitigation Approaches. *Plants*, 11(6), 1–21.
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., ve ark. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research*, 10(6), 239–247.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–349.
- Park, H. J., Kim, W. Y., & Yun, D. J. (2016). A new insight of salt stress signaling in plant. *Molecules and Cells*, 39(6), 447–459.
- Patel, S., & Gupta, R.S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 406–438.
- Penrose, D. M., Glick, B. R. 2003. "Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria". *Physiologia Plantarum*, 118, 10–15.
- Perevedentsev, Y. P., & Vasil'ev, A. A. (2023). Climate Change and Its Impact on Agriculture. *Russian Meteorology and Hydrology*, 48(9), 739–744.
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., & Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 17(6), 369–381.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., & Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. *Journal of Biomedical Science*, 7(6), 444–458.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Zhou, Z., Cruz, M. H. C., Fuentes-Broto, L., & Galano, A. (2015). Phytomelatonin: Assisting plants to survive and thrive. *Molecules*, 20(4), 7396–7437.
- Ross, M. D., & Jones, W. T. (1985). The origin of *Lotus corniculatus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 71(2), 284–288.
- Roy, S. J., Negrão, S., & Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 115–124.
- Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A., & Imaizumi, T. (2007). GIGANTEA directly activates Flowering Locus T in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 8574–8579.

- Schwyn, B., Neilands, J. B. 1987. "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores", *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Shi, H., Chen, Y., Tan, D. X., Reiter, R. J., Chan, Z., & He, C. (2015). Melatonin induces class A1 heat-shock factors (HSFA1s) and their possible involvement of thermotolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*, 58(3), 335–342.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J. K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6896–6901.
- Simsek, M., 2019. Farklı kaynaklardan izole edilen pigment üreten bakterilerin tanılanması ve tekstil endüstrisinde boyar madde olarak kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum Tekn. Üniv, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 63, Erzurum.
- Slama, H. Ben, Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Baranov, O., Ahadi, R., & Belbahri, L. (2023). Impacts of Salt Stress on the Rhizosphere and Endophytic Bacterial Role in Plant Salt Alleviation. *International Journal of Plant Biology*, 14(2), 361–376.
- Sorty, A. M., Meena, K. K., Choudhary, K., Bitla, U. M., Minhas, P. S., & Krishnan, S. (2016). Effect of plant growth promoting bacteria associated with halophytic weed *Psoralea corylifolia* on growth and ion homeostasis in wheat under saline conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(2), 62.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., & Koes, R. (1996). The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85(2), 159-170.
- Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89–97.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Liu, X., Rosales-Corral, S. A., Acuña-Castroviejo, D., Reiter, R. J. (2012). Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of Pineal Research*, 54(2), 127–138.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (2007). One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research*, 42(1), 28–42.
- Vaishnav, A., Shukla, A. K., Sharma, A., Kumar, R., & Choudhary, D. K. (2019). Endophytic Bacteria in Plant Salt Stress Tolerance: Current and Future Prospects. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 650–668.
- Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M.T., & Kern, R. (2003). *Bacillus nealsonii* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 1655–1660.

- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523–539.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13–24.
- Wang, P., Sun, X., Li, C., Wei, Z., Liang, D., Ma, F. (2016). *Melatonin enhances the tolerance of apple leaves to drought stress*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 741.
- Wei, W., Li, Q. T., Chu, Y. N., Reiter, R. J., Yu, X. M., Zhu, D. H., & Zhang, W. K. (2015). Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 695-707.
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1-4.
- Yang, J., Kloepper, J.W., & Ryu, C.M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1–4.
- Yolcu, H., & Tan, M. (2008). *Ülkemiz Yem Bitkileri Tarımına Genel Bir Bakış General View to Turkey Forage Crops Cultivation*. 14(3), 303–312.
- Zhan, H., Nie, X., Zhang, T., Li, S., Wang, X., Du, X., Tong, W., & Song, W. (2019). Melatonin: A small molecule but important for salt stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3).
- Zhang, J., Shi, Y., Zhang, X., Du, H., Xu, B., Huang, B. (2017). Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 138, 36–45.
- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., ... & Guo, Y.D. (2017). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1467–1486.
- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., ... & Guo, Y. D. (2013). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 64(3), 469-482.
- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., ... & Guo, Y. D. (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 647–656.
- Zhang, N., Zhao, B., Zhang, H. J., Weeda, S., Yang, C., Yang, Z. C., Ren, S., Guo, Y. D. (2015). Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research*, 58(1), 15–23.

- Zhang, N., Zhao, B., Zhang, H. J., Weeda, S., Yang, C., Yang, Z. C., ... & Ren, S. (2019). Melatonin alleviates salt stress by improving antioxidant enzyme activities and enhancing the expression of salt-responsive transcription factors in watermelon. *Frontiers in Plant Science*, 10, 770.
- Zhang, N., Zhao, B., Zhang, H. J., Weeda, S., Yang, C., Yang, Z. C., ... & Ren, S. (2015). Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research*, 59(3), 269–279.
- Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., & Wang, P. (2021). Regulation of plant responses to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 1–16.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(2), 66–71.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 247–273.
- Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), 441–445.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313–324.

EKLER

EK 1

>Seq1 [organism= *Niallia nealsonii*] *Niallia nealsonii* strain DSM 15077 16S ribosomal RNA, partial sequence

TTTTTAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCT
GTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCC
TTTTCTACTCATGTAGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGCTGTCACTTAC
AGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
TTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTA
ACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTG
CAGAAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTA ACTGAC
GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCT
TTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
CATCTCCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTTCCCCTTCGGGGGACAGG
ATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTA
GTTGGGCACTTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCAAAACCGCGAGGTCGAGCCAATCC
CATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA

**AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACA
CCCG**



EK 2

- Bakterinin PGPB Özellikleri

İzolasyon Kodu	Gram +/-	Katalaz	Oksidaz	Azot Fiksasyonu	IAA Üretimi	ACC Deaminaz Aktivitesi	Siderofor Üretimi
H11	+	+	+	+	+	+	-