

**HUMİK ASİT VE LİKEN KÖKENLİ
MİKROORGANİZMALARIN YONCADA
(*Medicago sativa* L.) TUZ STRESİ TOLERANSI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Aytakın MAMMADOVA

**Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
2025
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**HUMİK ASİT VE LİKEN KÖKENLİ MİKROORGANİZMALARIN YONCADA
(*Medicago sativa* L.) TUZ STRESİ TOLERANSI ÜZERİNE ETKİLERİ**

(Effects of Humic Acid and Lichen-Derived Microorganisms on Salt Stress Tolerance in Alfalfa
(*Medicago sativa* L.)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aytakın MAMMADOVA

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Erzurum

Ağustos, 2025

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Aytakın Mammadova tarafından hazırlanan “Humik Asit ve Liken Kökenli Mikroorganizmaların Yoncada (*Medicago sativa* L.) Tuz Stresi Toleransı Üzerine Etkileri” başlıklı çalışması 13/ 08/ 2025 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı, Botanik Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Özlem GÜLMEZ

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Alper NUHOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Prof. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında sunulan “*Humik Asit ve Liken Kökenli Mikroorganizmaların Yoncada (Medicago sativa L.) Tuz Stresi Toleransı Üzerine Etkileri*” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	5	30
Kuramsal Temeller	0	30
Materyal ve Metot	20	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	0	20
Sonuçlar	0	20
Tezin Geneli	10	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Aytakın MAMMADOVA	Prof. Dr. Ökkeş ATICI
23.7.2025	23.7.2025
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi araştırma projesi olarak hazırlanan bu araştırma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten duygularıyla şükranlarımı sunarım. Tez çalışma kapsamında yer alan mikroorganizma deneyleri kısmında bilgi birikimini esirgemeyen sayın hocam Dr. Öğrt. Üyesi Özlem GÜLMEZ'e en içten duygularıyla şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca her türlü ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi eğitim hayatımda da hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, babam Valerik MAMMADOV'a, yoğun çalışma tempomda destek ve ilgilerini her zaman gördüğüm annem Nihala MAMMADOVA'ya minnet ve şükranlarımı sunarım.

Aytakın MAMMADOVA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HUMİK ASİT VE LİKEN KÖKENLİ MİKROORGANİZMALARIN YONCADA (*Medicago sativa* L.) TUZ STRESİNE KARŞI ETKİLERİ

Aytakın MAMMADOVA

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Amaç: Bu çalışmanın amacı, humik asit (HA) ile liken (*Rhizoplaca melanophthalma*) kaynaklı endofitik mikroorganizmalar olan *Bacillus wiedmannii* bakterisi ve *Scopulariopsis brevicaulis* fungus izolatlarının, yonca (*Medicago sativa* L., cv. Konya) bitkisinin tuz stresi altındaki fizyolojik ve biyokimyasal yanıtları üzerindeki koruyucu etkilerini belirlemektir.

Yöntem: Liken örneklerinden izole edilen bakteri ve fungus, saf kültür haline getirildikten sonra tanımlanmış ve HA'yı karbon kaynağı olarak kullanma yetenekleri doğrulanmıştır. Saksı ortamında yürütülen deneysel tasarım; kontrol, yalnız HA (500 ve 1000 mg/L), yalnız bakteri veya fungus, yalnız tuz stresi (100 mM NaCl) ve bunların tüm ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşturuldu. Saksılar, gece/gündüz fotoperiyodu (16/8 saat) ve kontrollü sıcaklık (25/22°C, gündüz/gece) koşullarında bir iklim odasına transfer edilmiştir. Gelişen 35 günlük fidelerde; nispi su içeriği (RWC), reaktif oksijen türleri (ROS) ve lipid peroksidasyonu (LPO) seviyeleri, antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, APX, GPX ve GR) ve fotosentetik pigmentlerin (klorofil a, b, toplam klorofil ve karotenoid) içerikleri incelenmiştir.

Bulgular: Tuz stresi; yoncada RWC, fotosentetik pigmentlerin düzeyi ve antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. Buna karşın ROS (H₂O₂ ve O₂⁻) ve LPO gibi oksidatif stres göstergelerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. HA (500 ve 1000 mg/L) ile birlikte uygulanan *B. wiedmannii* izolatı (OG24) ROS ve MDA birikimini azaltırken, SOD ve CAT gibi başlıca antioksidan enzimlerin aktivitesini ve fotosentetik pigmentlerin düzeyini iyileştirmiştir. Diğer yandan, HA ile birlikte uygulanan *S. brevicaulis* (OG18) izolatı, özellikle oksidatif stresin baskılanmasında daha etkili olmuştur. İlave olarak CAT, SOD, APX ve GR aktivitelerinde, RWC ve fotosentetik pigment düzeylerinde daha güçlü iyileşmeler sağlamıştır. Yüksek dozdaki (1000 mg/L) HA'nın bazı durumlarda antioksidan savunma sistemi üzerinde baskılayıcı etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. En dengeli ve olumlu sonuçlar 500 mg/L HA doz seviyesinde elde edilmiştir.

Sonuç: HA ile liken kökenli bakteri veya fungal inokülasyonlarının kombine kullanımı, yoncada tuz stresi kaynaklı oksidatif hasarı azaltmış, antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirmiş ve fotosentetik performansı koruyarak biyokütle üretimini desteklemiştir. Tuz stresi altında *S. brevicaulis* ile 500 mg/L HA kombinasyonu, daha yüksek bir koruyucu etkiye neden olduğundan, endofitik mantar-biyostimülan stratejilerinin geliştirme çalışmalarında öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiği ileri sürülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Humik asit, liken, *Bacillus wiedmannii*, *Scopulariopsis brevicaulis*, tuz stresi, yonca, antioksidan savunma, fotosentetik pigment

Ağustos 2025, 90 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

THE EFFECTS OF HUMIC ACID AND LICHEN-BASED MICROORGANISMS ON SALT STRESS IN ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

Aytakın MAMMADOVA

Supervisor: Prof. Dr.Ökkeş ATICI

Purpose: The aim of this study was to determine the protective effects of humic acid (HA) in combination with the bacterium *Bacillus wiedmannii* and the fungus *Scopulariopsis brevicaulis*, which were isolated from the lichen *Rhizoplaca melanophthalma*, on the physiological and biochemical responses of alfalfa (*Medicago sativa* L., cv. Konya) under salt stress conditions.

Method: The bacterium and fungus isolated from lichen samples were purified into pure cultures, identified, and tested for their ability to utilize HA as a carbon source. The pot experiment included the following treatments: control, HA alone (500 and 1000 mg/L), bacterium or fungus alone, salt stress alone (100 mM NaCl), and all possible dual and triple combinations of these treatments. The pots were transferred to a climate-controlled growth chamber under a 16/8 h (light/dark) photoperiod and day/night temperature regime (25/22°C). In 35-day-old seedlings, relative water content (RWC), reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (LPO) levels, antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, APX, GPX, and GR), and photosynthetic pigment contents (chlorophyll a, b, total chlorophyll, and carotenoids) were analyzed.

Findings: The salt stress led to reductions in RWC, photosynthetic pigment levels, and antioxidant enzyme activities in the alfalfa. In contrast, there were significant increases in oxidative stress markers such as ROS (H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$) and LPO. The application of *B. wiedmannii* (OG24) in combination with HA (500 and 1000 mg/L) reduced ROS and MDA accumulation while enhancing the activities of key antioxidant enzymes (SOD and CAT) and improving pigment levels. On the other hand, the combination of *S. brevicaulis* (OG18) with HA was found to be more effective, particularly in suppressing oxidative stress. This treatment led to stronger improvements in CAT, SOD, APX, and GR activities, RWC, and the pigment levels. It was also observed that the higher dose of HA (1000 mg/L) exerted inhibitory effects on the antioxidant defense system in some cases. The most balanced and favorable outcomes were obtained with the 500 mg/L HA dose.

Results: The combined use of HA with lichen-derived bacterial or fungal inoculants alleviated the salt-induced oxidative damage in alfalfa, strengthened antioxidant defense mechanisms, and supported biomass production by preserving photosynthetic performance. Since the combination of *S. brevicaulis* with 500 mg/L HA under the salt stress demonstrated a higher protective effect, it is suggested that endophytic fungus-biostimulant strategies should be prioritized in future development studie.

Keywords: Humic acid, lichen, *Bacillus wiedmannii*, *Scopulariopsis brevicaulis*, salt stress, alfalfa, antioxidant defense, photosynthetic pigment

August 2025, 90 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	ix
GİRİŞ	1
KURAMSAL TEMELLER	17
MATERYAL ve METOTLAR	27
Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	27
Bitki Materyali ve Tuz Konsantrasyonunun Belirlenmesi	27
Humik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	28
Liken Kökenli Mikroorganizmaların İzolasyonu	29
Mikroorganizmaların HA'yı Karbon Kaynağı Olarak Kullanım Potansiyelleri.....	30
Saksı Aşamasında Gerçekleştirilen Çalışmalar	31
Yaş ve Kuru Ağırlık Tayini.....	32
Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi.....	33
Bitki Dokularında Protein İçeriğinin Belirlenmesi	34
Lipid Peroksidasyonu Tayini	35
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi.....	35
Süperoksit Anyonu (O ₂ ⁻) Miktarının Tayini	36
Antioksidan Enzimlerin Aktivitelerinin Belirlenmesi	36
Katalaz aktivitesinin ölçülmesi	37
Guaiacol peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	37
Süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini	37
Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin ölçümü	38
İstatistik analiz	39
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	40
Bakteri Uygulamasından Elde Edilen Bulgular	40
Yapraklarda su içeriği bulguları.....	40
LPO (MDA olarak) ve ROS içeriği bulguları	41

Antioksidan enzim aktivitelerine ait bulgular	43
Fotosentetik pigment içeriği bulguları	48
Fungus Uygulamasından Elde Edilen Bulgular	51
Yapraklarda su içeriği bulguları	51
LPO ve ROS içeriği bulguları	53
Antioksidan enzim aktivitelerine ait bulgular	57
Fotosentetik Pigment İçeriği Bulguları	62
SONUÇ ve ÖNERİLER	66
Öneriler:	67
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Bacillus wiedmannii</i> OG24 kodlu bakterinin Humik asit degradasyonu	31
Şekil 2. <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> OG18 kodlu fungus Humik asit degradasyonu.....	31
Şekil 3. Protein tayininde kullanılan standart grafik.	34
Şekil 4. H ₂ O ₂ tayininde kullanılan standart grafik.	36
Şekil 5. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının MDA ve RWC seviyeleri üzerindeki etkileri.. ..	41
Şekil 6. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının H ₂ O ₂ ve O ₂ ⁻ miktarı üzerinde etkileri.. ..	43
Şekil 7. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının CAT ve SOD enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri.. ..	44
Şekil 8. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının APX, GPX ve GR enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri.. ..	45
Şekil 9. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının fotosentetik pigment içeriği üzerindeki etkileri.. ..	50
Şekil 10. Tuz (T), humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının MDA ve nispi su içerikleri (RWC) üzerindeki etkileri.	52
Şekil 11. Tuz (T), humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının H ₂ O ₂ ve O ₂ ⁻ içerikleri üzerindeki etkileri.	55
Şekil 12. Tuz (T), humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının CAT ve SOD aktivitesiüzerine etkileri.	57
Şekil 13. Tuz, humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının APX, GR ve GPX içerikleri üzerindeki etkileri.	59
Şekil 14. Tuz (T), humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının Klorofil a, Klorofil b, Toplam klorofil (Tklo) ve karotenoid içerikleri üzerindeki etkileri.	63

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

HA	: Humik Asit
NaCl	: Sodyum klorür
MDA	: Malondialdehit
RWC	: Nispi Su İçeriği (Relative Water Content)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
APX	: Askorbik Asit Peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
LPO	: Lipid peroksidasyonu
GPX	: Guaiakol peroksidaz
FW	: Taze Ağırlık (Fresh Weight)
DW	: Kuru Ağırlık (Dry Weight)
<i>B. wiedmannii</i>	: <i>Bacillus wiedmannii</i> (bakteri türü)
<i>S. Breviceaulis</i>	: <i>Scopulariopsis breviceaulis</i> (fungus türü)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
UV	: Ultraviyole
LSD	: En Küçük Önemli Fark (Least Significant Difference)
%	: Yüzde işareti
±	: Artı-eksi (ortalama ± standart hata)
µmol	: Mikromol
mg/L	: Miligram/Litre
nm	: Nanometre

GİRİŞ

Küresel ölçekte artan insan nüfusu, gıda üretimi üzerindeki baskıyı her geçen gün artırmakta ve bu durum, tarımsal üretim sistemlerinin daha verimli, sürdürülebilir ve çevresel stres faktörlerine karşı daha dirençli hâle getirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu baskı, yalnızca üretim miktarının artırılmasını değil, aynı zamanda kalite bakımından da iyileştirmeleri gerekli kılmaktadır (Rabbi *et al.* 2021; Feigin *et al.* 2025).

Artan nüfusun gıda ihtiyacını karşılayabilmek amacıyla tarım arazilerinin yoğun kullanımı ve genişletilmesi, doğal ekosistemlerde önemli değişimlere yol açmakta; bu durum, arazi örtüsünün dönüşümü, biyoçeşitlilik kaybı ve iklim değişikliğinin etkilerinin şiddetlenmesi gibi çevresel sorunları beraberinde getirmektedir. Tarımsal üretimi tehdit eden en önemli etkenlerden arasında biyotik (hastalıklar, zararlılar, yabancı otlar) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklık vb.) stres faktörleri bulunur. Bu stresler, özellikle verimlilik açısından ciddi kayıplara neden olabilmekte ve dolayısıyla gıda üretimi ve güvenliği hedeflerini tehlikeye atmaktadır. Modern tarımın karşılaştığı bu zorluklar karşısında, üretim potansiyelini en üst düzeye çıkarmak için stres koşullarına dayanıklı bitki türlerinin geliştirilmesi ve çevresel streslerin etkisini minimize edecek stratejilerin uygulanması büyük önem taşımaktadır. Çevresel faktörlerin, zirai ürünlerin genetik verim potansiyelini doğrudan veya dolaylı biçimde sınırladığı göz önünde bulundurulduğunda, bu etkilerin yönetilebilir hale getirilmesi, günümüzün ve gelecek kuşakların gıda ihtiyacının karşılanmasında stratejik bir rol oynamaktadır (Hawkesford 2024; Li *et al.* 2024; Perales *et al.* 2025).

Tuz (NaCl) stresinin dünya genelinde tarımsal üretkenliği sınırlayan en önemli abiyotik stres faktörleri arasında olduğu kabul edilir. Tuzlu topraklar, dünya genelindeki tarım arazilerinin yaklaşık %20'sini ve sulanan arazilerin ise %33'ünü etkilemektedir (Stavi *et al.* 2021). Bu oran, özellikle Orta Doğu, Güney Asya, Avustralya ve Akdeniz havzası gibi sulamaya dayalı tarım yapılan bölgelerde daha da artmaktadır. Özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde, sulama kaynaklarının yetersizliği ve suyun kalitesinin düşük olması nedeniyle toprakta biriken sodyum (Na⁺) ve klorür (Cl⁻) iyonları, bitki büyümesi ve gelişmesi üzerinde çok yönlü olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2022 verilerine göre, dünya genelinde yaklaşık 831 milyon hektar tarım arazisi tuzluluk tehdidi altındadır. Bu miktarın iklim değişikliğinin etkileriyle birlikte giderek daha da artacağı öngörülmektedir. Ülkemizin özellikle Güneydoğu, İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgeleri gibi ağırlıklı olarak sulamaya dayalı tarım yapılan alanlarında bu sorun giderek daha fazla hissedilmektedir. Tuz stresi, bitkilerde öncelikle ozmotik stres, iyon toksisitesi ve

oksidatif stres olmak üzere üç temel mekanizma aracılığıyla ciddi hasarlar ve verim kayıpları oluşturur (Yılmaz vd. 2011; Çetinkaya vd. 2013; Arslan vd. 2013; Zhou *et al.* 2024).

Toprakta tuz konsantrasyonunun artması, toprak çözeltisinin su potansiyelini (veya ozmotik potansiyelini) önemli ölçüde düşürür. Bu durum, kök hücreleriyle toprak arasında normalde mevcut olan su potansiyeli gradyanının tersine dönmesine neden olarak bitkinin su alım kapasitesini düşürür. Şiddetli durumlarda, suyun ters yönde hareketi sonucunda köklerden dış ortama su kaybı dahi gerçekleşebilir. Bu koşullarda, hücrelerin turgor basıncı azalır; dolayısıyla hücre büyümesi, gelişmesi ve bölünmesi gibi temel fizyolojik süreçler sekteye uğrar. Yaprak alanında daralma, stomal faaliyetlerde azalma ve fotosentez oranında düşüş gözlenir. Bu durum, bitkilerin su kaybını dengelemekte zorluk yaşamasına ve büyüme süreçlerinin yavaşlamasına yol açar. Tuz stresinin yüksek olduğu durumlarda, bitkilerde ozmotik dengeyi korumak için daha fazla enerji harcanması gerekebilir (Mukhopadhyay *et al.* 2020) Tuzlu toprak koşullarında, özellikle yüksek konsantrasyonlarda bulunan Na^+ ve Cl^- iyonları, bitkilerin su alım mekanizmalarını ciddi biçimde azaltır. Topraktaki tuz oranının artması, toprak çözeltisinin ozmotik potansiyelini düşürerek bitki köklerinin suyu absorbe etmesini zorlaştırır. Normal şartlarda, suyun kökten yapraklara doğru taşınması, toprak çözeltisindeki su potansiyelinin bitki hücrelerindeki yüksek olması sayesinde gerçekleşir. Ancak tuzlu koşullarda bu süreç gerçekleşemez. Bu durum, bitkide "osmotik stres" veya daha genel anlamıyla "su stresi" olarak tanımlanır. Su stresine maruz kalan bitkilerde, hücrelerin turgor basıncı azalır; bu da hücre bölünmesi ve genişlemesi gibi temel fizyolojik süreçlerin aksamasına neden olur. Sonuç olarak, bitkinin büyüme hızı önemli ölçüde yavaşlar, yaprak alanı daralır, fotosentetik kapasite düşer ve genel biyokütle üretimi azalır (Parida and Das 2005; Hernández 2019).

Tuz stresi bitkide yalnızca osmotik dengeyi değil, aynı zamanda iyon dengesini de bozar. Na^+ ve Cl^- iyonlarının bitki hücrelerinde aşırı birikmesi, özellikle Na^+ 'un potasyum (K^+) ile hücresel taşıma sistemlerinde rekabete girmesi sonucu K^+ alımını düşürür. Sodyum iyonları, özellikle K^+ benzer iyonik özelliklere sahip olduğu için taşıyıcı proteinler aracılığıyla hücre içine taşınabilir; bu durum potasyumun alımını baskılar. Potasyum, osmotik denge, hücre içi pH regülasyonu, stomaların açılıp kapanması ve enzim aktivitesinin düzenlenmesi gibi birçok temel hücresel işlevde görev alır. Dolayısıyla, K^+ yetersizliği bitkide metabolik dengenin bozulmasına neden olur (Parida and Das 2005; Hernández 2019). Ayrıca, iyon toksisitesi nedeniyle Cl^- ve Na^+ iyonlarının hücrelerde birikmesi, enzim aktivitelerinde bozulmalara ve hücre zarlarında yapısal hasarlara da neden olur. Diğer taraftan toprakta biriken yüksek düzeydeki Na^+ ve Cl^- iyonları, bitkiler için hayati öneme sahip kalsiyum

(Ca⁺²) ve magnezyum (Mg⁺²) gibi diğer makro besin elementleri ile de rekabete girerek bu iyonların hücre içine alımını engeller. Kalsiyumun alımının engellenmesi, hücre duvarı ve zar bütünlüğü üzerinde olumsuz etkiler yaratır. Kalsiyum, plazma zarının yapısal stabilitesini ve seçici geçirgenliğini korumada önemli bir rol oynar. Bu iyonun eksikliği, zar geçirgenliğinin artmasına ve iyon sızıntılarının meydana gelmesine neden olur. Benzer şekilde, M⁺² eksikliği de klorofil sentezi ve ATP üretimi gibi yaşamsal süreçleri olumsuz etkiler. Yüksek düzeyde Na⁺ birikimi özellikle kök hücrelerinde toksik etki göstererek iyon homeostazını bozar. Bu durum, hücrede iyonik stresin yanı sıra oksidatif stresin de tetiklenmesine neden olabilir. Sodyumun hücre içinde birikmesi, hücre zarlarında yapısal hasara yol açarak membran lipidlerinin peroksidasyonuna (LPO) neden olur. Bu da hücre metabolizmasının düzenini bozar, enerji üretimini sekteye uğratar ve sonuç olarak bitkisel gelişim yavaşlar ya da tamamen durur. Tüm bu etkiler, bitkide fotosentez oranının düşmesine, protein sentezinin aksamasına ve genel fizyolojik canlılığın zayıflamasına neden olur. Bitkinin tuz stresine karşı dayanıklılığı ise büyük ölçüde iyon taşıma sistemlerinin etkinliği, antioksidan savunma mekanizmalarının gücü ve ozmotik düzenleme kapasitesine bağlıdır. Tuza toleranslı bitki türleri, genellikle sodyumu vakuollere hapsederek sitoplazmik iyon dengesini koruyan veya iyon seçici taşıyıcılar sayesinde zar geçirgenliğini düzenleyebilen türlerdir (Munns and Tester 2008; Yılmaz vd. 2011; Hernández 2019).

Tuz stresinin bitkisel gelişimi üzerindeki diğer etkileri çok yönlü olmakla birlikte, bu etkinin en belirgin biçimde gözlemlendiği süreçlerin başında fotosentez, enerji metabolizması ve buna bağlı enerji dönüşüm mekanizmaları gelir. Fotosentez, bitkilerde karbon fiksasyonunu sağlayan temel biyokimyasal süreç olması nedeniyle çevresel stres faktörlerinden doğrudan etkilenmektedir. Tuzluluk koşullarında, özellikle toprakta biriken Na⁺ ve klor Cl⁻ iyonlarının neden olduğu iyonik stres, hücre içinde iyon homeostazisini bozarak kloroplastların yapısal ve işlevsel bütünlüğünü olumsuz yönde etkiler (Kunz *et al.* 2024). Bu durum, klorofil biyosentezini inhibe etmekte ve klorofil içeriğinde ciddi düşümlere neden olmaktadır. Bitkideki klorofil kaybı, doğrudan fotosistem II (PSII) aktivitesini azaltarak net fotosentez hızını düşürür (Chauhan *et al.* 2023; Wang *et al.* 2024). Tuz stresi koşullarında aynı zamanda stoma açılıp-kapanması da önemli ölçüde olumsuz etkilenir. Stomaların kapanması, transpirasyon oranını düşürerek su kaybını minimize etmeye yönelik bir adaptif tepki olsa da, bu durumun sonucu olarak CO₂ alımında kısıtlanma meydana gelir (Chauhan *et al.* 2023). CO₂ alımındaki azalma, Calvin döngüsünde kullanılan substrat miktarının düşmesine ve dolayısıyla karbon fiksasyonunun yavaşlamasına neden olur. Ayrıca stoma kapanması, hücre içi su potansiyelini etkileyerek turgor basıncında düşüşe yol açar. Turgor

basıncının azalması, hücre genişlemesi ve stomatal hareketliliğin mekanik olarak sınırlandırılması gibi dolaylı etkiler de yaratarak fotosentetik verimliliği düşürür. Fotosentezde meydana gelen bu bozulmalar yalnızca karbon fiksasyonu sürecini değil, aynı zamanda fotofosforilasyon yoluyla ATP ve NADPH üretimini de etkiler. Bu iki molekül, fotosentezin ışığa bağımlı reaksiyonlarında sentezlenmekte ve Calvin döngüsünün temel enerji kaynağı olarak görev yapmaktadır. ATP ve NADPH üretiminde meydana gelen düşüş, şeker ve nişasta sentezini baskılar ve bu da bitkinin hem kısa vadeli enerji ihtiyacını hem de uzun vadeli karbon rezervlerini (yedek besin) ciddi şekilde azaltır. Özellikle kaynak-yük dengesinin bozulması, bitkide büyüme ve gelişmenin tüm aşamalarında metabolik ve fizyolojik aksaklıklara yol açar (Yılmaz vd. 2011; Yang *et al.* 2020; Chauhan *et al.* 2023).

Tuz stresi mitokondriyal enerji metabolizmasını da olumsuz etkiler. Bitki hücrelerinde solunum, özellikle glukoz gibi organik bileşiklerin potansiyel enerjilerini oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP'ye dönüştürülmesini sağlar. Ancak yüksek tuz konsantrasyonu, mitokondrilerin membran potansiyelini bozarak elektron taşıma zincirinde (ETS'de) kaçaklara neden olur ve ATP üretiminde verim kaybına yol açar. Buna bağlı olarak tuz stresi altında mitokondride ROS üretimi artar; bu da oksidatif zarara ve mitokondriyal enzimlerin inaktivasyonuna neden olarak enerji metabolizmasını daha da bozar. Bu tür bir enerji açığı, özellikle meristematik dokular gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerde hücre bölünmesini ve farklılaşmasını engelleyerek bitki gelişimini sekteye uğratar (Jacoby *et al.* 2011). Enerji dönüşüm süreçlerindeki bu bozulmalar, bitkinin tüm fizyolojik sistemleri üzerinde domino etkisi yaratır. Örneğin, şeker üretimindeki azalma, sinyal iletimi ve hormon sentezi gibi birçok enerjiye bağımlı süreçte aksamalara neden olurken; nişasta birikiminin yetersizliği, bitkinin stres sonrası toparlanma yeteneğini sınırlayabilir. Ayrıca ATP yetersizliği, iyon taşınımı ve ozmotik düzenleme gibi aktif transport mekanizmalarının verimsiz çalışmasına neden olur. Bu da tuz stresine karşı geliştirilmesi gereken osmotik adaptasyon ve iyon detoksifikasyon stratejilerinin başarısız kalmasına zemin hazırlar (Yılmaz vd. 2011; Che-Othman *et al.* 2017; Hasanuzzaman *et al.* 2021).

Tuz stresi, bitkilerde ozmotik dengesizlik, iyon toksisitesi ve besin alımında bozulmalara neden olmanın yanında temelde ve en önemlisi de reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde artışa neden olarak oksidatif stresin ortaya çıkmasına zemin hazırlar. Oksidatif stres, hücre içi metabolik dengenin bozulması sonucu ROS'ların birikmesiyle ortaya çıkar. Normal fizyolojik koşullar altında düşük seviyelerde üretilen ROS, fotosentez, solunum ve hücrel savunma gibi temel metabolik süreçlerde rol oynar. Ancak stres koşullarında ROS üretimi kontrolsüz şekilde artarak bitkisel dokularda biyolojik makromoleküller üzerinde

toksik etkiler göstermeye başlar. En yaygın ROS bileşenleri arasında süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve singlet oksijen (1O_2) bulunmaktadır. Bu moleküller, özellikle kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi enerji metabolizmasında aktif rol alan organellerde yoğun miktarda üretilir (Yılmaz vd. 2011; Hasanuzzaman *et al.* 2021).

ROS birikimi, hücre içi temel biyomoleküller olan proteinler, lipidler, karbohidratlar ve nükleik asitler üzerinde geri dönüşümlü olmayan oksidatif hasarlar oluşturabilir. Proteinlerde amino asit kalıntılarının oksidasyonu ve enzimatik işlevin kaybı, hücre metabolizmasının etkinliğini azaltırken, lipid peroksidasyonu (LPO) ile hücre zarlarının geçirgenliğini bozarak hücre bütünlüğünü bozar. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengin olan hücre zar lipidlerinin ROS ile reaksiyona girmesi sonucunda ortaya çıkan malondialdehit (MDA) gibi bileşikler, hücre için toksik birikimlere yol açmaktadır. Ayrıca DNA üzerinde baz modifikasyonları, zincir kırıkları gibi mutasyonlar meydana gelerek genetik stabilitenin bozulmasına neden olur. RNA moleküllerinin oksidatif modifikasyonu ise translasyon verimliliğini düşürerek protein sentezini sekteye uğratabilir. Karbohidratlar, özellikle hücre duvarı bileşenleri olan selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi polisakkaritler de ROS etkisiyle bozulmaktadır. Bu durum, hücre duvarının mekanik dayanıklılığını ve savunma kapasitesini zayıflatarak bitkiyi biyotik stres ajanlarına karşı açık hedef yapar (García-Caparrós *et al.* 2019; Kesawat *et al.* 2023).

Bitkiler, oksidatif stresle başa çıkabilmek amacıyla çok katmanlı bir savunma sistemi bulundurlar. Bu sistem genel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki grup altında incelenir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbik peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) gibi enzimler, ROS'un daha az reaktif veya zararsız bileşiklere dönüştürülmesinde görev alır. Bununla birlikte askorbik asit (vitamin C), glutatyon (GSH), tokoferoller (vitamin E), flavonoidler ve fenolik bileşikler gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da doğrudan ROS ile etkileşerek zararlı etkilerin önüne geçmeye çalışır. Ancak stresin şiddeti ve süresi arttığında, antioksidan sistemlerin kapasitesi aşılabilmekte ve hücre düzeyinde geri dönüşü olmayan hasarlar meydana gelmektedir. Günümüzde bitki moleküler biyoteknoloji alanında yapılan çalışmalar, antioksidan savunma sistemlerinin genetik olarak iyileştirilmesi yönünde önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Özellikle antioksidan enzimlere ait genlerin aşırı ekspresyonu, ROS birikiminin kontrol altına alınmasını ve bitkilerin stres toleransının artırılmasını sağlayabilmektedir. Transgenik bitki çalışmalarında daha güçlü SOD, CAT ve APX gibi protein genlerinin bitkilere kazandırılmasıyla, tuz stresine karşı daha

dirençli bireyler elde edildiği gösterilmiştir (Yılmaz vd 2011; García-Caparrós *et al.* 2019; Kesawat *et al.* 2023). Örneğin pirinç bitkisinde bakteriyel kökenli bir SOD geninin ekspresyonu ile klorofil içeriği ve biyokütle üretiminde önemli artışlar belirlenmiştir (Guan *et al.* 2017).

Tuz stresine bağlı olarak meydana gelen metabolik ve fizyolojik bozulmalar yalnızca bireysel bitki düzeyinde değil, tarımsal üretim sistemleri üzerinde de ciddi etkiler oluşturur. Özellikle buğday, pirinç, mısır gibi tahıllar; nohut, mercimek gibi baklagiller ve yonca, fiğ gibi yem bitkileri gibi ekonomik önemi yüksek türlerde tuzluluk kaynaklı verim kayıpları gıda üretimini doğrudan tehdit eden bir unsur hâline gelmiştir (El Sabagh *et al.* 2021; Kumar *et al.* 2022). Bunun yanında tuz stresi, sadece verimi değil, ürün kalitesini, protein ile yağ içeriğini ve besin değerini de olumsuz yönde etkileyerek tüketiciye ulaşan ürünün niteliğini düşürmektedir. Ayrıca bitkilerde stres toleransına bağlı olarak görülen gelişimsel gecikmeler, hasat süresini uzatarak üretim döngülerini sekteye uğratmaktadır. Bu olumsuzluklara ek olarak, tarımsal faaliyetlerin sürdürüldüğü toprak sistemleri de tuz birikiminin etkilerinden ciddi şekilde zarar görmektedir (Kumar *et al.* 2022; Atta *et al.* 2023).

Tuz stresine maruz kalan bitkiler, bu olumsuz çevresel koşulları tolere edebilmek ve hayatta kalma şanslarını artırabilmek için çok yönlü morfolojik, fizyolojik ve moleküler adaptasyon mekanizmaları bulundurlar. Bu adaptasyon stratejileri genel olarak üç temel başlık altında toplanabilir. Bunlar, osmotik uyumun sağlanması, iyon homeostazisinin korunması ile tuzun bölgesel izolasyonu ve antioksidan savunma sistemlerinin aktive edilmesidir. Bu mekanizmaların her biri, bitkinin metabolik, hücresel ve dokusal düzeyde bütünlüğünün sürdürülmesini, metabolik dengesinin korunmasını ve büyüme-gelişme faaliyetlerine devam edebilmesine katkıda bulunur. İlk savunma hattı olan osmotik uyum, hücre içi su dengesinin korunmasını hedefler (Gill *et al.* 2010). Tuz stresine bağlı olarak dış ortamın su potansiyelinin düşmesi, hücrelerin su kaybetmesine neden olur. Bitkiler bu durumu telafi edebilmek için, prolin, glisin-betain, mannitol ve trehaloz gibi küçük molekül, yüksek çözünürlüklü osmotik düzenleyicileri (ozmolitler) sentezler. Bu bileşikler yalnızca su dengesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda proteinlerin üç boyutlu yapılarının korunmasında, enzimlerin denatürasyona karşı stabilize edilmesinde ve zar bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynar (Hasanuzzaman *et al.* 2021; Atta *et al.* 2023). Özellikle prolinin hem osmotik stresin etkilerini azaltmada hem de ROS birikimini baskılamada görev aldığı bilinmektedir. Prolin düzeyindeki artışın aynı zamanda antioksidan enzim aktiviteleriyle de korelasyon gösterdiği araştırmalarla desteklenmektedir (Hasanuzzaman *et al.* 2021; Atta *et al.* 2023). İkinci savunma stratejisi olan iyon homeostazisi ve tuzun bölgesel

izolasyonu, sitoplazmik iyon dengesinin düzenlenmesine odaklanır. Tuz stresi altında özellikle Na⁺ iyonlarının sitoplazmada birikimi, birçok biyokimyasal süreci sekteye uğratarak hücrel toksisiteye yol açar. Bu toksik etkiyi azaltabilmek için bitkiler, Na⁺ iyonlarını aktif taşıma yoluyla vakuoller içerisine hapseder. Bu mekanizmada görev yapan başlıca taşıyıcılar, tonoplast (vakuol) üzerinde bulunan Na⁺/H⁺ antiport taşıyıcı proteinleridir. Bunlar, Na⁺ iyonlarını proton (H⁺) değişimi yoluyla vakuole taşıırken, aynı zamanda sitoplazmanın pH dengesinin korunmasına katkı yapar. Bununla birlikte kök hücrelerinde yer alan SOS (Salt Overly Sensitive) yolakları da iyon toksisitesine karşı kritik öneme sahiptir. SOS1 taşıyıcısı, Na⁺ iyonlarını hücre dışına atarak hücrel Na⁺ yükünü azaltırken; SOS2 ve SOS3 protein kinazları bu süreci düzenleyici moleküller olarak görev yapar. Potasyumun korunması da bu süreçte büyük önem taşır çünkü Na⁺/K⁺ oranı, hücrelerin iyonik denge ve enzim aktivitesi açısından kritik parametrelerinden biridir (Mittler 2002; Zhu 2001; Parida and Das 2005). Tuz stresine karşı geliştirilen üçüncü ana adaptasyon mekanizması, antioksidatif savunma sistemlerinin aktive edilmesidir. ROS birikiminin neden olduğu oksidatif stres, yukarıda belirtildiği üzere hücrel yapılarda ciddi hasarlara neden olmaktadır. Bitkiler bu zararı minimize edebilmek amacıyla bir dizi antioksidan enzim üretir. SOD, süperoksit anyonlarını H₂O₂'e dönüştürerek oksidatif zincirin ilk halkasında görev alır. CAT ve APX gibi enzimler ise H₂O₂'yi daha az zararlı bileşiklere parçalayarak hücre içi ROS dengesini düzenler. Ayrıca peroksidaz (POD) enzimleri, hücre çeperinde lignin sentezi gibi yapısal savunma süreçlerinde de yer almakta ve stres tepkisine önemli bir yanıt oluşturmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında yer alan fenolik bileşikler, flavonoidler, karotenoidler ve askorbik asit (ASA) gibi bileşikler de ROS'larla doğrudan etkileşime girerek zararları azaltmaktadır. Bu bileşiklerin çoğu aynı zamanda sinyal iletiminde rol oynayarak gen ekspresyon düzenlemelerinde de görev alır (Miller *et al.* 2010; Hasanuzzaman *et al.* 2021; Kesawat *et al.* 2023).

Tarımsal topraklarda aşırı tuzlanma, toprak mikrobiyal çeşitliliğini azaltmakta, faydalı mikroorganizmaların yaşam potansiyellerini sınırlamakta ve simbiyotik ilişkileri zayıflatmaktadır. Buna ilave olarak toprak tekstürünün yapısı bozulmakta, su geçirgenliği düşmekte ve toprak havalanması engellenmektedir. Tuzluluk sorununun yaygınlaşmasında insan kaynaklı etkenlerin payı büyüktür. Yanlış sulama uygulamaları, özellikle kapalı drenaj sistemlerinin yetersizliği, yer altı sularının kontrolsüz kullanımı ve geri dönüşümlü sulama sularının tuz içeriği açısından denetlenmemesi, toprak tuzluluğunun artmasında başlıca faktörler arasında yer alır (Stavi *et al.* 2021). Bu nedenle, sürdürülebilir tarım uygulamaları kapsamında tuzlu toprakların ıslahı ve yönetimi, yalnızca ekolojik değil, aynı zamanda

ekonomik ve sosyal boyutları da olan kritik bir konudur. Bu çerçevede son yıllarda önerilen stratejiler arasında, biyolojik çözümler olarak örneğin bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR), biyostimülanlar (örneğin humik ve fulvik asitler, deniz yosunu ekstraktları, amino asit kompleksleri) ve moleküler/genetik ıslah yaklaşımlar bulunur. Bu stratejilerin tarım sistemlerine entegrasyonu, hem bitki stres toleransının artırılması hem de toprak sağlığının korunması açısından çok yönlü faydalar sağlayabilir. Böylece sürdürülebilir tarım hedeflerine ulaşılması ve gıda güvencesinin sağlanması yönünde önemli katkılar sunulabilir (Emilia *et al.* 2020; Ma *et al.* 2022; Hernández-Canseco *et al.* 2022; AbuQamar *et al.* 2024).

Baklagiller (Fabaceae) familyasına ait yem bitkileri, yalnızca hayvan beslenmesi açısından değil; aynı zamanda toprak-su dengesinin korunması, biyolojik azot fiksasyonu ve toprak verimliliğinin artırılması gibi ekolojik işlevleri bakımından da büyük önem taşımaktadır (Yüzbaşıoğlu 2021). Bu bağlamda, yonca (*Medicago sativa L.*), yüksek protein içeriği ve zengin mineral ile vitamin miktarı sayesinde, dünya genelinde en yaygın yetiştirilen ve "Yemlerin Kraliçesi" olarak adlandırılan bir baklagil yem bitkisidir (Brahmbhatt and Kalasariya 2015; Galindo-Sotomonte *et al.* 2023). Yonca, yalnızca hayvansal üretimde temel bir yem kaynağı olmakla kalmayıp aynı zamanda yüksek biyokütle verimi, geniş adaptasyon kapasitesi, hastalıklara karşı doğal direnci, toprağın yapısını iyileştirici etkisi ve ekosistem hizmetleri bakımından da değerli bir bitkidir (Wu 2004; Brahmbhatt and Kalasariya 2015). Bununla birlikte, günümüzde artan insan faaliyetleri, iklim değişikliği, meraların bakımsızlığı ve tarım alanlarında yem bitkilerinin payının yetersiz düzeyde kalması, özellikle Türkiye gibi ülkelerde hayvansal üretimi ciddi biçimde tehdit etmektedir (Ülker *et al.* 2020). Çok yıllık bir yem bitkisi olan yonca, biyolojik azot fiksasyon kapasitesi ve toprak iyileştirme özellikleri sayesinde tarım sistemlerinde kritik rol oynamaktadır. Ancak çimlenme ve erken fide gelişimi evrelerinde tuz stresine karşı oldukça hassastır. Tuzlu koşullarda stoma kapanması, klorofil bozulması, iyon birikimi ve turgor basıncındaki düşüş gibi fizyolojik etkiler, yonca gelişimini önemli ölçüde kısıtlamaktadır (Yılmaz vd. 2011; Özkurt *et al.* 2019).

Bitkiler, stresli çevresel koşullara karşı geliştirdikleri doğal adaptasyon mekanizmaları aracılığıyla hayatta kalma mücadelesi verirler. Yukarıda bu mekanizmalar temel olarak üç ana başlık altında incelemiştik (ozmotik uyum, iyon homeostazisinin sağlanması ile toksisitenin azaltılması ve antioksidan savunma sistemlerinin etkinleştirilmesi). Ancak bitkide bu doğal savunma mekanizmalarının sınırlı etkinliği göz önüne alındığında, modern tarım uygulamalarında bitkiyi dışsal destekleyici stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. İşte bu noktada, bitki-mikrop etkileşimleri temeline dayanan faydalı mikrobiyal uygulamalar, sürdürülebilir ve

etkili çözümler sunarak bitki stres toleransını artırmada önemli bir rol oynamaktadır (Emilia *et al.* 2020; Ma *et al.* 2022).

Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR), konak bitki üzerinde çok çeşitli etkilere sahip olan ve birçok tarım ürününün büyüme ve verimini artırma yeteneğine sahip çeşitli bir bakteri grubudur. PGPR'lerin bu bağlamda sunduğu avantajlar sadece tarımsal üretimin miktarını değil, aynı zamanda kalitesini de artırmakta; bitki sağlığı, toprak verimliliği ve mikrobiyal denge üzerinde olumlu etkiler sağlamaktadır. PGPR, bitki kök çevresinde kolonize olarak büyümeyi teşvik eden ve stres toleransını artırır (Olivares *et al.* 2017). PGPR bakterileri; indol-3-asetik asit (IAA), gibberellin ve sitokin gibi büyüme hormonlarının üretimi, 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) deaminaz aktivitesi ile etilenin azaltılması, siderofor üretimi, azot fiksasyonu ve fosfat çözünürlüğünün artırılması gibi mekanizmalarla tuz stresine karşı bitkileri desteklemektedir (Kang *et al.* 2014; Egamberdieva *et al.* 2017; Kumawat *et al.* 2023; Atıcı *et al.* 2025). Aynı zamanda, bazı bakteriler Na⁺ iyonlarının köklere alınımını ve birikimini sınırlandırarak iyon toksisitesini azaltmakta ve antioksidan enzim sistemlerini aktive etmektedirler. PGPR kapsamındaki bakteriyel gruplara ek olarak, son yıllarda faydalı fungusların da bitki stres toleransında önemli bir rol üstlendiği ortaya konmuştur. Özellikle arbusküler mikoriza fungusları (AMF) ve endofitik funguslar (ENF), bitki-mikroorganizma simbiyozunun temel aktörleri arasında yer alır. AMF'ler (örneğin *Glomus intraradices* ve *Rhizophagus irregularis* gibi), bitki köklerine penetre olarak eksternal hif ağı aracılığıyla toprakta bulunan su ve mineral besin elementlerin (özellikle P, Zn, K ve Ca) alınımını artırmakta ve tuz stresine karşı toleransın artmasını sağlamaktadır (Porcel *et al.* 2012; Evelin *et al.* 2009). AMF-mikorizal ilişkiler, kök hücrelerinde iyon taşınımını regüle eden genlerin ekspresyonunu değiştirerek Na⁺ birikiminin sınırlandırılmasına da katkı sağlar. Endofitik funguslar (örneğin *Trichoderma harzianum* ve *Piriformospora indica*) ise bitki dokularına zarar vermeksizin yerleşen ve sistemik fayda sağlayan mikroorganizmalardır. Bu funguslar, hücre içi ROS seviyelerini düşürerek antioksidan sistemleri modüle etmekte; büyüme hormonları sentezleyerek stres kaynaklı büyüme üzerindeki baskıyı azaltmaktadır (Zhang *et al.* 2019; Liu *et al.* 2020). Aynı zamanda, *Trichoderma* türlerinin rizosferde biyofilm oluşturarak kök sistemini tuzlu koşullara karşı fiziksel ve kimyasal olarak koruduğu gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2019). Örneğin, yonca bitkisi, *Sinorhizobium meliloti* ile kurduğu simbiyotik ilişki sayesinde atmosferik azotu fiksleyerek, dışsal azot girdi ihtiyacını azaltır. Ancak tuzlu koşullar, hem nodül oluşumunu hem de nitrojenaz enzimi aktivitesini olumsuz etkileyerek azot fiksasyon verimliliğini düşürmektedir (Ibragimova *et al.* 2006; Al-Barakah *et al.* 2014). Bu veriler

değerlendirildiğinde, PGPR bakterileri ve mikorizal funguslarının eşzamanlı uygulanması, bitki büyüme ve gelişmesini destekleyebileceği öngörülebilir. Örneğin, mikoriza-yonca etkileşimleri sırasında oluşan hormonal düzenlenme, *Rhizobium* kolonizasyonunu kolaylaştırmakta ve bunun sonucu olarak karbon metabolizması ve protein sentezini desteklemektedir (Bonfante and Genre 2010; Olson *et al.* 2022). Konsorsiyum uygulamaları, yalnızca büyümeyi artırmakla kalmaz, aynı zamanda bitkisel bağışıklık sistemini aktive ederek abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılığı önemli ölçüde artırır. Bu kombinasyonlar, enzimatik antioksidan aktivitelerin artışı (SOD, CAT ve GPX gibi), LPO seviyesinin azalması, iyon taşıma proteinlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi ve ozmotik denge moleküllerinin sentezlenmesi gibi çok sayıda biyokimyasal ve moleküler süreci tetikleyebilmektedir (Hasanuzzaman *et al.* 2020; Gülmez *et al.* 2023; Atıcı *et al.* 2025).

PGPR'lerin tuz stresine maruz kalan bitkilerde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde olumlu etkilere neden olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Evelin *et al.* 2009; Hasanuzzaman *et al.* 2020; Gülmez *et al.* 2023; AbuQamar *et al.* 2024; Atıcı *et al.* 2025). Özellikle *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* gibi cinslere ait PGPR suşlarının, tuzlu ortamlarda bitkilerin büyüme performansını ve stres toleransını artırdığı bilinmektedir. Bu bakteriler; IAA üretimi, siderofor salgılanması, ACC deaminaz aktivitesi ile stres kaynaklı etilen üretiminin azaltılması, osmotik dengeyi sağlayan çözünür şekerlerin ve prolin gibi osmolitlerin sentezinin artırılması gibi çeşitli mekanizmalar üzerinden etkili olmaktadır (Raheem and Ali 2015; Olivares *et al.* 2017; Egamberdieva *et al.* 2019; Bhise *et al.* 2017). Nitekim Han vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 suşunun yonca bitkisine uygulanmasının, tuz stresi altında fotosentez kapasitesini ve antioksidan savunma düzeyini artırdığı bildirilmiştir. Bitkilerde antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, APX gibi) aktivitesinin bu uygulama sonucunda arttığı; buna karşılık LPO'nun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bakteriyel inokulasyonun oksidatif stresi hafiflettiğini göstermektedir. Bununla beraber Raheem vd. (2015) ve Yang vd. (2020) de farklı bitki türlerinde yaptıkları çalışmalarla PGPR'lerin, tuzlu ortamlarda iyon homeostazının korunmasında ve osmotik stresin yönetilmesinde etkin rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu bakterilerin Na^+/K^+ oranını düzenleyerek sodyum toksisitesini sınırladıkları ve aynı zamanda hücre zarlarının stabilitesini korudukları rapor edilmiştir. Son yapılan bir çalışmada, yabani halofit bitkilerden izole edilen halotolerant rizobakterilerin mısır (*Zea mays* L.) tohumlarına inokulasyonu, bitkilerin tuz stresine karşı fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar çalışmada, doğal tuzlu ortamlarda (Tuz Gölü) yaşayan

bitkilerin rizosferinden elde edilen bakteriyel izolatların, mısır fidelerinde tuz stresi altında büyüme performansını artırdığı ve antioksidan savunma sistemleri gibi stres toleransını destekleyen mekanizmaları ve iyon düzenlemesini olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (Atıcı *et al.* 2025).

PGPR'lerin etkileri yalnızca antioksidan sistem ve iyon dengesinin korunmasıyla sınırlı kalmayıp, bitki savunma sistemlerini sistemik olarak aktive etmeleri bakımından da önem arz etmektedir. Örneğin, bazı bakteriyel suşlar tarafından indüklenen sistemik kazanılmış direnç (SAR), bitkinin hem abiyotik hem de biyotik stres koşullarına karşı önceden "hazırlıklı" olmasını sağlamaktadır (Van Loon 2007; Liu *et al.* 2010; Meena *et al.* 2020). Bu kapsamda, tuz stresine maruz kalan bitkilerde hücrel sinyal yollarının (örneğin MAPK ve jasmonat/etilen yolları) aktive edilmesi ile antioksidan enzimlerin transkripsiyonu ve stres tolerans genlerinin ekspresyonu artırılmaktadır. Bu biyolojik ajanların pratik tarımsal uygulamalarda kullanımı, sürdürülebilir tarım hedefleri doğrultusunda da büyük potansiyele sahiptir. Kimyasal gübre ve pestisitlerin neden olduğu toprak bozulmalarını azaltma açısından PGPR temelli biyogübrelerin kullanımı çevresel açıdan da avantaj sağlamaktadır. Özellikle tuzlu toprakların verimliliğini artırma, mikrobiyal çeşitliliği iyileştirme ve karbon ayak izini düşürme konularında PGPR'lerin önemli katkılar sunduğu bildirilmektedir (Etesami *et al.* 2018; Arora *et al.* 2020; Kumawat *et al.* 2023). Bununla birlikte, mevcut literatürde özellikle yonca (*M. sativa*) gibi stratejik yem bitkilerinde tuz stresi koşullarında PGPR uygulamalarının fizyolojik ve moleküler etkilerine yönelik yapılan çalışmalar sınırlıdır. Oysa bu tür bitkilerde gerçekleştirilecek detaylı çalışmalar, hem bitki-mikrobiyotik etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasını hem de biyoteknolojik uygulamalara yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (Olivares *et al.* 2017).

Son yıllarda, kimyasal gübre ve pestisit uygulamalarının neden olduğu toprak bozulması ve ekosistem tahribatı, alternatif biyolojik yaklaşımların önemini ön plana çıkarmıştır. Biyolojik teknikler, besin maddesi kullanım etkinliğini artırmak ve tarımsal üretimin çevresel ve ekonomik maliyetlerini azaltmak açısından umut verici bir yaklaşımdır. Bu kapsamda, humik asitler ve liken kökenli mikroorganizmalar gibi doğal biyostimülanlar, bitkilerin stres toleransını artırma potansiyeline sahip çevre dostu çözümler olarak değerlendirilmektedir. Bu uygulamalar, yalnızca bitkinin büyüme ve gelişmesini desteklemekle kalmamakta, aynı zamanda toprak sağlığını iyileştirerek mikrobiyal aktiviteyi artırmakta ve uzun vadeli verimliliğe katkı sağlamaktadır (Olivares *et al.* 2017; Tiwari *et al.* 2023; Gülmez *et al.* 2023).

PGPR'lerin bitkilere ulaştırılmasında çeşitli taşıyıcı materyaller kullanılmaktadır. Bunlar arasında etilselüloz, modifiye nişasta, karboksimetilselüloz, mısır nişastası, kitosan, aljinat, polimerik inokulantlar, vermikülit, perlit, kil peletleri, aktif karbon filtreleri, torrefiye edilmiş (ısıtılarak karbonsuzlaştırılmış) çim lifleri, kaolin, kil mineralleri, kil topraklar, tavuk gübresi, muz atıkları, atık su çamuru, lignin, mısır sapı, bira üretiminden arta kalan arpa lifleri, üzüm posası, mantar kompostu, torf, hindistan cevizi lifi/torfu, farklı hammaddelerden elde edilen kompostlar ve vermikompost kompostu, linyit, kömür, zamk (gum) ve talaş yer almaktadır. Tüm bu taşıyıcı materyaller Bashan vd. (2014) tarafından listelenmiştir ancak ilginç bir şekilde, humik maddelere doğrudan değinilmemiştir (Olivares *et al.* 2017).

Doğada doğal olarak oluşan humik maddeler (humik asitler), toprak, su ve tortulardaki organik maddenin başlıca bileşenidir. Kimyasal olarak, nanometre ölçeğinde hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla stabilize edilen, dinamik birliktelikler oluşturan, çeşitli ve nispeten düşük moleküler kütleyle sahip organik moleküllerden oluşan bir koleksiyon olarak tanımlanabilir. Genellikle sarıdan siyaha kadar değişen renklere sahiptirler ve yüksek moleküler ağırlığa sahiptirler (Akıncı 2011; Canellas *et al.* 2024). Humik maddeler, yapılarında hem aromatik olmayan kısımlar içeren hem de düzenli bir moleküler yapıya sahip olmalarından dolayı, onları belirli bir kimyasal formülle tanımlamak veya iyi tanımlanmış diğer organik bileşiklerle doğrudan karşılaştırmak genellikle mümkün değildir. Onlar, doğada yaygın olarak bulunan ve toprak, su gibi ortamlarda önemli rol oynayan kendine özgü bir organik madde grubunu temsil ederler. Humik maddeler, yapıları itibarıyla bakteriyel hücreleri ve kararsız organik molekülleri hidrofobik bölgelerinde bozunmaya karşı koruyabilirler (Spaccini *et al.* 2000 ve 2002). Bitki kökleri tarafından salgılanan organik asitler gibi maddelerin varlığı, bu supramoleküler yapıyı değiştirebilir ve bitki büyümesini etkileyebilecek biyoaktif moleküllerin salınımına neden olabilir. Örneğin mısırdaki humik madde uygulaması sonucu organik asit salgısının arttığı, gösterilmiştir (Canellas *et al.* 2008; Puglisi *et al.* 2008) ve bitki kökleri ile humik madde arasındaki etkileşim "cross-talk" olduğu ileri sürülmüştür (Nardi *et al.* 2017). İlave olarak, humik asitler, organik maddenin mikrobiyal ayrışması sonucu oluşan, yüksek moleküler ağırlıklı ve fonksiyonel grup açısından zengin bileşiklerdir. Bu nedenle, kimyasal ve fiziksel özellikleri diğer organik bileşikler gibi çok iyi tanımlanmamıştır. Humik maddeler, asit ve bazlardaki çözünürlüklerine göre üç ana gruba ayrılır: Humik asit, fulvik asit ve humin. Bu sınıflandırma, humik maddelerin kimyasal özellikleri ve reaktiviteleri açısından farklılıklar gösterdiğini yansıtır (Rupiasih and Vidyasagar 2005; Akıncı 2011). Fulvik asit, humik asitten daha küçük moleküler bir yapıya sahiptir, bu nedenle toprakta daha az kalıcıdır ve mikroorganizmalar tarafından daha kolay bir

şekilde ayrıştırılır. Huminler ise ne asitli ne de alkali ortamlarda çözünmeyen humik bileşiklerdir. Humik asit ise büyük moleküler ağırlığa sahiptir ve daha yavaş bir şekilde parçalanır. Bu nedenle, genellikle toprak uygulamalarında humik asitler tercih edilir. Leonardit, turba ve linyit gibi kaynaklardan elde edilen humik asit, toprak pH'sını dengeleyici, besin elementlerini şelatlayıcı ve su tutma kapasitesini artırıcı özellikleriyle öne çıkmaktadır. Ayrıca, humik asitlerin, stres koşullarında antioksidan enzim aktivitelerini artırarak bitkilerin oksidatif zarara karşı direncini yükselttiği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Canellas *et al.* 2024). Bununla birlikte, kök gelişimini uyarıcı etkileri sayesinde bitkilerin topraktan daha etkili su ve mineral alımı gerçekleştirmesi sağlanmaktadır. Humik maddelerin fizyolojik etkileri geniş çapta değerlendirilmiştir ve bu etkiler özetle; besin kullanım verimliliğini artırmak, makro ve mikro besin elementlerinin alımına yardımcı olmak ve karbon, azot ve ikincil metabolizmayı uyararak bitki büyümesini teşvik etmek şeklinde tanımlanmaktadır (Olivares *et al.* 2017).

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde humik asit uygulamalarının sağladığı koruyucu etkiler, birkaç temel biyolojik mekanizma üzerinden açıklanabilir. İlk olarak, ozmotik düzenleme açısından humik asit, bitkilerde su kaybının azaltılmasına yardımcı olan prolin, glisin betain ve trehaloz gibi osmolütlerin sentezini uyararak hücre içi su dengesinin korunmasını desteklemektedir. Bu bileşikler aynı zamanda proteinlerin denatürasyonunu önleyerek enzimatik aktivitelerin stabil kalmasına olanak sağlar. Böylece bitkiler, düşük su potansiyeline sahip tuzlu ortamlarda bile turgor basıncını sürdürebilmekte ve büyüme süreçlerine devam edebilmektedir. İkinci olarak, iyon homeostazı bağlamında humik bileşikler, özellikle Na⁺ iyonlarının kök hücrelerinden girişini sınırlayarak iyon toksisitesini azaltır. İlaveten K⁺, Ca⁺² ve Mg⁺² gibi hayati öneme sahip makroelementlerin taşınmasını ve alımını kolaylaştırarak, bitkisel metabolizmanın sürdürülebilirliğine katkı sağlar. Na⁺/K⁺ oranının optimal düzeyde tutulması, hücre zarlarının elektriksel potansiyelinin korunması ve metabolik reaksiyonların etkinliği açısından hayati role sahiptir. Bir diğer önemli etki, fotosentez süreçlerinin desteklenmesidir. Humik asitler, klorofil biyosentezini artırmakta ve fotosistem II'nin (PSII veya P680) aktivitesini iyileştirerek, tuz stresi nedeniyle baskılanan fotosentetik verimliliğin yeniden kazanılmasına yardımcı olur. Artan klorofil içeriği, yaprak yüzeyinde ışık soğurulmasını kolaylaştırmakta ve karbondioksit fiksasyonu kapasitesini yükseltmektedir. Bu sayede, tuz stresine bağlı olarak ortaya çıkan karbon metabolizması bozuklukları belirli ölçüde dengelenebilmektedir. Bunlara ilave olarak, oksidatif stresle mücadelede humik asitler önemli katkılara sahiptir. Tuz stresi, bitki hücrelerinde ROS birikimine yol açarak lipid, protein ve DNA gibi temel biyomoleküllerde ciddi hasarlara

neden olur. Humik asit uygulamaları, bu tür biyomolekülleri zararlara karşı bitkinin doğal antioksidan savunma sistemlerini aktive etmektedir. SOD, CAT, POD ve APX gibi başlıca antioksidan enzimlerin aktivitelerinin artması, ROS'ların toksik etkilerini sınırlayarak hücrel bütünlüğün korunmasına yardımcı olur. Ayrıca fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi enzim dışı antioksidan bileşenlerin sentezini de destekleyerek genel savunma kapasitesini artırır. Humik asitlerin bu çok yönlü biyolojik etkileri, yalnızca stres altında bitki sağlığını desteklemekle kalmaz, aynı zamanda toprak yapısının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini de iyileştirerek uzun vadeli tarımsal verimliliğin temelini oluşturur. Artan organik madde içeriği, toprak mikrobiyal biyotasını zenginleştirerek simbiyotik etkileşimleri teşvik eder; böylece sürdürülebilir tarım uygulamaları için elverişli bir mikro-çevre oluşur (Kang *et al.* 2014; Olivares *et al.* 2017; Canellas *et al.* 2024).

Özellikle tarımsal üretimin temelini oluşturan türlerde (yonca, buğday ve domates gibi) yapılan çalışmalar, humik asit ve PGPR uygulamalarının fotosentez oranlarını artırdığını, stomatal açıklığı koruduğunu ve antioksidan savunma sistemlerini aktive ettiğini göstermektedir (Olivares *et al.* 2017; Lucas *et al.* 2023; Gülmez *et al.* 2023; Canellas *et al.* 2024; Atıcı *et al.* 2025). Buna karşılık, son zamanlarda yapılan sınırlı sayıda araştırma, liken kökenli mikroorganizmaların da bitki stres cevabında önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Likenler, alg/siyanobakteri ile fungus arasındaki simbiyotik birlikten oluşan organizmalardır ve ekstrem çevresel koşullarda hayatta kalabilmeleriyle dikkat çekerler. Bu dayanıklılığın ardında, sahip oldukları zengin mikrobiyal çeşitlilik ve güçlü metabolik esneklik yatmaktadır (Bianchi *et al.* 2019; Gülmez *et al.* 2023; Li *et al.* 2024; Patil and Gore 2025). Likenlerden izole edilen bazı endofitik mikroorganizmaların, PGPR benzeri özellikler göstererek bitki gelişimini desteklediği, iyon toksisitesini azalttığı ve ozmotik stresle baş etmede rol oynadığı belirlenmiştir (Gülmez *et al.* 2023; Li *et al.* 2024; Patil and Gore 2025). Ancak mevcut literatür incelendiğinde, özellikle yonca gibi yüksek ekonomik değere sahip yem bitkilerinde humik asit ve liken kökenli mikroorganizmaların sinerjik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmamaktadır. Bu bağlamda, yapılacak yeni araştırmalar hem bitki-mikrobiyotik etkileşimlerinin anlaşılması hem de iklim değişikliğine karşı dirençli üretim sistemlerinin geliştirilmesi açısından bilimsel ve pratik anlamda önemli katkılar sağlayacaktır.

Yukarıda ifade edildiği gibi humik asit, toprağın fiziksel ve kimyasal yapısını iyileştiren, bitki besin maddelerinin alımını kolaylaştıran ve mikroorganizma faaliyetlerini destekleyen önemli bir organik maddedir. Likenler ise ekstrem çevre koşullarında hayatta kalabilme yetenekleri sayesinde, özellikle tuzlu koşullarda mikrobiyal çeşitliliğin artırılması

ve bitki-mikroorganizma etkileşimlerinin güçlendirilmesi açısından dikkate değerdir. Bu iki faktörün birlikte kullanımı, bitki büyümesi, stres toleransı ve toprak mikrobiyal dinamikleri üzerinde sinerjistik bir etki oluşturabilir. Öncelikle, toprak yapısının iyileştirilmesi ve mikrobiyal çeşitliliğin artırılması bakımından bu sinerji oldukça değerlidir. Humik asit, toprağın agregasyonunu teşvik ederek su tutma kapasitesini artırmakta, aynı zamanda pH düzenlemesi ve katyon değişim kapasitesini yükselterek toprakta daha elverişli bir mikrohabitat yaratmaktadır (Tiwari *et al.* 2023). Bu ortam, liken kaynaklı mikroorganizmaların-özellikle antimikrobiyal bileşikler üretebilen mantar türleri ve azot fiksasyonu yapabilen siyanobakterilerin-kök çevresinde daha kolay kolonize olmasını sağlar. Böylece, toprakta mikrobiyal çeşitliliğin artması yoluyla ekosistem işlevselliği güçlendirilir. İkinci olarak, bitki kök gelişiminin teşvik edilmesi, bu kombinasyonun sağladığı bir başka avantajdır (Olivares *et al.* 2017). Humik asit, kök sisteminin uzamasını ve lateral kök oluşumunu destekleyen büyüme hormonlarının (IAA gibi) üretimini tetiklerken; liken kökenli mikrobiyal simbiyozlar, bitki köklerinde koloni oluşturarak kök yüzey alanını artırır ve bitki ile toprak arasındaki besin alışverişini hızlandırır. Ayrıca, bu mikroorganizmaların siderofor üretimi sayesinde demir gibi sınırlı elementlerin bitki tarafından alımı kolaylaşır. Üçüncü olarak, tuzlu ortamlarda besin alımının optimize edilmesi, humik asit ve liken mikroorganizmalarının birlikte uygulandığı sistemlerde daha etkili bir şekilde gerçekleşir. Humik asit, Na^+ iyonlarının taşınmasını sınırlarken K^+ , Ca^{+2} ile Mg^{+2} gibi temel makroelementlerin bitki tarafından daha etkin bir şekilde alınmasına aracılık eder. Liken mikroorganizmaları ise, özellikle siyanobakteri içeren türler aracılığıyla azot fiksasyonu yaparak bitkiye biyoyararlı azot sağlar (Olivares *et al.* 2017). Bunun yanı sıra, bazı liken endofitlerinin fosfat çözündürme kapasitesine sahip olduğu da gösterilmiştir (da Silva *et al.* 2022), bu da fosforun kullanılabilirliğini artırarak kök gelişimini ve enerji metabolizmasını destekler. Diğer taraftan, stres esnasında ROS üretiminin azaltılması ve hücresel bütünlüğün korunması, bu sinerjinin önemli bileşenlerinden biridir. Tuz stresi, bitki hücrelerinde oksidatif stres düzeylerini artırarak zar hasarına ve enzim denatürasyonuna neden olur (Parida and Das 2005). Yukarıda ifade edilen bilgiler ışığında, bizim hipotezimiz, bir kombinasyon halinde uygulandığında humik asidin bitkide antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT ve POD) regüle ederek tuz toksisitesi zararlarını sınırlayabilir ve liken mikroorganizmaları tarafından salgılanan polifenoller, polisakkaritler ve antioksidan bileşikler de hücresel ROS birikimini baskılayabilir. Bu durum, bitki hücrelerinin bütünlüğünü koruyarak fizyolojik süreçlerin devamlılığını sağlayabilir. Ancak, bu alandaki bilimsel çalışmalar hâlen sınırlı düzeyde olup, kontrollü deneyler ve saha uygulamaları yoluyla etkinliğinin daha ayrıntılı biçimde ortaya konulması gerekmektedir. Özellikle, Web of Science'da liken kökenli mikroorganizmalar ve

humik asit kombinasyonunu içeren başka çalışmalar aradık ancak kapsamlı bir literatüre ulaşamadık.

Humik asidin mikrobiyal yollarla parçalanarak organik karbonun yeniden kullanıma sunulması, toprak ekolojisi açısından da kritik bir süreçtir. Özellikle bakteriler ve bazı mantar türlerinin humik ve fulvik asitleri parçalayabildiği, çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Olivares *et al.* 2017). Örneğin *Streptomyces rochei* gibi aktinomisetlerin humik maddeleri biyolojik olarak dönüştürebildiği ve bu süreçte bitki gelişimini destekleyici metabolitler üretebildiği gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2024a). İlave olarak, anaerobik koşullarda yaşayan bazı bakteriler, örneğin *Clostridium* türleri, humik maddeleri karbon kaynağı olarak kullanabilmekte, bu da humik asitlerin mikrobiyal dönüşüm potansiyelini daha da genişletmektedir (Ueno *et al.* 2016). Bilindiği gibi likenler, bir alg (veya siyanobakteri) ile mantarın oluşturduğu simbiyotik organizmalardır. Likenleri oluşturan mikrosimbiyotların, özellikle mantar partnerin, saprotrofik özellikler taşıdığı ve kompleks organik maddeleri parçalama kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, likenlerin de humik veya fulvik asitleri doğrudan ya da dolaylı yollarla karbon kaynağı olarak kullanabilme potansiyeline sahip olabilecekleri bir hipotez olarak öne sürülebilir. Ancak mevcut literatürde, likenlerin bu maddeleri doğrudan parçaladığını veya metabolize ettiğini açıkça ortaya koyan spesifik çalışmalar sınırlıdır. Bu boşluk, yeni yapılacak olan deneysel araştırmalar için önemli bir fırsat sunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, humik asit ile liken kökenli mikroorganizmaların (bakteri ve mantar) sinerjik etkilerini inceleyerek, tuz stresine maruz kalan yonca (*Medicago sativa* L. cv. Konya) bitkisinin tuz stresine fizyolojik ve biyokimyasal yanıtları üzerindeki potansiyel etkilerini ortaya koymaktır. Bu iki biyolojik ajanın humik asit ile birlikte kullanımı, özellikle tuzlu toprak koşullarında bitki büyümesini destekleme ve iyon dengesini sağlama açısından alternatif ve sürdürülebilir bir yaklaşım sunabilir. Bu bağlamda çalışma, bitki-mikroorganizma etkileşimleri temelinde, biyogübre ya da biyostimülant potansiyeli taşıyan doğal çözümlerle tarımsal üretimde tuzluluk stresine karşı dirençli stratejiler geliştirmeye katkı sağlamayı hedeflemektedir. Çalışmamız bu anlamda literatüre önemli katkılar sunabilecektir.

KURAMSAL TEMELLER

Yapılan literatür taramalarında *Medicago sativa* bitkisi ile ilgili tuz stresi, verim ve fizyolojik tepkiler üzerine birçok çalışmanın bulunduğu, ancak humik asit ve liken kökenli mikroorganizmaların birlikte kullanımının tuz stresi toleransı üzerindeki etkilerine dair sınırlı sayıda çalışma yapıldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmamız, bu alandaki bilgi eksikliğini gidermeyi amaçlamakta olup, kaynak özetleri kısmında literatürde yer alan benzer stres faktörlerine karşı kullanılan mikroorganizmalar, uygulama dozları ve uygulama yöntemlerine yer verilmiştir.

Literatürde, bitkilerdeki abiyotik stres faktörlerine (tuz, kuraklık, ağır metal vb.) karşı kullanılan mikrobiyal inokulantlar, humik maddeler ve bitki kökenli bileşiklerle ilgili çok sayıda araştırma yer almaktadır. Bu doğal bileşikler ve mikroorganizmalar; bitki büyümesini teşvik edici özellikleri, toksisitelerinin düşük olması, çevreye zarar vermemeleri ve uygulama kolaylıkları nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Örneğin, farklı bitki türlerinde humik asit uygulamalarının fotosentez pigmentlerini artırdığı, iyon dengesini düzenlediği ve oksidatif stresi azaltarak biyokimyasal parametrelerde iyileşmelere yol açtığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, liken kökenli mikroorganizmaların bitkilerle simbiyotik ilişkiler kurarak stres toleransını artırdığı ve toprak mikrobiyal çeşitliliğini desteklediği rapor edilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda humik asit ve liken kökenli mikroorganizmaların birlikte kullanımının *Medicago sativa* bitkisinde tuz stresine karşı oluşturduğu fizyolojik ve biyokimyasal tepkiler ayrıntılı olarak ele alınmıştır (Akıncı 2017; Branco *et al.* 2022; Khan 2023; Gülmez *et al.* 2023).

Medicago sativa (yonca), Fabaceae (baklagiller) familyasına ait, çok yıllık, yem bitkisi olarak dünya genelinde yaygın şekilde yetiştirilen bir bitkidir. Yüksek protein içeriği, sindirilebilirliği ve biyokütle verimi sayesinde hayvancılıkta önemli bir yem kaynağıdır. Derin köklü yapısı sayesinde kuraklığa dayanıklı olup, simbiyotik *Rhizobium* bakterileri ile atmosferik azotu bağlayarak toprağın azot içeriğini artırır. Ancak, tuzluluk gibi abiyotik stres faktörleri, yoncanın büyümesini, verimini ve fizyolojik dengesini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, tuz stresine karşı dayanıklılığının artırılması, sürdürülebilir tarım açısından önem arz etmektedir (Bhattarai *et al.* 2020; Srhiouar *et al.* 2022).

Yonca, yüksek protein ve besin değeri nedeniyle yem bitkisi olarak oldukça değerlidir. Dünyada yaklaşık 30 milyon hektarlık alanda yetiştirilir ve en çok ABD, Kanada, Çin, İtalya ve Avustralya gibi ülkelerde üretilir. Sıcak mevsimde yetişen çok yıllık bir baklagildir. Ancak

yonca, tuzluluğa karşı orta düzeyde hassas bir bitkidir. Yüksek tuz oranlarında çimlenme azalır, büyüme yavaşlar ve yapraklarda sararma (kloroz) gibi stres belirtileri görülür. Ayrıca, tuzlu ortamlarda kökler suyu almakta zorlanır, hatta bazen su kökten dışarı çekilebilir. Yine de bazı yonca çeşitleri daha dayanıklıdır. Örneğin, 3840-5120 ppm tuz seviyelerinde bile ürün verebilen çeşitler vardır. Ladak 65 gibi bazı çeşitlerin belirli tuz seviyelerinde daha iyi çimlendiği gösterilmiştir. Laboratuvar çalışmalarında W75RS gibi tuza dayanıklı bitki hatları geliştirilmiş ve 40,000 ppm tuz seviyesine kadar dayanabildiği görülmüştür (Scasta *et al.* 2012). Yoncanın tuz dayanıklılığı, zararlı iyonlar olan sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) maddelerinin yapraklara ulaşmasını engelleyebilme yeteneğine bağlıdır. Bazı çeşitler bu iyonları daha iyi kontrol edebildiği için tuza karşı daha dayanıklıdır. Ayrıca, derin ve lifli kök sistemine sahip olan veya daha az su kaybıyla yaşayan (yüksek terleme verimliliğine sahip) çeşitler, tuzlu ve kurak koşullarda daha başarılı olabilmektedir. Ancak biyoteknoloji kullanılarak yapılan tuz toleransı geliştirme çalışmaları şu ana kadar istenen başarıyı sağlayamamıştır (Emam *et al.* 2009; Fan *et al.* 2023).

Yonca kaliteli besin içeriği ve geniş adaptasyon kabiliyeti ile önemli birçok yıllık yem bitkisidir. Ancak, tuz stresine karşı orta düzeyde tolerans göstermekte ve tuzlu koşullarda verim kaybı yaşamaktadır. Bir çalışmada, tuza toleranslı 'Halo' ve tuza hassas 'Vernal' çeşitlerinin morfolojik, fizyolojik ve genetik yanıtları incelenmiştir. Denemeler, beş farklı tuzluluk seviyesinde (0, 4, 8, 12 ve 16 dS/m) hidroponik ortamda yürütülmüştür. Organik bileşik ve element dağılımı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, mikro-X-ışını floresan spektromikroskopisi ve ICP-MS ile analiz edilmiştir. Ayrıca, RNA-Seq analizi ile tuz stresine karşı farklı şekilde ifade edilen genler belirlenmiştir. Tuz stresi tohum çimlenmesi, bitki boyu, ham protein oranı ve biyokütleyi önemli ölçüde azaltmıştır. 'Halo', yüksek tuz koşullarında daha yüksek çimlenme ve doku dayanıklılığı göstermiştir. Çalışmada, 8 dS/m'ye kadar "düşük iyon birikimi", 12 dS/m'de ise "doku toleransı" mekanizmalarının etkin olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, elde edilen bulgular ve genomik veriler, tuza dayanıklı yeni yonca çeşitlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (Bhattarai *et al.* 2020).

Medicago sativa'da tuz toleransı artırılırken, çimlenme evresinde büyük önem taşır çünkü bu dönemde bitki tuza daha hassastır. Çeşitler tuzlu koşullarda çimlenme kabiliyeti açısından farklılık göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, iki *M. sativa* çeşidinin farklı NaCl konsantrasyonlarında (0, 100, 150, 200 ve 250 mM) çimlenme tepkileri değerlendirilmiştir. ANOVA sonuçları, kök uzunluğu (RL), kök yaş ağırlığı (RFW) ve sürgün yaş ağırlığındaki (SFW) değişimlerin çeşit kaynaklı olduğunu göstermiştir. Hipokotil uzunluğu (HL), RL ve SFW ise çeşit ve uygulama etkileşiminden etkilenmiştir. 250 mM NaCl'de çimlenme oranı

%46-66 oranında düşmüştür. Ayrıca 200 mM NaCl'de kök ve hipokotil uzunlukları %40'tan fazla azalmıştır. Kaliforniya çeşidi RL ve RFW bakımından daha dayanıklı bulunurken, El Hemma çeşidi SFW'de daha az etkilenmiştir (Jabri *et al.* 2021).

Tuz stresine karşı dayanıklılık, bitkilerde genetik çeşitliliğin varlığına ve stres koşullarında üstün performans gösteren bireylerin seçimine bağlıdır. Araştırmalar, yonca (*Medicago sativa L.*) çeşitleri arasında tuz toleransı açısından belirgin fenotipik farklılıklar olduğunu göstermektedir. Bu durum, yüksek tuz toleransına sahip genotiplerin seçilerek ıslah çalışmalarında kullanılabilceğini ortaya koymaktadır. Monirifar vd. (2004), Azerbaycan kökenli bazı yonca çeşitlerinde farklı tuzluluk seviyelerine karşı değişen yem verimleri gözlemlemiş ve bu çeşitler arasında tuza dayanıklı olanları belirlemişlerdir. Bu çalışma, yeni tuza dayanıklı yonca çeşitlerinin seçimi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Tuz stresi, dünya genelinde tarımı tehdit eden önemli bir çevresel sorundur. Bu stresin etkilerini azaltmak için tuza dayanıklı yeni bitki çeşitlerinin ıslahı kısa vadede etkili ve ekonomik bir çözüm olabilir. Bu amaçla beş farklı yonca (*Medicago sativa L.*) ekotipi (*Seyah-Roud*, *Ahar-Hourand*, *Oskou*, *Malekan* ve *Sefida-Khan*) olgun bitki döneminde sera koşullarında değerlendirilmiştir. Bitkiler perlit ortamında yetiştirilmiş ve 0, 100, 200 mM NaCl içeren Hoagland solüsyonları ile sulanmıştır. Tuz stresine bağlı olarak yem verimi, yapraklarda sodyum (Na) ve potasyum (K) içerikleri, K/Na oranı, prolin ve klorofil düzeyleri analiz edilmiştir. *Seyah-Roud* ve *Sefida-Khan* ekotipleri daha düşük Na içeriği gösterirken, *Malekan*, *Ahar-Hourand* ve *Oskou* yüksek yem verimini koruyabilmiştir. Tüm ekotiplerde Na miktarı artarken, *Ahar-Hourand* ve *Malekan* daha yüksek Na ve K içeriklerine sahip olup, K/Na oranları daha düşüktür. Genel olarak, *Malekan* ve *Ahar-Hourand* ekotipleri tuz stresine daha dayanıklı bulunmuştur (Monirifar and Barghi 2009).

Tuzluluk, dünya genelinde tarım alanlarını etkileyen önemli sorunlardan biridir. Günümüzde ekili alanların yaklaşık %20'si ve sulanan arazilerin neredeyse yarısı tuzdan etkilenmektedir (Zhu 2001). Tuzlu topraklar, fazla miktarda tuz içerdiği için bitkiler üzerinde olumsuz etkiler yaratır. Bu durum, topraktaki suyun ozmotik basıncını düşürerek (ozmotik stres), besin alımını engeller, iyonik zehirlenmelere neden olur ve besin dengesizlikleri oluşturur (An *et al.* 2003). Yüksek tuz seviyesi; tohumun çimlenmesi, fidenin gelişimi, bitkinin büyümesi, çiçeklenme ve meyve oluşumu gibi süreçleri olumsuz etkileyerek verim ve ürün kalitesinde azalmaya yol açar (Sairam and Tyagi 2004). Ayrıca, tuzlu toprakta yetişen bitkilerin yaprak yapısı ve anatomisi önemli ölçüde değişmektedir (Çavuşoğlu *et al.* 2008).

Tuz stresi, bitkilerde turgor kaybı, fotosentez azalması ve enzim aktivitelerinin bozulması yoluyla büyümeyi olumsuz etkiler (Munns and Tester 2008). Bu etkiler iki aşamada gelişir: İlk aşamada, kök bölgesinde yüksek tuz konsantrasyonu ozmotik stres oluşturarak su ve mineral alımını sınırlar; ikinci aşamada ise yapraklarda tuz birikimi toksik etkilere yol açar. Ozmotik stres, bitki dokularında su eksikliği oluşturarak yaprak ve sürgün büyümesini, dolayısıyla üreme gelişimini sınırlar. Ayrıca, ozmotik stres kaynaklı stomatal kapanma nedeniyle fotosentez oranı azalır (Munns and Tester 2008).

Tuz stresinde kökler tarafından alınan yüksek sodyum (Na^+) iyonu, potasyum (K^+) ile rekabet ederek hücre metabolizmasını olumsuz etkiler ve potasyum eksikliğine yol açar (Schachtman and Liu 1999; Abbasi *et al.* 2016). Artan Na^+ ve Cl^- iyonları, hücresel işleyişi bozarak fotosentetik sistemin hasar görmesine ve hücrelerin dehidrasyonuna neden olur (Ashrafi *et al.* 2018). Bu nedenle, tuz toleransı için sitozolde sodyum birikiminin sınırlanması ve yüksek K^+/Na^+ oranının korunması kritik öneme sahiptir (Atta *et al.* 2023; Bhattarai *et al.* 2020). Düzenli fotosentez kapasitesi ve iyon dengesi, tuza dayanıklı yonca çeşitlerinde geliştirilmesi gereken temel özelliklerdir.

Yonca bitkisi, tuz stresine çimlenme, fide gelişimi ve olgun bitki büyümesi olmak üzere üç farklı aşamada duyarlıdır (Bhattarai *et al.* 2020). Özellikle çimlenme ve fide dönemleri, tuza karşı en hassas evrelerdir (Peel *et al.* 2004). Çimlenme sürecinde tolerans, tohumun su alarak çimlenebilmesi ve fidenin hayatta kalabilmesi ile belirlenirken, ileri büyüme aşamalarında tolerans, tuzlu ve tuzsuz koşullarda gözlenen büyüme farkı ile ölçülmektedir (Anower *et al.* 2013). Tuz stresi çimlenmeyi, tohumun su alımını engelleyerek veya embriyo üzerinde toksik etki yaratarak azaltır (Sosa *et al.* 2005). Çimlenme sonrası dönemde ise tuz iyonlarının neden olduğu ozmotik stres, su alımını ve hücre genişlemesini engelleyerek sürgün gelişimini durdurur, aşırı durumlarda köklerin su kaybetmesine ve bitkinin ölmesine yol açar (Munns and Tester 2008). Çimlenme ve olgun büyüme evreleri arasında fizyolojik ve genetik bağlantılar bulunabileceği öne sürülmüş olsa da, erken dönem performansına dayalı dolaylı seleksiyon yöntemleri genel olarak istenilen başarıyı sağlayamamıştır (Peel and Anower 2023).

Yonca bitkisinde tuz toleransı çalışmaları genellikle NaCl çözeltisi kullanılarak yapılmış, farklı tuz karışımları ise daha az araştırılmıştır (Soltanpour *et al.* 1999; Cornacchione and Suarez 2017). Araştırmalar, yonca tohumlarının CaCl_2 ve NaCl tuzlarına karşı daha hassas, KCl 'ye ise daha dirençli olduğunu göstermektedir (Jorjandi and GR 2012). Tuz stresi, çimlenme oranı ile tohum canlılığını belirgin şekilde azaltmaktadır (Soltani *et al.*

2012). Na₂SO₄ çözeltisi ile yapılan çalışmalarda, 12,7 dS/m seviyesinde çıkış oranı ciddi oranda düşerken, 30 dS/m'de bitki çıkışı gözlenmemiştir (Cornacchione and Suarez 2015). Bir diğer çalışmada, farklı tuz karışımları kullanılarak yapılan denemelerde 1,5-8,0 dS/m arasında çıkış oranlarının benzer olduğu, ancak 15,6 dS/m seviyesinde belirgin bir azalma yaşandığı bildirilmiştir (Steppuhn *et al.* 2012).

Bir çalışmada, iki farklı yonca çeşidinde NaCl kaynaklı tuz stresinin antioksidan enzim aktiviteleri, indirgen şeker içerikleri ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yazdi (*tuz toleranslı*) ve Diabolourde (*tuz hassas*) çeşitleri, 0, 100, 150 ve 200 mM NaCl konsantrasyonlarında çözültide yetiştirilmiştir. Tuz seviyesinin artışıyla birlikte indirgen şeker miktarı ve peroksidaz (POD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerinde artış gözlenmiş, ancak yüksek tuz konsantrasyonlarında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi azalmıştır. Toleranslı çeşitte antioksidan enzimlerdeki artış daha belirgin olmuştur. Her iki çeşitte de tuz uygulamaları lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif stres oluşturmuş, bu artış hassas çeşitte daha yüksek seviyelerde gerçekleşmiştir. Elde edilen bulgular, tolerant çeşidin tuz stresine bağlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlarını daha etkili şekilde sınırlandırabildiğini göstermektedir (Babakhani *et al.* 2011).

Humik maddeler; humik, fulvik ve himatomelonik asitleri kapsar ve doğada toprakta, torfta ve sulara yaygın olarak bulunur (Muscolo *et al.* 2007; Maffia *et al.* 2025). Bu maddeler arasında en önemlisi humik asittir (HA) ve tarımda sentetik gübrelere alternatif olarak kullanılabilir doğal bir kaynaktır. HA'nın, normal ve tuzlu ortamda tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmalar sınırlıdır. Yapılan bazı araştırmalar, dışarıdan uygulanan HA'nın arpa, börülce, buğday, fasulye, karpuz, sardunya, salatalık ve kadife çiçeği gibi bitkilerin çimlenme oranını ve erken fide gelişimini artırdığını göstermiştir (Hartwigsen and Evans 2000; Szczepanek and Wilczewski 2011; Rose *et al.* 2104; Yaquby *et al.* 2024).

Tuz stresi, kurak ve yarı kurak bölgelerdeki kentsel peyzaj alanlarında önemli bir sorundur. Bu olumsuz etkileri azaltmak amacıyla, büyüme ortamına organik madde ve bitki besin maddeleri eklemek gereklidir. Bir çalışmada, *Salvia splendens* bitkisinin farklı tuz konsantrasyonlarına verdiği tepkiler ve humik asit uygulamasının tuz stresini hafifletmedeki rolü araştırılmıştır. Deneyde 0, 20, 40, 60 ve 80 mM NaCl seviyelerinde tuzluluk ve 0, 100, 500 ve 1000 mg/L dozlarında humik asit uygulamaları yapılmıştır. Büyüme parametreleri, fizyolojik özellikler ve biyokimyasal içerikler incelenmiştir. Sonuçlara göre, tuz uygulanan bitkilerde büyüme parametreleri kontrol grubuna göre azalmıştır. Tuz stresi, bitkilerde relatif

su içeriğini, buharlaşma oranını ve elektrolit sızıntısını önemli ölçüde etkilemiştir. Ayrıca tuzluluk, kontrol bitkilerine kıyasla prolin, malondialdehit (MDA), şeker, DPPH radikal temizleme kapasitesi ve toplam fenol içeriklerinde artışa, klorofil miktarında ise azalmaya neden olmuştur. Humik asit uygulaması ise yaprak alanı ve bitki boyunda bir azalma oluşturmuş, bu etkiler büyüme parametreleri açısından tuz stresine benzer bulunmuştur. Çalışmanın bulguları, *Salvia splendens*'in tuza hassas bir bitki olduğunu ve bu çalışmada kullanılan humik asit dozlarının, tuz stresinin olumsuz etkilerini hafifletmede etkili olmadığını göstermektedir (Karimian *et al.* 2019).

Bir diğer çalışmada, humik asitler (HA) ve bitki büyümesini destekleyen bakterilerin (PGPB), şeker kamışı yapraklarının metabolik profili üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda, bitkilerde stres yanıtı, hücresel büyüme ve enerji metabolizması ile ilişkili çeşitli metabolitlerin seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. HA uygulaması, bazı amino asitlerin azalmasına neden olurken, stres yanıtı ve büyüme süreçleri ile bağlantılı metabolitlerin birikimini artırmıştır. PGPB uygulaması ve HA+PGPB birlikte kullanımı, çok sayıda metabolitin birikmesini sağlamış; özellikle lipitler, amino asitler, vitaminler ve antioksidan bileşiklerde belirgin artışlar kaydedilmiştir. Elde edilen bulgular, şeker kamışında enerji metabolizmasına bağlı yolların (glukoz, pentoz, mevalonat ve trikarboksilik asit döngüsü) aktif hale geldiğini ve genel hücresel metabolizmanın olumlu yönde etkilendiğini göstermektedir (Aguruar *et al.* 2018).

Humik asit (HA) ve fulvik asidin (FA) toprak özelliklerini iyileştirerek (havalanma, geçirgenlik, su tutma kapasitesi, iyon taşınımı ve pH dengesi) dolaylı, hormon benzeri aktiviteleriyle doğrudan etkili olduğu bilinmektedir (Nardi *et al.* 2002; Rose *et al.* 2014; Olaetxea *et al.* 2018). HA ve FA uygulamaları, tohum çimlenmesini, bitki büyümesini, biyokütle artışını, besin alımını artırmakta ve bitkilerin stres direncini yükseltmektedir (Haghighi *et al.* 2012; Canellas and Olivares 2014; Hatami *et al.* 2018). Ayrıca, HA uygulamaları farklı bitkilerde antioksidan aktiviteyi, klorofil miktarını, fotosentezi ve nükleik asit sentezini artırmıştır (Schiavon *et al.* 2010; Fan *et al.* 2014; Akladious and Mohamed 2018). FA uygulaması ise biber bitkisinde toplam fenol, karbonhidrat ve karotenoid içeriğini artırmıştır (Aminifard *et al.* 2012) ve safranda sekonder metabolitlerin artışına katkı sağlamıştır (Santiago *et al.* 2008). HA ve FA'nın bitki büyümesini ve verimini artırıcı etkileri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Aminifard *et al.* 2012; Yazdani *et al.* 2014; Dinçsoy and Sönmez 2019). Yapılan araştırmada, humik asit (HA) ve fulvik asidin (FA) civanperçemi (*Achillea millefolium* L.) bitkisinin büyüme, antioksidan aktivite ve besin içeriği üzerindeki etkileri tarla ve sera koşullarında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmada, 5, 10, 15 ve

20 kg/ha dozlarında HA ve FA uygulanmış, kontrol grubu ile karşılaştırmalar yapılmıştır. Sonuçlar, her iki uygulamanın da büyüme parametrelerini, fotosentetik pigmentleri ve antioksidan aktiviteleri artırdığını göstermiştir. Tarlada, 15 kg/ha HA uygulaması ile sürgün kuru ağırlığında %80 artış sağlanırken, serada 20 kg/ha FA uygulaması ile %60 artış elde edilmiştir. HA ve FA uygulamaları, yaprak ve çiçeklerde toplam fenol, flavonoid içeriklerini ve antioksidan aktiviteyi anlamlı derecede artırmıştır. Yapraklardaki en yüksek toplam fenol içeriği, tarlada 5 kg/ha ve serada 15 kg/ha HA uygulamalarıyla sağlanmış, kontrole göre sırasıyla %59 ve %57 artış gözlenmiştir. Ayrıca, yapraklardaki N, P ve K içerikleri HA ve FA uygulamalarıyla artmıştır. Genel olarak, özellikle tarla koşullarında, HA ve FA uygulamalarının civanperçemi bitkisinin büyümesi ve antioksidan özellikleri üzerinde olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir (Bayat *et al.* 2021).

Humik asitlerin (HA) pH 13'te tamamen çözüldüğü, pH 1'de ise çözünmediği genel bir kabul görse de, orta pH aralıklarındaki çözünürlük durumları ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Brigante vd. (2007) IHSS (Uluslararası Humik Maddeler Derneği) yöntemine göre hazırlanan humik asitlerin pH 10-4 aralığında çözünme kinetiğini araştırmış ve pH 10'un üzerinde kısa sürede tamamen çözüldüğünü, pH 8-9 arasında çözünmenin daha yavaş ama neredeyse tam olduğunu ortaya koymuştur. pH 8,5 ve 8'de çözünürlük oranı sırasıyla %60 ve %40 civarındadır. Bu sonuçlar, pH 1'de çözünmeyen humik asidin aslında heterojen bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Fakat aynı pH değerinde çözünür ve çözünmeyen fraksiyonlar arasındaki kimyasal farklılıklar henüz incelenmemiştir. IHSS tarafından önerilen ekstraksiyon yönteminde elde edilen HA örneklerinin %30'a varan oranda inorganik madde içerebildiği bilinmektedir. Bu nedenle, ekstrakte edilen humik maddeler, genellikle hidroklorik-hidroflorik asit ile saflaştırılarak kül oranı %2'nin altına düşürülür. Ancak, alkali ekstraksiyonla çözünüp humik maddeye kuvvetle bağlanan inorganik bileşenlerin kimyasal yapısı üzerine fazla çalışma yapılmamıştır. Yapılan çalışmada, farklı pH değerlerinde (pH 1, 3, 5 ve 7) Na-humat çözeltileri kullanılarak humik asit fraksiyonlarının çözünür ve çözünmeyen kısımları kimyasal ve spektroskopik yöntemlerle analiz edilmiştir. pH 5 ve 7'de çözültide kalan humik bileşenlerin, aromatik ve alifatik gruplar bakımından zengin olduğu belirlenmiştir. pH 1 ve 3'te elde edilen çözünmeyen fraksiyonlar ise yüksek asitlik ve aromatik yapı gösterirken, çözünür fraksiyonlar zayıf içerikli bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, doğal toprak ortamlarında humik asitlerin çözünürlük özellikleri ve bitki metabolizmasına etkileri konusunda önemli bilgiler sunmaktadır (Baglieri *et al.* 2014).

Kök ortamındaki tuzluluğun artması, bitkilerin gelişimini ve verimini azaltır; birçok bitki ise tuz stresine karşı sınırlı direnç gösterir. Uygun gübreleme, sulama ve genetik

iyileştirme yöntemleri toleransı artırabilse de, çoğu zaman ek destek gereklidir. Dünya genelinde yaygın üretimi yapılan çilek (*Fragaria spp.*, Rosaceae) tuz stresine özellikle hassastır. NaCl stresi, çilek verimini azaltmakla kalmayıp meyve kalitesini de düşürür (Jamalian *et al.* 2013; Garriga *et al.* 2015). Tuzluluk stresinin olumsuz etkileri kimyasal uygulamalarla azaltılabilir. Humik asit (HA), bitki büyümesini destekleyen ve stres toleransını artıran etkili bir biyostimülanttır (Aydın *et al.* 2012). HA; su ve tuz stresinde bitki metabolizmasını düzenler, enzimatik antioksidanları (CAT, POD, SOD) aktive eder, hücre zarının stabilitesini artırır, su alımını düzenler ve mineral madde alımını iyileştirir. Ayrıca hormonal dengeyi koruyarak bitki gelişimini destekler (Ali *et al.* 2019) ve toprak verimliliğine katkı sağlar (Trevisan *et al.* 2009; Geçer 2020). Yapılan çalışmada, çilek bitkisinde 50 mmol/L NaCl tuz stresi altında 50 mg/L humik asit (HA) uygulamasının etkileri araştırıldı. HA uygulaması, taç ve kök yaş/kuru ağırlıkları ile stomatal iletkenliği artırdı, stres metabolitlerini (prolin, MDA, katalaz, peroksidaz) azalttı. Ayrıca toplam klorofil, C vitamini ve likopen içerikleri yükseldi. Sonuç olarak, HA, çilekte tuz stresine karşı toleransı güçlendirdi (Dikilitaş *et al.* 2021).

Humik maddeler, doğadaki en güçlü antioksidanlardan biridir ve fenilpropanoid metabolizmasını tetikleyerek antimikrobiyal bileşik üretimini artırabilir. Brezilya'nın ana narenciye bölgelerinde, sürekli humik madde uygulanan bahçelerin HLB hastalığı belirtileriyle daha iyi başa çıktığı gözlemlenmiştir. Huanglongbing (HLB) hastalığı, narenciyelerde ciddi zararlara yol açmaktadır. Bu hastalıkta bakteriyel enfeksiyon, kaloz birikiminden önce oksidatif stres oluşturarak hücre hasarına sebep olur. Çalışmada humik madde uygulamalarında bakteri konsorsiyumu ilavesinin ilave bir etkisi tespit edilmemiştir. Humik maddeler ise, POX, PAL ve β -1,3-glukanaz enzimlerinin aktivitelerini artırmış ve bu yüksek seviyeler altı ay boyunca sürdürmüştür. İlgili genlerin ekspresyon seviyelerinde de artış gözlenmiştir. Bu bulgular, ticari bahçelerde yıllardır uygulanan humik madde tedavilerinden elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiş ve humik maddelerin bitkilerde bağışıklık sistemini harekete geçirerek doğal bir priming ajan gibi çalıştığı ve hastalık belirtilerini azaltarak narenciye üretiminde daha dirençli bitkiler yetiştirilmesine katkı sağlayabileceği ortaya konmuştur (da Silva *et al.* 2023).

Humik maddeler, kök yapısını ve büyüme dinamiklerini iyileştirerek bitki gelişimini teşvik eder. Bu etkiler; kök uzunluğunda artış, kök tüylerinde yoğunluk ve H⁺-ATPaz aktivitesinin artışı ile birlikte besin alımının kolaylaşmasını içerir. Ayrıca humik maddeler, kök salgıları ve bitki metabolizmasında değişikliklere yol açabilir. Etkiler, bitki türü ve çevre koşullarına göre farklılık gösterir. Mikrobiyal bozunmaya dirençli yapıları sayesinde faydalı

mikroorganizmaların taşınmasında taşıyıcı olarak kullanılabilirler. Bu durum, sürdürülebilir tarımda humik maddelerin hem bitki gelişimini desteklemesi hem de rizosfer mikrobiyotasını olumlu yönde etkilemesiyle yeni biyogübre yaklaşımlarına olanak sağlar (Canellas and Olivares 2014).

Endofitik Entomopatojenik Mantarlar (EIPF), hem böceklere karşı biyolojik mücadelede etkili hem de bitki gelişimini destekleyici mikroorganizmalardır. Bu mantarlar bitki kökleri ve bazı durumlarda üst bitki dokularında kolonileşebilir. Bitkilerde hastalık belirtisi göstermeden yaşarlar ve tuzluluk, kuraklık gibi abiyotik streslere karşı dayanıklılığı artırır. Özellikle *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* gibi türler köklerde yerleşerek bitkiyi zararlılardan korur, besin alımını artırır ve büyümeyi destekler. Bu özellikleri sayesinde, entomopatojenik mantarlar hem biyogübre hem de biyopestisit olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Yapılan çalışmalarda, böcek öldürücü özellikleriyle bilinen entomopatojenik mantarların, endofit olarak bitkilerle simbiyotik yaşam kurma, hastalıklara karşı etki gösterme, büyümeyi teşvik etme ve rizosferde yaşama gibi birçok ekolojik rol üstlendiği vurgulanmaktadır. Endofitik kolonizasyonun doğrudan (besin alımı, fitohormon üretimi) ve dolaylı (direnç artışı, antibiyotik ve metabolit üretimi, stres azaltımı) etkileri ele alınmıştır. İzolasyon ve sınıflandırma zorlukları gibi bazı engellere rağmen, biyoteknolojik ilerlemeler bu sorunlara çözüm sunmaktadır. Bu mantarların hem biyokontrol ajanı hem de büyüme destekleyici olarak kullanımı için gelecek vadetmektedir (Ahsan *et al.* 2024).

Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler (PGPB), sürdürülebilir tarım uygulamalarında önemli bir yer edinmiş olmasına rağmen, biyoinkulant formülasyonlarında kullanılan mikrobiyal çeşitlilik, mevcut doğal mikrobiyal zenginlikle karşılaştırıldığında oldukça sınırlıdır. 1998-2014 yılları arasında yapılan kapsamlı bir derlemede, yaklaşık 30 farklı cinse ve 60 türe ait mikroorganizmanın biyoinkulant formülasyonlarında kullanıldığı bildirilmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında *Azospirillum* (ör. *A. brasilense*, *A. lipoferum*), *Azotobacter* (ör. *A. chroococcum*, *A. vinelandii*), *Bacillus* (ör. *B. subtilis*, *B. megaterium*), *Pseudomonas* (ör. *P. fluorescens*, *P. putida*), *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Chlorella* ve diğer bazı bakteriyel ve fungal suşlar yer almaktadır (Yıldırım vd. 2022). Bu mikrobiyal çeşitlilik, bitki-bakteri etkileşimlerinin tarımsal üretimde daha etkin ve çevre dostu uygulamalara dönüştürülmesinde önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Bununla birlikte, mevcut biyoinkulantlarda kullanılan sınırlı sayıda PGPB, daha fazla türün araştırılması ve yeni kombinasyonların geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Brezilya'da yapılan bir çalışmada, ısı ile muamele edilen şeker kamışı tohumlarına *Herbaspirillum seropedicae* (10^8 hücre/mL) ve vermikomposttan elde edilen humik asit (20 mg C/L) uygulanmıştır. Bu kombinasyon, kök uzunluğu ve yüzey alanında %118'e varan artış sağlamış; sürgün ve kök biyokütlesini de önemli ölçüde artırmıştır. Özellikle ısı uygulanmış bitkilerde etkiler daha belirgin olmuş, bakteri popülasyonunun köklerde arttığı gözlenmiştir. (Canellas *et al.* 2013).

Bir diğer çalışma domates bitkisinde yapılmış ve yapılan çalışmalarda, fidelerin yetiştirildiği ortama diazotrofik endofitik bakteriler (DEB) ve humik maddelerin eklenmesi, biyofortifikasyon stratejisi olarak uygulanmıştır. Ticari fide altlıklarına ya da doğal olarak bitki gelişimini destekleyen mikroorganizmalar ve humik maddeler içeren vermikompost bazlı ortamlara yapılan bu uygulama, fidelerin erken gelişimini önemli ölçüde desteklemiştir. Tarlaya aktarılan bitkilerde bu olumlu etkiler devam etmiş, yapraktan uygulanan DEB ve humik asit kombinasyonu ise hem meyve verimini hem de hastalık direncini artırmıştır. Ayrıca, yapraktan yapılan bu uygulama ile kök bölgesi, yaprak ve rizosferdeki azot fiksasyonuna katkı sağlayan mikrobiyel popülasyonun da arttığı belirlenmiştir (Olivares *et al.* 2015).

Yukarıda sunulan literatür bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, *Medicago sativa* (yonca) bitkisi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, özellikle humik asit ve liken kökenli mikroorganizmaların birlikte kullanımının tuz stresi toleransı üzerindeki etkilerini ele alan araştırmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Ayrıca, ülkemiz özelinde bu konuyla doğrudan ilişkili herhangi bir yüksek lisans veya doktora tezine de rastlanmamıştır. Bu nedenle yürütülen bu çalışmanın, hem Türkiye'deki bilim insanlarının dikkatini bu alana çekmesi hem de literatürdeki önemli bir boşluğu doldurması açısından katkı sağlaması beklenmektedir.

MATERYAL ve METOT

Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Çimlenme kabini (İnkübatör)	: Memmert, Germany, INBE, 410 1583
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Otoklav	: Hirayama, Japan, HVE 50
Dijital hassas terazi	: Shimadzu, Japan, AY220
İklim kabini	: Jeno Tech, Güney Kore
Soğutucu	: Arçelik
Saf su cihazı	: GFL-2004
Derin dondurucu (-30 °C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	: Nuaire
Tüp Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21, Germany
Soğutmalı masa santrifüjü	: Hettich Micro 22 R, Germany
Otomatik pipetler	: Axigen, Ependhof
pH metre	: WTW unilab
Sıcak su banyosu	: Wise-Hot Bath
UV-visible spektrofotometre	: Shimadzu, Japan, UVmini-1240
Multiskan spektrofotometre	: Multiscan Go
Vortex tüp karıştırıcı	: IKA, USA, MS2
Kuru blok inkübatör	: Allsheng
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500

Bitki Materyali ve Tuz Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Araştırmamızda, Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (Erzurum) temin edilen yoncanın (*Medicago sativa* L.) Konya çeşidi kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle yoncanın Konya çeşidinde çimlenme ve büyümeyi yaklaşık %50 oranında azaltan tuz (NaCl) konsantrasyonu belirlenmiştir. Bunun için önce 500 mM konsantrasyonda NaCl'nin bir stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bu stok çözelti otoklavda steril edilmiş ve sonra bundan otoklavlanmış steril saf su ile 0,0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 mM NaCl içeren tuz ortamları elde edilmiştir. Yonca tohumları, %10 çamaşır suyu ile steril edildikten sonra, farklı tuz stresi ortamı olarak hazırlanan çözeltilerin bulunduğu Petri kabına ekilmiştir. Steril Petri kapları, otoklavda steril edilmiş 2 tabaka kurutma kağıdı içerecek şekilde hazırlanmış ve tohum ekiminden önce her Petri kabına 10 mL steril tuz ortamları (0,0, 25, 50, 75, 100, 150,

200 ve 250 mM NaCl) eklenmiştir. Daha sonra bir steril kabin içinde her Petri kabına 25 tohum ekimi yapılmıştır. Petri kapları hava akışını tam kısıtlamayacak şekilde parafilm ile kaplanmıştır. Daha sonra, Konya çeşidi tohumları farklı tuz stresi konsantrasyonlarında (0,0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 mM NaCl) iklim kabini koşullarında (25/22°C, 16/8 saat, gece/gündüz) çimlenmeye maruz bırakılmıştır. Tohumların ekiminden sonra, her gün çimlenme yüzdeleri alınmıştır. Çimlenmenin 5. günü fidelerin kök-gövde uzunluğu ve çimlenme yüzdeleri değerlerine göre, çimlenme ve fide gelişimini %50 oranında azaltan tuz dozu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda, 100 mM NaCl konsantrasyonunun çimlenme yüzdesi ve fide gelişimini kontrole göre yaklaşık %50 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Buna karşılık, 200 mM tuz ve üzeri konsantrasyonlarda aynı tohumların çimlenme oranı %95-%100 arasında inhibisyon göstermiştir.

Humik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada, humik madde kaynağı olarak, içeriği ve doğallığı nedeniyle leonardit kaynaklı Humik Asit (HA) tercih edilmiştir. Leonardit kaynaklı HA, yüksek humik ve fülvik asit içeriği sayesinde bitkiler üzerinde güçlü bir etki oluşturabilmektedir. Ayrıca doğal ve organik bir kaynak olması, çevre dostu kullanımını mümkün kılmaktadır. Diğer humik asit kaynaklarıyla kıyaslandığında, leonardit daha düşük kül içeriğine sahip olup, bu özelliğiyle toprağın tuzluluğunu artırmaz ve mikroorganizmaların faaliyetini engellemez. Linyit ve kömür kaynaklı humik asitler ise genellikle daha düşük organik madde içerir ve çözünürlükleri sınırlıdır, bu da bitki gelişimi üzerindeki etkilerini zayıflatır. Sentetik humik asitler ise doğal kaynaklardan elde edilmediği için organik tarımda kullanılamaz ve çevresel etkileri daha olumsuz olabilir. Bu nedenlerle leonardit kaynaklı humik asit, diğer kaynaklara göre daha etkili ve sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda, ülkemizin Maraş-Elbistan Bölgesi'nde üretilen ve Tarım 11 firmasına ait Agro Elbistan HA tercih edilmiştir. Bu HA, pH değeri 2-4 olan doğal leonarditten üretilmiş olup; toplam organik madde: %12, toplam (humik + fülvik) asit: %12, suda çözünür potasyum oksit (K₂O): %2,5 ve pH 7-9 aralığında olan yerli üretim bir humik asittir (<https://tarim11.com>).

Yukarıda belirtilen ön denemeye benzer olarak, yoncada bitki gelişimini artırma potansiyeli olan en uygun HA konsantrasyonu belirleme çalışması yapılmıştır. Bunun için önce 5000 mg/L konsantrasyonunda HA'nın bir stok solüsyonu (pH 6-6,5) hazırlanmıştır. Bu stok çözelti otoklavda steril edilmiş ve bundan otoklavlanmış steril saf su ile seyreltme yapılarak 0,0, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ve 2000 mg/L dozlarında HA içeren çimlenme ortamları elde edilmiştir. Yonca tohumları, %10 çamaşır suyu ile steril edildikten sonra,

çimlenme ortamı olarak hazırlanan çözeltilerin bulunduğu Petri kaplarına ekilmiştir. Steril Petri kapları, yine otoklavda steril edilmiş 2 tabaka kurutma kağıdı içerecek şekilde hazırlanmış ve tohum ekiminden önce her Petri kabına hazırlanan 10 mL steril çimlenme ortamı (0,0, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 veya 2000 mg/L) çözeltileri eklenmiştir. Daha sonra bir steril kabin içinde her Petri kabına 25 tohum ekimi yapılmıştır. Petri kaplarının ağzı parafilmle kapatılmıştır. Tohumların ekiminden sonra, her gün çimlenme yüzdeleri alınmıştır. Çimlenmenin 5. günü fidelerin kök-gövde uzunluğu ve çimlenme yüzdeleri değerlerine göre, çimlenme ve fide gelişimini en iyi uyaran HA'nın iki dozu belirlenmiştir. Yapılan bu ön çalışma sonucunda, çimlenme yüzdesi ve fide gelişimini kontrole göre iyileştiren 500 ve 1000 mg/L HA konsantrasyonu çalışmada kullanılacak HA dozları olarak seçilmiştir.

Saksı aşamasındaki uygulamalar, yukarıda ifade edilen ön denemelerden elde edilen bulgular doğrultusunda belirlenen 1 tuz (100 mM NaCl) ve 2 humik asit (500 ve 1000 mg/L) konsantrasyonları üzerinden yürütülmüştür.

Liken Kökenli Mikroorganizmaların İzolasyonu

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde, likenlerden endofitik bakteri ve mantar izolasyonları üzerine çalışmalar yürüten araştırmacılar bulunmaktadır. Bu araştırmalar kapsamında, bitkilerde patojenite göstermeyen ve bazı bitkilerde büyüme ile gelişmeyi teşvik edici etkilere sahip olabilen liken kökenli bakteri ve fungus izolatları elde edilmiştir (Gülmez *et al.* 2023).

Çalışmada, fungus ve bakteri izolasyon kaynağı olarak Erzurum İli (Rakım: 1 768 m; Koordinatlar: 40°03'19.238" K, 41°17'45.515" D) çevresinde gelişen bir kaya likeni (*Rhizoplaca melanophthalma*) kullanılmıştır. Liken örnekleri, taze toplanır toplanmaz laboratuvara getirilmiş ve yüzeydeki toprak, toz ve diğer kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla önce havlu kâğıtla nazikçe silinmiş, ardından steril distile su ile yıkanmıştır. Temizlenen liken tallusundan yaklaşık 5 mm² boyutunda parçalar alınarak steril havan ve tokmakta hafifçe ezilmiş; oluşan süspansiyon, artıkları ayırmak için ardışık olarak 500 µm ve 150 µm gözenek çapına sahip iki elekten geçirilmiştir.

Elde edilen süspansiyonun her bir 150 µm fraksiyonundan, diseksiyon mikroskobu altında steril iğne halkası kullanılarak tek tek fungus miselyum parçacıkları seçilmiş ve Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren petri kaplarına aktarılmıştır. İzole edilen mantar kolonileri, saf kültür elde edilene dek tekrar PDA plaklarına aktarılıp çoğaltılmış ve *Scopulariopsis brevicaulis* (OG18) tür identifikasyonu, morfolojik inceleme ve moleküler

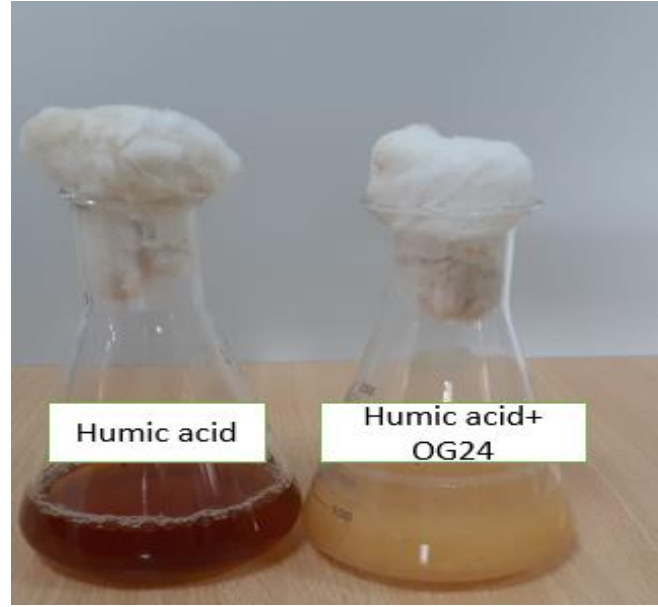
dizileme yöntemleriyle doğrulanmıştır (Gülmez *et al.* 2023). Fungusun tohum ekim ortamına uygulanması için misel süspansiyonu hazırlanmıştır. Bunun için saf PDA plaklarından toplanan miselyum büyüme parçaları, 2×10^6 spore/mL yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan spor süspansiyonu içinde süspense edilmiş ve bir 250 mL'lik erlenmeye 100 mL Patates Dekstroz Broth (PDB) eklenmiştir. Karışım, 25°C'de 180 rpm'de 96 saat inkübe edilerek yoğun misel büyümesi sağlanmıştır. İnokulum uygulaması öncesinde, her bir saksıya 5 mL misel süspansiyonu dozajlanmış, bu miktar önce 10 mL steril izotonik su ile seyreltilmiş ve bir misel parçalayıcı ile homojen dispersiyon elde edilene dek işlenmiştir. Sonrasında hazırlanan mantar inokulumu, tohum ekim ortamına (steril) doğrudan (tarla kapasitesini aşmayacak şekilde) uygulanmıştır (Gülmez *et al.* 2023).

Bakteriyel organizma olarak ise yukarıda ifade edilen aynı liken örneklerinden izole edilen *Bacillus wiedmannii* (izolat No: OG24) kullanılmıştır. İzolasyon sonrası bakteri kültürü Nutrient Agar ortamında 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen tekil koloniler steril öz ucu yardımıyla toplanarak steril fizyolojik tuz çözeltisine aktarılmış ve OD600 değeri spektrofotometrik olarak 1,00 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu, tohum ekim ortamına (steril) inokulum olarak (10 mL) uygulanmak üzere son aşamaya (tarla kapasitesini aşmayacak şekilde) gerilmiştir (Gülmez *et al.* 2023).

Mikroorganizmaların HA'yı Karbon Kaynağı Olarak Kullanım Potansiyelleri

Çalışılan mikroorganizmaların humik asit (HA) degradasyon potansiyellerini belirlemek için; 1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,52 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0 g/L KH_2PO_4 , 0,0005 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 0,0003 g/L ZnSO_4 içeren 100 mL saf su ile hazırlanan minimal tuz ortamına tek karbon kaynağı olarak 1g/L HA konulmuş ve 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (Hang *et al.* 2024). Hazırlanan besi yerine 1×10^6 CFU bakteri ve 1×10^6 fungus spor süspansiyonu inoküle edilmiş ve 1 hafta boyunca oda sıcaklığında 180 rpm'de çalkalanmıştır.

Çalışmada *Bacillus wiedmannii* OG24 kodlu bakterinin Humik asit degradasyonu belirlenmiş ve 1 haftalık inkübasyon sonunda %100 oranında degrades edildiği tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Bacillus wiedmannii* OG24 kodlu bakterinin humik asit degradasyonu

Çalışmada *Scopulariopsis brevicaulis* OG18 kodlu fungus da humik asit degradasyonu belirlenmiş ve Şekil 2’de görüldüğü üzere 1 haftalık inkübasyon sonunda %100 oranında degrades edildiği belirlenmiştir.



Şekil 2. *Scopulariopsis brevicaulis* OG18 kodlu fungus humik asit degradasyonu

Saksı Aşamasında Gerçekleştirilen Çalışmalar

Çalışmada 15x10x10 cm ebatlarında ışık geçirmeyen plastik saksılar kullanılmıştır. Bu saksılar çalışma öncesi %70'lik alkol ile iki kez sterilize edilmiştir. Saksılarda bitki büyüme ve gelişiminin sağlanması amacıyla, önceden otoklavda sterilize edilen perlit ve torfun 1:3 (w/w) oranında karıştırılmasıyla elde edilen torf-toprak karışımı (450 gr) kullanılmıştır.

Tohum ekiminden önce, her bir saksıdaki toprak karışımının su tutma kapasitesi belirlenmiş ve deney süresince saksı ortamındaki tuz konsantrasyonunun sabit kalmasına özen gösterilmiştir. Bunun için ayrıca saksıların günlük su buharlaşma miktarları belirlenmiş ve her gün aynı saatte her saksıya buharlaşma miktarı (25 mL) kadar saf su ilave edilmiştir. Böylece saksılardaki tuz ve HA konsantrasyonlarındaki dalgalanmalar minimize edilmiştir. Her saksıya, tarla kapasitesini sağlayacak miktarda, hazırlanan tuz (100 mM NaCl) + humik asit (500 veya 1000 mg/L) + mikroorganizma (bakteri veya fungus) karışımı eklenmiş ve saksılar tohum ekimine hazır hale getirilmiştir.

Sterilize edilmiş yonca tohumları, içerikleri yukarıda açıklandığı şekilde ayarlanmış saksıların her birine 25 adet olacak şekilde ekilmiştir. Saksılar, gece/gündüz fotoperiyodu (16/8 saat) ve sıcaklık (25/22°C) koşullarına sahip kontrollü bir iklim odasına transfer edilmiştir. Tohumların çimlenmesine takiben gelişen fideler, 30. günde (toplamda 35 gün) hasat edilmiştir. Hasat sırasında, taze bitki örnekleri kullanılarak yapılacak deneyler (kök-gövde uzunluğu vb. gibi) için bitki örnekleri ayrıldıktan sonra, geri kalan bitki materyali fizyolojik ve biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmak üzere derin dondurucuya aktarılmıştır.

Çalışma deseni (bakteri için) örneği aşağıdaki şekilde olmuştur (Her grup için 3 saksı).

1. Kontrol (saf su)
2. Tek başına tuz; 100 mM NaCl
3. Tek başına HA-1 (500 mg/L)
4. Tek başına HA-2 (1000 mg/L)
5. Tek başına bakteri (B)
6. Tuz + HA-1
7. Tuz + HA-2
8. Tuz + B
9. Tuz + B + HA-1
10. Tuz + B + HA-2

Not: Fungus içinde aynı uygulamalar yapılmıştır.

Yaş ve Kuru Ağırlık Tayini

Bu analiz, bitkilerin su içeriği ve biyokütle birikimi üzerindeki çalışılan faktörlerinin etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Hasat sonrası, her deneme grubundan rastgele seçilen birer bitki örneği ile yaş ve kuru ağırlık analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle bitkilerin yaş ağırlıkları, bitkiler yıkandıktan ve yüzey nemi kurutma kâğıdıyla uzaklaştırıldıktan hemen sonra hassas terazi kullanılarak belirlenmiştir. Ardından örnekler,

65 °C sıcaklıktaki bir etüvde 48 saat boyunca kurutularak sabit ağırlığa gelmeleri sağlanmıştır. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra örnekler yeniden tartılmış ve böylece kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. Elde edilen yaş ve kuru ağırlık verileri kullanılarak bitkilerin kuru madde yüzdesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\text{Kuru ağırlık (\%)} = (\text{Kuru ağırlık} / \text{Yaş ağırlık}) \times 100$$

Bu aşamadan sonraki deneysel parametrelerde, deneysel analizlerde kullanılmak üzere seçilen bitki türüne ait örnekler, çalışma öncesinde uygun şartlarda yetiştirilmiş ve belirli gelişim (en az 3-4 yapraklı) evrelerinde hasat edilmiştir. Analizlerde kullanılacak doku miktarı her parametreye özgü olarak standartlaştırılmış ve örnekler analiz öncesinde sıvı azot altında dondurularak -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi

Bitki örneklerindeki klorofil a, klorofil b, karotenoid ve toplam pigment içeriklerinin belirlenmesinde, Witham vd. (1971) tarafından geliştirilen yöntem esas alındı. Analizlerde, her bir örnekten 0,25 gr taze yaprak dokusu alındı ve %80’lik aseton içerisinde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, örnekler bir havan yardımıyla 2,5 mL %80’lik aseton ile iyice ezildi ve oluşan ekstrakt, filtre kâğıdından süzülerek temizlendi. Süzülen ekstrakt, yeniden %80’lik aseton ilavesiyle toplam hacmi 5 mL’ye tamamlanacak şekilde seyreltildi. Elde edilen ekstraktın absorbans değerleri 450 nm, 645 nm ve 663 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu absorbans değerleri, aşağıda verilen formüllerde yerine konularak, her bir pigment türüne ait içerik miktarları mg/g taze yaprak dokusu olarak hesaplandı.

$$\text{Klorofil a (mg/gr doku)} = [12,7 (D663) - 2,69 (D645)] (V/ 1000.W)$$

$$\text{Klorofil b (mg/gr doku)} = [22,9 (D645) - 4,68 (D663)] (V/1000.W)$$

$$\text{Toplam klorofil (mg/gr doku)} = [20,2 (D645) + 8,02 (D663)] (V/1000.W)$$

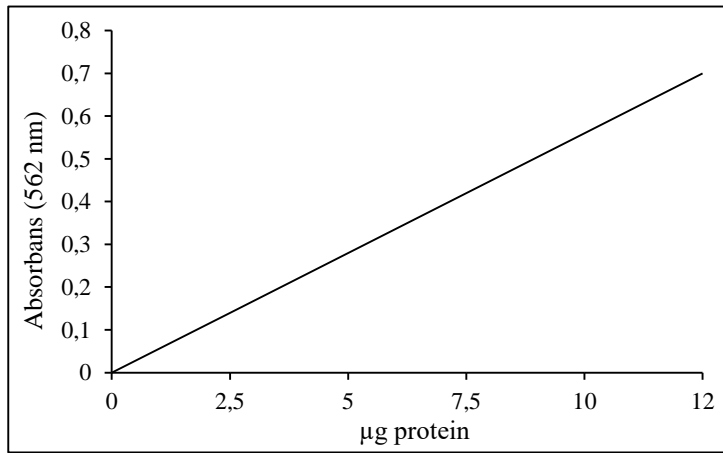
$$\text{Toplam karotenoid (mg/gr doku)} = 4,07 \times D450 - (0,0435 \times K_{la} \text{ miktarı} + 0,367 \times K_{lb} \text{ miktarı})$$

Eşitliklerde:

D, klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini; V, %80’lik aseton son hacmini; W, ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığını göstermektedir.

Bitki Dokularında Protein Miktarının Belirlenmesi

Bu çalışma, bitki kök ve yaprak dokularında toplam protein miktarının miligram düzeyinde belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu doğrultuda, rastgele seçilen 0,25 gram taze bitki dokusu alınarak sıvı azot ortamında havan ve tokmak kullanılarak ince un haline getirilmiştir. Elde edilen örnekler, 2,5 mL fosfat tamponu (100 mM KH_2PO_4 , pH 7,0) ile karıştırılmış ve bir doku homojenleştirici yardımıyla iyice homojenize edilmiştir. Hazırlanan homojenat, +4 °C'de 15 dakika boyunca 10,000 rpm'de santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant dikkatlice temiz bir tüpe aktarılmıştır. Protein tayini için süpernatanttan 20 μL örnek, mikrolaka kuyularına (250 μL ; 8x12) aktarılmış; ardından her bir kuyuya 200 μL BCA (Bicinchoninic asit + CuSO_4) reaktifi eklenmiştir. Mikrolaka hafifçe çalkalanarak reaktifin örnekle karışması sağlanmış ve ardından 60 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, her örneğin absorbans değeri, 562 nm dalga boyunda, uygun bir Multiskan spektrofotometre ile kör örneğe karşılık olarak ölçülmüştür. Kör olarak yalnızca 20 μL saf su ve 200 μL BCA reaktifi içeren bir karışım kullanılmıştır. Protein konsantrasyonunun kantitatif olarak belirlenebilmesi için standart eğri oluşturulmuştur. Bu amaçla, 10 mg sığır serum albümini (BSA), 10 mL fosfat tamponu (100 mM, pH 6,75) içerisinde çözülerek stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan sırasıyla 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 ve 12,0 μL hacimlerinde alınarak mikrolaka kuyularına aktarılmış, her kuyu 20 μL 'ye tamamlanmış ve 200 μL BCA reaktifi eklenmiştir. Bu standartlar da örneklerle aynı inkübasyon koşullarına tabi tutulmuştur. Elde edilen absorbans değerlerine göre oluşturulan standart eğri kullanılarak (Şekil 1) bitki kök ve yaprak dokularındaki toplam protein miktarı $\mu\text{g/g}$ taze doku cinsinden hesaplanmıştır (Smith *et al.* 1985).



Şekil 3. Protein tayininde kullanılan standart grafik.

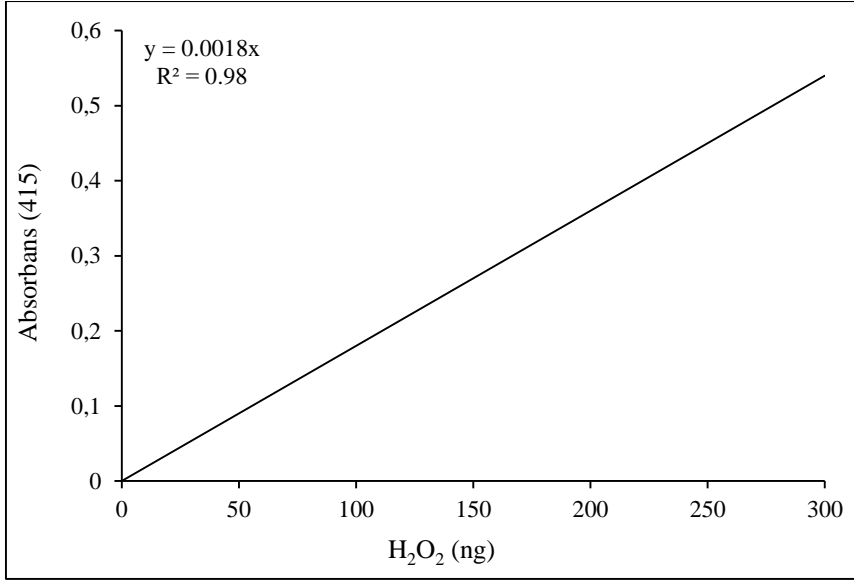
Lipid Peroksidasyonu Tayini

Bitki dokularında lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesinin tayini, malondialdehit (MDA) içeriğinin ölçülmesine dayalı olarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, 0,25 gram taze bitki dokusu, %5 trikloroasetik asit (TCA) içeren 2,5 mL çözelti içerisinde iyice homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat, 12,000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve üst faz (süpernatant) dikkatlice ayrılmıştır. Süpernatanttan alınan 2 mL hacme, %0,5 oranında tiyobarbitürik asit (TBA) içeren 0,5 mL çözelti ilave edilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımı, kaynar su banyosunda 30 dakika süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda, reaksiyonun sonlandırılması amacıyla tüpler buz banyosuna aktarılmış ve hızla soğutulmuştur. Soğutma işlemini takiben karışım, 10,000 rpm'de 5 dakika süreyle tekrar santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı spektrofotometrik ölçüm için kullanılmıştır. Absorbans değerleri, önce 532 nm dalga boyunda okunmuş; ardından 600 nm'de elde edilen non-spesifik absorbans değeri ile düzeltilmiştir. Nihai MDA konsantrasyonu, aşağıdaki formül kullanılarak nmol/mL cinsinden hesaplanmıştır (Hodges *et al.* 1999).

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/mL}): [[(A532 - A600) - (A450 - A600) \times (0.0571)]] / 157,000) \times 10^6$$

Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi

Hidrojen (H₂O₂) peroksit içeriğinin tespiti amacıyla, 0,25 gramlık bitki dokusu alınarak 2,5 ml soğuk aseton içerisinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat, 10,000 x g'de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Ayrılan süpernatanttan 1,5 mL alınarak, 0,15 mL %5'lik titanyum sülfat [Ti(SO₄)₂] ve 0,3 mL %19'luk amonyum hidroksit (NH₄OH) çözeltisiyle karıştırılmıştır. Bu karışımda meydana gelen çökelek, tekrar 10,000xg'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, tüpte kalan çökelti 3 mL 2 M sülfürik asit (H₂SO₄) içinde çözülmüştür. Ortaya çıkan çözeltinin absorbansı 415 nm'de ölçülmüş ve elde edilen değerler, önceden oluşturulmuş standart eğri aracılığıyla nanogram (ng) cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürülmüştür. Nihai sonuçlar, gram doku başına düşen hidrojen peroksit miktarı (ng/g doku) şeklinde sunulmuştur (Velikova *et al.* 2000; Atıcı *et al.* 2025).



Şekil 4. H₂O₂ tayininde kullanılan standart grafik.

Süperoksit Anyonu (O₂⁻) Miktarının Tayini

Bu analiz için 0,25 gram bitki dokusu 2,5 mL 65 mM'lik, pH 7,8'e ayarlanmış soğuk fosfat tamponu içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat, 5000xg'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmından 1 mL alınarak üzerine 0,9 mL fosfat tamponu ile 0,1 mL 10 mM hidroksilamin hidroklorür eklenmiştir. Bu karışım 25°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, bu çözeltilerden 1 mL alınarak; 1 mL 17 mM aminobenzen sülfonik asit ve 1 mL 17 mM 1-naftilamin ilavesiyle yeni bir karışım oluşturulmuş ve tekrar 20 dakika inkübe edilmiştir. Son aşamada, karışıma 3 mL n-bütül alkol ilave edilmiş ve çözeltilerin absorbansı 530 nm'de ölçülmüştür. Ölçümlerin değerlendirilmesi, çeşitli konsantrasyonlardaki NaNO₂ çözeltilerinin absorbans değerlerini içeren standart eğri üzerinden yapılmıştır (Eltner and Heupel 1976; Hodges *et al.* 1999).

Antioksidan Enzimlerin Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenebilmesi için 0,25 gr bitki örneği sıvı azot eşliğinde porselen havanda iyice ezilerek homojenize edilmiş ve üzerine %1 PVP ve 1 mM EDTA içeren, pH 7,0'e ayarlanmış 0,1 M KH₂PO₄ tamponu (0,25 mL) eklenmiştir. Hazırlanan homojenat, santrifüj tüplerine alınarak +4°C'de, 15,000xg'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant kısmı, aşağıda çalışılan tüm enzim aktivitesi analizlerinde enzim kaynağı (enzim ekstraktı) olarak kullanılmıştır (Esim *et al.* 2013; Gülmez *et al.* 2023; Atıcı *et al.* 2025).

Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) enziminin aktivitesi, H₂O₂'nin su ve oksijene parçalanması sırasında 240 nm'de meydana gelen absorbans azalışı ile izlenmiştir. Ölçüm için 3 mL'lik spektrofotometre küvetine; 1,475 mL 103 mM KH₂PO₄ tamponu, 1,5 mL 40 mM H₂O₂ çözeltisi ve 25 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirilerek, 240 nm'de her dakika ölçüm alınmak suretiyle toplamda 3 dakika boyunca absorbans değerleri kaydedilmiştir. Absorbansın lineer azaldığı bölüm dikkate alınarak dakikalık azalma hesaplanmıştır. Bu değerler, hazırlanan standart eğri aracılığıyla H₂O₂ miktarına (µmol) çevrilmiş ve sonuçlar, mg protein başına enzim ünitesi (EU/mg protein) olarak raporlanmıştır (Esim *et al.* 2013). Spesifik aktivite, aşağıdaki formül yardımıyla mikromol H₂O₂/mg protein/dakika cinsinden ifade edilmiştir. Bu hesaplamada, 240 nm'deki molar absorptivite katsayısı ($\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) olarak kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{mg protein} / \text{dk}) = (\Delta A_{240} \text{ nm/dk} \times 1000) / [39.4 \times (\text{mg protein} / \text{mL})]$$

Guaiacol peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz aktivitesi (GPX; EC 1.11.1.7) guaiacol ile H₂O₂'nin reaksiyonu sonucunda oluşan renkli bileşiğin 470 nm'deki absorbans artışına dayalı olarak ölçülmüştür. Analiz için; 3 mL 0,1 M NaH₂PO₄ (pH 5,5) ve 5 mM guaiacol içeren substrat çözeltisi üzerine 10 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Absorbans artışı, 470 nm'de her dakika olmak üzere toplam 5 dakika boyunca ölçülmüş; doğrusal artış gösteren bölüm değerlendirilmiştir. Absorbansın dakikada 0,01 artmasına neden olan enzim miktarı 1 enzim ünitesi (EU) kabul edilerek sonuçlar U/mg protein cinsinden sunulmuştur (Agarwal and Pandey 2004; Esim *et al.* 2013).

Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini

SOD (EC 1.15.1.1) enziminin aktivitesi, NBT'nin süperoksit radikalleri tarafından mavi renkli formazona dönüştürülmesinin, SOD varlığında inhibe edilmesi esasına dayanmaktadır. Analiz için hazırlanan 3 mL reaksiyon karışımı; 50 mM KH₂PO₄ (pH 7,8), 13 mM metiyonin, 63 µM NBT, 13 µM riboflavin ve 0,1 mM EDTA içermektedir. Riboflavin içermeyen karışımdan 2,58 mL spektrofotometre küvetine alınarak üzerine 30 µL enzim ekstraktı eklenmiştir. Reaksiyon, 390 µL 13 µM riboflavin eklenmesi sonrası beyaz ışık kaynağı önünde 15 dakika süreyle gerçekleştirilmiş ve bu sürenin sonunda 560 nm'de absorbans değerleri alınmıştır. Enzimsiz kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonunu sağlayan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak

tanımlanmıştır. Sonuçlar, mg protein başına enzim aktivitesi (EU/mg protein) şeklinde sunulmuştur (Agarwal and Pandey 2004; Esim *et al.* 2013).

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi tayini

Glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2), okside glutasyonu (GSSG), NADP'ı kullanarak redükte glutatyona (GSH) indirgeyen bir flavoenzimdir. Kısaca elektron vericisi olarak NADP'ı kullanarak GSH oluşturan enzimdir. GR aktivitesi, NADPH'ın oksitlenmesi esasına dayalı olarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir (Foyer and Halliwell 1976). Reaksiyon karışımı; 200 µL 0,5 mM EDTA, 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH çözeltilerinin 2,95 mL 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,8) içerisinde hazırlanmasıyla oluşturulmuştur. Bu karışıma 50 µL enzim ekstraktı eklenmiştir. NADPH'ın oksidasyonu sonucu 340 nm'de oluşan absorbans düşüşü 5 dakika boyunca kaydedilerek GR aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Foyer and Halliwell 1976). Bu hesaplamada, NADPH'ın 340 nm'deki molar absorptivite katsayısı ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) olarak kullanılmıştır.

Aktivite (EU/mg protein) = $(\Delta A_{340}/dk \times \text{Toplam hacim (mL)}) / (6,22 \times \text{Enzim hacmi (mL)} \times \text{Protein miktarı (mg/mL)})$

Askorbat peroksidaz aktivitesinin ölçümü

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) enziminin aktivitesi, askorbik asidin (ASA) H_2O_2 ile reaksiyonu sırasında 290 nm'de gözlenen absorbans azalışına dayalı olarak belirlenmiştir (Nakano and Asada 1981). Reaksiyon karışımı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 µM ASA, 5 mM H_2O_2 ve 100 µL enzim ekstraktı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen absorbans değişimleri 290 nm'de ölçülerek, epsilon katsayısı ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dikkate alınmak suretiyle enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve sonuçlar U/mg protein biriminde ifade edilmiştir.

Aktivite (U/mg protein) = $(\Delta A_{290}/dk \times V_{\text{topl}}) / (2,8 \times 1 \text{ cm} \times V_{\text{enzim}} \times C_{\text{protein}} \text{ mg/mL})$

Formülde;

V_{topl} : Toplam reaksiyon hacmi (mL)

ϵ (epsilon): Molar absorptivite katsayısı ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

1 cm: Küvetin ışık yolu uzunluğu

V_{enzim} : Eklenen enzim çözeltisi hacmi (mL)

C_{protein} : Enzim ekstraktındaki protein miktarı (mg/mL)

İstatistik analiz

Çalışmada elde edilen veriler, her bir uygulama grubuna ait üç bağımsız biyolojik örnekten (n=3) ve her bir örneğin iki teknik tekrarı alınarak toplam altı ölçümden elde edilen ortalama değerler şeklinde sunulmuştur. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, SPSS 21,0 paket yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin analizinde tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) uygulanmış ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunması durumunda, bu farklılıkların belirlenmesi için Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmıştır. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çalışmada, içeriği ve doğallığı nedeniyle, ülkemizin Maraş-Elbistan Bölgesi'nde üretilen ve leonardit kaynaklı humik asit (HA) tercih edilmiştir. Bu HA, pH aralığı 2-4 olan doğal leonarditten üretilmiş olup; toplam organik madde: %12, toplam humik asitler: %12, suda çözünür potasyum oksit (K₂O): %2,5 ve pH 7-9 aralığında olan yerli üretim bir humik asittir (İlay *et al.* 2021). Leonardit kaynaklı HA, yüksek humik içeriği sayesinde bitkiler üzerinde güçlü bir etki yaratmaktadır. Ayrıca doğal ve organik bir kaynak olması, çevre dostu kullanımını mümkün kılmaktadır. Diğer HA kaynaklarıyla kıyaslandığında, leonardit daha düşük kül içeriğine sahip olup, bu özelliğiyle toprağın tuzluluğunu artırmaz ve mikroorganizmaların faaliyetini engellemez. Linyit ve kömür kaynaklı humik asitler ise genellikle daha düşük organik madde içerir ve çözünürlükleri sınırlıdır, bu da bitki gelişimi üzerindeki etkilerini zayıflatır. Sentetik humik asitler ise doğal kaynaklardan elde edilmediği için organik tarımda kullanılamaz ve çevresel etkileri daha olumsuz olabilir (Pekcan *et al.* 2018). Bu nedenlerle leonardit kaynaklı HA, diğer kaynaklara göre daha etkili ve sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır (<https://tarim11.com>).

Bu çalışmanın amacı, leonardit kaynaklı humik asit ile liken (*Rhizoplaca melanophthalma*) kökenli (likenden izole edilen) endofitik *Bacillus wiedmannii* bakterisi veya *Scopulariopsis brevicaulus* fungus izolatının birlikte kullanımının, tuz stresi altındaki yonca bitkisinin fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerine etkisini değerlendirmektir. Bu biyolojik ajanların kombine uygulaması, tuzlu koşullarda bitki gelişimini destekleyecek sürdürülebilir bir yaklaşım sunarak, biyogübre ve biyostimülan geliştirme çalışmalarına bilimsel ve pratik katkılar sağlamayı hedeflemektedir.

Araştırma bulguları sunulurken, sırayla önce bakteri uygulaması ve sonra fungus uygulamasından elde edilen bulgular verilmiştir. Çalışılan her bir parametreye ait bulgular verildikten sonra, peşine elde edilen bulguların literatür ile tartışması yapılmıştır.

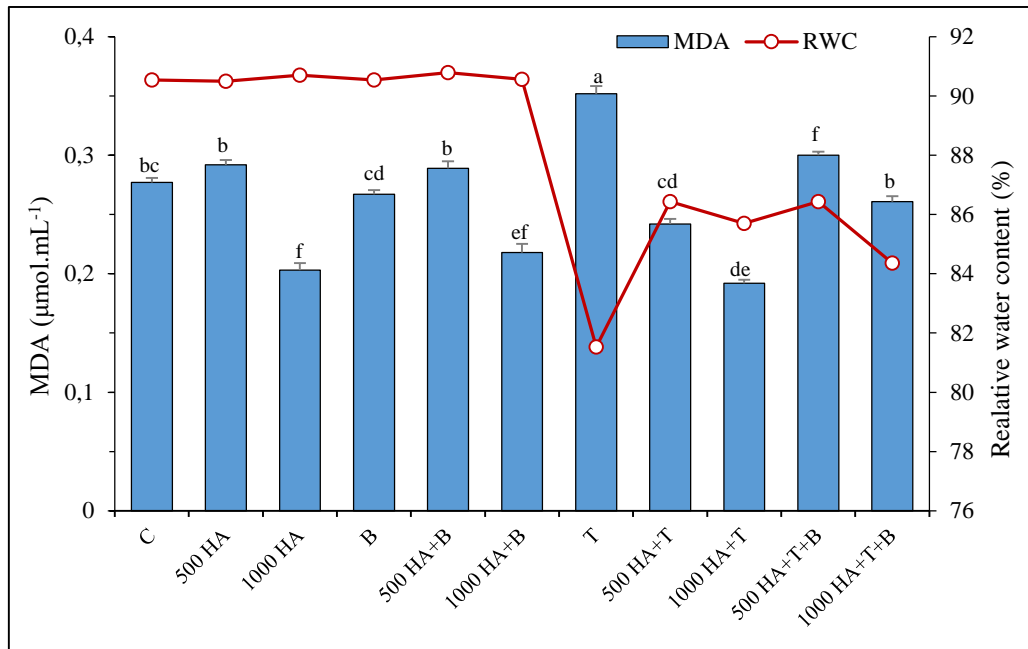
Bakteri Uygulamasından Elde Edilen Bulgular

Yapraklarda su içeriği bulguları

Çalışmada, ön denemeler sonucunda 100 mM NaCl konsantrasyonunun yonca (*Medicago sativa* L. cv. Konya) tohumlarının çimlenme ve fide gelişimini yaklaşık %50 oranında baskılayarak orta şiddette bir tuz stresi oluşturduğu belirlendi. Bu nedenle, bu tuz seviyesi çalışmanın stres seviyesi olarak seçilmiştir. Ayrıca, humik asit (HA) uygulamalarında

500 ve 1000 mg/L konsantrasyonlarının yonca gelişimini desteklediği saptanmıştır. Yaprak su içeriği açısından, HA ve bakteri (*B. wiedmannii*) uygulamaları kontrole (%90,54) göre kıyaslandığında yaprak su içeriğini (RWC) anlamlı seviyede değiştirmemiştir (Şekil 1). Ancak tuz stresine maruz kalan bitkilerde RWC %82,5 ile en düşük seviyeye gerilerken, tuzlu koşullarda HA ve bakteri uygulamaları bu düşüşü belirgin şekilde hafifletmiştir. Örneğin 1000 HA+B+Tuz grubunda RWC %85,7'ye kadar yükselmiştir.

Yaprak nisbi su içeriği (RWC), stresin bitkideki su dengesine olan etkisini ortaya koymaktadır. Kontrol grubunda RWC %90,54 seviyesindeyken, yalnızca tuz stresine maruz kalan bitkilerde bu değer %82,5'e kadar gerilemiştir. Bu düşüş, tuzun osmotik potansiyeli düşürerek bitkinin su alımını sınırladığı ve su kaybını artırdığı yönündeki literatürle örtüşmektedir (Gupta and Huang 2014). Ancak, tuz stresi altında HA ve *B. wiedmannii* uygulamalarıyla %RWC değerlerinde anlamlı bir iyileşme sağlamıştır. Özellikle 1000 mg/L HA+Bakteri+Tuz kombinasyonunda RWC değerinin %85,7'ye yükselmesi, bu uygulamaların su tutma kapasitesini iyileştirme potansiyelini göstermektedir. Bu iyileştirici etki, muhtemelen HA'nın kök gelişimini artırarak su alımını kolaylaştırması ve bakteriyel izolatin (*B. wiedmannii*) tuz stresi cevaplarını artırmasının bir sonucu olabilir (Egamberdieva *et al.* 2017).



Şekil 5. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının MDA ve RWC seviyeleri üzerindeki etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir ($p < 0,05$).

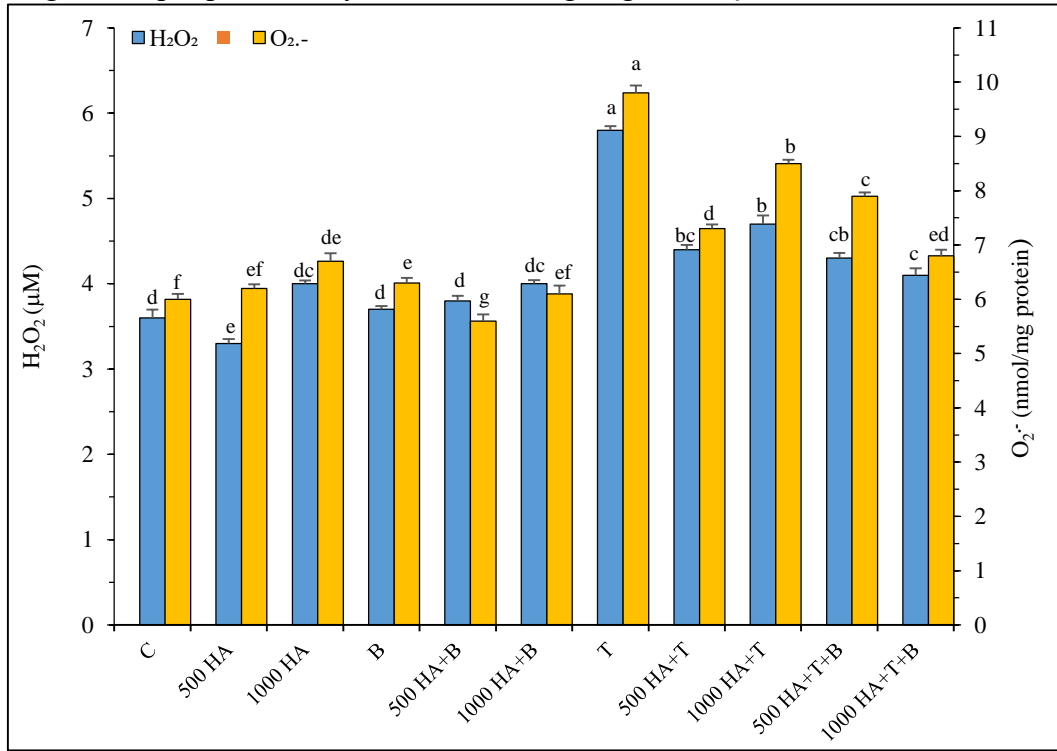
LPO (MDA olarak) ve ROS içeriği bulguları

Kontrol grubuna göre HA uygulamaları MDA düzeyini anlamlı şekilde düşürerek 0,23 ve 0,30 µmol/mL seviyelerine kadar düşürmüştür ($p < 0,05$). Bakteri uygulaması tek başına

uygulandığında MDA seviyesini 0,27 $\mu\text{mol/mL}$ 'ye düşürerek kontrol grubuna göre orta düzeyde bir azalma sağlamıştır. HA+B kombinasyonları kontrole göre anlamlı bir etki sergilememiştir. Tuz uygulaması ile oluşturulan stres koşulunda MDA düzeyi 0,36 $\mu\text{mol/mL}$ 'ye çıkarak tüm gruplar arasında en yüksek değeri vermiştir ($p<0,05$). Tuzla birlikte yapılan HA uygulamaları incelendiğinde, HA+Tuz kombinasyonları MDA düzeyini tekrar 0,23 ve 0,27 $\mu\text{mol/mL}$ seviyesine düşürerek yüksek doz HA'nın tuz stresi altında da oksidatif stresi etkin biçimde azalttığını göstermiştir. Bakteri ile birlikte yapılan tuz ve HA kombinasyonlarında ise 500 HA+Tuz+B grubunda MDA değeri 0,30 $\mu\text{mol/mL}$, 1000 HA+Tuz+B grubunda ise 0,27 $\mu\text{mol/mL}$ olarak belirlenmiştir. Tuz stresi (100 mM NaCl) uygulaması, *M. sativa* bitkilerinde hem H_2O_2 hem de O_2^- düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırmıştır ($p<0,05$). En yüksek H_2O_2 (yaklaşık 6 μM) ve O_2^- (yaklaşık 10,5 nmol/mg protein) seviyeleri yalnızca tuz uygulanan grupta gözlenmiştir. HA (500 ve 1000 mg/mL) uygulamaları tek başına H_2O_2 ve O_2^- seviyelerinde hafif bir artışa yol açarken, bakteri (*B. wiedmannii*) uygulaması bu parametrelerde belirgin bir değişiklik oluşturmamış ve özellikle süperoksit birikimini azaltma eğiliminde olmuştur. HA ve bakteri birlikte uygulandığında, her iki ROS düzeylerinde kısmi azalmalar gözlenmiştir. Tuz stresi altında ise hem HA hem de bakteri uygulamaları tek başına oksidatif stresi azaltmış, ancak en dikkat çekici düşüşler HA ve bakterinin birlikte uygulandığı gruplarda kaydedilmiştir. Özellikle 1000 mg/mL HA+B+Tuz grubu, H_2O_2 ve O_2^- seviyelerinituz stresine maruz kalan kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaltarak oksidatif stresin baskılanmasında en etkili kombinasyon olmuştur. Bu sonuçlar, HA ve *B. wiedmannii*'nin birlikte uygulanmasının tuz stresine karşı sinerjistik bir koruyucu etki oluşturduğunu göstermektedir.

Tuz stresi, bitkilerde H_2O_2 ve O_2^- gibi ROS birikimini artırarak oksidatif hasara yol açan önemli bir abiyotik stres faktörüdür (Gill and Tuteja 2010). Bu çalışmada kontrole kıyasla tek başına HA, bakteri ve HA+BA uygulamaları *M. sativa* yapraklarının ROS içeriği üzerinde güçlü anlamlı bir etki sergilememiştir. Buna karşılık, tuz stresinin kontrole kıyasla H_2O_2 ve O_2^- seviyelerini önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. Yüksek tuz konsantrasyonları, hücrelerde iyon dengesizliğine, proteinlerin denatürasyonuna ve fotosentetik aktivitenin azalmasına neden olarak ROS üretimini tetikleyebilir (Gupta *et al.* 2014; Hasanuzzaman *et al.* 2020). Ancak, HA ve bakterinin birlikte uygulandığı gruplarda oksidatif stresin baskılanmasında sinerjistik bir etki gözlenmiştir. Özellikle 1000 mg/mL HA+B+Tuz grubunda H_2O_2 ve O_2^- seviyelerinin tek başına tuz uygulanmış gruba göre anlamlı düzeyde azalması, bu kombinasyonun tuz stresine karşı bitkileri korumada tek başına uygulamalara göre çok daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu sinerjik etki, HA'nın bitkinin fizyolojik

durumunu iyileştirerek bakterinin stres azaltıcı mekanizmalarının daha etkin çalışmasına olanak sağlaması veya bakterinin HA'nın biyoaktif bileşenlerinin bitki tarafından alınımı ve kullanımını artırması gibi çeşitli mekanizmalarla açıklanabilir. LPO'nun bir göstergesi olan MDA düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre tek başına HA ve B uygulamalarının MDA düzeyini anlamlı şekilde düşürmesi, bu iki ajanın ayrı ayrı oksidatif hasarı azaltıcı potansiyelini desteklemektedir. Tuz uygulamasının MDA düzeyini önemli ölçüde artırması, tuz stresinin neden olduğu membran hasarının literatürdeki bulgularla uyumlu bir göstergesidir (Hasanuzzaman *et al.* 2020; Gupta *et al.* 2014). HA+Tuz ve HA+Tuz+B uygulamaları da MDA düzeylerinde azalmalar gözlemlenmiştir. Özellikle 1000 HA+Tuz+B grubunda elde edilen düşük MDA değeri, HA ve bakterinin birlikte uygulanmasının tuz stresine bağlı membran hasarını azaltmada sinerjik bir etki gösterebileceğine dair ek kanıt sunmaktadır. Bu bulgular, HA ve *B. wiedmannii*'nin birlikte uygulanmasının, sinerjistik bir etkiyle, tuz stresinin *M. sativa* bitkilerinde neden olduğu oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığını ve lipid peroksidasyonunu baskıladığını göstermiştir.



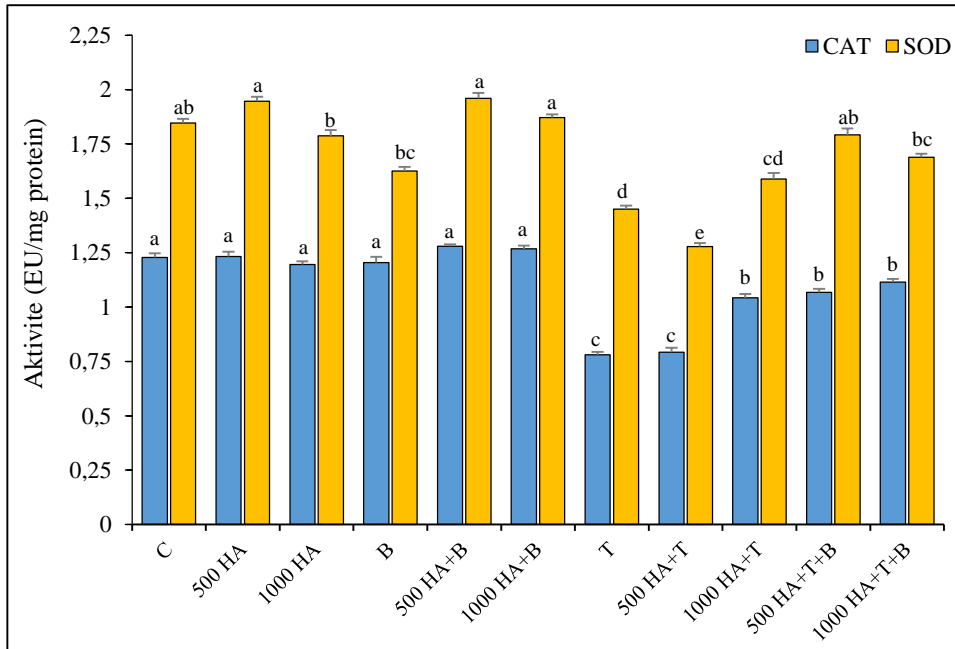
Şekil 6. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının H₂O₂ ve O₂⁻ miktarı üzerinde etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir (p<0,05).

Antioksidan enzim aktivitelere ait bulgular

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi kontrol grubunda yaklaşık 1,8 EU/mg protein düzeyinde ölçülmüştür (Şekil 7). Humik asit (500 HA) uygulaması SOD aktivitesini az da olsa artırarak bu enzimin aktivitesini korumuş ancak 1000 HA uygulaması biraz daha düşük

aktivite göstermiştir. Bakteri (B) uygulaması ise benzer düzeyde kalmıştır. Humik asit (HA) ve B kombinasyonları ise SOD aktivitesini en yüksek seviyelere çıkarmış ve yaklaşık 2,0 EU/mg protein düzeyine ulaşmıştır. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde SOD aktivitesi belirgin şekilde azalarak yaklaşık 1,4 EU/mg protein düzeyine düşmüştür. Tuz + humik asit uygulamaları, SOD aktivitesini kısmen toparlayarak anlamlı bir artış göstermiştir. Ancak en dikkat çekici artışlar, 500 HA+T+B ve 1000 HA+T+B gruplarında gözlemlenmiştir. Bu gruplar, SOD aktivitesini tekrar 1,8-1,9 EU/mg protein düzeyine çıkarmıştır. Bu bulgular, HA ve B kombinasyonunun tuz stresinde SOD aktivitesini etkili biçimde restore ettiğini göstermektedir (Şekil 7).

Katalaz (CAT) aktivitesi, kontrol grubuna (1,3 EU/mg protein) kıyasla, HA ve B uygulamaları tarafından, kayda değer bir değişikliğe neden olmamıştır ($p>0,05$). Humik asit+B kombinasyonları da benzer şekilde CAT aktivitesinde anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır (Şekil 8). Tuz uygulaması, kontrole göre CAT aktivitesini önemli ölçüde düşürerek yaklaşık 1,0 EU/mg protein seviyesine çekmiştir. Tuz+HA uygulamaları, CAT aktivitesinde küçük artışlar sağlamış; özellikle 1000 HA+Tuz grubunda bu artış anlamlı olmuştur. En dikkat çekici artış, 500 HA+Tuz+B ve 1000 HA+Tuz+B gruplarında gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, tuz stresine karşı HA ve bakterinin birlikte uygulanmasının CAT enzimini eski düzeyine döndürmede etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

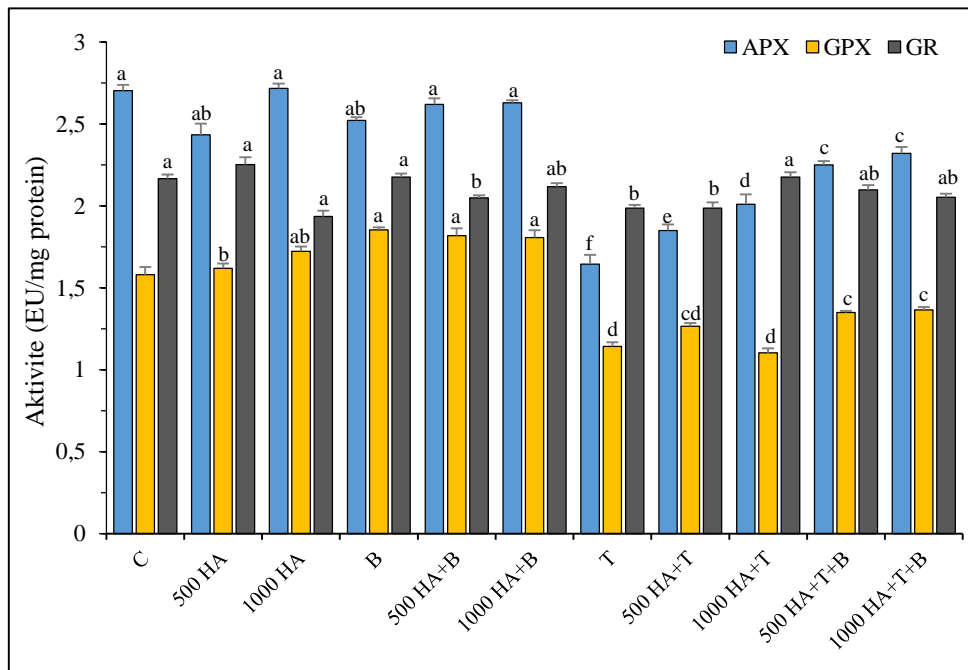


Şekil 7. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının CAT ve SOD enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir ($p<0,05$).

Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesine gelince, kontrol grubuna göre, HA ve B uygulamaları APX aktivitesinde anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır (Şekil 9). Tuz

uygulaması bitkilerde APX aktivitesini önemli ölçüde düşürmüştür, bu grupta aktivite yaklaşık 1,6 EU/mg protein düzeyine gerilemiştir. Tuz ile birlikte uygulanan HA, APX aktivitesi tuz grubuna göre anlamlı ($p<0,05$) şekilde artış göstermiştir. HA ve B uygulamasının tuz altında uygulandığı gruplarda APX aktivitesinde daha belirgin artışlar gözlemlenmiştir.

Guaiakol peroksidaz (GPX) aktivitesi, kontrol göre, HA ve B uygulamaları GPX aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmamış ve kontrol ile benzer düzeyde kalmıştır. Tuz uygulaması GPX aktivitesinde ciddi bir azalmaya (1,1 EU/mg protein) neden olmuştur (Şekil 8). 500 ve 1000 mg/L HA ile birlikte tuz uygulanan gruplarda, GPX aktivitesinde hafif ama anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. En belirgin artışlar, hem HA hem de B ile birlikte tuz uygulanan gruplarda gözlemlenmiş olup, bu gruplarda GPX aktivitesi yaklaşık 1,6-1,7 EU/mg protein düzeyine ulaşmıştır. Bu bulgu, HA ve B'nin birlikte uygulanmasının, tuz stresine karşı GPX aktivitesini eski haline getirme kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 8. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının APX, GPX ve GR enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir ($p<0,05$).

Guaiakol redüktaz (GR) aktivitesi verileri incelendiğinde kontrol göre, HA uygulamaları ve tek başına B uygulaması GR aktivitesinde hafif ($p>0,05$) artışlar belirlenmiştir (Şekil 8). Tuz uygulanan grupta, GR aktivitesi ciddi oranda azalarak yaklaşık 1,5 EU/mg protein düzeyine inmiştir. HA ve tuzun birlikte uygulandığı gruplarda, GR aktivitesinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu artış, özellikle 1000 HA+Tuz grubunda daha belirgin olmuştur. En dikkat çekici toparlanma, tuzla birlikte hem HA+Bakteri uygulanan

gruplarda tespit edilmiştir. Bu gruplarda GR aktivitesi 2,0 EU/mg protein düzeyine kadar. Bu durum, HA ve bakterilerin birlikte uygulanmasının tuz stresine karşı GR aktivitesini normal seviyelere döndürmede etkili olduğunu göstermektedir.

Yukarıda sunulan HA ve bakteri uygulamalarının antioksidan enzimler üzerindeki etkisine ait veriler, literatür verileri ile karşılaştırıldığında, çalışmamızda literatür için önemli bulgular elde edilmiştir. Örneğin, SOD enzimi, süperoksit anyonunu H₂O₂'ye dönüştürerek bitkilerde serbes radikallere karşı ilk savunma hattını oluşturduğu iyi bilinmektedir (Hasanuzzaman *et al.* 2020). Tuz stresi genellikle hücre içi ROS seviyesini yükseltir ve SOD aktivitesini uyarmaya yönelik bir tetikleyici etki gösterir. Örneğin Younesi ve Moradi (2014) 200 mM NaCl uygulaması alfalfa fidesinde SOD aktivitesini anlamlı şekilde artırmıştır. Buna karşılık, bizim çalışmamızda 100 mM tuz stresi koşullarında SOD aktivitesi kontrol seviyelerine kıyasla düşmüştür (Şekil 7). Bu durum çalıştığımız çeşidin tuza tolerans seviyesi ile ilişkili olabilir. Nitekim çalışmamızda kullanılan yoncanın Konya çeşidi 100 mM tuz seviyesinde %50 büyüme inhibisyonu göstermiş ve 200 mM tuzda çimlenme ve büyüme gerçekleşmemiştir. Literatürde tuza toleranslı çeşitlerde SOD aktivitesinin yüksek olduğu, bu sayede tuz kaynaklı stresle daha iyi baş edilebildiği bildirilmiştir. Örneğin tuza dayanıklı pirinç çeşitlerinde SOD geninin ekspresyonu yükselmiş, tuza hassas çeşitlere göre SOD aktivitesi yüksek bulunmuştur (Hasanuzzaman *et al.* 2020). Ancak bu düşüş HA veya bakteri (*B. wiedmannii*'nin) uygulamalarıyla kısmen giderilmiş ve hatta HA+B kombinasyonu ile SOD aktivitesi kontrol düzeyine yakın bir seviyeye ulaşmıştır. Benzer biçimde, humik asit uygulamalarının buğdayda da SOD dahil antioksidan enzim aktivitesini artırarak tuz toleransını geliştirdiği gösterilmiştir (Abbas *et al.* 2022). Ayrıca *Bacillus* PGPR suşlarının inokülasyonunun, pirinç bitkilerinde SOD aktivitesini tuz stresi altında %25-50 oranında artırdığı gösterilmiştir (Ali *et al.* 2022). Bizim bulgularımızda da *B. wiedmannii*'nin inokülasyonuna bağlı olarak SOD aktivitesi belirgin şekilde artmış, HA ile birlikte uygulandığında ise aktivite kontrol seviyesine yakın olarak geri dönmüştür. Benzer olarak, CAT aktivitesi 100 mM NaCl uygulaması ile önemli ölçüde düştüğü, ancak 500 ve 1000 mg/mL HA ile bakterinin birlikte uygulanması, CAT aktivitesinde kayda değer artışlar sağlamıştır. Benzer bir çalışmada *Bacillus subtilis* ve *B. aryabhatai* uygulaması, tuz stresine maruz kalan pirinç ve domates bitkilerinde CAT aktivitelerini anlamlı şekilde artırmıştır (Patani *et al.* 2023; Siddika *et al.* 2024). Benzer şekilde, HA'nın da bitkilerdeki oksidatif hasarı azaltarak enzimatik savunmayı güçlendirdiği bildirilmiştir (Meng *et al.* 2023). Ayrıca, katalaz üretme yeteneği olan *Bacillus* konsorsiyumlarının CAT aktivitesini %50'nin üzerinde artırabildiği gösterilmiştir (Saeed *et al.* 2023). Bu bağlamda, mevcut çalışmadaki HA+B.

wiedmannii kombinasyonlarının SOD ve CAT aktivitesini artırma etkisi, tuz stresi altında *M. sativa*'nın fizyolojik dayanıklılığını artırma potansiyeline katkı sağladığı ileri sürülebilir. APX, askorbat (AsA)-glutasyon (GSH) döngüsünde H₂O₂'yi temizleyen temel enzimlerden biridir. Tuz stresi koşullarında APX aktivitesi genellikle yükselir; Younesi ve Moradi (2014) alfalfa çalışmasında 200 mM NaCl, APX aktivitesini iki katın üzerinde artırmıştır. Tuz toleranslı genotiplerde APX ekspresyonunun ve aktivitesinin yüksek olması da literatürde rapor edilmiştir (Hasanuzzaman *et al.* 2020). Ancak çalışmamızda çalıştığımız yonca çeşidinde APX aktivitesi tuz stresi ile düşüş göstermiştir (Şekil 8). Bu durum çalıştığımız çeşidin tuza tolerans seviyesi ile ilişkili olabilir. Nitekim çalışmamızda kullanılan yoncanın Konya çeşidi 100 mM tuz seviyesinde %50 büyüme inhibisyonu göstermiş ve 200 mM tuzda çimlenme gerçekleşmemiştir. Diğer taraftan, tek başına HA veya bakteri uygulaması bir miktar toparlama sağlarken, HA+B kombinasyonu APX aktivitesini kontrol düzeyine yakınlaştırmıştır. Bazı çalışmalar humik asidin APX aktivitesini artırdığını ileri sürmüştür. Örneğin HA uygulaması, tuz altındaki sorgum bitkisinde APX aktivitesini belirgin oranda yükseltmiştir (Ali *et al.* 2020). Benzer şekilde, *Bacillus* PGPR inokülasyonu pirinçte APX aktivitesini %45-58 aralığında artırmıştır (Ali *et al.* 2022). Ayrıca PGPB ve HA birlikte uygulandığında antioksidan enzim aktiviteleri genel olarak artmakta ve hücre hasarını gösteren peroksidasyon değerleri azalmaktadır (da Silva *et al.* 2021). Çalışma bulgularımız, HA+B. *wiedmannii*'nin kombinasyonunun APX aktivitesini eski seviyelerine yaklaştırdığını göstermiştir ki, bu da literatürdeki humik asit ve mikroorganizma birlikteliğinin antioksidan tepkiyi modüle ettiği mekanizmalarla tutarlıdır. GPX, fenolik substratlar kullanarak H₂O₂'yi parçalayan bir peroksidaz türüdür ve hücre zarını oksidasyondan korur (Hasanuzzaman *et al.* 2020). Tuz stresi altında birçok türde peroksidaz aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Yıldız *et al.* 2014). Bu durum, bitkilerin tuz kaynaklı ROS'u gidermek için GPX yolunu aktive ettiğini göstermektedir. Bizim deneysel sonuçlarımızda ise GPX aktivitesi tuz stresiyle önemli oranda azalmıştır (Şekil 8). Bir çalışmada tuz stresine maruz kalan ryegrass bitkisinde, uygulamanın başlangıcında GPX dahil antioksidan enzim aktiviteleri artmış, ancak 12. günden sonra bu aktiviteler kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu durum tuz stresi altında antioksidan enzimler başlangıçta (erken dönemde) savunma amaçlı aktive olabildiğini, stresin devam etmesi durumunda bu savunma sistemini baskılanmakta olduğunu göstermektedir (Hu *et al.* 2012). Bizim çalışmamızda da yoncanın 35 gün tuz stresine maruz kaldığı göz önüne alındığında çalışmamızdan elde edilen bulgunun sürpriz olmadığı açıktır. Diğer taraftan çalışmamızda tuz ile düşen aktivite HA veya bakteri uygulamaları ile kısmen toparlanmış, HA+B kombinasyonunda ise kontrol seviyesine yakın bir iyileşme sağlanmıştır. Literatürde humik asit uygulamalarının GPX aktivitelerini artırdığı, bitkileri oksidatif strese karşı koruduğu

gösterilmiştir (Abbas *et al.* 2022; Ali *et al.* 2022). Benzer biçimde, *Bacillus* inokülasyonu buğday ve mısır gibi bitkilerde GPX aktivitelerini olumlu yönde değiştirmiştir (Ali *et al.* 2022). Dolayısıyla elde edilen bulgular, HA+B. *wiedmannii* uygulamasının tuz stresi altındaki yoncada GPX aktivitesini eski düzeylerine yaklaştırarak hücrel ROS temizliğini desteklediğini göstermektedir. GR, bitkilerde AsA-GSH döngüsünün önemli bir elemanıdır. Bu enzim DHAR üzerinden oluşan dehidroaskorbattan AsA'yı yenilerken, aynı zamanda okside glutathionun (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) dönüşümünü sağlar (Hasanuzzaman *et al.* 2020). Tuz stresi ortamında GR aktivitesinde değişim genellikle daha sınırlı olduğu ileri sürülmüştür. Örneğin alfalfada tuz stresi, SOD ve APX aktivitelerini artırırken, GR aktivitesinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Younesi and Moradi 2014). Bu durum, GR'in genellikle AsA-GSH döngüsünün sistem bütünlüğünü sürdürmek için daha stabil kaldığını düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda ise GR aktivitesi tuz stresiyle kontrol seviyesine göre azalmış, ancak HA veya bakteri uygulamaları bu düşüşü ancak kısmen toparlamıştır (Şekil 8). Bu durum yoncanın tuz stresi toleransı ve tuz uygulama süresiyle yakından ilişkili olabilir. Ancak HA+B kombinasyonu tuz etkisiyle düşen GR aktivitesini kontrol seviyesine yaklaştırmıştır. Genel olarak, HA ve PGPR uygulamalarının GR ve diğer döngü enzimlerini harekete geçirerek AsA-GSH döngüsünü güçlendirdiği, böylece H₂O₂ temizliğinin iyileştiği bilinmektedir (da Silva *et al.* 2021). Çalışmamızdaki sonuçlar, HA+B. *wiedmannii* GR aktivitesini eski düzeyine geri döndürmesi bakımından bu mekanizmalarla uyumludur.

Fotosentetik pigment içeriği bulguları

Tuz stresi tek başına uygulandığında tüm klorofil parametrelerinde önemli bir düşüş belirlenmiş ($p < 0,05$) ve klorofil a'daki oransal düşüşün, klorofil b'deki oransal düşüşe kıyasla daha fazla olmuştur (Şekil 9). Humik asit (HA) uygulamalarının, özellikle yüksek dozda (1000 mg/mL) uygulandığında, kontrol grubuna göre klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağlamıştır ($p < 0,05$). Ancak, yüksek dozda HA (1000 mg/mL) klorofil a üzerindeki artırıcı etkisi, klorofil b üzerindeki artırıcı etkisinden daha belirgin olmuştur. Bakteri uygulaması da tek başına uygulandığında klorofil içeriklerinde artışa neden olmuştur. Bu uygulamada da klorofil a üzerindeki artışın, klorofil b üzerindeki artıştan biraz daha fazla olduğu söylenebilir. Ancak, bu artışın humik asit uygulaması kadar belirgin olmadığı görülmektedir. Tuz stresiyle birlikte humik asit ve bakteri uygulamalarının kombinasyonları incelendiğinde ise, bu uygulamaların tuzun neden olduğu olumsuz etkileri kısmen azaltabilmiştir. Özellikle 1000 mg/mL HA ve bakteri kombinasyonu (1000 HA+Tuz +B) uygulamasında, sadece tuz uygulanan gruba göre klorofil içeriklerinde

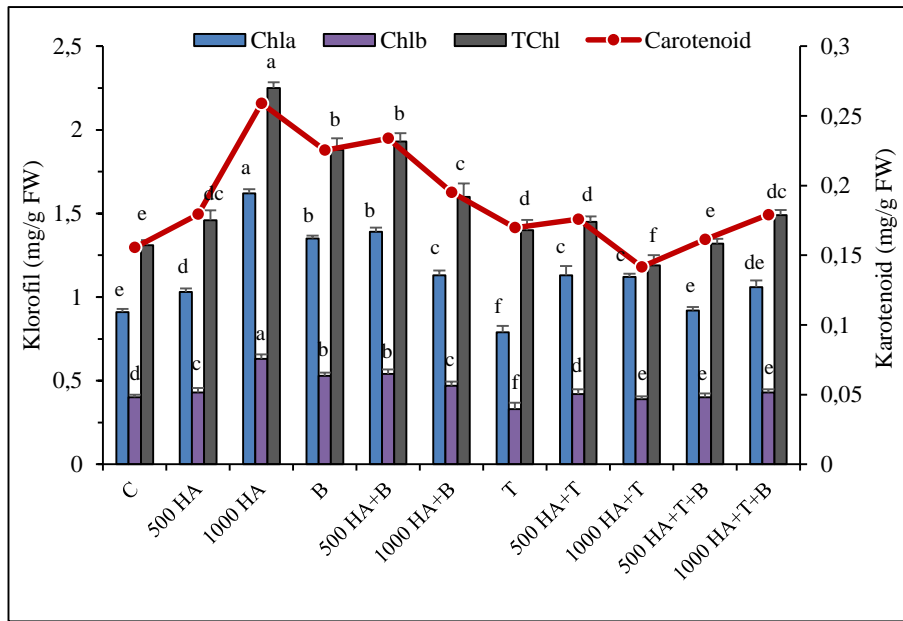
önemli bir iyileşme tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu uygulamalarda, genellikle klorofil a'daki iyileşme, klorofil b'deki iyileşmeden daha belirgin olmuştur.

Tuz stresinin, bitkilerde fotosentetik pigment sentezini bozduğu ve pigment yıkımını hızlandığı, bu nedenle klorofil a (Kla), klorofil b (Klb) ve toplam klorofil miktarlarının genellikle azaldığı iyi bilinmektedir (Jabborova *et al.* 2025). Bu çalışmada, yalnızca 100 mM NaCl uygulanması, kontrol bitkilerine kıyasla Kla ve Klb düzeylerinde belirgin bir azalmaya yol açmıştır; bu azalma Klb'ye kıyasla Kla'da daha yüksek oranda gerçekleşmiştir (Şekil 5). Bu sonuçlar, yonca bitkisinde tuzluluğun klorofil içeriğini azalttığını ve fotosistem II (PSII) verimliliğini düşürdüğünü, ancak düşük tuzluluk seviyelerinde PSII aktivitesini önemli ölçüde değiştirmediğini ortaya koyan önceki çalışmalarla uyumludur (Jabborova *et al.* 2025). Humik asit (HA) uygulamaları, özellikle 1000 mg mL⁻¹ dozunda, Kla, Klb ve toplam klorofil miktarlarını kontrol bitkilerine göre anlamlı düzeyde artırmıştır; bu artış Kla üzerinde Klb'ye kıyasla daha belirgin olmuştur. Ayrıca, Sofi vd. (2018), HA'nın çeşitli tuzluluk seviyelerine maruz kalan yonca fidelerinde Kla, Klb ve toplam klorofil düzeylerini iyileştirdiğini, özellikle 120 mM NaCl altında etkili olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, mısır ve salatalık bitkilerinde yapılan çalışmalar da, HA uygulamasının tuzluluğun etkilerini azaltarak pigment içeriklerini artırdığını, yaprak relatif su içeriğini (RWC) koruduğunu ve antioksidan enzim aktivitelerini artırdığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, *Bacillus wiedmannii* inokulasyonu tek başına, kontrol bitkilerine kıyasla Kla ve Klb miktarlarını (Kla'da biraz daha yüksek bir artışla) hafif düzeyde artırmıştır; ancak bu artış, HA uygulamalarına kıyasla daha düşüktür. Bu artışlar, bitki büyümesini destekleyen rizobakterilerin (PGPR) su ilişkilerini iyileştirerek ve osmolite birikimini artırarak pigment sentezini destekleyebileceğini ortaya koyan literatürle uyumludur (Ansari *et al.* 2019). Özellikle, tuzlu koşullar altında *Bacillus* suşlarıyla inoküle edilen yonca bitkilerinde, klorofilaz aktivitesinin düşürülmesi ve PSII fonksiyonunun korunması sayesinde klorofil kaybının önlenildiği gösterilmiştir (Ansari *et al.* 2019; Khan *et al.* 2021). Bu çalışmada HA ve bakterinin tuz stresi (100 mM NaCl) altında birlikte uygulanması, klorofil içeriğinde kısmi bir toparlanmaya yol açmıştır. 1000 mg/mL HA + Tuz + Bakteri uygulaması, yalnızca tuz uygulamasına göre Kla ve Klb seviyelerinde anlamlı bir iyileşme sağlamış; bu iyileşme Kla'da daha belirgin olmuştur.

Kontrol grubuna kıyasla tek başına tuz uygulaması karotenoid içeriğini düşürmüştür (Şekil 9). Ancak, tek başına 1000 mg/L HA ve bakteri uygulamaları karotenoid içeriğini belirgin şekilde artırmıştır (Şekil 9). Özellikle tek başına bakteri uygulanan grupta en yüksek

karotenoid değeri (yaklaşık 0,26) tespit edilmiştir. 500 mg/L HA ve kombinasyon uygulamaları (500 HA+B ve 1000 HA+B) da kontrol grubuna göre artış göstermiştir; ancak 1000 HA+B grubunda bu artışın anlamlı olmadığı değerlendirilmiştir. Tuz stresine karşı HA ve bakteri uygulamalarının etkileri incelendiğinde, 500 HA+T ve 1000 HA+T gruplarında tuzun olumsuz etkisinin kısmen hafifletildiği, fakat karotenoid düzeylerinin yine de kontrol düzeyinin altında kaldığı belirlenmiştir. Bakteri uygulamasının tuzla birlikte kullanıldığı gruplarda (Tuz+B ve 1000 HA+Tuz+B) karotenoid düzeylerinin, yalnızca tuz uygulanan gruba kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 9. Tuz (T), humik asit (HA) ve bakteri (B) uygulamalarının fotosentetik pigment içeriği üzerindeki etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir ($p < 0.05$). FW: Yaş ağırlık.

Karotenoidler, abiyotik stres altında ROS'ları temizleyerek fazla uyarılma enerjisini dağıtır ve fotokoruma işlevi görürler. Tuzluluğun karotenoid içeriğini azalttığı ve oksidatif zararı artırdığı bilinmektedir (Khan *et al.* 2021; Seven and Akinci 2025). Bu çalışmada, tuz uygulaması karotenoid seviyelerini kontrol grubunun altına düşürmüştür. Buna karşılık, hem 1000 mg/L dozundaki HA ve B uygulamaları karotenoid içeriğini artırmıştır. *Bacillus wiedmannii* tek başına en yüksek karotenoid sağlamıştır. Benzer şekilde, tuz stresi altındaki pirinç ve domates bitkilerinde *Bacillus* aracılığıyla karotenoid artışı gözlenmiştir; burada PGPR (bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler) kaynaklı antioksidan enzim aktivasyonu ve artan karotenoid sentezi oksidatif zararın azaltılmasına katkı sağlamıştır (Ansari *et al.* 2019; Khan *et al.* 2021). Ayrıca, Tuz+Bakteri ve 1000 HA+Tuz+Bakteri gruplarında karotenoid seviyeleri yalnızca Tuz grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, tuzlu koşullarda *Bacillus*'un

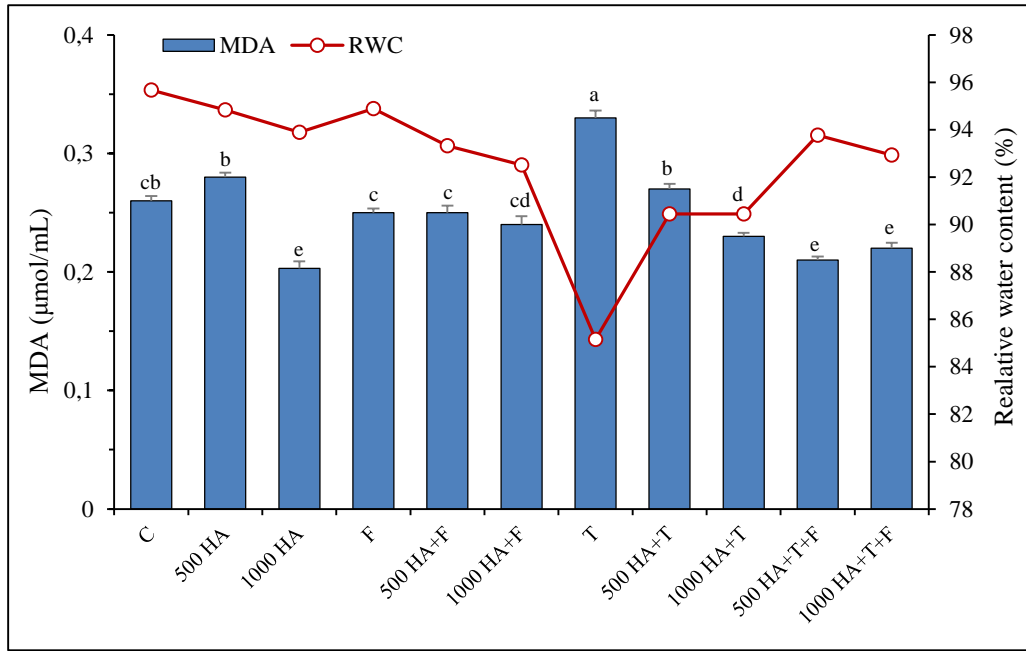
(HA ile birlikte ya da tek başına) karotenoid savunmasını artırmadaki üstün etkisini göstermektedir. Bu bulgular, *Bacillus*'un karotenoid biyosentezini düzenlemedeki etkisinin, tuz stresine maruz kalan yoncada antioksidan kapasiteyi geri kazandırmak açısından HA'dan daha güçlü olabileceğini düşündürmektedir (Ansari *et al.* 2019; Khan *et al.* 2021). Genel olarak değerlendirildiğinde, bu veriler 1000 mg/mL HA ve *Bacillus wiedmannii*'nin, tuz kaynaklı fotosentetik pigment düşüşlerini azaltabildiğini ve bu bileşik uygulamaların birlikte kullanıldığında daha etkili bir toparlanma sağladığını ortaya koymaktadır.

Fungus Uygulamasından Elde Edilen Bulgular

Yapraklarda su içeriği bulguları

Nispi su içeriği (RWC), bitkilerin su tutma kapasitesini ve hücrel su durumunu gösteren temel fizyolojik parametrelerden biridir. Yüksek RWC değeri, bitkinin metabolik aktivitelerini optimum seviyede sürdürebilme potansiyelini ve stres koşullarına karşı direnç düzeyini ifade eder. Çalışmamızın bu basamağında, kontrol grubunda RWC değeri %95,68 olarak tespit edilmiştir (Şekil 10). Bu, bitkinin doğal koşullardaki su içeriğini ve fizyolojik dengesini yansıtmaktadır. Çalışmamıza belirlenen RWC bulguları incelendiğinde, kontrol grubunda RWC %95,5 olarak belirlenmiş, 500 HA grubunda %94,8'e düşerek %0,7'lik bir azalma, 1000 HA grubunda ise %94,0'a gerileyerek %1,6'lık bir azalma gözlenmiştir. Ancak, bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Özetle, tek başına humik asit uygulamaları (500 HA ve 1000 HA), RWC değerinde hafif bir azalma göstermiştir. Bu durum, humik asidin tek başına su içeriğini artırmadığını, hatta yüksek dozunun hafif bir düşüşe neden olabileceğini düşündürmektedir. Fungus uygulaması (*Scopulariopsis brevicaulis*) grubunda ise RWC %93,5 olarak ölçülmüş ve kontrol grubuna göre %2,1'lik anlamsız ($p>0,05$) bir azalma görülmüş ve bitki su içeriğini olumsuz yönde etkilememiştir. Ancak fungus ve humik asit kombinasyonları RWC'yi daha belirgin şekilde azaltmıştır (500 HA+F: %93,33; 1000 HA+F: %92,52). Bu düşüş, bazı mikrobiyal etkileşimlerin veya metabolik değişimlerin su dengesini kısmen bozabileceğini akla getirmektedir. Tuz stresi (NaCl, 100 mM) uygulamasında RWC değeri %85,16 olarak gözlemlenmiş, bu da tuz stresinin tek başına su içeriğini anlamlı şekilde düşürdüğünü göstermektedir. Ancak dikkat çekici bir şekilde, humik asit ve tuzun birlikte uygulanması (500 HA+Tuz, 1000 HA+Tuz) RWC değerini tek başına tuza kıyasla kontrol grubuna çok yakın seviyelere (%93,33) çıkarmıştır. Bu durum, humik asidin tuz stresine karşı su dengesini koruyucu etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, tuz uygulamasına kıyasla yüksek RWC değerleri humik asit+tuzfungus kombinasyonlarında da gözlenmiştir (500 HA+Tuz+F: %93,77; 1000 HA+

Tuz+F: %92,94). Bu sonuçlar, HA+F uygulamaların tuz koşullarında sinerjik bir etki göstererek bitkilerin su tutma kapasitesini en üst düzeye taşıdığını göstermektedir.



Şekil 10. Tuz (T), humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının MDA ve nispi su içerikleri (RWC) üzerindeki etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir ($p < 0,05$).

HA uygulamaları bitkide RWC'de hafif azalma oluşturmuş olsa da literatürde tuz stresine maruz bitkilerde HA uygulamasının yaprak su içeriğini koruyucu etkisi bildirilmiştir (Amerian *et al.* 2024). Örneğin sera altında tuz stresine maruz kalan hıyar bitkisinde HA uygulamasının tuzun neden olduğu RWC azalmasını telafi ettiğini rapor etmiştir (Amerian *et al.* 2024). Benzer şekilde, Kibar vd. (2024) tuzlu koşullarda ıspanak bitkisine uygulanan HA'nın bitki su içeriğini artırdığını bildirmiştir (Turfan *et al.* 2024). Bizim bulgularımızda, tek başına HA'nın yüksek dozunun RWC'de hafif düşüşe neden olması, HA'nın doz ve uygulama yöntemine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Likenden izole edilen fungus (*S. brevicaulis*) tek başına RWC'yi kontrol düzeyine yakın tutmuş, ancak fungus+HA kombinasyonları daha belirgin RWC düşüşü göstermiştir. Bu düşüş, mikrobiyal etkileşimlerin veya oksidatif metabolik dengedeki değişimlerin su dengesini olumsuz etkileyebileceğini işaret etmektedir. Öte yandan tuz stresi (100 mM NaCl) tek başına bitkide anlamlı bir RWC düşüşü yaratmamıştır (%94,63). Tuz uygulamasında RWC'deki stabilite, yonca bitkisinin tuz tolerans mekanizmalarının bir göstergesi olabilir. İlginç biçimde, HA ile birlikte uygulanan tuz stresi RWC değerlerini kontrol düzeyine çıkarmıştır (yaklaşık %95,45). Yani HA, tuz stresi altında bitkilerin su tutma kapasitesini korumada belirgin bir rol oynamıştır. Üçlü uygulamalarda (HA+Tuz+Fungus) RWC değerleri daha da yüksek bulunmuştur (\approx %95,8). Bu sonuç, HA ve mikroorganizma birlikteliğinin su tutma üzerine sinerjik etki yapabileceğini

göstermektedir. Benzer şekilde, tuz toleranslı bitki büyüme destekleyici bakteri uygulamalarının bitkilerde RWC'yi artırdığı bildirilmiştir. Örneğin Akhtyamova vd. (2021) çalışmalarında, tuza dayanıklı bir *Bacillus* izolatu uygulanmış arpa bitkisinde RWC'nin anlamlı biçimde yükseldiği rapor edilmiştir. Bu bulgular, bizdeki HA + mikroorganizma kombinasyonlarının su dengesini iyileştirme etkisini desteklemektedir. Sonuç olarak, HA bitkiye doğrudan su sağlamasa da toprak su tutma kapasitesini artırarak ve bitkinin osmotik dengesini düzenleyerek RWC'yi koruyucu rol üstlenir.

LPO ve ROS içeriği bulguları

MDA içeriği, bitkilerde lipid peroksidasyonunun (LPO) ve dolayısıyla oksidatif stres seviyesinin önemli bir göstergesidir. Çevresel stresler bitkilerde oksidatif stresin artmasına neden olur. Bu stres sonucunda bitki hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) birikir. ROS yüksek seviyelerde üretildiğinde proteinler, DNA ve pigmentler gibi biyomoleküllere, özellikle de hücre zarlarına zarar verirler. Bu hasarın başlıca sonuçlarından biri hücre zarındaki lipitlerin peroksidasyonudur (Lipit peroksidasyonu-LPO). Bu yüzden LPO, bozulmuş hücre bütünlüğünün ve oksidatif stresin şiddetinin bir göstergesidir (Turfan *et al.* 2024; Khoso *et al.* 2024). Çalışmamızda, uygulayacağımız HA+F uygulamasının antioksidan savunmayı tetikleyerek veya ROS üretimini baskılayarak oksidatif stresi azaltacağını ve bitkinin antioksidan sistemlerini aktive edeceğini öngörüyoruz. Bu nedenle, ROS ve LPO düzeylerini ölçmek, bu uygulamaların stres azaltıcı etkilerini doğrudan değerlendirmek için önemli bir göstergedir.

Tuz uygulaması yapılmayan gruplar arasında, kontrol grubunda MDA düzeyi 0,26 $\mu\text{mol/mL}$ olarak belirlenmişken, 500 HA grubunda MDA seviyesi 0,28 $\mu\text{mol/mL}$ 'e çıkmış ve %7,7'lik bir artış göstermiştir (Şekil 10). Ancak, bu artış istatistiksel olarak anlamlı ($p>0,05$) değildir. 1000 HA grubunda ise MDA seviyesi 0,20 $\mu\text{mol/mL}$ 'e düşerek %23,1'lik anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Fungus uygulaması (F) grubunda ise MDA seviyesi 0,29 $\mu\text{mol/mL}$ olarak ölçülmüş ve kontrol grubuna göre %11,5'lik anlamlı bir artış gösterilmiştir ($p<0,05$). 500 HA+F ve 1000 HA+F kombinasyonlarında ise sırasıyla %3,8 ve %16,9'luk artışlar gözlenmiş, ancak sadece 1000 HA+F grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Tuz stresi altında, tuz (T) grubunda MDA düzeyi 0,33 $\mu\text{mol/mL}$ olarak belirlenmiştir. 500 HA+T grubunda MDA seviyesi 0,27 $\mu\text{mol/mL}$ 'e düşerek %18,2'lik anlamlı bir azalma ($p<0,05$) gözlenmiştir. 1000 HA+T grubunda ise MDA seviyesi 0,23 $\mu\text{mol/mL}$ 'e inmiş ve %30,3'lük anlamlı bir azalma ($p<0,05$) görülmüştür. Fungus+tuz (T+F) uygulaması grubunda MDA 0,31 $\mu\text{mol/mL}$ olarak ölçülmüş ve %6,1'lik bir azalma

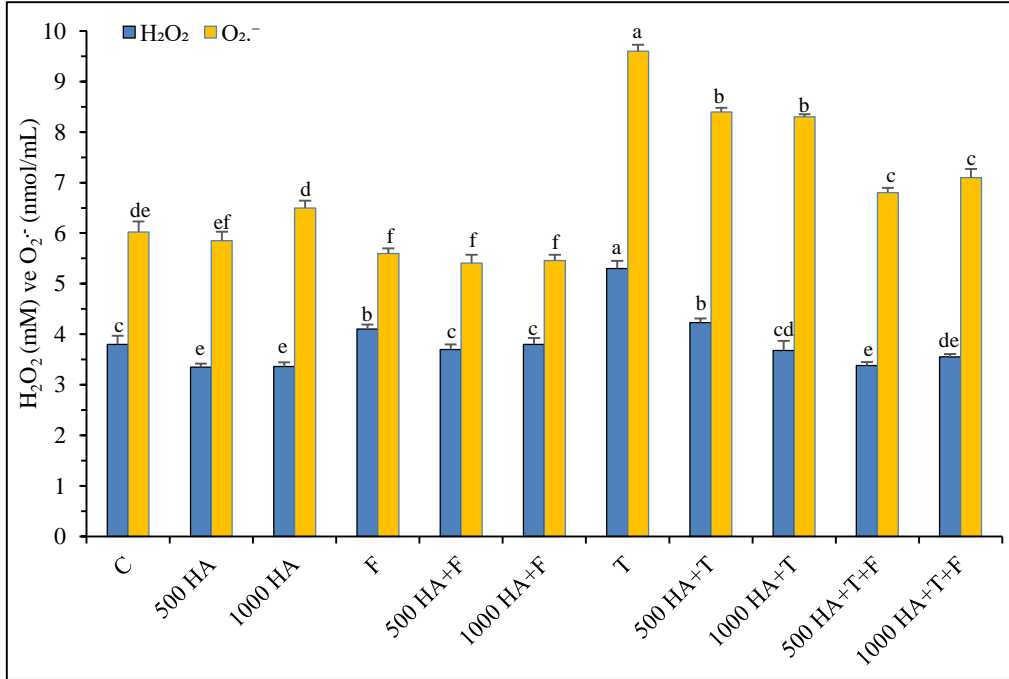
gözlemlenmiştir, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. 500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F kombinasyonlarında ise MDA sırasıyla 0,21 ve 0,22 $\mu\text{mol/mL}$ olarak ölçülmüş, bu da sırasıyla %36,4 ve %33,3'lük anlamlı ($p<0,05$) azalmalar göstermektedir ($p<0,05$). Sonuç olarak, humik asit ve *S. brevicaulis* fungusunun, tuz stresine karşı yonca bitkisinin stres yanıtlarını iyileştirerek MDA birikimini anlamlı şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. Humik asit ve fungus kombinasyonları ise tuz stresinin olumsuz etkilerini hafifletmede en etkili sonuçları vermiştir.

Elde edilen veriler, tuz stresinin H_2O_2 birikimini önemli ölçüde artırdığını, buna karşılık HA ve fungus uygulamalarının bu stresi hafifletmede etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıntılı değerlendirmeler aşağıda sunulmuştur (Şekil 11). Tuz (T) uygulaması, H_2O_2 seviyelerinde belirgin bir artışa yol açmıştır. Tuz uygulanan grupta, H_2O_2 seviyesi kontrol grubuna göre %39 oranında artmıştır (5,3 mM), bu fark istatistiksel ($P<0,05$) olarak anlamlıdır. Diğer gruplara bakıldığında, Fungus (F) uygulaması, H_2O_2 seviyelerinde %8'lik bir artış sağlamış (4,1 mM), ancak bu artış, tuz uygulamasının etkisine göre daha düşük kalmıştır. 500 HA+F ve 1000 HA+F kombinasyonları da H_2O_2 seviyelerinde sırasıyla %2 ve %5 artış göstermiştir, ancak bu artışlar tuz uygulamasına kıyasla oldukça düşüktür ve istatistiksel ($p>0,05$) olarak anlamlı farklar oluşturmamıştır. 500 HA ve 1000 HA gruplarında ise H_2O_2 seviyeleri kontrol grubuna göre sırasıyla %11 ve %12 azalma göstermiştir (3,35 ve 3,36 mM). Bu azalma, humik asit uygulamalarının oksidatif stres yanıtını hafifletmeye yönelik bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. 500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F gruplarında ise H_2O_2 seviyelerinde sırasıyla %11,1 ve %6,6 azalmalar gözlemlenmiştir. Bu azalma, humik asit ve fungus kombinasyonlarının tuzun yol açtığı H_2O_2 artışını düşürdüğünü göstermektedir.

Tuz (T) uygulaması, O_2^- seviyelerinde de önemli bir artışa yol açmıştır. Tuz grubunda O_2^- seviyesi kontrol grubuna göre %60 oranında artmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmuştur (9,6 nmol/mL). Fungus (F) uygulaması, O_2^- seviyelerini tuz uygulamasına göre %7 azaltmış ve bu azalma istatistiksel ($p>0,05$) olarak anlamlı olmamıştır (5,6 nmol/mL). 500 HA+F ve 1000 HA+F kombinasyonlarında da O_2^- seviyeleri tuz grubuna göre sırasıyla %10 ve %20 daha düşük bulunmuştur. Bu azalma, tuz uygulamasının etkisini kısmi olarak dengelemekte etkili olabilir, ancak farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. 500 HA+T ve 1000 HA+T gruplarında ise O_2^- seviyeleri tuz grubuna göre sırasıyla %13 daha düşük bulunmuştur (8,4 ve 8,3 nmol/mL). Bu gruplarda da, tuzun oluşturduğu artışın azalması gözlemlenmiştir. 500 HA+T+F grubunda, O_2^- seviyesi Tuz (T) grubuna kıyasla %29 azalmıştır. Benzer şekilde, 1000 HA+T+F grubunda da O_2^- seviyesi %26 azalma göstermektedir. Bu

azalmalar, HA+T+F uygulamalarının, Tuz uygulamasının neden olduğu artan $O_2^{\cdot-}$ seviyelerini düşürmeye yönelik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Genel olarak, tuz stresinin hem H_2O_2 hem de $O_2^{\cdot-}$ iyonları üzerinde belirgin bir artışa yol açtığı belirlenmiştir. Tuz uygulaması, her iki parametreyi de önemli ölçüde artırmış, ancak Fungus ve HA uygulamaları bu artışı düşürmeyi başarmıştır. Özellikle, tuz stresiyile artan oksidatif stres yanıtlarını azaltmada Fungus ve Humik Asit kombinasyonlarının etkili olduğu, görülmüştür.



Şekil 11. Tuz (T), humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ içerikleri üzerindeki etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir ($p < 0,05$)

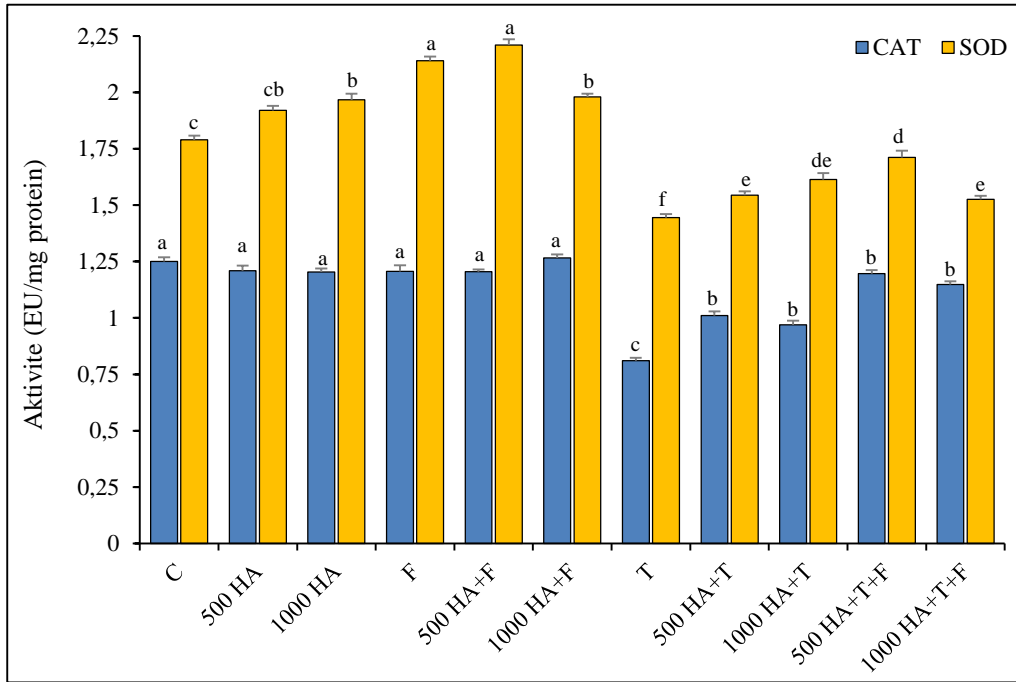
Literatürde tuz stresi genellikle bitkilerde ROS birikimine yol açarak oksidatif stresi tetiklediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Hashem *et al.* 2018; Abbas *et al.* 2022). Bu çalışmada elde ettiğimiz verilere göre tuz stresi (100 mM NaCl) hücre membranında belirgin LPO artışına neden olmuştur (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tuz uygulanmasında MDA içeriği %27 artmıştır). Humik asit uygulamaları yüksek dozda (1000 mg/L) tuz stresi altında MDA'yı anlamlı şekilde düşürmüştür (yaklaşık %30 azalma), 500 mg/L'de ise belirgin düşüş sağlamıştır. Buna karşın liken kaynağı *S. brevicaulis* mantar uygulaması tek başına tuz stresi olmadan MDA'yı hafifçe artırmıştır; oysa literatürde birçok endofitik fungusun tuz stresi sırasında MDA seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Örneğin, *Chaetomium globosum* uygulaması *Chrysanthemum morifolium*'da MDA birikimini azaltırken antioksidan enzim aktivitelerini artırmıştır (Zhang *et al.* 2024b). Bizim çalışmamızda mantar tek başına MDA'yı artırsa da, humik asit ile kombinasyonda (özellikle 500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F) MDA

birikimi anlamlı oranda düşmüştür. Bu sonuçlar, humik asit ve mantarın birlikte stres kaynaklı LPO'yu engelleyici bir etki yaptığını göstermektedir. Gerçekten de humik asit ile *Fusarium solani* kombinasyonunun uygulandığı domates bitkilerinde hücre zar bütünlüğünün korunduğunu, böylelikle stres belirtilerinin (LPO) azaldığını rapor edilmiştir (Heikal *et al.* 2025). Sonuç olarak, bizim bulgularımızda humik asit uygulamaları stresli bitkilerde ROS ve MDA birikimini azaltarak membran hasarını önlemekte etkili bulunmuştur.

Çalışmamızda, tuz stresi, reaktif oksijen türlerinin birikimine de yol açmıştır (Şekil 11). Örneğin, tuz uygulanan grupta H₂O₂ seviyesi kontrol grubuna göre %39 oranında artmıştır. Humik asit uygulaması (500 ve 1000 mg/L) tuz stresinde H₂O₂ üretimini belirgin şekilde baskılamıştır; örneğin 500 HA ve 1000 HA gruplarında H₂O₂ seviyesi %11-12 düşüş göstermiştir. Humik asit ile birlikte mantar uygulamaları (500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F) da tuzun artırdığı H₂O₂'yi sırasıyla %11,1 ve %6,6 azaltmıştır. Bu bulgular, humik asit uygulamalarının oksidatif stres koşullarında hücrenin antioksidan savunmasını kuvvetlendirerek H₂O₂ birikimini sınırladığı literatürle uyumludur (Li *et al.* 2023). Ayrıca, mantar inokülasyonu içeren çalışmalarda da benzer etkiler rapor edilmiştir: Örneğin, *Aspergillus aculeatus* aşılama bermuda otu bitkilerinde tuz stresiyle biriken H₂O₂ seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır (Xie *et al.* 2017). Bizim çalışmamızda *S. brevicaulis* fungusunun HA ile kombinasyonunun H₂O₂ artışını sınırlandırması, bu tür mikroorganizmaların bitkide antioksidan enzimleri aktive ederek ROS temizleme mekanizmalarını harekete geçirmesiyle açıklanabilir. Süperoksit (O₂^{·-}) iyonu açısından da benzer eğilimler gözlenmiştir. Tuz uygulaması süperoksit seviyelerini kontrol bitkilere göre %60 artırmıştır. Humik asit ve mantar uygulamaları bu artışı önemli ölçüde baskılamıştır: Örneğin, 500 HA+T ve 1000 HA+T gruplarında O₂^{·-} seviyeleri tuz grubuna göre yaklaşık %13 düşmüştür. Humik asit ile mantarın birlikte uygulandığı 500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F gruplarında ise süperoksit %26-29 daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar, humik asit ve yararlı mantarların serbest radikal metabolizmasını düzenleyerek süperoksit birikimini azalttığını işaret etmektedir. Nitekim literatürde, humik asit ve mikrobiyal ajanların antioksidan enzim aktivitelerini artırarak reaktif oksijen seviyelerini düşürdüğü vurgulanmaktadır (Xie *et al.* 2017).

Antioksidan enzim aktivitelerine ait bulgular

Şekil 12’deki verilere göre, tuz uygulaması olmayan gruplarda elde edilen CAD ve SOD aktivite sonuçları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında şu şekilde yorumlanabilir (Şekil 12). Kontrol grubunda CAT ve SOD aktiviteleri sırasıyla 1,202 ve 0,847 EU/mg protein olarak belirlenmiştir. HA uygulamaları altında CAT aktivitesi kontrol seviyelerine oldukça yakın kalmıştır. Özellikle 500 mg/L HA, en yüksek CAT değerini (1,21 EU/mg protein) vermiştir. Bu durum, düşük doz HA’nın antioksidan sistemi uyarabileceğini göstermektedir. SOD aktivitesi ise 1000 mg/L HA ile birlikte hafif azalma göstermiştir (0,788), bu da yüksek dozun antioksidan sistemi baskılayıcı etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Tuz uygulaması, SOD aktivitesini belirgin biçimde artırmış (1,06), bu da tuz stresinin oksidatif yanıtı tetiklediğini ortaya koymuştur. Özellikle 500 HA+Tuz kombinasyonu, hem CAT (1,27) hem de SOD (1,078) aktivitelerinde en yüksek düzeyleri göstermiştir.



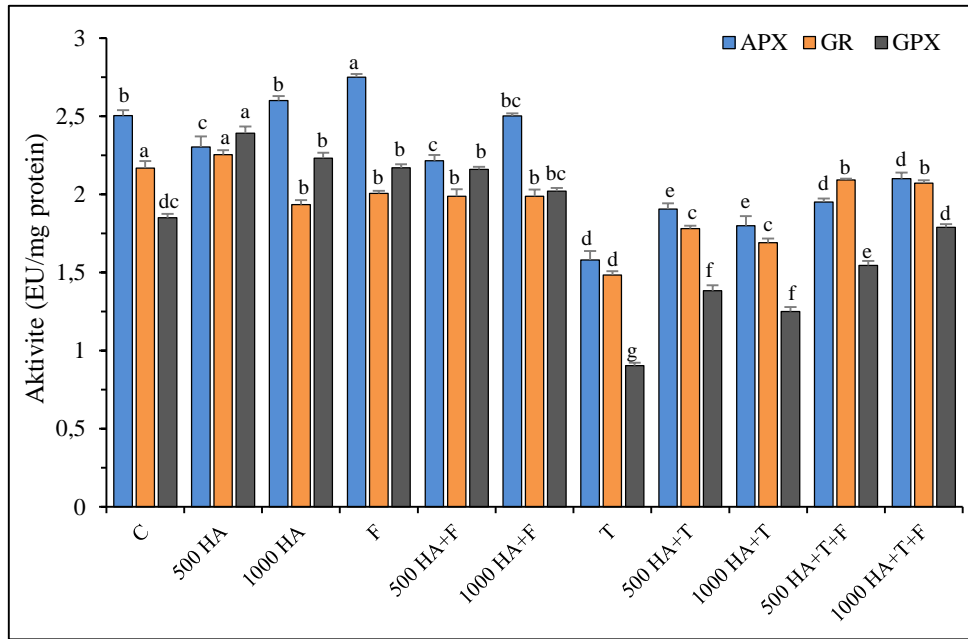
Şekil 12. Tuz (T), humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının CAT ve SOD aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan’ın Çoklu Karşılaştırma Testi’ne göre istatistiksel olarak önemsizdir ($p < 0,05$).

Bu bulgular, bu kombinasyonun antioksidan sistemleri en etkili şekilde aktive ettiğini düşündürmektedir. Fungus uygulamaları, SOD aktivitesinde dikkate değer bir düşüşe neden olmuştur. Özellikle 1000 HA+Fungus kombinasyonu, en düşük SOD aktivitesini vermiştir. Bu durum, yüksek doz HA ile fungal uygulamanın birlikte SOD enzim aktivitesini baskılayıcı bir etki yaratabileceğini düşündürmektedir. 1000 HA+Tuz+Fungus grubunda ise SOD aktivitesi 0,926 olup, stres koşullarında orta düzeyde bir antioksidatif yanıt olduğu

görülmektedir. CAT aktivitesinde ise aynı grupta düşüş gözlenmiş (1,148), bu da çoklu uygulamaların kombinasyon etkisine bağlı olarak enzimsal yanıtların değişkenlik gösterebileceğini göstermektedir.

Tuz uygulaması yapılmamış gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, CAT aktivitesinde herhangi bir önemli ($p<0,05$) değişiklik gözlenmemiştir. 500 HA ve 1000 HA gruplarındaki CAT aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla yalnızca %5'in altında bir artış göstermiş ve bu değişiklikler istatistiksel ($p>0,05$) olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu gruplarda elde edilen CAT aktiviteleri sırasıyla 1,25, 1,209 ve 1,203 olarak ölçülmüştür. Tuz uygulaması yapılmış gruplarda ise, HA ve fungus kombinasyonlarının etkisiyle CAT aktivitesinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Tuz (T) uygulama grubu (0,81) ile karşılaştırıldığında, 500 HA+T ve 1000 HA+T gruplarında sırasıyla %24,7 ve %19,8'lik artışlar elde edilmiştir. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı olup, tuz grubu ile karşılaştırıldığında bu gruplarda daha yüksek CAT aktiviteleri gözlemlenmiştir. Ayrıca, CAT aktivitesi, 500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F gruplarının tuz grubu ile karşılaştırıldığında önemli artışlar gözlenmiştir. 500 HA+T+F grubunun CAT aktivitesi, tuz grubuna göre %47,7 oranında bir artış göstermiştir. Bu, humik asit ve fungus kombinasyonunun, tuz stresine karşı bitkinin oksidatif savunma kapasitesini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Diğer taraftan, 1000 HA+T+F grubunda ise tuz grubuna göre CAT aktivitesinde %41,7 oranında bir artış elde edilmiştir. Bu da humik asit ve fungus kombinasyonunun, tuz stresinin etkilerini hafifletmede etkili olduğunu ancak 500 HA+T+F grubuna kıyasla biraz daha düşük bir etki sağladığını ortaya koymaktadır. Her iki grup da tuz stresine karşı olumlu etkiler göstermiştir, ancak 500 HA+T+F grubundaki artış daha belirgin olmuştur. SOD aktivitesi, tuz uygulaması olmayan gruplarda, kontrole göre (1,79), 500 HA (1,92) ve 1000 HA (1,98) gruplarında %5-10 arasında bir artış gösterse de bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 12). Bu gruplarda, SOD aktivitesindeki değişikliklerin kontrol grubuyla kıyaslandığında önemli ($p<0,05$) bir fark oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Tuz uygulaması yapılmış gruplarda ise SOD aktivitesinde daha belirgin artışlar gözlenmiştir. Tuz (T) grubu (1,445) ile karşılaştırıldığında, 500 HA+T grubunda (1,545) %6,9, 1000 HA+T grubunda (1,614) %11,7'lik artışlar elde edilmiştir. Ayrıca, 500 HA+T+F grubunda (1,712) %18,4 ve 1000 HA+T+F grubunda (1,52) %5,6'lık artışlar gözlenmiştir. Bu artışlar, tuz uygulama grubuna kıyasla belirgin bir iyileşme göstermekte olup, tuz stresine karşı daha yüksek SOD aktiviteleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar, humik asit ve fungus kombinasyonlarının tuz stresine karşı bitkinin oksidatif savunma kapasitesini artırdığını göstermektedir.

APX aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla, fungus (F) uygulaması APX aktivitesinde %9,8'lik önemli bir artış sağlarken ($p<0,05$), 500 HA uygulaması %8,0'lik bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 13). 1000 HA uygulaması ise kontrol grubuna yakın değerler göstermiştir. Tuz stresi (T), APX aktivitesinde kontrol grubuna göre %36,9'luk ciddi bir düşüşe yol açmıştır ($p<0,05$). Tuzlu koşullarda humik asit uygulamaları (500 HA+T ve 1000 HA+T) bu düşüşü kısmen telafi ederek aktiviteyi sırasıyla %20,6 ve %13,9 oranında artırmıştır. En belirgin iyileşme, 500 HA+T+F uygulamasında gözlenmiş olup, bu grupta APX aktivitesi tuz grubuna göre %23,4 daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 13. Tuz, humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının APX, GR ve GPX içerikleri üzerindeki etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir ($p<0,05$).

GPX aktivitesi verileri incelendiğinde, 500 HA uygulaması, kontrol grubuna göre GPX aktivitesinde %29,2'lik belirgin bir artış sağlarken ($p<0,05$), fungus (F) uygulaması %17,3'lük bir artışa neden olmuştur. Tuz stresi (T), GPX aktivitesinde kontrol grubuna göre %51,1'lik ciddi bir düşüşe yol açmıştır ($p<0,05$). Tuzlu koşullarda humik asit uygulamaları (500 HA+T ve 1000 HA+T) bu düşüşü kısmen telafi etmiş, en belirgin iyileşme 500 HA+T+F uygulamasında gözlenmiştir. Bu grupta GPX aktivitesi tuz grubuna göre %70,9'luk önemli bir artış göstermiştir ($p<0,05$).

GR aktivitesi verileri incelendiğinde, kontrol grubuna göre 500 HA uygulaması GR aktivitesinde %4,0'lık hafif bir artış sağlarken, fungus (F) uygulaması %7,4'lük bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 13). Tuz stresi, GR aktivitesinde kontrol grubuna göre %31,5'lik önemli bir düşüşe yol açmıştır ($p<0,05$). Tuzlu koşullarda humik asit ve fungus

kombinasyonu (500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F) GR aktivitesinde tuz grubuna göre sırasıyla %40,9 ve %39,6'lık önemli artışlar sağlamıştır ($p<0,05$). Bu sonuçlar, humik asit ve fungus kombinasyonunun tuz stresinin GR aktivitesi üzerindeki olumsuz etkilerini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir.

Tuz stresi, bitkilerde serbest radikal üretimini artırarak oksidatif stresi tetiklediği bilinmektedir. Bu gibi durumlarda bitkiler SOD, CAT, APX, GR ve GPX gibi antioksidan enzimlerle savunma mekanizmalarını güçlendirir (Azeem *et al.* 2023; Atıcı *et al.* 2025). Örneğin, SOD süperoksit radikali H_2O_2 'ye dönüştürürken, katalaz ve APX bu H_2O_2 'yi suya çevirir (Azeem *et al.* 2023). Literatürde tuz stresi genellikle SOD ve CAT aktivitesini yükselten bir uyarıcı ajan olarak bildirilmiştir. Örneğin, arbusküler mikorizal fungus inokulasyonlarının tuz stresinde SOD, CAT, APX ve GR aktivitelerini artırarak bitkilerin tuz toleransını geliştirdiği raporlanmıştır (Hasanuzzaman *et al.* 2020; Azeem *et al.* 2023; Atıcı *et al.* 2025). Çalışmamızda da tuz uygulaması tek başına SOD aktivitesinde belirgin artış (kontrolle göre) göstermiştir, bu da bitkilerin oksidatif yük altındaki tipik savunma yanıtıdır. Ancak bizim verilerimizde, tuz stresinin APX, GR ve GPX aktivitelerinde keskin düşüşlere yol açtığı görülmüştür. Bu durum artan tuz stresi koşullarında metabolik hasarın veya enzim baskısının bir göstergesi olabilir (Turfan *et al.* 2024).

HA uygulamalarının antioksidan sistem üzerindeki olumlu etkisi pek çok çalışmada gösterilmiştir. Tuz stresi altındaki bitkilerde HA uygulaması, antioksidan enzim aktivitelerini artırarak stresi hafifletebilir. Örneğin, ıspanakta HA ve L-triptofan uygulamalarının APX, CAT, POD ve SOD aktivitelerini önemli ölçüde yükselttiğini bulunmuş, tuz stresi ise bu aktiviteleri düşürmüştür (Turfan *et al.* 2024). Benzer biçimde, kabak üzerinde yapılan bir çalışmada 200 mg/L HA'nın CAT aktivitesini anlamlı şekilde artırdığı belirtilmiştir (Amerian *et al.* 2024). Çalışmamızda da humik asit uygulamalarının (özellikle 500 mg/L dozunda) CAT aktivitesini yükselttiği gözlenmiştir. Kontrol koşullarında 500 mg/L HA, kontrol seviyesine yakın olan 1,209 EU/mg protein ile en yüksek CAT değerini vermiştir. Bu durum, uygun doz HA'nın antioksidan sistemi uyarabileceğini göstermektedir. Ural vd. (2023) domateste ise tuz stresi altında HA uygulamasının SOD gen ekspresyonu üzerinde değişim oluşturmadığını, APX gen ekspresyonunu artırdığını, ancak CAT ve GR gen ekspresyonunu azalttığını bildirmiştir. Çalışmamızla kısmen karşılaştırıldığında, bizim verilerimizde HA tek başına CAT aktivitesini hafifçe artırırken GR ve APX üzerinde belirgin etki göstermiştir. Bu farklılıklar türler arası yanıt değişkenlikleri veya doz/uygulama yönteminden kaynaklanıyor olabilir. Sonuç olarak, bizim verilerimiz de düşük doz HA'nın antioksidan enzimleri uyarıcı etkisini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda fungus tek başına uygulandığında SOD aktivitesi belirgin biçimde artmıştır. Bu sonuç, fungus uygulamasının bitki antioksidan sistemini iyileştirici bir etkiye yol açabileceğini düşündürmektedir. Literatürde genellikle mikorizal veya diğer faydalı fungal inokulasyonlarının tuz stresi altındaki bitkilerde SOD, APX ve GR aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (Evelin *et al.* 2019). Bununla birlikte, fungus uygulaması APX aktivitesinde hafif bir artışa neden olmuş ve GR aktivitesi ise tek başına F uygulamasında azalmıştır. Öte yandan, HA ile F birlikte uygulanması antioksidan savunmada sinerjik bir etki ortaya koymuştur. Tuz stresi varlığında 500 mg/L HA+T+F grubu, başta APX (%23,4 artış), GR (%40,9) ve GPX (%70,9) aktiviteleri olmak üzere birçok enzimde kayda değer artış sağlamıştır. Bu grupta elde edilen artışlar, tuz stresinin olumsuz etkilerini hafifletmede HA+Fungus kombinasyonunun güçlü bir antioksidan yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Bu bulgular, literatürde humik asit ile faydalı mikroorganizmaların birlikte kullanımının bitkilerin oksidatif savunma kapasitesini artırdığı yönündeki raporlarla tutarlıdır (Turfan *et al.* 2024). Örneğin, ıspanakta HA+L-triptofan kombinasyonunun tuz stresi altında APX, CAT ve SOD aktivitelerini yükselttiği gösterilmiştir (Turfan *et al.* 2024). Ayrıca, azot fiksasyonu yapan bakteriler veya mikorizalar ile HA kullanımının azot fikse eden simbiyozları destekleyerek bitkide genel savunmayı artırdığı bilinmektedir (de Silva *et al.* 2021). Bizim çalışmamızda da HA ve fungus'un birlikte bitkiye sunduğu organik karbon, besin ve hormonik uyarıların, hücrel antioksidan mekanizmaları koordine ederek tuz stresi etkilerini azalttığı ileri sürülebilir.

Çalışmamızda görülen doz etkileri de literatürle örtüşmektedir. Düşük doz (500 mg/L) HA genellikle 1000 mg/L'den daha etkin bulunmuş; yüksek dozlarda bazı enzim aktivitelerinin artışının görece azalmış olması, HA'nın doza bağlı etkisinin varlığını işaret eder. Bu durum, aşırı HA konsantrasyonunun bazen yarar yerine stres etkisi yaratabileceğini gösterir. Genel olarak, verilerimiz HA ve fungal uygulamalarının özünde olumlu antioksidan etkiler taşıdığını; özellikle HA+Fungus kombinasyonunun yonca bitkisinde tuz stresine karşı enzimatik savunmayı belirgin biçimde güçlendirdiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, literatürdeki pek çok çalışmanın önerdiği gibi, HA ile mikrobiyal inübesyonun tuz toleransını artırmak için umut verici bir strateji olduğunu desteklemektedir (Turfan *et al.* 2024). Sonuç olarak, elde edilen antioksidan enzim aktiviteleri verileri, HA ve liken kökenli fungus'un birlikte uygulanmasının yoncadaki tuz stresi etkilerini önemli ölçüde hafifleterek hücrel oksidatif dengeyi korumaya yardımcı olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, araştırmamızın amaçlarıyla uyumlu olarak HA ve fungusun sinerjik etkilerinin bitkilerin tuz stresine karşı antioksidan savunmasını iyileştirdiğini göstermektedir.

Fotosentetik pigment içeriği bulguları

Bitkilerde klorofil ve karotenoid pigmentleri, fotosentez süreçlerinin temel bileşenleri olup, çevresel stres faktörlerine karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde önemli biyokimyasal göstergelerdendir. Bu çalışmada yonca bitkilerine farklı humik asit (HA) dozları, liken kökenli fungus uygulamaları ve tuz (NaCl) stresi altında yapılan muamelelerin fotosentetik pigment içerikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 14).

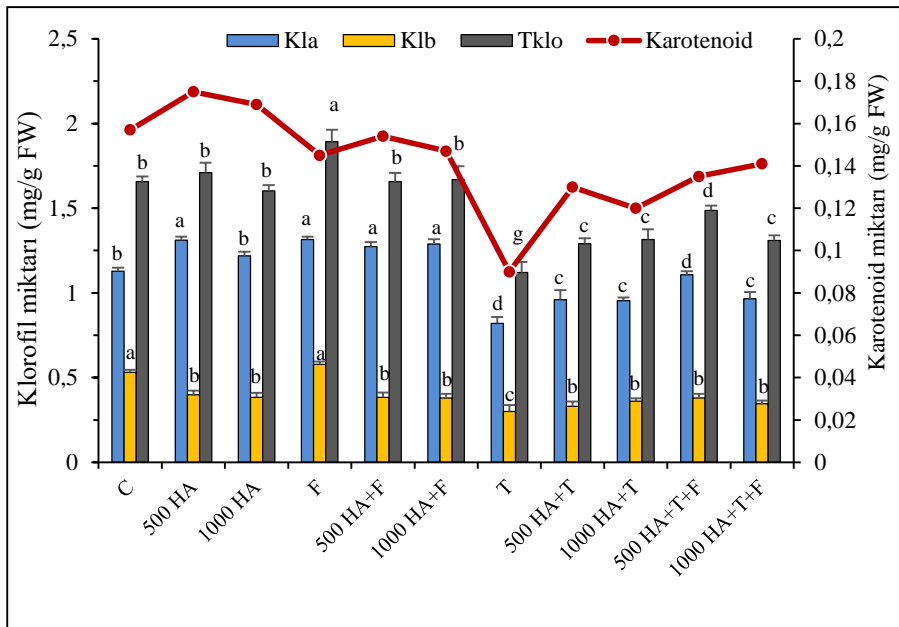
Çalışmada, K_{1a} (Klorofil a) miktarı, tuz uygulaması olmayan gruplarda, kontrol grubu ile kıyaslandığında çeşitli değışiklikler göstermektedir. 500 HA grubunda (1,312 mg/g FW), kontrol grubuna kıyasla %16,3 oranında bir artış gözlenmiştir. 1000 HA grubunda ise (1,219 mg/g FW) %7,9'luk bir artış görülmüştür. F grubunda (1,315 mg/g FW), kontrol grubuna göre %16,6'lık bir artış belirlenmiştir. Bu artışlar, istatistiksel olarak anlamlıdır ve özellikle 500 HA ve F grubunda daha belirgin bir artış kaydedilmiştir. Tuz uygulaması yapılmış gruplara bakıldığında, T grubunda (0,82 mg/g FW) K_{1a} miktarı en düşük seviyeye inmiştir. 500 HA+T (0,96 mg/g FW) ve 1000 HA+T (0,955 mg/g FW) gruplarında sırasıyla %17,6 ve %16,4'lük artışlar gözlenmiştir. 500 HA+T+F (1,108) ve 1000 HA+T+F (0,965) gruplarında da sırasıyla %35,4 ve %17,2'lik artışlar sağlanmıştır. Bu artışlar, tuz grubuna göre belirgin bir iyileşme göstermektedir.

K_{1b} (Klorofil b) miktarı, tuz uygulaması olmayan gruplarda genellikle F grubu dışında benzer seviyelerde kalmıştır. 500 HA ve 1000 HA gruplarında %24,3 ve %27,7'lik artışlar gözlenmiş, ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. F grubunda, kontrol grubuna göre %9,1'lik bir artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Tuz uygulaması yapılmış gruplara baktığımızda, tuz grubunda (0,3 mg/g FW) K_{1b} miktarı en düşük seviyede bulunmuştur. 500 HA+T ve 1000 HA+T gruplarında sırasıyla %10 ve %20'lik artışlar gözlenmiş ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır. 500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F gruplarında ise sırasıyla %26,7 ve %14,8'lik artışlar gözlenmiştir. Bu artışlar da tuz grubuna kıyasla belirgin bir iyileşme göstermektedir.

Tklo (Total klorofil) miktarı açısından, tuz uygulaması olmayan gruplar kontrol grubuna kıyasla daha yüksek değerler göstermektedir. 500 HA grubunda, kontrol grubuna göre %3,1'lik bir artış gözlenmiştir. 1000 HA grubunda ise, %3,4'lük bir düşüş gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı değildir. F grubunda, kontrol grubuna kıyasla %13,8'lik artış elde edilmiştir ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Tuz uygulaması yapılmış gruplarda ise, T grubunda, Tklo miktarı belirgin şekilde düşmüştür. 500 HA+T ve 1000 HA+T gruplarında

sırasıyla %15,5 ve %17,4'lük artışlar gözlenmiştir. 500 HA+T+F (1.488) ve 1000 HA+T+F gruplarında ise sırasıyla %32,9 ve %17,0'lik artışlar gözlenmiştir. Bu artışlar, tuz grubuna göre oldukça belirgindir ve bu gruplar, tuz stresine karşı daha yüksek Tklo seviyeleri sağlamıştır.

Son olarak, karotenoid miktarı, tuz uygulaması olmayan gruplarda 500 HA (0,175 mg/g FW) ve 1000 HA (0,169 mg/g FW) gruplarında sırasıyla %11,5 ve %7,6'lık artışlar göstermektedir. F grubunda ise kontrol grubuna kıyasla %7.7'lik bir azalma gözlenmiştir. Tuz uygulaması yapılmış gruplarda ise, T grubunda (0,09 mg/g FW) karotenoid miktarı oldukça düşmüştür. 500 HA+T ve 1000 HA+T gruplarında sırasıyla %44,4 ve %33,3'lük artışlar gözlenmiştir. 500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F gruplarında ise sırasıyla %50 ve %56,7'lik artışlar sağlanmıştır. Bu artışlar, tuz grubuna kıyasla anlamlı bir iyileşme göstermektedir.



Şekil 14. Tuz (T), humik asit (HA) ve fungus (F) uygulamalarının Klorofil a, Klorofil b, Toplam klorofil (Tklo) ve karotenoid içerikleri üzerindeki etkileri. Aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklar, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre önemsizdir ($p < 0,05$).

Bu sonuçlara göre, humik asit ve *Scopulariopsis brevicaulis* fungusunun, tuz stresine karşı Kla, Klb, Tklo ve Karotenoid miktarları üzerinde belirgin iyileşmeler sağladığı gözlenmiştir. Tuz uygulaması yapılmamış gruplarda, fungus grubunun pigment içeriği önemli ölçüde artmış, özellikle 500 HA grubunda da pigment miktarlarında artışlar gözlenmiştir. Tuz uygulaması yapılan gruplarda ise, humik asit ve fungus kombinasyonlarının tuz stresine karşı bitkilerin fotosentetik pigment içeriklerini artırdığı ve tuz uygulama grubuna kıyasla pigment seviyelerinin önemli ölçüde yükseldiği tespit edilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğine, çalışmamızda, yonca bitkilerinde farklı HA dozları ve liken kökenli *S. brevicaulis* fungusunun tuz stresi altındaki fotosentetik pigment seviyeleri üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 14). Elde edilen sonuçlar literatürde bildirilen bulgularla büyük ölçüde uyumludur. Tuz stresi genelde bitkilerde klorofil *a*, klorofil *b*, total klorofil ve karotenoid miktarlarını azalttığı bilinmektedir (Meganid et al. 2015; Atıcı et al. 2025). Bu çalışmada da tuz (T) etkisiyle kontrol grubu bitkilerde tüm fotosentetik pigmentlerin en düşük değerlere indiği görülmüştür.

Tuz uygulanmayan koşullarda, 500 mg/L HA uygulanmasıyla K_{1a} %16,3, 1000 mg/L HA ile %7,9 oranında artış saptanmıştır. Benzer şekilde liken-fungus uygulaması (F) K_{1a}'da %16,6 oranında artış sağlamıştır. Bu sonuçlar, humik asidin ve bazı faydalı mikroorganizmaların bitkilerin klorofil sentezini desteklediğini gösteren literatürle tutarlıdır. Örneğin Meganid vd. (2015) humik asit uygulamasının fasulye, mısır, marul gibi bitkilerde tuz altında klorofil *a* içeriğini arttırdığını raporlamıştır. Tuz stresli koşullarda ise, T grubundaki bitkilerde K_{1a} en düşük değere inmişken, 500 HA+T ve 1000 HA+T uygulamaları sırasıyla %17,6 ve %16,4'lük artışlar vermiştir. Özellikle 500 HA+T+F (%35,4 artış) ve 1000 HA+T+F (%17,2) gruplarında gözlenen iyileşme belirgindir. Bu bulgu, humik asit ve endofitik fungus kombinasyonunun tuzun olumsuz etkisini telafi ettiğini göstermektedir. Tuzsuz gruplarda, 500 ve 1000 mg/L HA ile K_{1b} sırasıyla %24,3 ve %27,7 oranında artış gözlenmiştir. İlave olarak, fungus (F) uygulamasıyla K_{1b}'de %9,1'lik anlamlı artış sağlanmıştır. Bu durum, farklı bitki sistemlerinde çeşitli biyostimülanların klorofil *b* sentezini olumlu yönde etkileyebileceğini gösterir. Tuzlu gruplarda ise, tuz yalnız uygulanan T grubunda K_{1b} en düşük düzeyde kalmıştır. 500 HA+T ile %10, 1000 HA+T ile %20 oranında anlamlı artışlar kaydedilmiş; 500 HA+T+F ve 1000 HA+T+F uygulamaları sırasıyla %26,7 ve %14,8 artış elde etmiştir.

Toplam klorofil içeriği değerlendirildiğinde, tuzsuz koşullarda toplam klorofil, kontrol grubuna göre 500 mg/L HA ile %3,1 artmış, 1000 mg/L HA ile %3,4 oranında (anlamlı olmayan) düşüş göstermiştir. Fungus uygulaması (F) ise kontrol ile kıyaslandığında %13,8'lik anlamlı bir artış getirmiştir. Tuz uygulamasında, T grubunda toplam klorofil düzeyi belirgin şekilde düşmüştür. HA uygulamaları, 500 HA+T ve 1000 HA+T'de sırasıyla %15,5 ve %17,4'lük artışlar sağlamıştır. İlave olarak, 500 HA+T+F ile %32,9; 1000 HA+T+F ile %17,0 artış kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, HA ve fungus uygulamasının tuz stresinin azaltılmasında sinerjik etki yaptığını göstermektedir. Örneğin HA uygulanan fasulye, mısır ve marul bitkilerinde hem klorofil *a* hem de *b* miktarlarında artış gözlenmiş; tuz uygulamasıyla azalan klorofil seviyeleri, HA sayesinde tekrar yükselebilmektedir (Mekkaoui et al. 2024).

Karotenoid içeriği değerlendirildiğinde, tuzsuz grupta 500 mg/L HA uygulaması karotenoid içeriğini %11,5, 1000 mg/L HA %7,6 oranında artırmıştır. Buna karşın fungus uygulaması (F) ile kontrol düzeyine göre %7,7 oranında azalma gözlenmiştir. Tuz uygulaması ise karotenoid seviyesini ciddi biçimde düşürmüştür. Ancak, 500 HA+T ile %44,4 ve 1000 HA+T ile %33,3 oranlarında artış sağlanmıştır. En güçlü artışlar 500 HA+T+F (%50) ve 1000 HA+T+F (%56,7) uygulamalarında görülmüştür. Karotenoidler, fotosistem koruyucu ve antioksidan bileşiklerdir; bu nedenle tuz stresi nedeniyle düşen karotenoidler HA ve fungus takviyesiyle yeniden yükseltilmiştir. Literatürde, tuz stresi altında uygulanan biyolojik uyarıcıların karotenoid düzeylerini iyileştirdiği bildirilmektedir. Örneğin organik gübre ve mikorizal fungus kombinasyonunda, tuz stresiyle azalan karotenoid konsantrasyonunun biostimlanlarla normale döndüğü gözlenmiştir (Mekkaoui *et al.* 2024). Çalışmamızda da humik asit ve liken kökenli fungus ile uygulanan grupların, tuzun olumsuz etkisini karotenoid miktarı açısından büyük oranda telafi ettiği görülmüştür. Toparlayacak olursak, humik asit ve *Scopulariopsis brevicaulis* fungus uygulamalarının tuz stresine karşı fotosentetik pigmentleri koruyucu etkisi literatürdeki bulgularla uyumludur. Hem tuzsuz kontrol hem de tuzlu koşullarda, 500 mg/L humik asit dozu+fungus takviyesinin özellikle klorofil *a*, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarında belirgin artışlar sağladığı görülmüştür. Bu durum, HA ve birlikte fungusun bitkilerde besin alımını ve antioksidan mekanizmaları güçlendirerek fotosentez etkinliğini artırabileceğini gösterir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, tuz stresine karşı humik asit (HA) ve liken kökenli mikroorganizmaların (bakteri ve mikorizal mantar) yonca bitkisi (*Medicago sativa* L., cv. Konya) üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkilerini değerlendirmiştir. Tezden elde edilen bulgulara göre, mevcut literatürde sınırlı yer bulan bu etkileşimlere dair aşağıdaki sonuçlara ulaşılmış ve bu sonuçlara göre yeni araştırmalar için öneriler sunulmuştur:

Humik asit ve mikroorganizmaların tekli ya da kombine uygulanması, yonca bitkisinde tuz stresiyile indüklenen olumsuz etkileri büyük ölçüde azaltmıştır. Fotosentetik pigment içerikleri (klorofil a, b ve karotenoid), HA + Mikorizal Mantar uygulamasında kontrol grubuna oldukça yakın değerlerde korunmuştur. Bu sonuç, bu maddelerin tuz stresi altında fotosentez sistemini koruyarak bitki verimliliğini artırabileceğini göstermekte ve literatürde giderek artan “biyolojik destekli tuz toleransı” yaklaşımlarını desteklemektedir.

Malondialdehit (MDA), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS düzeylerinde, özellikle HA + Mantar uygulamasında önemli azalmalar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, HA ve liken kökenli mikroorganizmaların membran lipidlerini oksidatif hasardan koruyarak hücre stabilitesini sağladığını göstermektedir. Bu mekanizma, tuz stresine bağlı hücre zararı üzerine çalışan literatür için önemli bir katkı sunmaktadır.

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve peroksidaz (POD) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde özellikle HA + Mantar uygulamasında anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu artışlar, serbest radikal birikimini baskılayarak hücre yapısının korunmasını sağlamıştır. Tuz stresi altında oksidatif zarara karşı HA ve mikroorganizmaların sinerjik etkileri, bitkisel savunma sistemini aktive ettiklerini göstermektedir.

Mikorizal mantarın tuz stresiyile mücadelede bakteri türlerine kıyasla daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Özellikle HA ile birlikte uygulandığında sinerjik etki gözlemlenmiştir. Bu bulgu, mikorizal mantarların bitki köklerinde simbiyotik ilişki kurarak daha güçlü bir koruyucu etki sunduğunu göstermekte, tür seçiminin stres toleransı artırıcı biyogübre stratejilerinde belirleyici olduğunu ortaya koymaktadır. Tekli uygulamalara kıyasla HA + Mikorizal Mantar kombinasyonu, en yüksek koruyucu etkiyi sağlamıştır. Bu bulgu, bitki stres fizyolojisinde sinerjistik biyotik ve abiyotik faktör etkileşiminin önemini ortaya koymakta ve literatürde az çalışılmış olan “kombine biyolojik uygulamalar” alanına yeni bir katkı sağlamaktadır.

Bu tez, humik asit ve liken kökenli mikroorganizmaların tarımsal üretimde tuz stresine karşı potansiyel bir biyolojik koruma stratejisi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle fotosentez pigmentlerinin korunması, ROS düzeylerinin düşürülmesi ve antioksidan sistemin desteklenmesi, bu stratejinin etkinliğini bilimsel olarak kanıtlamaktadır. Literatürde, liken kökenli mikroorganizmaların bitki stres toleransı üzerine etkileri oldukça sınırlı iken, bu çalışma yeni ve özgün bir bakış açısı sunmaktadır.

Öneriler:

Humik asit ve liken kökenli mikroorganizmalar gibi doğal biyostimülanlar, özellikle tuzlu toprak koşullarında tarımsal verimliliği sürdürülebilmek için pratik olarak kullanılmalıdır. Liken endofitlerinin tarımda kullanımını hâlâ yeni bir alandır. Farklı türlerin stres yönetiminde potansiyel etkileri daha fazla araştırılmalıdır.

Kombine uygulamaların (HA + mikorizal mantar) sinerjik etkisi nedeniyle, bu tür kombinasyonlar tarımsal ürünler için önerilen biyogübre formülasyonlarına dahil edilmelidir. Bu çalışmanın kontrollü koşullarda elde ettiği bulguların doğrulanması amacıyla, tarla koşullarında uzun süreli saha denemeleri yapılmalıdır.

Moleküler ve Omik düzeyde araştırmaların derinleştirilmesi için antioksidan gen ekspresyonları, iyon taşıyıcı proteinler ve metabolit düzeyleri gibi moleküler süreçler, omik teknolojilerle detaylandırılmalıdır (transkriptomik, metabolomik vb.).

Yonca gibi stratejik yem bitkileri, tuz stresıyla karşı karşıya kalabilen bölgelerde biyolojik stres giderici programlarla desteklenmelidir. Humik asit ve mikrobiyal uygulamaların buğday, domates, arpa gibi farklı ekonomik türlerde ve çeşitli iklim/toprak yapılarında test edilmesi gerekmektedir.

Humik asit ve mikrobiyal uygulamalar, kimyasal gübre ve pestisit ihtiyacını azaltarak çevresel sürdürülebilirliğe katkı sağlar; bu nedenle biyogübre politikaları desteklenmelidir.

Humik asitlerin toprak yapısını iyileştirici etkilerinden faydalanılarak özellikle tuzlanmış alanlarda toprak ıslah projeleri teşvik edilmelidir. Artan tuzluluk problemi karşısında, bu tür biyolojik çözümler, iklim değişikliğine uyum stratejilerinin bir parçası olarak değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abbas, G., Rehman, S., Siddiqui, M. H., Ali, H. M., Farooq, M. A., & Chen, Y., 2022. Potassium and humic acid synergistically increase salt tolerance and nutrient uptake in contrasting wheat genotypes through ionic homeostasis and activation of antioxidant enzymes. *Plants*, 11(3), 263.
- Abbasi, H., Jamil, M., Haq, A., Ali, S., Ahmad, R., Malik, Z., & Parveen, Z. (2016). Salt stress manifestation on plants, mechanism of salt tolerance and potassium role in alleviating it: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103(2), 229-238.
- AbuQamar, S.F., El-Saadony, M.T., Saad, A.M., Desoky, E.S.M., Elrys, A.S., Abd El-Mageed, T.A., and El-Tarabily, K.A., 2024. Halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria improve soil fertility and plant salinity tolerance for sustainable agriculture-A review. *Plant Stress*, 12, 100482.
- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Aguiar, N. O., Olivares, F. L., Novotny, E. H., & Canellas, L. P. (2018). Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. *PeerJ*, 6, e5445.
- Ahsan, S. M., Injamum-Ul-Hoque, M., Das, A. K., Rahman, M. M., Mollah, M. M. I., Paul, N. C., & Choi, H. W. (2024). Plant–Entomopathogenic fungi interaction: recent progress and future prospects on endophytism-mediated growth promotion and biocontrol. *Plants*, 13(10), 1420.
- Akhtyamova, Z., Arkhipova, T., Martynenko, E., Nuzhnaya, T., Kuzmina, L., Kudoyarova, G., & Veselov, D. (2021). Growth-promoting effect of rhizobacterium (*Bacillus subtilis* IB22) in salt-stressed barley depends on abscisic acid accumulation in the roots. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10680.
- Akıncı, Ş., 2011. Humik asitler, bitki büyümesi ve besleyici alımı. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 23(1), 46-56.
- Akıncı, Ş., 2017. Humik asitlerin stres altındaki bitkilerin büyümesine ve besleyicilerin
- Akladios, S.A., Mohamed, H.I., 2018. Ameliorative effects of calcium nitrate and humic acid on the growth, yield component and biochemical attribute of pepper (*Capsicum annuum*) plants grown under salt stress. *Sci. Hort.* 236, 244–250.
- Al-Barakah, F.N., and Mridha, M.A.U., 2014. Status of symbiotic nitrogen fixation by *Shinorhizobium meliloti* in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) under Field Conditions in
- Ali, A. Y. A., Ibrahim, M. E. H., Zhou, G., Nimir, N. E. A., Jiao, X., Zhu, G., Elsiddig A. M. I., Zhi, W., Chen, X., & Lu, H., 2019. Ameliorative effects of jasmonic acid and humic acid on antioxidant enzymes and salt tolerance of forage sorghum under salinity conditions. *Agronomy Journal*, 111(6), 3099-3108.
- Ali, A. Y. A., Ibrahim, M. E. H., Zhou, G., Nimir, N. E. A., Jiao, X., Zhu, G., ... & Yue, W., 2020. Exogenous jasmonic acid and humic acid increased salinity tolerance of sorghum. *Agronomy Journal*, 112(2), 871-884.
- Ali, Q., Ayaz, M., Mu, G., Hussain, A., Yuanyuan, Q., Yu, C., ... & Gao, X., 2022. Revealing plant growth-promoting mechanisms of *Bacillus strains* in elevating rice growth and its interaction with salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 994902.
- Amerian, M., Palangi, A., Gohari, G., & Ntatsi, G. (2024). Humic acid and grafting as sustainable agronomic practices for increased growth and secondary metabolism in cucumber subjected to salt stress. *Scientific Reports*, 14(1), 15883.
- Aminifard, M.H., Aroiee, H., Nemati, H., Azizi, M., Hawa, Z.E., 2012. Fulvic acid affects pepper antioxidant activity and fruit quality. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 13179–13185.
- An P, Inanaga S, Li X, Schimizu H and Tanimoto E 2003. Root characteristics in salt tolerance. *Root Res.* 12: 125-132.

- Anower, M. R., Mott, I. W., Peel, M. D., & Wu, Y. (2013). Characterization of physiological responses of two alfalfa half-sib families with improved salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, *71*, 103-111.
- Ansari, M., Shekari, F., Mohammadi, M. H., Juhos, K., Végvári, G., & Biró, B., 2019. Salt-tolerant plant growth-promoting bacteria enhanced salinity tolerance of salt-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars at high salinity. *Acta physiologiae plantarum*, *41*, 1-13.
- Arora, N.K., Fatima, T., Mishra, J., Mishra, I., Verma, S., Verma, R., Verma, M., Bhattacharya, A., Verma, P., Mishra, P., and Bharti, C., 2020. Halotolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*, *26*, 69-82.
- Arslan, M., Çetin, S., and Erdurmuş, C., 2013. Tuz stresinin bitki gelişimindeki olumsuz etkileri ve bazı yem bitkilerinin tuzluluk toleransları. *Ziraat Mühendisliği*, *360*, 32-39.
- Ashrafi, E., Razmjoo, J., & Zahedi, M. (2018). Effect of salt stress on growth and ion accumulation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, *41*(7), 818-831.
- Atıcı, Ö., Aydın, İ., Karakus, S., and Tiryaki, D., 2025. Inoculating maize (*Zea mays* L.) seeds with halotolerant rhizobacteria from wild halophytes improves physiological and biochemical responses of seedlings to salt stress. *Biologia Futura*, 1-16.
- Atta, K., Mondal, S., Gorai, S., Singh, A. P., Kumari, A., Ghosh, T., ... & Jespersen, D. (2023). Impacts of salinity stress on crop plants: improving salt tolerance through genetic and molecular dissection. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1241736.
- Atta, K., Mondal, S., Gorai, S., Singh, A.P., Kumari, A., Ghosh, T., and Jespersen, D., 2023. Impacts of salinity stress on crop plants: Improving salt tolerance through genetic and molecular dissection. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1241736.
- Aydın, A., Kant, C., & Turan, M., 2012. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *African Journal of Agricultural Research*, *7*, 1073–1086.
- Azeem, M., Pirjan, K., Qasim, M., Mahmood, A., Javed, T., Muhammad, H., ... & Rahimi, M. (2023). Salinity stress improves antioxidant potential by modulating physio-biochemical responses in *Moringa oleifera* Lam. *Scientific Reports*, *13*(1), 2895.
- Babakhani, B., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., & Saadatmand, S., 2011. Biochemical responses of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars subjected to NaCl salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, *10*(55), 11433-11441.
- Baglieri, A., Vindrola, D., Gennari, M., & Negre, M. (2014). Chemical and spectroscopic characterization of insoluble and soluble humic acid fractions at different pH values. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *1*(1), 9.
- Bashan, Y., de Bashan, L.E., Prabhu, S.R., and Hernandez, J.P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, *378*, 1-33.
- Bayat, H., Shafie, F., Aminifard, M. H., & Daghighi, S., 2021. Comparative effects of humic and fulvic acids as biostimulants on growth, antioxidant activity and nutrient content of yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Scientia Horticulturae*, *279*, 109912.
- Bhattarai, S., Biswas, D., Fu, Y. B., & Biliget, B. (2020). Morphological, physiological, and genetic responses to salt stress in alfalfa: A review. *Agronomy*, *10*(4), 577.
- Bhattarai, S., Biswas, D., Fu, Y. B., & Biliget, B., 2020. Morphological, physiological, and genetic responses to salt stress in alfalfa: A review. *Agronomy*, *10*(4), 577.
- Bhise, K.K., Bhagwat, P.K., and Dandge, P.B., 2017. Plant growth-promoting characteristics of salt tolerant *Enterobacter cloacae* strain KBPD and its efficacy in amelioration of salt stress in *Vigna radiata* L. *J. Plant Growth Regul.*, *36*, 215–226.
- Bianchi, E., Benesperi, R., Colzi, I., Coppi, A., Lazzaro, L., Paoli, L., and Gonnelli, C., 2019. The multi-purpose role of hairiness in the lichens of coastal environments: Insights

- from *Seiropora villosa* (Ach.) Frödén. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 398-406.
- Bonfante, P., and Genre, A., 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(1), 48.
- Brahmbhatt, N.H., and Kalasariya, H.S., 2015. Effect of algae on seedling growth of “Queen of Forages”. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(2), 827-833.
- Branco, S., Schauster, A., Liao, H. L., & Ruytinx, J., 2022. Mechanisms of stress tolerance and their effects on the ecology and evolution of mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 235(6), 2158-2175.
- Brigante M, Zanini G, Avena M., 2007. On the dissolution kinetics of humic acid particles: effects of pH, temperature and Ca²⁺ concentration. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects* 294:64–70.
- Canellas, L. P., & Olivares, F. L., 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1, 1-11.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., et al., 2013. Root growth promotion by humic acids from vermicompost associated with endophytic diazotrophic bacteria. *Applied Soil Ecology*, 63: 1–10.
- Canellas, L.P., da Silva, R.M., Busato, J.G., and Olivares, F.L., 2024. Humic substances and plant abiotic stress adaptation. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1), 66.
- Chauhan, J., Prathibha, M.D., Singh, P., Choyal, P., Mishra, U.N., Saha, D., and Singhal, R.K., 2023. Plant photosynthesis under abiotic stresses: Damages, adaptive, and signaling mechanisms. *Plant Stress*, 10, 100296.
- Che-Othman, M.H., Millar, A.H., and Taylor, N.L., 2017. Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C3 plants. *Plant, Cell & Environment*, 40(12), 2875-2905.
- Cornacchione, M. V., & Suarez, D. L. (2015). Emergence, forage production, and ion relations of alfalfa in response to saline waters. *Crop science*, 55(1), 444-457.
- Cornacchione, M. V., & Suarez, D. L. (2017). Evaluation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations’ response to salinity stress. *Crop Science*, 57(1), 137-150.
- Çetinkaya, H., Kendal, E., and Sayar, M.S., 2013. Ekolojik tarım açısından güneydoğu anadolu bölgesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 195-198.
- da Silva, A.V., da Silva, M.K., de Oliveira, A.J., Silva, J.V., Paulino, S.S., de Queiroz, A.C., and Duarte, A.W.F., 2022. Phosphate solubilization by Antarctic yeasts isolated from lichens. *Archives of Microbiology*, 204(12), 698.
- da Silva, M. S. R. D. A., dos Santos, B. D. M. S., da Silva, C. S. R. D. A., da Silva, C. S. R. D. A., Antunes, L. F. D. S., dos Santos, R. M., ... & Rigobelo, E. C. (2021). Humic substances in combination with plant growth-promoting bacteria as an alternative for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 12, 719653.
- da Silva, R. M., Canellas, N. A., Olivares, F. L., Piccolo, A., & Canellas, L. P., 2023. Humic substances trigger plant immune responses. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 123.
- Dikilitaş, S. K., & Dikilitaş, M., 2021. Determination of the physiological and biochemical effects of humic acid application in strawberry plant grown under salt stress. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(3), 326-335.
- Dinçsoy, M., Sonmez, F., 2019. The effect of potassium and humic acid applications on yield and nutrient contents of wheat (*Triticum aestivum* L. Var. Delfii) with same soil properties. *J. Plant Nutr.* 42 (20), 2757–2772.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S.D., Mishra, J., and Arora, N.K., 2019. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2791.

- Egamberdieva, D., Wirth, S.J., Alqarawi, A.A., Abd_Allah, E.F., and Hashem, A., 2017. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2104.
- El Sabagh, A., Islam, M.S., Skalicky, M., Ali Raza, M., Singh, K., Anwar Hossain, M., and Arshad, A., 2021. Salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) in the changing climate: Adaptation and management strategies. *Frontiers in Agronomy*, 3, 661932.
- Elstner, E.F., Heupel, A. (1976). Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*, 70(2), 616-620.
- Emam, Y., Bijanzadeh, E., Naderi, R., & Edalat, M., 2009. Effects of salt stress on Vegetative growth and ion accumulation of two alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. *Desert*, 14(2), 163-169.
- Emilia, D.A., Luisa, D.A., Stefania, D.P., and Petronia, C., 2020. Use of biostimulants to improve salinity tolerance in agronomic crops. *Agronomic Crops: Volume 3: Stress Responses and Tolerance*, 423-441.
- Esim, N., Atici, O. 2013. Nitric oxide alleviates boron toxicity by reducing oxidative damage and growth inhibition in maize seedlings (*Zea mays* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 7(8), 1085-1092.
- Etesami, H., and Maheshwari, D.K., 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 225–246.
- Evelin, H., Devi, T. S., Gupta, S., & Kapoor, R. (2019). Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and new challenges. *Frontiers in Plant Science*, 10, 470.
- Evelin, H., Kapoor, R., and Giri, B., 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany*, 104(7), 1263-1280.
- Fan, H.M., Wang, X.W., Sun, X., 2014. Effects of humic acid derived from sediments on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in chrysanthemum. *Sci. Hortic.* 177, 118–123.
- Fan, S., Chen, J., Mu, J., & Zhang, M., 2023. Genetic diversity and salt tolerance assessment of 51 alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties under saline soil conditions. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1278913.
- Feigin, S.V., Wiebers, D.O., Blumstein, D.T., Knight, A., Eshel, G., Lueddeke, G., and Winkler, A.S., 2025. Solving climate change requires changing our food systems. *Oxford Open Climate Change*, 5(1), kgae024.
- Foyer, CH. and Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133,21-25.
- Galindo-Sotomonte, L., Jozefkowicz, C., Gómez, C., Stritzler, M., Frare, R., Bottero, E., and Soto, G., 2023. CRISPR/Cas9-mediated knockout of a polyester synthase-like gene delays flowering time in alfalfa. *Plant Cell Reports*, 42(5), 953-956.
- García-Caparrós, P., Hasanuzzaman, M., and Lao, M.T., 2019. Oxidative stress and antioxidant defense in plants under salinity. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*, 291-309.
- Garriga, M., Muñoz, C.A., Caligari, P.D., & Retamales, J.B., 2015. Effect of salt stress on genotypes of commercial (*Fragaria x ananassa*) and Chilean strawberry (*F. chiloensis*). *Scientia Horticulturae*, 195, 37-47.
- Geçer, M. K., 2020. Effects of Humic Acid Application on Fruit Yield and Quality in Some Strawberry Cultivars. *International Journal of Agriculture and Wildlife Science*, 6(1), 21 – 27.
- 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.

- Guan QingJie, G.Q., Liao Xu, L.X., He MingLiang, H.M., Li XiuFeng, L.X., Wang ZhenYu, W.Z., Ma HaiYan, M.H., and Liu ShenKui, L.S., 2017. Tolerance analysis of chloroplast OsCu/Zn-SOD overexpressing rice under NaCl and NaHCO₃ stress. *PLoS One*, 12(10), e0186052.
- Gupta, B., & Huang, B., 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics*, 2014(1), 701596.
- Gülmez, O., Tiryaki, D., Atici, O., and Baris, O., 2023. Boron-resistant *Alternaria alternata* (OG14) mitigates boron stress by improving physiological and antioxidative response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 202, 107911.
- Haghighi, M., Kafi, M., Fang, P., 2012. Photosynthetic activity and N metabolism of lettuce as affected by humic acid. *Int. J. Veg. Sci.* 18.
- Han, L., Zhang, M., Du, L., Zhang, L., & Li, B., 2022. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 on photosynthesis and antioxidant characteristics of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) under drought stress. *Agronomy*, 12(9), 2177.
- Hartwigsen, J. A., & Evans, M. R. (2000). Humic acid seed and substrate treatments promote seedling root development.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., and Fotopoulos, V., 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M.R.H., Masud, A.A.C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., and Fujita, M., 2021. Regulation of reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under salinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9326.
- Hashem, A., Alqarawi, A. A., Radhakrishnan, R., Al-Arjani, A. B. F., Aldehaish, H. A., Egamberdieva, D., & Abd Allah, E. F., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi regulate the oxidative system, hormones and ionic equilibrium to trigger salt stress tolerance in *Cucumis sativus* L. *Saudi J Biol Sci* 25: 1102–1114.
- Hatami, E., Shokouhian, A.A., Ghanbari, A.R., Naseri, L.A., 2018. Alleviating salt stress in almond rootstocks using of humic acid. *Sci. Hortic.* 237, 296–302.
- Hawkesford, M.J., 2024. Enhancing food security amid climate change through rewilding and de novo domestication. *Frontiers in Science*, 2, 1531043.
- Heikal, Y. M., Albahi, A. M., Alyamani, A. A., Abdelmigid, H. M., Haroun, S. A., & Soliman, H. M. (2025). Integrated management of tomato fusarium wilt: ultrastructure insights into Zn nanoparticles and phytohormone applications. *Cells*, 14(14), 1055.
- Hernández, J.A., 2019. Salinity tolerance in plants: trends and perspectives. *IJMS* 20:2408.
- Hernández-Canseco, J., Bautista-Cruz, A., Sánchez-Mendoza, S., Aquino-Bolaños, T., and Sánchez-Medina, P.S., 2022. Plant growth-promoting halobacteria and their ability to protect crops from abiotic stress: an eco-friendly alternative for saline soils. *Agronomy*, 12(4), 804.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.
- Hu LongXing, H. L., Li HuiYing, L. H., Pang HuangCheng, P. H., & Fu JinMin, F. J. (2012). Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance.
- Ibragimova, M.V., Rummyantseva, M.L., Onishchuk, O.P., Belova, V.S., Kurchak, O.N., Andronov, E.E., and Simarov, B.V., 2006. Symbiosis between the root-nodule bacterium *Sinorhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) under salinization conditions. *Microbiology*, 75, 77-81.

- İlay, R., Aktaş, M., Aslantekin, N. B., & Özcan, H., 2021. Farklı kaynaklardan elde edilen organik materyalin kumlu tın bünyeli toprağın bazı özellikleri üzerine etkileri. *Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi*, 9(1), 30-38.
- Jabborova, D., Zhang, Y., Alhewairini, S. S., Jabbarov, Z., Barasarathi, J., Abdrakhmanov, T., ... & Saharan, B. S., 2025. Enhancing growth and physiological traits in alfalfa by alleviating salt stress through biochar, hydrogel, and biofertilizer application. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1560762.
- Jabri, C., Zaidi, N., Maiza, N., Rafik, K., Ludidi, N., & Badri, M. (2021). Effects of salt stress on the germination of two contrasting *Medicago sativa* varieties. *Journal of Oasis Agriculture and Sustainable Development*, 3(3), 13-18.
- Jacoby, R.P., Taylor, N.L., and Millar, A.H., 2011. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends in Plant Science*, 16(11), 614-623.
- Jamalian, S., Gholami, M., & Esna-Ashari, M., 2013. Abscisic acid-mediated leaf phenolic compounds, plant growth and yield in strawberry under different salt stress regimes. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25, 291-299.
- Jorjandi, M., & GR, S. S. (2012). The effect of priming on germination and seedling growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under salinity stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 8(3), 234-239.
- Kang, S.M., Khan, A., Waqas, M., You, Y.H., Kim, J.H., Kim, J.G., Hamayun, M., and Lee, L.J., 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *J. Plant Interact.* 9, 673–682.
- Karimian, Z., Samiei, L., & Nabati, J., 2019. Alleviating the salt stress effects in *Salvia splendens* by humic acid application. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 18(5), 73-82.
- Kesawat, M.S., Satheesh, N., Kherawat, B.S., Kumar, A., Kim, H.U., Chung, S.M., and Kumar, M., 2023. Regulation of reactive oxygen species during salt stress in plants and their crosstalk with other signaling molecules-current perspectives and future directions. *Plants*, 12(4), 864.
- Khan, A. L. (2023). The phytomicrobiome: solving plant stress tolerance under climate change. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1219366.
- Khan, M. A., Hamayun, M., Asaf, S., Khan, M., Yun, B. W., Kang, S. M., & Lee, I. J., 2021. Rhizospheric *Bacillus spp.* rescues plant growth under salinity stress via regulating gene expression, endogenous hormones, and antioxidant system of *Oryza sativa* L. *Frontiers in plant science*, 12, 665590.
- Khoso, M. A., Wang, M., Zhou, Z., Huang, Y., Li, S., Zhang, Y., ... & Li, L., 2024. *Bacillus altitudinis* AD13–4 enhances saline-alkali stress tolerance of alfalfa and affects composition of rhizosphere soil microbial community. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5785.
- Kumar, P., Choudhary, M., Halder, T., Prakash, N.R., Singh, V., V, V.T., and Siddique, K.H., 2022. Salinity stress tolerance and omics approaches: revisiting the progress and achievements in major cereal crops. *Heredity*, 128(6), 497-518.
- Kumawat, K.C., Sharma, B., Nagpal, S., Kumar, A., Tiwari, S., and Nair, R.M., 2023. Plant growth-promoting rhizobacteria: Salt stress alleviators to improve crop productivity for sustainable agriculture development. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1101862.
- Kunz, H.H., Armbruster, U., Mühlbauer, S., de Vries, J., and Davis, G.A., 2024. Chloroplast ion homeostasis—what do we know and where should we go? *New Phytologist*, 243(2), 543-559.
- Li, B., Mamuti, R., Xiao, L., Qian, B., Wang, Y., and Wei, X., 2024. The adaptation of lichen symbiosis to desert saline-alkali stress depends more on their symbiotic algae. *Physiologia Plantarum*, 176(5), e14510.

- Li, H., Kong, F., Tang, T., Luo, Y., Gao, H., Xu, J., ... & Li, L. (2023). Physiological and transcriptomic analyses revealed that humic acids improve low-temperature stress tolerance in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) seedlings. *Plants*, 12(3), 548.
- Li, J., Pei, J., Fang, C., Li, B., and Nie, M., 2024. Drought may exacerbate dryland soil inorganic carbon loss under warming climate conditions. *Nature Communications*, 15(1), 617.
- Liu, P.P., Bhattacharjee, S., Klessig, D.F., and Moffett, P., 2010. Systemic acquired resistance is induced by R gene-mediated responses independent of cell death. *Molecular Plant Pathology*, 11(1), 155-160.
- Liu, Y., Jin-Li, C., Qiang-Sheng, W., and Kamil, K., 2020. *Piriformospora indica*: a root endophytic fungus and its roles in plants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(1), 1-13.
- Lucas, J.A., Garcia-Villaraco, A., Montero-Palmero, M.B., Montalban, B., Ramos Solano, B., and Gutierrez-Mañero, F.J., 2023. Physiological and genetic modifications induced by plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in tomato plants under moderate water stress. *Biology*, 12(7), 901.
- Ma, Y., Freitas, H., and Dias, M.C., 2022. Strategies and prospects for biostimulants to alleviate abiotic stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1024243.
- Maffia, A., Oliva, M., Marra, F., Mallamaci, C., Nardi, S., & Muscolo, A. (2025). Humic substances: Bridging ecology and agriculture for a greener future. *Agronomy*, 15(2), 410.
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Harish, Tripathi, Y.N., and Upadhyay, R.S., 2020. PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *Journal of Basic Microbiology*, 60(10), 828-861.
- Meganid, A. S., Al-Zahrani, H. S., & El-Metwally, M. S. (2015). Effect of humic acid application on growth and chlorophyll contents of common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) under salinity stress conditions. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 4(5), 2651-2660.
- Mekkaoui, F., Ait-El-Mokhtar, M., Zaari Jabri, N., Amghar, I., Essadssi, S., & Hmyene, A. (2024). The use of compost and arbuscular mycorrhizal fungi and their combination to improve tomato tolerance to salt stress. *Plants*, 13(16), 2225.
- Meng, Q., Yan, M., Zhang, J., Zhang, Q., Zhang, X., Yang, Z., ... & Wu, W., 2023. Humic acids enhance salt stress tolerance associated with pyrroline 5-carboxylate synthetase gene expression and hormonal alteration in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14, 1272987.
- Miller, G.A.D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., and Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 453-467.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Monirifar, H., & BARGHI, M. (2009). Identification and selection for salt tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes via physiological traits. *Notulae Scientia Biologicae*, 1(1), 63-66.
- Monirifar, H., M. Valizadeh, R. Mohammadian, M. S. Abedi and A. O. Milani., 2004. Variation for tolerance in five alfalfa cultivars. *International scientific symposium*, Ganja, Azerbaijan.
- Mukhopadhyay, R., Sarkar, B., Jat, H.S., Sharma, P.C., and Bolan, N.S., 2020. Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security. *Journal of Environmental Management*, 280, 111736.
- Munns, R., and Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.

- Muscolo, A., Sidari, M., Attinà, E., Francioso, O., Tugnoli, V., & Nardi, S. (2007). Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal*, 71(1), 75-85.
- Nakano, Y. and Asada, Y., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, (22), 867-880.
- Nardi, S., Ertani, A., and Francioso, O., 2017. Soil–root cross-talking: The role of humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(1), 5-13.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1527–1536.
- Olaetxea, M., De Hita, D., Garcia, C.A., Fuentes, M., Baigorri, R., Mora, V., Garnica, M., Urrutia, O., Erro, J., Zamarreno, ~ A.M., Berbara, R.L., 2018. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root-and shoot-growth. *Appl. Soil Ecol.* 123, 521–537.
- Olivares F.L., Aguiar NO, Rosa RCC, Canellas LP. 2015. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Sci Hortic.* 183:100–8.
- Olivares, F.L., Busato, J.G., de Paula, A.M., da Silva Lima, L., Aguiar, N.O., and Canellas, L.P., 2017. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4, 1-13.
- Olson, D., Berry, H.M., Riggs, J.D., Argueso, C.T., and Gomez, S.K., 2022. Phytohormone profile of medicago in response to mycorrhizal fungi, aphids, and gibberellic acid. *Plants*, 11(6).
- Özkurt, M., Saygılı, İ., and Dirik, K.Ö., 2019. Bazı yonca çeşitlerinin erken gelişme dönemindeki kuraklık toleransının belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(4), 557-562.
- Parida, A.K., and Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324-349.
- Patani, A., Prajapati, D., Ali, D., Kalasariya, H., Yadav, V. K., Tank, J., ... & Patel, A., 2023. Evaluation of the growth-inducing efficacy of various *Bacillus species* on the salt-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Frontiers in Plant Science*, 14, 1168155.
- Patil, P.S., and Gore, N.S., 2025. Botanical Symbiosis Unveiled: A Review of Mycorrhizas, Lichen, and Plant Consorts. *The Botanical Review*, 1-24.
- Peel, M. D., Anower, M. R., & Wu, Y. (2023). Breeding efficiency for salt tolerance in alfalfa. *Life*, 13(11), 2188.
- Peel, M. D., Waldron, B. L., Jensen, K. B., Chatterton, N. J., Horton, H., & Dudley, L. M. (2004). Screening for salinity tolerance in alfalfa: a repeatable method. *Crop science*, 44(6), 2049-2053.
- Pekcan, T., Esetlili, B. Ç., Turan, H. S., & Aydoğdu, E., 2018. Leonardit kökenli organik materyallerin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32(1), 31-41.
- Perales, A.D., Hernando, I.H., Martínez, G.N., Velasco, A.M.R., and Casanovas, M.R.V., 2025. Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the relationship between climate change and food security, and its impact on the nutritional status of the population. Vol. 3, No. 1, p. 0053E.
- Porcel, R., Aroca, R., and Ruiz-Lozano, J.M., 2012. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 181-200.
- Puglisi, E., Fragoulis, G., Del Re, A.A., Spaccini, R., Piccolo, A., Gigliotti, G., and Trevisan, M., 2008. Carbon deposition in soil rhizosphere following amendments with compost

- and its soluble fractions, as evaluated by combined soil–plant rhizobox and reporter gene systems. *Chemosphere*, 73(8), 1292-1299.
- Rabbi, M.F., Hasan, M., and Kovács, S., 2021. Food security and transition towards sustainability. *Sustainability*, 13(22), 12433.
- Raheem, A., and Ali, B., 2015. Halotolerant rhizobacteria: Beneficial plant metabolites and growth enhancement of *Triticum aestivum* L. in salt amended soils. *Arch. Agron. Soil Sci.*, 61, 1691-1705.
- Rose, M. T., Patti, A. F., Little, K. R., Brown, A. L., Jackson, W. R., & Cavagnaro, T. R. (2014). A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in agronomy*, 124, 37-89.
- Rose, M.T., Patti, A.F., Little, K.R., Brown, A.L., Jackson, W.R., Cavagnaro, T.R., 2014. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Adv. Agron.* 124, 37–89
- Rupiasih, N.N., and Vidyasagar, P., 2005. A review: Compositions, structures, properties and applications of humic substances. *J. Adv. Sci. Technol*, 8, 16-25.
- Saeed, S. W. Z., Naseer, I., Zahir, Z. A., Hilger, T., Shahid, S., Iqbal, Z., & Ahmad, M., 2023. *Bacillus* strains with catalase enzyme improve the physiology and growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Stresses*, 3(4), 736-748.
- Sairam, R.K and Tyagi A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86: 407-721.
- Santiago, A., Lose, M., Carmona, E., Delgado, A., 2008. Humic substances increase the effectiveness of iron sulfate and vivianite preventing iron chlorosis in white lupin. *Biol. Fertil. Soils* 44, 875–883.
- Scasta, J. D., Trostle, C. L., & Foster, M. A., 2012. Evaluating alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars for salt tolerance using laboratory, greenhouse and field methods. *Journal of Agricultural Science*, 4(6), 90.
- Schachtman, D., & Liu, W. (1999). Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in plant science*, 4(7), 281-287.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., Nardi, S., 2010. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *J. Chem. Ecol.* 36, 662–669.
- Seven, S., & Akinci, Ş. (2025). Effects of humic acid and salt stress on growth, physiological parameters and mineral substance uptake in *Artemisia dracunculus* L. (Tarragon). *Turkish Journal of Botany*, 49(2), 64-79.
- Siddika, A., Rashid, A. A., Khan, S. N., Khatun, A., Karim, M. M., Prasad, P. V., & Hasanuzzaman, M., 2024. Harnessing plant growth-promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* and *B. aryabhatai* to combat salt stress in rice: a study on the regulation of antioxidant defense, ion homeostasis, and photosynthetic parameters. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1419764.
- Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Sofi, A., Ebrahimi, M., & Shirmohammadi, E. (2018). Effect of humic acid on germination, growth, and photosynthetic pigments of *Medicago sativa* L. under salt stress. *Ecopersia*, 6(1), 21-30.
- Soltani, A., Khodarahmpour, Z., Jafari, A. A., & Nakhjavan, S. (2012). Selection of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars for salt stress tolerance using germination indices. *African Journal of Biotechnology*, 11(31), 7899-7905.
- Soltanpour, P. N., Ippolito, J. A., Rodriguez, J. B., Self, J., Gillaume, M., Al-Wardy, M. M., & Mathews, D. (1999). Chloride versus sulfate salinity effects on alfalfa shoot growth and ionic balance. *Soil Science Society of America Journal*, 63(1), 111-116.

- Sosa, L., Llanes, A., Reinoso, H., Reginato, M., & Luna, V. (2005). Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of botany*, 96(2), 261-267.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Haberhauer, G., and Gerzabek, M.H., 2002. Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(12), 1839-1851.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Haberhauer, G., and Gerzabek, M.H., 2000. Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by ¹³C distribution and CPMAS-NMR spectra. *European Journal of Soil Science*, 51(4), 583-594.
- Srhiouar, N., Ferioun, M., Bouhraoua, S., Hammani, K., & Louahlia, S., 2022. Impact of Severe Salt Stress on Morphological, Physiological, and Biochemical Parameters in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Sciences Proceedings*, 16(1), 27.
- Stavi, I., Thevs, N., and Priori, S., 2021. Soil salinity and sodicity in drylands: A review of causes, effects, monitoring, and restoration measures. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 712831.
- Steppuhn, H., Acharya, S. N., Iwaasa, A. D., Gruber, M., & Miller, D. R. (2012). Inherent responses to root-zone salinity in nine alfalfa populations. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(2), 235-248.
- Szczepanek, M., & Wilczewski, E. (2011). Effect of humic substances on germination of wheat and barley under laboratory conditions. *Acta Scientiarum Polonorum. Agricultura*, 10(1).
- Tiwari, J., Ramanathan, A.L., Baudh, K., and Korstad, J., 2023. Humic substances: Structure, function and benefits for agroecosystems-A review. *Pedosphere*, 33(2), 237-249.
- Trevisan, S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., Quaggiotti, S. & Nardi, S., 2009. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 12, 604-614.
- Turfan, N., Kibar, B., Davletova, N., & Kibar, H. (2024). Ameliorative effects of humic acid and L-tryptophan on enzyme activity, mineral content, biochemical properties, and plant growth of spinach cultivated in saline conditions. *Food Science & Nutrition*, 12(10), 8324-8339.
- Ueno, A., Shimizu, S., Tamamura, S., Okuyama, H., Naganuma, T., and Kaneko, K., 2016. Anaerobic decomposition of humic substances by *Clostridium* from the deep subsurface. *Scientific Reports*, 6(1), 18990.
- Ural, C., Ünlü, H. Ö., Erkan, İ. E., Akçay, U. Ç. (2023). Influence of humic acid on some physiological characteristics and antioxidant enzyme genes expression in tomato (*Solanum lycopersicum*) grown under salt stress conditions. *Alatarım* 22 (2): 86-97.
- Ülker, E., Yüksel, O., and Ergül, S., 2020. Ülkemizde yem bitkileri tarımının durumu, tohumluk üretimi ve dış ticareti. *Uşak Üniversitesi Fen ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 4(2), 127-138.
- Van Loon, L.C., 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-promoting Rhizobacteria Research*, 243-254.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66.
- Wang, X., Chen, Z., and Sui, N., 2024. Sensitivity and responses of chloroplasts to salt stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1374086.
- Witham, F.H., Blaydes, B.F., Devlin, R.M. 1971. *Experiments in plant physiology*, Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 167-200.

- Wu, S., Lu, Y.C., McMurtrey, J.E., Weesies, G., Devine, T.E., and Foster, G.R., 2004. Soil conservation benefits of large biomass soybean (LBS) for increasing crop residue cover. *Journal of Sustainable Agriculture*, 24(1), 107-128.
- Xie, Y., Han, S., Li, X., Amombo, E., & Fu, J. (2017). Amelioration of salt stress on bermudagrass by the fungus *Aspergillus aculeatus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(3), 245-254.
- Yang, Z., Li, J.L., Liu, L.N., Xie, Q., and Sui, N., 2020. Photosynthetic regulation under salt stress and salt-tolerance mechanism of sweet sorghum. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1722.
- Yaquby, A. M., Rabbani, B., & Soddad, S. (2024). Effect of humic acid and ascorbic acid on seed germination and growth of cucumber (*Cucumis sativus* L.) under salinity stress. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 37(1), 105-118.
- Yazdani, B., Nikbakht, A., Etemadi, N., 2014. Physiological effects of different combinations of humic and fulvic acid on Gerbera. *Commun. Soil Sci. Plan.* 45, 1357–1368.
- Yıldırım, B., Dönmez, M. F., Sunyar, B., & Çoruh, İ. (2022). Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler: Bazı fasulye çeşitlerinin tarımsal karakterleri üzerine etkileri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(3), 616-632.
- Yıldız, M., Terzi, H., & Akçalı, N., 2014. Tuz stresi altındaki bitkilerin metabolik yollarındaki proteom değişimleri. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(1), 81-93.
- Yılmaz, E., Tuna, A.L., and Bürün, B., 2011. Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri-tolerance strategies developed by plants to the effects of salt stress. *Celal Bayar University Journal of Science*, 7(1), 47-66.
- Younesi, O., & Moradi, A., 2014. Effect of priming of seeds of *Medicago sativa* "Bami" with gibberellic acid on germination, seedlings growth and antioxidant enzymes activity under salinity stress. *Journal of Horticultural Research*, 22(2).
- Yüzbaşıoğlu, E., 2021. Baklagillerde simbiyotik kök nodül gelişimi. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 33(1), 1-10.
- Zhang, F., Wang, Y., Liu, C., Chen, F., Ge, H., Tian, F., and Zhang, Y., 2019. *Trichoderma harzianum* mitigates salt stress in cucumber via multiple responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 436-445.
- Zhang, G., Li, B., Yang, Y., Zhang, Z., Cheng, D., Wang, F., and Sun, Y., 2024. Biodegradation of humic acids by *Streptomyces rochei* to promote the growth and yield of corn. *Microbiological Research*, 286, 127826.
- Zhang, J., Lu, J., Zhu, Y., Shen, X., Zhu, B., & Qin, L. (2024). Roles of endophytic fungi in medicinal plant abiotic stress response and TCM quality development. *Chinese Herbal Medicines*, 16(2), 204-213.
- Zhou, H., Shi, H., Yang, Y., Feng, X., Chen, X., Xiao, F., and Guo, Y., 2024. Insights into plant salt stress signaling and tolerance. *Journal of Genetics and Genomics*, 51(1), 16-34.
- Zhu, J.K., 2001. Over expression of a delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Tr. Plant Sci.* 6: 66-72.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Aytakın Mammadova
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek lisans:	
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
<ol style="list-style-type: none">1. Mammadova A, Atıcı Ö, Gülmez Ö. 2025. Synergistic effects of humic acid and lichen-derived <i>Bacillus wiedmannii</i> on the salt stress response of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.). Uluslararası Multidisipliner Bilimsel Araştırma Kongresi. July 04-06, 2025, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, Türkiye.2. Mammadova A, Atıcı Ö, Gülmez Ö. 2025. Combined humic acid and lichen-derived endophytic bacteria application alleviates salt stress-induced oxidative damage in alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.). Türk Doğa ve Fen Dergisi (İncelemede)	