



**IN VİTRO ŞARTLARDA KURAKLIK STRESİNE
MARUZ BIRAKILAN BAZI YEREL YONCA (*Medicago
sativa* L.) EKOTİPLERİNİN KALLUSLARINA
UYGULANAN CaO NPs'İNİN ve GRAFEN OKSİTİN
(GO) mtr-miR159 ve mtr-miR393 GEN
SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİKLİĞİN TESPİT
EDİLMESİ**

Büşra YAZICILAR

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

**2023
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

***IN VİTRO* ŞARTLARDA KURAKLIK STRESİNE MARUZ BIRAKILAN BAZI
YEREL YONCA (*Medicago sativa* L.) EKOTİPLERİNİN KALLUSLARINA
UYGULANAN CaO NPs'İNİN ve GRAFEN OKSİTİN (GO) mtr-miR159 ve mtr-
miR393 GEN SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİKLİĞİN TESPİT EDİLMESİ**

Büşra YAZICILAR

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2023

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

23 / 06 / 2023

Büşra YAZICILAR

ÖZET

DOKTORA TEZİ

***IN VİTRO* ŞARTLARDA KURAKLIK STRESİNE MARUZ BIRAKILAN BAZI YEREL YONCA (*Medicago sativa* L.) EKOTİPLERİNİN KALLUSLARINA UYGULANAN CaO NPs'NİN ve GRAFEN OKSİTİN (GO) mtr-miR159 ve mtr-miR393 GEN SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİKLİĞİN TESPİT EDİLMESİ**

Büşra YAZICILAR

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Yeryüzünde verimli toprakları etkisi altına alan kuraklık stresi, bitkilerin fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarında önemli değişikliklere neden olup tarımsal alanları olumsuz şekilde etkilemiştir. Nanoteknoloji çevresel faktörlerden kaynaklanan olumsuz etkileri çözmek için yeni fırsatlar sunmaktadır. Bu çalışmada, kuraklık stresine maruz bırakılan iki farklı yonca ekotipi doku kültürü şartlarında CaO NPs ve GO uygulaması yapılarak fizyolojik, biyokimyasal ve gen seviyesindeki değişikliklere karşı test edilmiştir. Öncelikle Erzurum ve Konya yöresinden toplanmış olan farklı yerel ekotiplerinin tohumları MS ortamında rejenerasyonu sağlanmış, rejenerasyon sonucu oluşan yonca yaprakları 2,4-D ve Kinetin ortamına alınarak kallus oluşumu sağlanmıştır. Oluşan bu kallus örneklerine farklı konsantrasyonlarda mannitol (50 ve 100 mM), CaO NPs ve GO (0,5 ve 1,5 ppm) içeren ortamlarda 1 ay süre ile bekletilmiştir. Kallus dokularında mannitol konsantrasyonu artıkça kuru/yaş ağırlığının azaldığı CaO NPs ve GO uygulamasında ise arttığı gözlemlenmiştir. Prolin, DNSA, MDA ve H₂O₂ kuraklık stresiyle doğru orantılı bir şekilde artış olurken, CaO NPs ve GO ise azalış göstermiştir. Fizyolojik ve biyokimyasal analizlerin sonucuna göre Erzurum için en ideal ortam 50 mM mannitol/ 2 CaO NPs/0,5 ppm GO iken Konya için ise 50 mM mannitol/ 0,5 ppm GO'dır. mtr-miR159 ve mtr-miR393 gen seviyesinde meydana gelen değişiklikte kuraklık stresi artıkça yukarı regülasyon CaO NPs ve GO uygulamasında ise aşağı regülasyon olmuştur. Yonca dokusundaki Ca²⁺ birikimi ise SEM ve CLSM kullanılarak doğrulanmıştır. Sonuç olarak, doku kültürü koşullarında CaO NPs ve GO uygulanmasının kuraklık stresine karşı yonca kallusları üzerindeki olumsuz etkileri önemli ölçüde azalttığını göstermiştir.

2023, 100 sayfa

Anahtar Kelimeler: *M. sativa*, CaO NPs, GO, mtr-miR159, mtr- miR393

ABSTRACT

Ph.D

DETERMINATION OF CHANGES IN *mtr-miR159* and *mtr-miR393* GENE LEVELS OF CaO NPs and GRAPHENE OXIDE (GO) APPLIED TO CALLUS OF SOME LOCAL Alfalfa (*Medicago sativa* L.) ECOTYPES EXPOSED TO DROUGHT STRESS UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Büşra YAZICILAR

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İsmail BEZİRĖANOĐLU

Drought stress affects fertile soils in the World, It causes important changes in the physiological, biochemical, and molecular mechanisms of plants and these changes adversely affect agricultural areas. Nanotechnology offers new opportunities to solve the negative effects of environmental factors. In this study, two different alfalfa ecotypes subjected to drought stress were tested in response to physiological, biochemical, and gene level changes applying CaO NPs and GO under tissue culture conditions. Firstly, seeds of different local ecotypes collected from Erzurum and Konya regions were regenerated in MS medium, and the alfalfa leaves formed as a result of regeneration ensured callus formation in 2,4-D and Kinetin medium. These callus samples were kept for 1 month in media containing different concentrations of mannitol (50 and 100 mM), CaO NPs and GO (0,5 and 1,5 ppm). It was observed that the dry/wet weight decreased as the mannitol concentration increased in the callus tissues and increased in CaO NPs and GO treatment. Proline, DNSA, MDA, and H₂O₂ increased in direct proportion to drought stress, while CaO NPs, and GO decreased. According to the results of physiological and biochemical analyses, the most optimum medium conditions for Erzurum were 50 mM mannitol/2 CaO NPs/0,5 ppm GO, while the optimum medium conditions were 50 mM mannitol/0,5 ppm GO for Konya. The changes in *mtr-miR159* and *mtr-miR393* gene levels were up-regulated as drought stress increased and down-regulated in CaO NPs and GO treatments. Ca²⁺ accumulation in alfalfa tissue was confirmed using SEM and CLSM. In conclusion, CaO NPs and GO treatment significantly reduced the negative effects of drought stress on alfalfa callus under tissue culture conditions.

2023, 100 page

Keywords: *M.sativa*, CaO NPs, GO, *mtr-miR159*, *mtr-miR393*

TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisansüstü eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile tezimin planlanmasından gerçekleştirilmesine kadar her aşamada desteklerini sunarak beni yönlendiren ve akademik gelişimime katkı sağlayan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. İsmail BEZİRĖANOĖLU'na,

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesi sürecine önerileri ile katkı sunan sayın hocalarım Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na, Prof. Dr. Özkan AKSAKAL'a, Doç. Dr. Semin GEDİKLİ'ye, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEMİR TOZLU'ya, Dr. Arş. Gör. Elif ERBAŞ'a,

Tez çalışmalarımın önemli bir bölümünün gerçekleştirilmesine olanak tanıyan Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezine,

Araştırma sürecinde manevi desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşım ve laboratuvar arkadaşlarıma (Özge CAM, Merve ŞİMŞEK GEYİK, Neslişah BARLAK, Ümmü Gülsüm KOÇ, Ayşe ÜSTÜN ve Fatma Özge ASLAN),

Tezin gerçekleştirilmesine maddi destek sağlayan; Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, TÜBİTAK-BİDEB 2211/A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı'na katkılarından dolayı şükranlarımı sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımı şekillendirirken aldığım her kararda beni destekleyen sevgili canım babam Hüseyin YAZICILAR'a, annem Hatice YAZICILAR'a, ablalarım Ruhan ATAR ve Fatma Gül YAZICILAR'a ve abilerim Mehmet YAZICILAR ve Serkan ATAR'a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Büşra YAZICILAR
Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Yonca	1
1.2. Stres.....	2
1.2.1. Abiyotik stres.....	3
1.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler	9
1.3.1. Prolin içeriği	12
1.3.2. Çözünebilir şeker	14
1.3.3. Abiyotik stres altında reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunması.....	15
1.4. Nanoteknoloji	19
1.4.1. Nanoteknolojinin tarımda kullanım alanları	20
1.4.2. Nanopartiküllerin sınıflandırılması	21
1.4.3. Nanoteknolojinin tarımda kullanılması	27
1.5. miRNA’ların Keşfi, Biyosentezi ve Mekanizması	29
1.5.1. Kuraklık stresine miRNA seviyesinde yanıtları	31
1.6. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)	32
1.7. Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu (CLSM).....	33
2. KAYNAK ÖZETLERİ	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	40
3.1. Bitki Ekstratların Hazırlanması	40
3.1.1. CaO NPs’nin hidrotermal sentezi, GO’ların kimyasal sentezi ve karakterizasyonu	40
3.1.2. CaO NP’nin ve GO’ların yapısal karakterizasyonu	40
3.2. Kallus Oluşumu	41

3.3. Kuraklığa Alıştırma Koşulları	43
3.4. Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Analizleri.....	44
3.4.1. Kuru/yaş ağırlık.....	44
3.4.2. Prolin içeriği	44
3.4.3. Çözünebilir şeker içeriğinin belirlenmesi.....	45
3.4.4. Lipid peroksidasyon içeriğinin belirlenmesi	46
3.4.5. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂).....	46
3.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)	47
3.6. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM).....	48
3.7. mtr-miR159 ve mtr-miR393 Gen İfadelerindeki Değişikliğin RT-qPCR ile Değerlendirilmesi.....	48
3.8. İstatistiksel Analiz.....	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	52
4.1. CaO NPs'nin ve GO'ların Yapısal Karakterizasyonu	52
4.2. Kallus Oluşumu	56
4.2.1. Kalluslara kuraklık ve nanopartikül uygulamaları.....	56
4.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	57
4.4. SEM ve CLSM Analizi	64
4.5. mtr-miR159 ve mtr-miR393 Gen İfadelerindeki Değişikliğin RT-qPCR ile Değerlendirilmesi.....	70
4.6. Bütün Analizlerin Değerlendirilmesi	72
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
gr	Gram
mL	Mililitre
°C	Santigart Derece

Kısaltmalar

¹ O ₂	Tekli Oksijen
2,4-D	Diklorofenoksiasetik Asit
ABA	Absisik Asit
ABI1	ABA Duyarsız 1
ACC	1-aminosiklopropan-1-karboksilat
AHK1	<i>Arabidopsis</i> Histidin Kinaz1
AMP1	Değişim Meristem Programı
AOX	Alternatif Oksidaz
APX	Askorbat Peroksidaz
ATHK1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Histidin Kinaz1
ATR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma
BR	Brassinosteroid
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
CaM	Kalmodulin
CaO NPs	Kalsiyum Oksit Nanopartikülleri
CAT	Katalaz
CBL	Kalsinörin B Benzeri Proteinler
CDPK/CPK	Ca ²⁺ Bağlı Kinazlar
CGR	Mahsul Büyüme Hızı
CIPK	CBL Etkileşimli Protein Kinazlar
CLE25	Klavatra 3, Embriyo-çevreleyen Bölgeyle İlgili ²⁵

CLSM	Konfokal Lazer Taramalı Elektron Mikroskop
CNG2	Döngü Nükleotit-Geçitlikanal2
CNT	Karbon Nanotüpler
CO	Constans
COR	Soğuk Düzenleyici
DEG	Farklı Şekilde Ekspre Edilmiş Gen
DFR	Dehidroflavonal-4-Redüktaz
DNSA	3,5-dinitrosalisilik Asit
EC	Elektrik İletkenliği
ER	Endoplazmik Retikulum
ETC	Elektron Taşıma Zinciri
FT-IR	Kızılötesi Spektroskop
GHR1	Koruyucu Hücre Hidrojen Peroksidazistan1
GO	Grafen Oksit
GR	Glutasyon Redüktaz
GRN	Gen Düzenleyici Ağ
GST	Glutasyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HPCA	Hidrojen Peroksit Bağımlı Ca ²⁺
JA	Jasmonik Asit
KML	CaM Benzeri Proteinler
LEA	Geç Embriyo Bolluğu
LPO	Lipid Peroksidaz
LRR-RLK	Lösin Zengin Tekrar Reseptörü Benzeri Kinaz
MDA	Malondialdehid
miRNA	MikroRNA
MS	Murashige ve Skoog
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NEDC3	Dokuz cis Epoksikarotenoid Dioksijenaz3
NPs	Nanopartiküller
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikalleri
OH ⁻	Hidroksil Radikalleri
P5CS	Pirolin-5-karboksilat sentetaz
PEG	Polietilen Glikol

PLC	Fosfolipaz C
PLD	Fosfolipaz D
POX	Peroksidaz
PSI	Fotosistem I
PTGS	Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma
PUCP	Bitki Ayrışma Proteinleri
RAB	Absisik Asite Yanıt
RBOH	Respiratuar Patlama Oksidaz Homolog
RBOHD	Solunum Burst Oksidaz Homolog D
RD22	Dehidrasyona Gen Tepkisi 22
RGR	Nispi Büyüme Oranı
RhodamineB	(N-[9-2-karboksifenil-6-(diethylamino)-3H-ksanten-3-iliden]-N-etiletanaminium klorür)
RLK	Reseptör Benzeri Kinaz
RNAi	RNA İnterferans
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Rubisco	5-bifosfat Karboksilaz-oksigenaz
RWC	Su İçeriği
SA	Salisilik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
SLAC1	S Tipi Anyon Kanalı
SOD	Süperoksit Dismutaz
stRNA	Küçük Geçici RNA
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
TG	Termo Grayimetrik
TIR1	Taşıma İnhibitörü Yanıtı 1
TRX	Tioredoksin
WAK	Hücre Duvarı ile İlişkili Kinazlar
XRD	X-ışını Kırınım
ZnO NP	Çinko Oksit Nanopartikül

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyotik ve abiyotik stres türleri.	3
Şekil 1.2. Kuraklığı etkileyen fizyolojik ve biyokimyasal süreçler.	5
Şekil 1.3. Kuraklık stres koşullarına yanıt olarak kökten sürgüne, sürgünden sürgüne ve yerel sinyallerin kavramsal diyagramı..	7
Şekil 1.4. Belirli bitki türlerinde yer değiştirmiş karbonhidratın önemli bir bölümünü oluşturan bazı yaygın altı karbonlu şeker alkollerinin kimyasal yapıları:	11
Şekil 1.5. Bitkilerde prolin metabolizmasının düzenlenmesi.	13
Şekil 1.6. Bitkilerde oksidatif stres ve sonuçları.	16
Şekil 1.7. Ca ²⁺ alımına ve bitkide yerine getirdiği işlevlere genel bakış.....	25
Şekil 1.8. Tarımda nanoteknoloji uygulamaları.	27
Şekil 3.1. Prolinin standart grafiği.....	44
Şekil 3.2. Çözünebilir şeker standart grafiği.....	46
Şekil 3.3. H ₂ O ₂ standart grafiği.	47
Şekil 4.1. CaO NPs'nin SEM görüntüsü.....	52
Şekil 4.2. CaO NPs yapısının XRD analizi spektrumu	53
Şekil 4.3. CaO NPs'nin FT-IR grafiği.	54
Şekil 4.4. Sentezlenen GO 'nun SEM görüntüsü.	54
Şekil 4.5. Grafen oksit yapısının XRD analizi spektrumu.....	55
Şekil 4.6. Sentezlenen GO'nun FT-IR grafiği.....	56
Şekil 4.7. <i>M. sativa</i> (Erzurum ve Konya) a: rejenerasyon, b: yaprak eksplantı ve c: kallus oluşumu.....	56
Şekil 4.8. Oluşan kallus görüntüsü.	57
Şekil 4.9. <i>M. sativa</i> yerel ekotiplerinde (<i>Konya ve Erzurum</i>) kuru/yaş ağırlık oranı.....	59
Şekil 4.10. <i>M. sativa</i> yerel ekotiplerinde (<i>Konya ve Erzurum</i>) prolindeki değişimi.....	60
Şekil 4.11. <i>M. sativa</i> yerel ekotiplerinde (<i>Konya ve Erzurum</i>) çözünebilir şeker miktarındaki değişimi.	60
Şekil 4.12. <i>M. sativa</i> yerel ekotiplerinde (<i>Konya ve Erzurum</i>) MDA'daki değişimi.....	63
Şekil 4.13. <i>M. sativa</i> yerel ekotiplerinde (<i>Konya ve Erzurum</i>) H ₂ O ₂ 'daki değişimi.	63
Şekil 4.14. Erzurum ekotipinde kallus, SEM ve CLSM görüntüleri	64
Şekil 4.15. Konya ekotipinde kallus, SEM ve CLSM görüntüleri.....	67

Şekil 4.16. Konya ekotipinde RT- qPCR ile analiz edilen kuraklık stres genleri için mtr-miR159 ve mtr-miR93 gen ekspresyon seviyelerinin değışikliği.....	71
Şekil 4.17. Erzurum ekotipinde RT- qPCR ile analiz edilen kuraklık stres genleri için mtr-miR159 ve mtr-miR393 gen ekspresyon seviyelerinin değışikliği.....	72
Şekil 4.18. Erzurum ekotipindeki fizyolojik ve biyokimyasal değışiklikler.....	73
Şekil 4.19. Konya ekotipindeki fizyolojik ve biyokimyasal değışiklikler.....	73



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Standart MS besiyerinde kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	42
Çizelge 3.2. Kuraklığa alıştırma koşulları	43
Çizelge 3.3. mtr-mRi159, mtr-miR393 ve 6U primer dizisi.....	49
Çizelge 3.4. Hidra kitinin protokolü.....	50
Çizelge 3.5. 5x HOT FIREPol EvaGREEN qPCR Supermiks kitinin protokolü.....	50
Çizelge 4.1. Erzurum ekotipinde kuru/yaş ağırlık, prolin ve çözünebilir total şeker miktarında meydana gelen değişimler.....	58
Çizelge 4.2. Konya ekotipinde kuru/yaş ağırlık, prolin ve çözünebilir total şeker miktarında meydana gelen değişimler.....	59
Çizelge 4.3. Erzurum yerel ekotipinde MDA ve H ₂ O ₂ miktarında meydana gelen değişimler.....	61
Çizelge 4.4. Konya yerel ekotipinde MDA ve H ₂ O ₂ miktarında meydana gelen değişimler.....	62
Çizelge 4.5. Erzurum ve Konya yerel ekotiplerinde SEM-EDX Ca birikme oranı.....	70

1. GİRİŞ

Baklagil ve buğdaygil bitkileri, dünya çapında ekili alanların yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır, ayrıca insan diyeti ve hayvan yemi için en önemli protein kaynaklarından biridir (Vance et al. 2000). Yonca, toprak bakterisi olan *Rhizobium* ile simbiyotik etkileşim ve nitrojen azot fiksasyon kapasiteleri sayesinde sürdürülebilir tarımın en önemli bitkileri arasındadır (Graham and Vance 2003). Bununla birlikte, kuraklık stresi baklagil bitkilerinin veriminin ve kalitesinin düşüşüne neden olur. Küresel gıda ve yem gereksinimlerini karşılamak için, mevcut iklim değişikliği senaryoları göz önünde bulundurularak, kuraklık stresine bitkilerin nasıl tepki verdiğini, metabolizmalarını nasıl adapte olduğunu ve olumsuz iklim koşullarıyla baş edebilmek için hangi savunma mekanizmalarını kullandığının anlaşılması önemlidir. Bu savunma mekanizmalarından biri, gen ifadesinin mikroRNA'lar (miRNA'lar) tarafından yeniden programlanmasıdır. miRNA'lar, bir dizi organizmada transkripsiyon sonrası seviyelerde genlerin önemli düzenleyicileri olarak ortaya çıkan, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki küçük kodlamayan RNA'lardır. Bazı miRNA'lar, bitki türleri arasında işlevsel olarak korunmuştur ve kuraklık stresi ile düzenlenmiştir. Bu özellikler, miRNA bazlı genetik modifikasyonların tahıl mahsullerinde kuraklık toleransını artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmalar sonucunda, bitki miRNA'larının düzenleyici mekanizmaları, bitki miRNA'larının yonca, arpa, buğday ve diğer bitki türlerinde kuraklık stresi tepkileri ve miRNA'ların kuraklık stresi altında bitkiye uyum sağlayan mekanizmaları anlamaya çalışılmıştır (Anjum et al. 2017; Zandalinas et al. 2018; Castañeda et al. 2019).

1.1. Yonca

Yonca (*Medicago sativa* L.), *Fabaceae* (*Leguminosae*) familyasına ait olan 'yem bitkilerinin kraliçesi' olarak bilinen çiftlik hayvanları için yüksek besin değeri olan ve strese dayanıklı olmasından dolayı dünya çapında en yaygın olarak yetiştirilen çok yıllık bir baklagil yem türüdür (Radović et al. 2009). *M. sativa*, dünya çapında yaklaşık 30 milyon hektarlık bir alanı kaplayarak ılıman iklimlerde en yaygın olarak yetiştirilen yemlik baklagil türleri arasındadır. Çok yıllık bir tür olan yonca yaygın olarak kurak ve yarı kurak bölgelerde yetişmektedir. Kökleri suya erişmek için toprak derinliklerine

1. GİRİŞ

ulaşmaktadır ve su eksikliği durumunda büyümesini sınırlayabilmektedir. *M. sativa* üretimi, aşırı sıcaklıklar, toprak tuzluluğu ve kuraklık nedeniyle büyük ölçüde kısıtlanmıştır. Yabancı tozlaşan ve ototetraploid karakter ($2n=4x=32$), farklı çeşitler arasında duyarlıdan toleranslıya ve orta derecede tuzluluğa kadar değişen geniş bir genetik çeşitlilikle sahiptir. Yonca, farklı stres faktörlerine karşı toleransı da dahil olmak üzere çeşitli temel agronomik özellikleri ıslah çalışmalarıyla yaklaşık bir yüzyıldan fazla bir süredir yoğun bir şekilde yetiştirilmektedir. *M. sativa* yaprakları, esansiyel aminoasitlerin bolluğu ve hayvansal kolesterol içermemesi nedeniyle insan tüketimi için yüksek kaliteli protein kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle sebze, garnitür veya gıda besin takviyesinin bir türü olup insan gıdası olarak da tüketilmektedir. Ayrıca, *M. sativa* yaprakları ve tohumları, toz, tablet ve kapsül formları şeklinde sağlık marketlerinde yer almıştır. Ayrıca, besleyici ve farmasötik özelliklerinden dolayı geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır (Kingston-Smith et al. 2013).

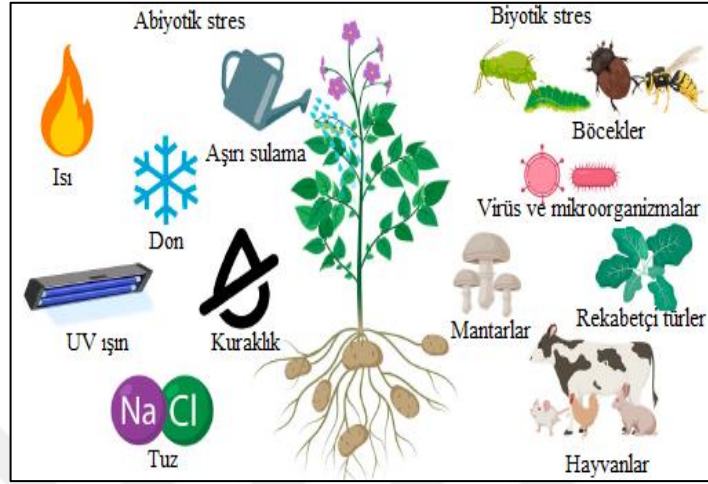
1.2. Stres

Stres, bir bitkinin metabolizmasını, büyümesini veya gelişimini etkileyen herhangi bir olumsuz durum olarak tanımlanmıştır. Stres, abiyotik ve biyotik olarak ikiye ayrılır. Abiyotik stresler, kuraklık, ışık (görünür, UV, IR), tuzluluk, sıcaklık ve pH'dır (Thakur et al. 2019). Biyotik stresler söz konusu olduğunda, bunlar mikroorganizmalar, böcekler, virüsler ve hatta bitki stresine neden olabilecek diğer bitki türleri gibi organizmalar tarafından üretilmiştir (Şekil 1.1) (Delgoda and Murray 2017).

Çevresel streslerin bitki büyümesi üzerinde birçok etkisi vardır. Abiyotik stres etkenleri, özellikle kuraklık, tuzluluk, ağır metaller ve aşırı sıcaklıklar, tarımsal üretimini kısıtlamaktadır. Küresel iklim değişikliğinde öngörülen, abiyotik streslerden bir veya daha fazlasına maruz kalmanın bir sonucu olarak mahsul kaybının artışına neden olmuştur (Haak et al. 2017). Aşırı stres genellikle bitki biyokütlesinin oluşumu sırasında ciddi hasara neden olur. Çevresel stres koşulları hızla veya kademeli olarak değişmektedir. Bu nedenle bitkiler, hayatta kalabilmek için stres koşullarını tanımalı ve çeşitli biyolojik sinyallerle uygun zamanda ve hızda yanıt vermelidir (Takahashi and Shinozaki 2019). Yüksek yapılı bitkiler, stres koşulları altında optimum büyümeyi sürdürmek için kuraklık da dahil olmak üzere abiyotik streslere gelişmiş yanıtlar ve

1. GİRİŞ

adaptasyonlar sağlamıştır (Nakashima et al. 2014; Takahashi et al. 2018). Stres koşulları, çimlenmeden tohum oluşumuna kadar bitkinin büyüme ve gelişim evrelerini olumsuz yönde etkilemiştir.



Şekil 1.1. Biyotik ve abiyotik stres türleri (Paramo et al. 2020)

Bitki, streslerle başa çıkmak için çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal stratejiler geliştirmiştir:

- ✚ Hücre duvarının yeniden şekillenmesi,
- ✚ Hücre içi iyon dengesinin yenilenmesi,
- ✚ Osmotik materyalin sentezi,
- ✚ Antioksidasyon,
- ✚ Strese yanıt olarak sinyal yollarının aktivasyonu,
- ✚ Genom modifikasyonudur (Haak et al. 2017).

1.2.1. Abiyotik stres

Kuraklık, tuzluluk, ağır metallerin varlığı, aşırı sıcak ve soğuk hava gibi abiyotik stresler bitkilerde önemli verim kayıplarına, mahsul hasarına ve büyüme hızındaki değişikliklere neden olur. İklim değişiklikleri, çevre kirliliği, bitkinin hangi strese ne kadar maruz kaldığı streslerle mücadele edilmesini zorlaştırır. Bu tür çevresel stresler, bitki metabolizmasında önemli değişikliklerle sonuçlanabilecek kaçınılmaz süreçlerdir.

Kuraklık stresi

Kuraklık, mahsul üretimini büyük ölçüde kısıtlayan ve küresel gıda güvenliğini tehdit eden başlıca abiyotik streslerden biridir. Kuraklık, bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (Pornsiriwong et al. 2017; Meza et al. 2020). Küresel iklim değişikliği, kuraklık şiddetinin sıklığını artırmaktadır. Uzun bir su kıtlığı döneminde, bitkilerinin çoğu kuraklıktan etkilenir ve sonunda bitkiler ölebilir (Desoky et al. 2021). Kurak bölgelerde yetişen bitki türleri, daha ılıman bölgelerde yetişen bitki türlerinden morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal bakımdan farklılık göstermektedir. Doğada yetişen bitkiler adaptasyonla kuraklık stresine dayanacak şekilde evrimleşebilmektedir (Bray 1997; Dai 2013; Bohnert et al. 1995). Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler, azalan hücre turgoru nedeniyle hücrelerinde daha yüksek oranda çözünen madde konsantrasyonlarına sahip olma eğilimindedir. Böylece bitkiler iki farklı gelişim aşamasıyla (hızlı fenolojik gelişim ve gelişimsel plastisite) kuraklık stresi yaşamazlar (Jones et al.1981).

- ✚ Hızlı fenolojik gelişme, hızlı bitki büyümesini içerip, toprak suyu tükenmeden önce minimum sayıda tohum üretmiştir. Bitkilerin herhangi bir özel morfolojik, fizyolojik veya biyokimyasal adaptasyona sahip olmadığı kabul edilmiştir.
- ✚ Gelişimsel plastisite, bitkiler kurak mevsimde çok az çiçek ve tohumla çok az büyüme göstermişlerdir, ancak yağışlı mevsimlerde büyük miktarda tohum üretmiştir.

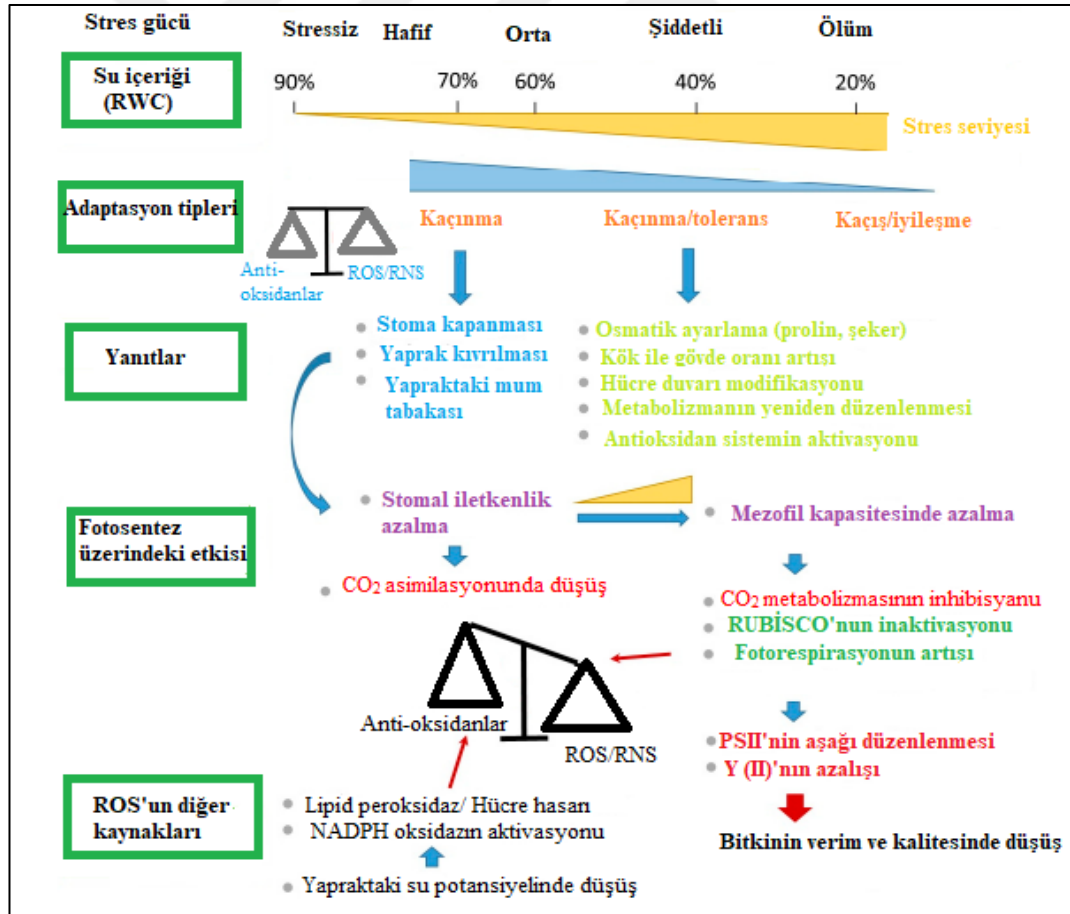
Kuraklık, bitki beslenmesini ve metabolizmasını etkileyerek su kıtlığına yanıt vermenin karmaşıklığından dolayı, bitkiler bu yanıtı cevap vermek için farklı mekanizmalar geliştirmişlerdir (Şekil 1.2). Bu mekanizmalar arasında,

- ✚ Kuraklıktan kaçış, bir bitki türünün kuraklık başlamadan önce yaşam döngüsünü tamamlama yeteneğidir.
- ✚ Kuraklıktan kaçınma, topraktaki su içeriğinin azalmasına rağmen bitki dokusunda yüksek su içeriğini koruma yeteneğidir. Kuraklıktan kaçınma, su kaybının en aza indirilmesini (su koruyucular) ve su alımının

1. GİRİŞ

optimizasyonunu (su harcayanlar) içeren çeşitli uyarlanabilir özellikler aracılığıyla elde edilir. Su harcayanlar, kuraklık stresinde artan köklenme ve hidrolik iletkenlik yoluyla su alımını koruyarak bitki dokusunda su daha yüksek duruma ulaşmıştır. Bunun tersine, su tasarrufu sağlayanlar, kuraklık stresinde terlemeyi, terleme alanını ve radyasyon emilimini azaltarak su kaybını en aza indirgeyip suyu etkin bir şekilde kullanılmıştır.

- ✚ Kuraklık toleransı, bitkilerin adaptif özellikler yoluyla bitki dokusunun düşük su içeriğine dayanma yeteneğidir. Bu uyarlanabilir özellikler, ozmotik denge, hücresel esneklik ve artan protoplazmik direnç yoluyla hücre turgorunun korunmasını içermektedir.
- ✚ Kuraklık direnci, bitkilerin yaşam döngülerini sonlandırmak için iyi performans göstermelerine olanak tanımlanmıştır (Rady et al. 2019; Desoky et al.2020; Morgan 1984).

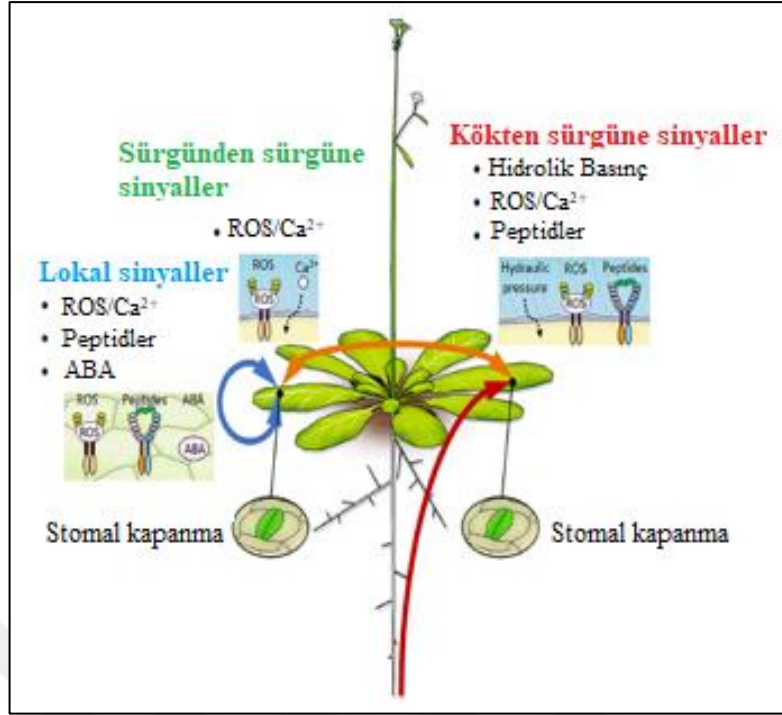


Şekil 1.2. Kuraklığı etkileyen fizyolojik ve biyokimyasal süreçler (Laxa et al. 2019)

Bitki biyoteknolojisi yardımıyla kuraklıktan etkilenen bitki türlerinin mahsul verimini ve kalitesini artırmada önemli adımlar atılmıştır. Bitki biyoteknolojide kullanılan yöntemlerden biri olan bitki doku kültürü abiyotik (kuraklık, tuz vb.) ve biyotik strese karşı toleranslı bitkilerin in vitro şartlarda kısa sürede çok sayıda bitki üretilmesinde yardımcı olmuştur. Ayrıca bitki doku kültürü, bitkilerin seleksiyonu için güçlü bir araç olup kontrollü çevre koşulları altında bitki büyümesi ve gelişiminin birçok yönünü incelemek için eşsiz bir fırsat sağlamıştır (Shibli et al. 2007; Chebet et al. 2002; Shatnawi et al. 2004).

Kökten sürgüne sinyal yoluyla yapraklarda dehidrasyon tepkileri

Gelişmiş karasal bitkiler, çeşitli organları ve dokuları arasında çevresel stres koşullarına ilişkin bilgileri iletebildikleri sistemler bulundurur (Şekil 1.3). Örneğin, azalan su potansiyeli durumu, bitkilerin dehidrasyon stres koşullarını tanıması için ilk adımdır (Christmann et al. 2013). Su eksikliği ilk olarak bitkinin kökleriyle algılanır ve bilgileri uzak organlar arasındaki iletişim sinyal yollarıyla taşınır. Başka bir çalışmada likofitlerin ve eğrelti otlarının stoma kapanmasını abisisik asit (ABA)'dan bağımsız bir şekilde düzenlediğini belirlenmiştir (Brodribb and McAdam 2011). Benzer bir çalışmada *Vitis vinifera* (üzüm asma), öncelikle su eksikliği koşullarına yanıt olarak stoma kapanmasını düzenler ve daha sonra kapalı stoma durumunu korumak için ABA seviyesini artırır (Tombesi et al. 2015).



Şekil 1.3. Kuraklık stres koşullarına yanıt olarak kökten sürgüne, sürgünden sürgüne ve yerel sinyallerin kavramsal diyagramı. Hidrolik basınç, ROS/Ca²⁺ dalgaları, peptidler ve fitohormonlar gibi mobil sinyaller, tüm bitki seviyesinde kuraklık stresi direncinin kazanılması için dokudan dokuya ve uzun mesafeli iletişime aracılık etmiştir. Kırmızı çizgi, dehidrasyon stres koşulları altında hidrolik basınç, ROS/Ca²⁺ dalgaları ve peptid sinyalleri gibi kökten sürgüne sinyalleri göstermiştir. Turuncu çizgi, stres koşullarında stoma kapanmasına aracılık etmek için ROS/Ca²⁺ dalgalarının atıştan atışa sinyallerini göstermiştir. Mavi çizgi, stres koşulları altında stoma kontrolüne aracılık eden ROS/Ca²⁺ dalgalarının, peptidin veya ABA sinyallerinin yerel sinyallerini göstermiştir (Takahashi et al. 2020).

Literatürde kuraklık stresi altındaki bitkilerin stoma kapanmasını düzenlemek için dokularında ABA biriktirdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. ABA biyosentezinde anahtar bir enzim olan Dokuz Cis Epoksikarotenoid Dioksijenaz 3 (NCED3) geni, kuralışıga maruz yapraklarda yüksek oran da ifade edilmiştir (Iuchi et al. 2001; Endo et al. 2008). Bazı çalışmalarda, ABA birikiminin stoma kapanmasını düzenlemek için yaprakların köklerden daha önemli olduğunu göstermiştir (Holbrook et al. 2002; McAdam et al. 2016). Ayrıca turgor kaybının neden olduğu hidrolik stres yapraklarda ABA biyosentezini aktive ettiği gösterilmiştir (Christmann et al. 2007). Son zamanlarda, Klavata3/Embriyo-Çevreleyen Bölgeyle İlgili25 (CLE25) peptidinin, yapraklarda ABA üretimi için kökten türetilmiş uzun mesafeli bir sinyal işlevi gördüğü gösterilmiştir (McLachlan et al. 2018; Takahashi et al. 2018; Yoshida and Fernie 2018). Bu sonuçlar,

1. GİRİŞ

bitkilerin uzun süreli dehidrasyon stres koşulları sırasında farklı zamanlarda üretilen çeşitli sinyaller yoluyla stoma açıklığını düzenlediğini göstermiştir (Şekil 1.3).

Stomatal düzenleme için çapraz sinyal sistemi

Kuraklık stresi direncinin kazanılması, bitkilerde hidrolik, peptit, ABA, ROS ve kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) akım sinyalleri gibi karmaşık fizyolojik sinyallerle gerçekleşmektedir. ABA, kstoma kilit hücrelerinde ROS'un ana bileşeni olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) aktivasyonu yoluyla Ca^{2+} akım sinyalini artırır. Son zamanlarda, hidrojen peroksit bağımlı Ca^{2+} artışı'nın (HPCA), kilit hücrelerinde bir H_2O_2 sensörü olduğu rapor edilmiştir (Wu et al. 2020). HPCA1, plazma zarına lokalize olan Lösin Zengin Tekrar Reseptörü Benzeri Kinazın (LRR-RLK) alt sınıfı VIII-1'e aittir. HPCA1'in aktivasyonu, HPCA1'in hücre dışı alanında bulunan iki sistein kalıntısı çiftinin, kilit hücrelerde Ca^{2+} akımlarının akışına yol açan H_2O_2 tarafından oksitlenmesi yoluyla gerçekleşmiştir. Sonuç olarak, *hpcal* mutantları, ABA ve H_2O_2 kaynaklı stomanın açılıp kapanma mekanizmasını bozar. HPCA1'in koruyucu hücrelerde stoma kontrolü için H_2O_2 sinyalinin anahtar bir bileşeni olduğunu göstermiştir.

Aşırı ışık stresi, bitkilerde fotosentez ve terlemedeki değişiklikleri stomaların kapanmasını hızla düzenler. Hafif stres ABA birikimini artırır ve ardından Solunum Burst Oksidaz Homolog D (RBOHD) aracılığıyla ROS/ Ca^{2+} dalgalarının oluşmasına neden olmuştur. Hem hafif stres kaynaklı ABA hem de ROS/ Ca^{2+} yerel yapraklarda stoma kapanmasına aracılık eder. Hafif stres tarafından üretilen ROS/ Ca^{2+} dalgası, bir yapraklardan sistemik yapraklara 100 mm/s hızla yayılımı karşılığında ABA ve jasmonik asit (JA) biyosentezinin başlatılmasına aracılık etmiştir. ROS/ Ca^{2+} dalgasıyla üretilen ABA ve JA, sistemik yapraklarda Koruyucu Hücre Hidrojen Peroksidazistan1 (GHR1) ve S Tipi Anyon Kanalı (SLAC1)'in aktivasyonu ile stoma kapanmasına aracılık eder. Bu nedenle, yerel yapraklarda ROS/ Ca^{2+} dalgaları, sistemik yapraklarda ABA yanıtlarını ve stoma kapanmasını düzenlemek için uzun mesafeli sinyaller olarak işlev görülebilir (Devireddy et al. 2018; Yoshida and Fernie 2018) (Şekil 1.3).

Su eksikliği durumlarında algılama sistemleri

Genel olarak, RLK'ler, histidin kinazlar ve integrin benzeri proteinler dahil olmak üzere zar proteinlerinin, bitkilerde olduğu kadar mayalarda da yapılan araştırmalara dayalı olarak ozmotik stres sensörleri olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. *Arabidopsis thaliana* histidin kinaz (ATHK) 1 /*Arabidopsis* histidin kinaz (AHK) 1, hücrelerin plazma zarında lokalizedir ve bitkilerde iki bileşenli maya sisteminin bir homologue olarak izole edilmiştir. ATHK1/AHK1, mayadaki osmosensör histidin protein kinazı kodlayan SLN1'in işlevini tamamlayarak ATHK1/AHK1'in bir ozmotik stres sensörü olarak işlev görebileceğini göstermiştir. ATHK1/AHK1'in fonksiyon kazancı ve kaybı, ATHK1/AHK1'in ABA birikimi ve kuraklık stresinin neden olduğu gen ekspresyonu yoluyla kuraklık stresi tepkilerine ve dirence aracılık ettiğini gösterilmiştir (Tran et al. 2007; Wohlbach et al. 2008).

1.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler

Su kıtlığı, bitkinin hayatta kalmasını zorlaştırarak bitki büyümesini ve verimini olumsuz etkiler. Kuşkusuz, şiddetli strese daha toleranslı olan bitki hatları, hafif stres altında daha iyi performans gösterebilir (Skirycz et al. 2011). Mannitol, sorbitol veya polietilen glikol (PEG) gibi bileşikler kuraklık stresıyla ilişkili büyüme inhibisyonuna yol açan moleküler olayları incelemek için kullanılır (Verslues et al. 2006). Gelişme sırasındaki bitkilere istenilen bir zaman aralığında mannitol, sorbitol veya PEG eklendiğinde, stres kaynaklı bitki büyümesini olumsuz etkileyen sinyal mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olur.

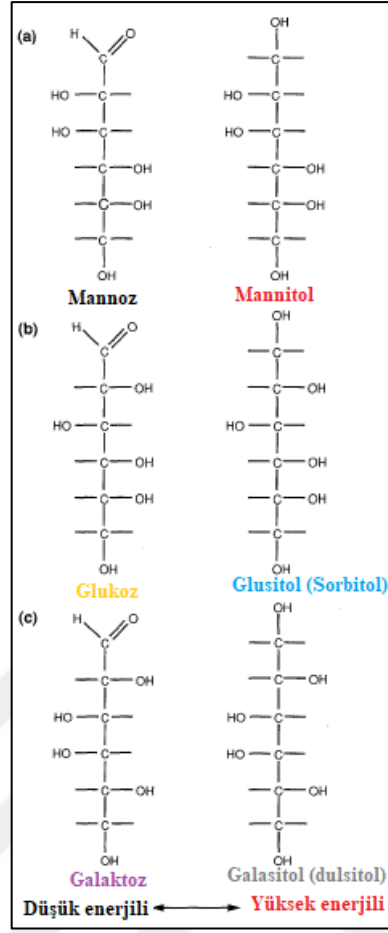
Su potansiyelini kontrol eden yapay bir ortam yaratmak için moleküler ağırlığı yüksek maddelerden en çok tercih edileni mannitoldür. Mannitol, ticari olarak yetiştirilen birçok tarımsal ve bahçe bitkilerinde üretkenliği ve kaliteyi, genellikle yüksek toprak tuzluluğu veya kuraklık gibi çevresel faktörlerden olumsuz etkiler. Bilinçsiz sulamanın neden olduğu topraklarda artan tuz birikimi, nihai olarak mevcut üretim seviyelerinde tarımın sürdürülebilirliğini engeller. Damarlı bitkiler, mantarlar, deniz yosunları ve maya gibi organizmalar kuraklık ve tuz stresine yanıt çözünür bileşikleri biriktirir ve düşük moleküler ağırlık bileşiklerin sentezini artırır (Brown and Simpson 1972; Jennings and Burke 1990). Bu bileşikler, yüksek hücrel konsantrasyonlarda birikebildikleri, ancak

1. GİRİŞ

hücre metabolizmasına müdahale etmedikleri için genellikle ‘uyumlu çözünen maddeler’ olarak adlandırılmıştır. Uyumlu çözünen maddeler,

- ✚ Şeker alkolleri (mannitol gibi),
- ✚ Dörtlü amonyak bileşikleri,
- ✚ Prolin,
- ✚ Üçüncül sülfonik bileşiklerdir.

Bu bileşiklerin sitozolde biriktikleri ve burada metabolik süreçlerin strese bağlı inaktivasyonunu önledikleri rapor edilmiştir (Brown and Simpson 1972; Greenway and Munns 1980; Galinski and Trfiper 1994). Şeker alkolleri, bir aldoz veya ketoz şekerinin kimyasal olarak indirgenmiş formunu temsil ettikleri için şekerlerle yakından ilişkilidir (Şekil 1.4). Su benzeri hidroksil grupları nedeniyle şeker alkollerinin suyun yapısını taklit edebileceği ve makromoleküllerin etrafında yapay bir hidrasyon küresi sağlayabileceği öne sürülmüştür. Düşük mannitol konsantrasyonları (25 mM), bitkinin gelişimini veya hayatta kalmasını süresini çok az etkilemiştir. *A. thaliana* rozet boyutunda ~%50'lik bir düşüşe neden olup hafif strese neden olmuştur. Mannitol bu nedenle büyümeyi baskılayan bir bileşik olarak kullanılmaktadır ve hücre hasarını ve lipidlerin peroksidasyonunu önleyerek aktif oksijen türlerinin temizleyicileri olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Skirycz et al. 2011).



Şekil 1.4. Belirli bitki türlerinde yer değiştirmiş karbonhidratın önemli bir bölümünü oluşturan bazı yaygın altı karbonlu şeker alkollerinin kimyasal yapıları: (a) mannitol (karşılık gelen şeker mannozu): kerevizde (*Apium graveolens*); (b) glusitol (karşılık gelen şeker glikozu): elmada (*Malus spp.*); ve (c) galaktitol (karşılık gelen şeker galaktoz) tatlı: kavunda (*Cucumis melo*). Kimyasal olarak indirgenmiş bileşikler (örn. NADH), karşılık gelen oksitlenmiş formlardan (örn. NAD) daha fazla enerji içermiştir. Bu nedenle, kimyasal olarak daha fazla indirgenmiş olan şeker alkollerini, karşılık gelen şekerlere göre daha yüksek enerji depolama bileşikleridir (Stoop et al. 1996).

Genç büyüyen yapraklardaki ozmotik stres tepkileri, olgun yapraklardakilerden çok farklıdır. Örneğin, genç sürgünlerde, hafif stres, kuraklıkla ilgili hormon ABA yerine, etilen öncüsü ACC'nin (1-aminosiklopropan-1-karboksilat) ve muhtemelen etilenin kendisinin de hızlı birikmesine neden olur (Skirycz et al. 2011). Büyüyen dokular, büyümeyi önleyici mekanizmalar tarafından daha fazla baskı altına alındığından, stres üzerine büyüme düzenlemesinin çözülmesi bu nedenle tercihen olgun yapraklar veya bütün fideler yerine büyüyen dokuda incelenmiştir. Mannitol kaynaklı kuraklık stresine maruz kalan büyüyen yaprak dokusunda, birbirine oldukça bağlı bir Gen Düzenleyici Ağ (GRN) indüklemiştir. Bu ağın parçası olan transkripsiyon faktörlerinin birbirlerinin

ifadesini düzenlediği ve ozmotik stres üzerine yaprak büyümesini düzenlediği gösterilmiştir (Van den Broeck et al. 2017).

1.3.1. Prolin içeriği

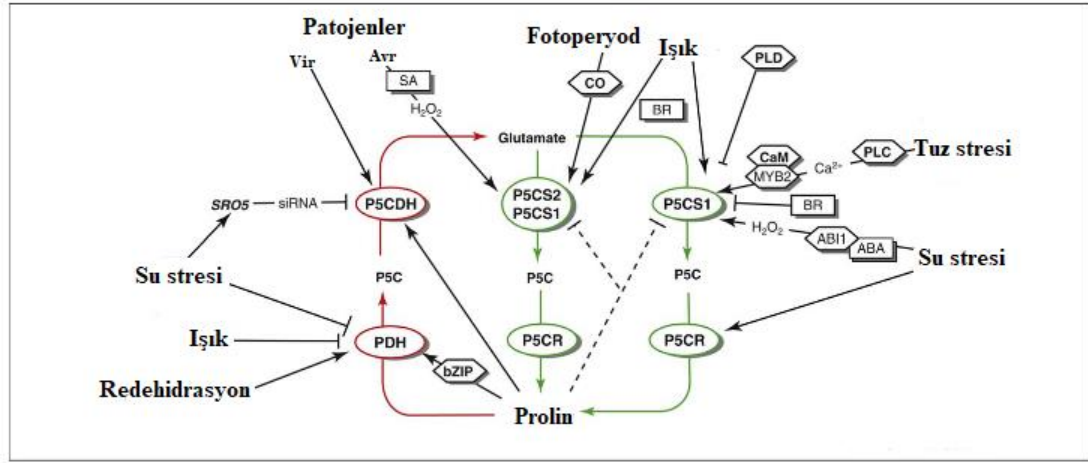
Prolin, ikincil bir amin olan a-amino grubu içeren proteinojenik bir amino asittir ve primer metabolizma için gereklidir (Szabados and Savouré 2010; Verslues and Sharma 2010). Protozoa, öbakteriler, deniz omurgasızları ve ayrıca çeşitli bitki türleri dahil olmak üzere farklı organizma türlerinin stres koşulları altında amino asit olarak prolin biriktirdiği gözlemlenmiştir (Mattioli et al. 2009). Prolinin uzun süredir uyumlu bir ozmolit olduğu düşünülmesine rağmen, son sonuçlar onun strese uyum sağlama, iyileşme ve sinyal vermedeki çoklu fonksiyonlarını vurgulamıştır. Prolin biyosentezinin bölümlere ayrılması, sitozol, kloroplast ve mitokondride parçalanması, prolin metabolizmasının fonksiyonel çeşitlendirilmesinin karmaşıklığına neden olmuştur. Prolinin işlevleri;

- ✚ Kloroplast ile sitozoldeki proteinlerin ve protein komplekslerinin stabilizasyonunda,
- ✚ Fotosentetik komplekslerin korunmasında önemli işlevlere sahiptir.

Kloroplastlardaki artan prolin biyosentezi oranı, olumsuz koşullar sırasında elektron taşınması doymuş olduğunda aşırı indirgeme potansiyelini dağıtarak redoks dengesinin stabilizasyonuna ve hücresel homeostazın korunmasına katkıda bulunur. Mitokondrideki prolin katabolizması, oksidatif solunumla bağlantılıdır ve stres sonrası büyümenin yeniden başlaması için enerji sağlar. Ayrıca, prolin oksidasyonu mitokondriyal ROS seviyelerini düzenler ve programlanmış hücre ölümünü etkiler. Hayvan ve maya modelleriyle yapılan analogiler, bitkilerde prolin devri, hücre döngüsü kontrolü, farklılaşma ve programlanmış hücre ölümü arasında yakın bir etkileşim olduğunu da düşündürülmüştür. Abiyotik ve biyotik streslere verilen yanıtları modüle etmenin yanı sıra prolin, metabolit havuzlarını ve redoks dengesini düzenleyen, çok sayıda genin ifadesini kontrol eden, bitki büyümesini ve gelişimini etkileyen metabolik bir sinyal işlevi görür. Sistem biyolojisi yaklaşımlarının uygulanması, bitkilerde proline bağımlı ve proline aracılı sinyalleşmenin düzenlenmesini anlamaya yardımcı olmuştur (Szabados and Savouré et al. 2010).

Prolin metabolizmasının düzenlenmesi

Prolin metabolizması bitkilerde 40 yılı aşkın bir süredir çalışılmasına rağmen, düzenlenmesinde yer alan sinyal yolları hakkında çok az şey bilinmektedir. Dehidrasyon sırasında prolin biyosentezi aktive edilir ve katabolizması baskılanır (Şekil 1.5) (Yoshiba 1995; Kiyosue et al. 1996; Deuschle et al. 2001; Xue et al. 2009).



Şekil 1.5. Bitkilerde prolin metabolizmasının düzenlenmesi. Biyosentetik yol yeşil çizgilerle ve katabolik yol kırmızı çizgilerle gösterilmiştir. Çevresel etkiler vurgulanmıştır. Hormonlar: ABA, BR (brassinolidler) ve SA. Metabolitler ve diğer faktörler: Ca²⁺ (serbest kalsiyum iyonu); H₂O₂ (hidrojen peroksit); P5C ve siRNA. Enzimler: P5CDH; P5CS; P5CR ve PDH. Düzenleyici genler ve proteinler: ABI1; bZIP; CaM (kalmodulin); CO; MYB2; PLC; PLD; ve P5CDH ile 3' örtüşen bir bölgeye sahip olan SRO5. Patojenler: avr, avirulent; vir, öldürücü (Szabados and Saviouré et al. 2010).

Prolin biyosentezi, bitkilerde bir korunmuş gen (housekeeping) ve bir strese özgü Pirolin-5-Karboksilat Sentetaz (P5CS) izoformunu kodlayan iki P5CS geninin aktivitesi tarafından kontrol edilir. Kopyalanmış P5CS genleri, kodlama bölgelerinde yüksek düzeyde bir sekans homolojisi paylaşırsa da, transkripsiyonel düzenlemeleri farklıdır (Armengaud et al. 2004; Xue et al. 2009). *Arabidopsis*'te P5CS2, sürgün ve kök uçları, çiçek salkımları ve meristematik dokularda aktif olan housekeeping genidir. Her iki P5CS geni de çiçek sürgünlerinin apikal meristemlerinde aktiftir ve çiçek gelişimini prolin sağlamıştır (Mattioli et al. 2009). *Arabidopsis*'te P5CS2 geninin, gün uzunluğuna yanıt olarak çiçeklenmeyi teşvik eden bir transkripsiyonel aktivatör olan Constans'ın (CO) hedeflerinden biri olarak tanımlanmış olması ilgi çekicidir. P5CS2, Aşırı Duyarlı bir yanıtı (HR) tetikleyen avirulent bakteri, salisilik asit (SA) ve ROS sinyalleri tarafından

1. GİRİŞ

da aktive edilmiştir (Fabro et al. 2004). *Arabidopsis* P5CS1, ozmotik ve tuz stresleri tarafından İndüklenmiş Absisik ABA bağımlı, ABA duyarsız 1 (ABI1) kontrollü düzenleyici sinyaller H₂O₂ türevi tarafından aktive edilmiştir (Yoshiba 1995). Ayrıca, P5CS1 aktivasyonu ve prolin birikimi ışık tarafından teşvik edilir ve brassinosteroidler (BR) tarafından baskılanmıştır (Hayashi et al. 2000). Stressiz koşullar altında, Fosfolipaz D (PLD), prolin birikiminin negatif düzenleyicisi olarak işlev görür, oysa kalsiyum sinyali ve Fosfolipaz C (PLC), tuz stresi sırasında P5CS transkripsiyonunu ve prolin birikimini tetiklemiştir (Thiery et al. 2004; Parre et al. 2007). Halofit *Thellungiella halophila*'da, PLD pozitif düzenleyici olarak işlev görürken, PLC prolin birikimi üzerinde negatif bir kontrol uygulamıştır (Ghars et al. 2008). Kalsiyum sinyalleri, MYB2 transkripsiyon faktörü ile etkileşime giren ve P5CS1 transkripsiyonunu yukarı regüle eden spesifik bir CaM4 kalmodulinle uyarılmıştır (Yoo et al. 2005).

1.3.2. Çözünebilir şeker

Yaygın olarak monosakkaritler ve disakkaritler olarak tanımlanan çözünebilir şekerler, tüm canlı hücrelerin yapısında ve işlevinde önemli bir rol oynar. Kökenleri, prebiyotik ve erken biyotik evrim ile sıkı bir şekilde bağlantılı olduğu görülmüştür (Hirabayashi 1996). Bu nedenle, glukoz ve fruktoz, ökaryotik hücreler için her yerde bulunan karbon ve enerji kaynaklarıdır. Bitkilerde, sukrozun işlenmesiyle ilgili tüm enzimler, proteinler fotosentez, taşıma ve heterotrofik kullanım arasında merkezi bir rol haline gelmiştir (Salerno and Curatti 2003).

Stres altında çözünebilir şeker metabolizması

Bitkiler, hem şeker üreten hem de tüketen ototrofik ve fotosentetik organizmalardır. Ancak, yaşam döngülerinin bir bölümünde kök, gövde ve çiçek gibi fotosentezde yer almayan bazı yeşil olmayan organlarında heterotroflar olarak hareket eder. Ayrıca, şeker tüketimi normal olarak bitkilerin ontogenezinde meydana gelir. Örneğin, su, ışık veya sıcaklık gibi çevresel faktörlerdeki değişiklikler, patojenlerin veya otçulların saldırıları fotosentez etkinliğini ve çözünebilir şekerlerin dokularda birikiminin azalmasına neden olmuştur. Şeker yoksunluğu koşulları altında, solunum ve diğer metabolik süreçleri sürdürmek için önemli fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler neden

1. GİRİŞ

olmuştur. Bitkilerin yaşam döngüsünde, tohum çimlenmesi, erken fide büyümesi, depolama tohum dokularından gövde ve kökçük gibi çeşitli organlara çözünebilir şekerler (sakaroz, glikoz ve fruktoz) şeklinde mobilize edilen başta karbonhidratlar olmak üzere depo maddelerine bağlıdır. Ayrıca hücrelerin ozmotik homeostazının büyümesi ve sürdürülmesi için gereklidir (Santos and Buckeridge 2004).

Bitkilerdeki şeker değişiklikleri statik bir model izlemez, genotip ve stres faktörüne göre değişmiştir (Morsy et al. 2007). Ayrıca, stres faktörleri bitkinin metabolizmasıyla ilişkili olaylarda tüm çözünebilir şekerlerin benzer roller oynamadığı da bildirilmiştir (Gill et al. 2001; Almodares et al. 2008). Sukroz ve glukoz, ya hücresel solunum için substratlar ya da hücre homeostazını sürdürmek için osmolitler olarak işlev görürken fruktoz, osmokeruma ile ilişkili değildir ikincil (sekonder) metabolitlerin sentezi ile ilişkili olduğu görülmüştür (Gupta et al. 2005). Hilal vd (2004) fruktozun, lignin ve fenolik bileşiklerin sentezinde substrat görevi gören Eritroz-4-P'nin sentezi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir.

1.3.3. Abiyotik stres altında reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunması

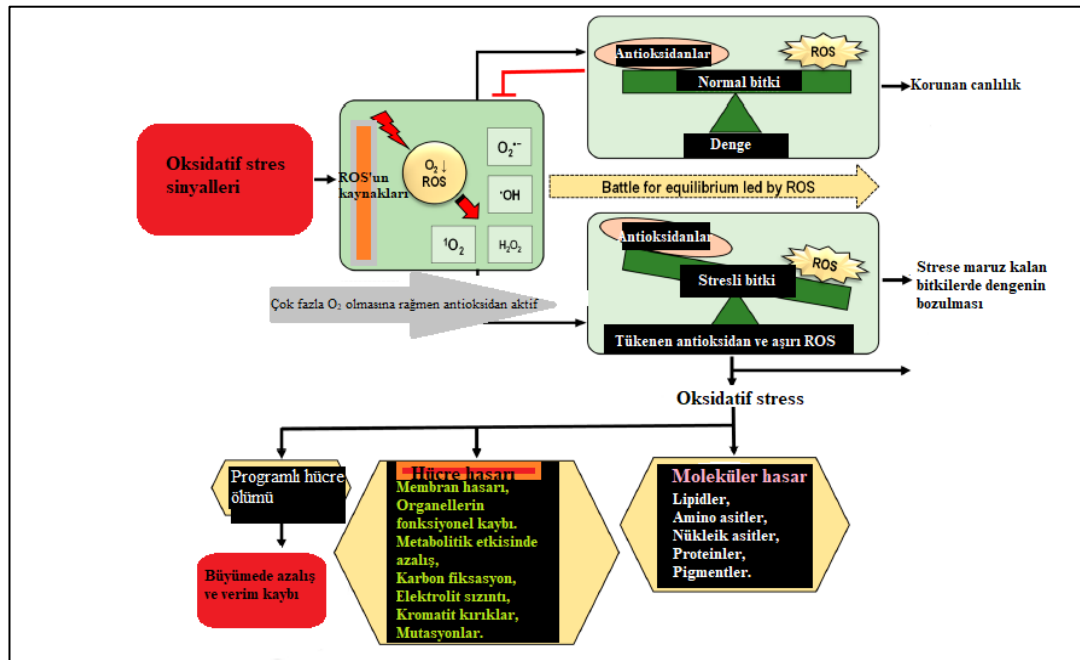
Ontogenez sırasında bitkiler, abiyotik faktörler (sıcaklık, aydınlık, karanlık, besin ile su mevcudiyeti ve ağır metaller gibi toksik bileşikler) ve biyotik etkileşimler (faydalı ve patojenik mikroorganizmalar, mantarlar, böcekler, diğer otçullar) tarafından tanımlanan dinamik olarak değişen bir ortamla karşı karşıyadır (Suzuki et al.2014). Metabolizma, bitkinin gelişimini ve verimini önemli ölçüde olumsuz etkileyen çevresel değişiklikler, stres durumları olarak kabul edilmekte ve biyolojik sistemde stres tepkilerine neden olmuştur. Bu tür stresler genellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimindeki artışa neden olur, bu da bunların üretimi ve temizlenmesi arasında bir denge sorununa yol açar. Reaktif ve toksik olmalarına rağmen, ROS ve RNS ayrıca stres tepkilerini tetikleyen sinyal iletim yollarının temel bileşenleridir. Ayrıca, ROS ve RNS, bitki gelişim süreçlerinde ve bitki-mikroorganizma etkileşimlerinde yer alır. Bununla birlikte, aşırı ROS ve RNS üretimi, hücre ölümünü önlemek için antioksidan sistemi sayesinde sağlanır (Corpas and Barroso 2015; Mhamdi and Van Breusegem 2018; Maier et al. 2001; Segal and Wilson 2018).

1. GİRİŞ

Kuraklık, su kaybına ve su potansiyelinde azalmaya neden olur. Bu olay aynı zamanda hücre turgorunda bir azalmaya yol açar. Kuraklığın neden olduğu en hızlı süreçler arasında stomaların ABA aracılı kapanması yer alır (Pirasteh -Anosheh et al. 2016). Uzun süreli kuraklık stresi ve artan stres yoğunluğu, daha fazla uyum reaksiyonlarına yol açtığı gösterilmiştir. Bu yanıtlar, ozmotik ayarlamayı, azalmış kök-kök oranını, hücre duvarı modifikasyonlarını, metabolizmanın yeniden programlanmasını ve antioksidan sistemin aktivasyonunu içerir (Blum 2017; Silva et al. 2012; Lü et al. 2013; Ajithkumar and Panneerselvam 2014). Bu modifikasyonların çoğu ölçülmüştür ve kuraklık stresinin şiddetini karakterize etmek için kullanılmıştır. Ölçülebilir özellikler, örneğin mezofil iletkenliği, net fotosentez, fotorespirasyon, uyumlu çözünen maddelerin (osmoprotektanlar) bolluğu, doku su potansiyeli, ABA içeriği ve zar bütünlüğüdür. Kuraklıktan kaçınma, yaprak kıvrılması ve yaprak yüzeyinde artan mum birikimi gibi morfolojik adaptasyonlarıdır (Kim et al. 2007).

Bitkilerde ROS mekanizması

Bitkilerin stres koşulları altındaki metabolizması, ROS oluşumundaki artış olarak ifade edilmiştir (Foryer and Noctor 2000).



Şekil 1.6. Bitkilerde oksidatif stres ve sonuçları (ROS, reaktif oksijen türleri; 1O_2 , singlet oksijen; $O_2^{\cdot-}$ süperoksit anyonu; H_2O_2 , hidrojen peroksit; $\cdot OH$, hidroksil radikali) (Al Mahmud et al. 2019).

1. GİRİŞ

Stres koşullarında fazla üretilen ROS, proteinler, lipidler ve DNA molekülleri ile reaksiyona girerek bir takım metabolik bozukluklara, hücre zarlarının tahribatına ve bunun sonucunda hücre ölümüne neden olur (Şekil 1.6) (Miller et al. 2010; Lushchak 2011). Kuraklık stresi, H_2O_2 , süperoksit radikalleri (O_2^-) ve hidroksil (OH^-) gibi ROS birikimini artırarak oksidatif strese yol açar (Saed Moucheshi et al. 2014). Reaktif oksijen türlerinin üretimi, protein ve nükleik asit yıkımı ile birlikte lipid peroksidasyonuna neden olur. Bitkiler, ROS'un zarar verici etkisini farklı mekanizmalarla azaltabilmektedir. Bu mekanizmalardan biri enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemidir. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POX) gibi antioksidan enzimler, bitki hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin detoksifiye edilmesinde rol oynayan en önemli oyunculardır.

ROS'un artan miktarına yanıt olarak, antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesi ve antioksidan enzimlerin aktivitesi artar. Üretilen oksidanlara karşı ilk enzimatik bariyer, O_2 'yi nispeten daha düşük radikal aktiviteye sahip bir molekül olan H_2O_2 'ye dönüştüren SOD'dir. H_2O_2 , CAT ve askorbat peroksidaz (APX) enzimleri tarafından su ve oksijene detoksifiye eder. Peroksidaz, H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesi için bir elektron alıcı olarak askorbik asit kullanarak bu bileşiği süpürüp atabilen H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda önemli bir role sahiptir (Saed-Moucheshi et al. 2014). Bu reaksiyon sırasında askorbik asit, monodehidroaskorbata dönüşür. POX, yüksek oksijen serbest radikal içeriğiyle başa çıkmak için hidrojen alıcılarına benzer fenollerini kullanabilen glikoproteinlerdir. Ayrıca POX'un bitki geliştirme süreçlerine, lignin üretimine, etilen biyosentezine ve strese karşı bitki savunmasına önemli işlevlere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Hossain et al. 2015). Abiyotik stres altında hücrelerde protein sentezini düzenlemeye yol açan ozmotik basıncı korumak için prolin gibi bazı serbest amino asitlerin birikmesiyle birlikte proteinlerde hasar gözlemlenmiştir (Şekil 1.3.3.1) (Osakabe et al. 2014). Bazı araştırmacılar, bazı protein türlerinin sentezindeki azalmanın polizom sayılarındaki azalmayla bağlantılı olduğu iddia edilmiştir (Suzuki et al. 2014). Proteinlerin içeriğindeki değişikliklere ek olarak, lipidleri indükleyen abiyotik stresler, oksidatif strese hızlı yanıt veren bir bileşik olan malondialdehit (MDA) adı verilen bazı aldehitlerin üretimiyle sonuçlanır (Berger et al. 2016).

Kuraklık stresi, mitoz, hücre genişlemesi ve büyüme gibi hücresel süreçleri etkileyerek bitki büyümesini olumsuz etkiler (Hussain et al. 2008). Ayrıca OH^\cdot , O_2^\cdot , H_2O_2 ve tekli oksijen ($^1\text{O}_2$) dahil olmak üzere ROS üreterek bitkilerde oksidatif strese neden olur (Akyol et al. 2020). Bu ROS, lipid peroksidasyonuna, hücre zarının denatürasyonuna, protein yapısının zarar görmesine ve DNA'nın yıkımına neden olabilmektedir (Bartels and Sunkar 2005; Simova-Stoilova et al. 2009). Bitkiler, bu ROS'un zararlı etkilerini azaltmak için çok güçlü bir antioksidan savunma mekanizmasına (enzimatik ve enzimatik olmayan) sahiptir. Enzimatik antioksidanlar arasında CAT, POX, APX, glutatyon redüktaz (GR) ve SOD vardır (Gong et al. 2005). Bunların arasında SOD, O_2 , H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize ettiği gözlemlenmiştir. ROS'a karşı ilk detoksifikasyon hattı olarak hareket ettiği için antioksidan savunma ağında merkezi bir role sahiptir (Prochazkova et al. 2001).

Kuraklık stresinde ROS

Bitkilerin kuraklığa ilk tepkisi, terleme nedeniyle su kaybını en aza indirmek için stomaların kapanmasıdır. Işıқта devam eden fotosentez nedeniyle, artan gaz difüzyon bariyeri, hücreler arası CO_2 konsantrasyonunun tükenmesine yol açar. Azalan CO_2 miktarı, ribuloz-1,5-bifosfat oksijenasyonunu ve dolayısıyla peroksizomlarda fotosolunumsal kaynaklı H_2O_2 üretimini artırır (Noctor et al. 2002). Elektron alıcı CO_2 'nin yetersiz miktarı, Calvin-Benson döngüsünde nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (NADPH) oksidasyonunu düşürür. NADP^+ eksikliği, elektron birikimine ve fotosentetik elektron taşınmasında aşırı azalmaya neden olur, bu da fotosistem I (PSI)'de Mehler reaksiyonunda alternatif elektron alıcısı olarak oksijenin azalmasına, O_2^\cdot ve H_2O_2 'in salınımını artırır.

Tioredoksin (TRX) indirgemesi yoluyla oldukça indirgenmiş bir kloroplast NADPH havuzu, NADPH'ye bağlı malat dehidrogenazı ve dolayısıyla indirgeyici eşdeğerlerin sitozol ve mitokondriye elektron taşıyan malat yolağını aktive eder. Fotosentezdeki elektron verme ve alma arasındaki denge sorunu, mitokondrideki solunum elektron taşıma zincirine (ETC) dengeli bir şekilde iletilir. Alternatif oksidazın (AOX) aktivasyonu ve *aox* geninin indüksiyonu ifadesi, kuraklık yanıtının ayırt edici özellikleridir (Bartoli et al. 2005). Normal koşullar altında bile, oksidatif fosforilasyonda

1. GİRİŞ

kompleks I ve III'teki aşırı azalma nedeniyle oksijenin %1-2'si ROS üretmek için tüketilir (Selinski et al. 2018). Kuraklık altında, AOX, Bitki Ayrışma Proteinleri (PUCP'ler) ve ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının kapasiteleri, ETC'deki fazla elektron akışını dağıtmak için uyarılır (Barreto et al. 2017). Atkin and Macherel (2009) kuraklık stresi altındaki bitkilerde solunum fonksiyonları yaklaşık üçte iki oranında engellebildiğini bildirmiştir. Bu çalışmalar, çeşitli yoğunluklarda ve farklı zaman ölçeklerinde dehidrasyon süreçlerini içermektedir. ROS apoplastta üretilir. İlginç bir şekilde, apoplastik ROS üretimi, kalsiyum sinyali ile birleşir (Gilroy et al. 2014). Plazma zarındaki Solunum Brust Oksidaz homolog (RBOH) proteinleri, kuraklığa ve diğer birçok strese yanıt olarak apoplastta süperoksit anyonları üreten kalsiyum ve fosforilasyona duyarlı enzimlerdir (Evans et al. 2016; Sierla et al. 2016). Hücre duvarı ile ilişkili kinazlar (WAK'lar), Reseptör Benzeri Kinaz (RLK) ailesinin üyeleridir ve muhtemelen RBOH'lerin fosforilasyonu ile ROS patlamalarını birbirine bağlayan kuraklık sırasında turgor basıncı değişikliklerinin algılanmasına katılır. Apoplastik ROS, özellikle kuraklık sırasında zar hasarının bir göstergesi olarak MDA yol açan lipid peroksidasyonunu uyarır. Apoplastta süperoksitin H_2O_2 'ye dismutasyonundan sonra, H_2O_2 'nin apoplasttan sitozole transferi de hücre içi ROS'a katkıda bulunur.

1.4. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, paketleme, biyomedikal, doku mühendisliği, sağlık hizmetleri, gıda endüstrisi, uzay endüstrisi gibi geniş uygulama alanlarına sahip gelişmiş ve gelişmekte olan bir teknolojidir (Mahanty et al. 2013). Nanoteknolojinin birçok hedefi bulunmaktadır, en önemlisi çeşitli morfolojideki ve kimyasal bileşimdeki (belirli boyut dağılımı ve tek dağılımlı) çeşitli nanopartikül (NP) türlerinin sentezi sağlanmak ve bunların insanlığın refahı için kullanmaktır (Elumalai et al. 2010). NP, en az bir boyutta veya 100 nm'den daha küçük boyutlara ve geniş nispi yüzey alanına sahip parçacıklar olarak tanımlanır. Volkanik patlamalar ve hidrotermal aktivite sonucunda biyosferde doğal olarak oluşabilmektedir (Luther and Rickard 2005). Bununla birlikte, fosil yakıtların yoğun şekilde yakılması ve son on yıllarda nanoteknolojilerin gelişmesi ve uygulanması, NPs'in çevreye salınımıyla doğrudan ilişkilidir. Üretilen NPs, atmosferik emisyonlar, evsel atık su, tarım, üretim ve nakliye sırasında kazara salınım yoluyla istemeden çevreye yayılmıştır (Klaine et al. 2008). Yapılan çalışmalar sonucu, büyük

1. GİRİŞ

şehirlerin, endüstriyel yerleşim birimlerinin ve yüksek trafik hacmine sahip otoyolların atmosferindeki ince ve ultra ince NP konsantrasyonlarında önemli bir artış göstermiştir (Nowack and Bucheli 2007; Weijers et al.2004). İnce NP'in (>20 nm) ömrü nispeten uzundur. Bu, bunların uzun mesafeler boyunca taşınabileceği ve böylece bölgesel hava kalitesinin bozulmasına neden olmuştur (Dietz and Herth 2011). NPs'in etkileri çeşitli mikrobiyal ve suda yaşayan organizmalarda da tanımlanmıştır, ancak NPs'in yüksek yapılı bitkilerle etkileşimlerini araştıran çalışmalar hala düşük denecek sayılardadır. NPs'in bir büyüme ortamında taşınması ve bitki dokularına nüfuz etmesi, NPs'in bitkiler üzerindeki etkisini değerlendirmek için en kritik parametrelerdir (Navarro et al. 2008). Yüksek bitkiler özellikle atmosferik NP birikimine maruz kalsalar da şimdiye kadar bitkiler üzerinde yürütülen deneysel çalışmaların çoğunda hava ortamının yerine besiyeri ortamı, agar veya toprak kullanılmıştır (Kurepa et al. 2010; Lee et al. 2012). Atmosferde oluşan NPs bitki yüzeylerinde topaklaşır ve stomalar gibi kutikula içermeyen alanlardan yapraklara nüfuz eder (Dietz and Herth 2011; Eichert et al. 2008; Navarro et al. 2008). Toprak suyu ve toprak kolloidal parçacıkları ile ilişkili NPs köklerle etkileşime girmiştir. Daha sonra ksilemin içine nüfuz ederek terlemeyle bitkilerin toprak üstü kısımlarına taşınır (Zhu et al. 2008).

1.4.1. Nanoteknolojinin tarımda kullanım alanları

Nanoteknoloji, bitkinin besinleri kullanıp verimliliğini artırmasında, iklim değişikliğinin etkilerini hafifletme ve ağır metalleri iyileştirme dahil olmak üzere tarımsal ekosistem için çeşitli avantajları sayesinde umut verici bir teknik olmuştur (Manzoor et al. 2021). Tarımsal sanayi alanında, nanoteknoloji yaygın olarak gübreler, herbisitler, pestisitler, fungusitler ve nano-sensörler gibi ürünler üretmek için kullanılmaktadır (Iavicoli et al. 2017).

Bu ilerlemeler, tarımda gelecekteki sorunların üstesinden gelmeye, kaliteyi ve ürün verimini artırmaya, kimyasalların neden olduğu kirliliği azaltıp, ekinleri çevresel streslere karşı korumaya yardımcı olmuştur (Liu et al. 2021). Nanoteknolojinin tarımda ilginç uygulamaları olsa da, bu malzemelerin çevrede, özellikle bitki ve canlı organizmalarda oluşturabileceği olumsuz etkileri hala tam olarak anlaşılmadığı iyi bilinmektedir. Pek çok araştırma, yüksek konsantrasyonlardaki NPs marul (*Lactuca*

sativa L.) domates (*Lycopersicon lycopersicum* L.), buğday (*Triticum aestivum*) ve salatalık (*Cucumis sativus*) gibi mahsuller üzerinde toksikolojik etkiler oluşturabileceğini göstermiştir (Zhu et al. 2019; Rastogi et al. 2019). Nanoteknolojinin belirli problemlerin çözümü için keşfedilmeyi bekleyen birçok faydası var ancak yüksek konsantrasyonda uygulanmasının bitkiler, hayvanlar ve nihayetinde insanoğlu için bir dizi soruna yol açabileceğinin farkında olmalıyız. Mishra et al. (2019), nanoteknolojiyi güvenli bir şekilde uygulayabilmemiz ve çevresel olumsuzluktan kaçınabilmemiz için nanopartiküllerin güvenlik bilincini artırıp güçlü düzenleme sistemleri oluşturmanın önemli olduğunu vurgulamıştır.

1.4.2. Nanopartiküllerin sınıflandırılması

Nanopartiküllerin bitkinin tohum çimlenmesinde, gelişiminin teşvik edilmesinde, azot metabolizmasını ve bitki fotosentezini iyileştirmede, besin emilimini destekleme gibi olumlu etkileri olduğunu gösterilmiştir (Husen and Siddiqi 2014). Nanopartiküllerin boyuta göre sınıflandırmanın yanı sıra, nanomalzemeler kimyasal yapılarına göre de sınıflandırılmıştır (Khan et al. 2019). Bu sınıflandırma 4 ana nanomalzeme kategorisi içerir:



- ✚ Karbon bazlı nanomalzemeler arasında fullerenler, grafen ve karbon nanotüpler (CNT'ler) gibi yapılardır.
- ✚ Seramik (metal oksitler), TiO₂, ZnO, CaO ve FeO₂ gibi metal oksit bileşiklerinden yapılan inorganik katılardır (C Thomas et al. 2015).
- ✚ Metal, metaller, Au, Ag, Cu ve Ni bazlı nanomalzemeleri içerir
- ✚ Polimerik bileşikler, organik nanomalzemeler, genellikle çekirdeğe simetrik olan organik NPs'den türetilen dendrimerleri kapsar (Ealias and Saravanakumar 2017).

Son yıllarda heterojen katalizörler olarak geçiş metali oksit nanopartikülleri, olağanüstü yapıları ve olağanüstü katalitik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Nano boyutlu metal parçacıkların, reaktanlar ve katalizörler arasında önemli ölçüde artabilen yüksek bir yüzey-hacim oranına sahip olduğu iyi bilinmektedir. Bu amaçla nanopartikül formundaki heterojen katalizörler sıklıkla kullanılmaktadır. Heterojen

1. GİRİŞ

katalizör özelliklerinden dolayı geri dönüştürülebilir. Aynı ürünleri yüksek reaksiyon hızları ve yüksek verimlerle elde etmek için nano-katalizin homojen kataliz için uygun bir alternatif olmasını sağlamıştır (Lipshutz and Ghorai 2012).

Heterojen katalizörlerden biri olan grafen, alışılmadık yapısı, etkileyici fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi uyandıran küresel bir karbon nanomateryaldir. Son araştırmalar, nanomalzemelerin sınıfına, konsantrasyonuna, özelliklerine, bitki türlerine ve tohum boyutuna bağlı olduğu için karmaşık olduğunu göstermiştir (Wu et al. 2012). Diğer yandan indirgenmiş grafen oksit yapıları, asit ve bazik ortamlarda olduğu kadar yüksek basınç ve sıcaklıklarda da yüksek yüzey alanı, ayarlanabilir gözeneklilik ve olağanüstü kararlılık gösterir (Piccinno et al. 2011; Khan et al. 2019). İndirgenmiş grafen oksit katalizli reaksiyonlarda desteklenen geçiş metali oksit, yüksek atom verimliliği, basitleştirilmiş ürün izolasyonu, kolay geri kazanım ve katalizörün geri dönüştürülebilirliği gibi avantajlar sunar (Kaur et al. 2016). Grafen destekli metal oksit nanopartikülün bu olağanüstü katalitik aktiviteleri, esas olarak çeşitli solventlerdeki etkili dispersiyon, metal oksit nanopartikülün çok daha az agregasyonu ve nanokatalizörün daha büyük gözenek boyutundan kaynaklanmaktadır (Shoeb et al. 2018). Bu nedenle günümüzde nanokatalizörler, çok kısa sürelerde yüksek verimli ürünler üreten organik reaksiyonlar için ana materyallerdir. Geçtiğimiz yıllarda Schiff bazları, DNA parçalama antiviral, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri gibi çeşitli biyolojik uygulamaları sayesinde büyük ilgi görmüştür. Tıbbi kimyada Schiff bazı bileşiklerinin tasarımı ve sentezi büyük ilgi görmüştür. Bunların yanı sıra Schiff bazları farmasötik kimyadaki önemlerinin yanı sıra polimer ve boya endüstrisinde fotonik bileşenler, sıvı kristaller ve katalizörler olarak birçok önemli uygulama alanı bulmuştur. Çeşitli Schiff bazı türevleri, iyi şelatlama yeteneklerinden dolayı metal iyonlarının moleküler sensörler olarak tanınması için kanıtlanmıştır (Milosavljevic et al. 2016; Moletti et al. 2007). Daha önceki literatür çalışmalarında, indirgeyici şekerin grafen oksidi grafene indirgediğini doğrulanmıştır. Bu nedenle, genellikle NPs'in hem indirgeyici ajanı hem de stabilizatörü olarak kullanılmıştır (Solomon et al. 2017; Zhu et al. 2010; Xu et al. 2016). Sonuç olarak, nanopartiküllerin yeşil sentezi:

-  Basit,
-  Uygun maliyetli,

1. GİRİŞ

- ✚ Biyouyumlu,
- ✚ Tekrarlanabilir,
- ✚ Hızlı ve güvenli bir yöntem olmasından dolayı avantaj sağlar.

Yeşil sentezin dışında grafen oksit Hummers yöntemiyle de sentezlenmiştir. Bu yöntemler, kuvvetli asit ve oksidantlar ile grafitin oksidasyonu işlemine dayanmaktadır. Hummers yönteminin avantajları:

- ✚ Üretim miktarının fazla olması,
- ✚ Maliyetinin düşük olması,
- ✚ Sentez süresinin kısılması,
- ✚ Patlamaların olmaması,
- ✚ Zehirli gazların oluşmaması,
- ✚ Üretilen GO'nun kimyasal indirgeme reaksiyonları ile seri ve fazla miktarda grafen üretilebildiği için maliyeti düşüktür (AshaRani et al. 2009; Milosavljevic et al. 2016).

Kalsiyum, sürgündeki konsantrasyonları kuru ağırlığın %0,1 ila %5'i arasında değişen bitkilerde temel bir makrobesindir. Hem hücre duvarlarının ve zarlarının yapısal bir bileşeni olarak hem de hücre içi ikinci haberci olarak işlev görmektedir.

Kalsiyumun birinci görevi, bitkilerde yapısal rolünü yerine getirmek için, yeterli miktarda bulunması gerekmektedir. Yeterli miktarda kalsiyum bulunmaması durumunda ve floem yoluyla yaşlı dokudan genç dokuya düşük remobilizasyon nedeniyle, genç yaprak ve meyvede semptomlara rastlanmıştır. Bu, ksilem yoluyla beslenmeye ve dolayısıyla genç dokularda az miktarda terlemeye neden olmuştur. Ortaya çıkan hastalıklar, örneğin marulda (*Lactuca sativa* L.) uç yanması ve domateste (*Lycopersicon lycopersicum* L.) çiçek uçlarının çürümesi neden olmuştur (Hirschi 2004). Yapısal rolünün yanı sıra, kalsiyumun ana işlevi, kök veya polen tüpü büyümesi, abiyotik ve biyotik strese verilen tepkilere kadar uzanan çeşitli süreçlerde ikinci bir haberci olarak işlev görmüştür (Michard et al. 2011; Monshausen et al. 2011; Blume et al. 2000). Sitolitik Ca^{2+} konsantrasyonundaki sürekli artışlar hücre içi ve dışında dengenin sağlanmasında sinyal görevi görür (Dodd et al. 2010; Thor and Peiter 2014). Bu işlevi

1. GİRİŞ

yerine getirmek için, uyarılmamış koşullar altında sitozoldeki serbest Ca^{2+} seviyelerinin yaklaşık $0,1 \mu M$ gibi düşük bir seviyede tutulması gerekmiştir. Bu, Ca^{2+} 'yı apoplast veya hücre içi depolara aktif olarak ileten biyokimyasal tamponların yanı sıra H^+ / Ca^{2+} antiporterleri ve Ca^{2+} -ATPazların etkisiyle elde edilmiştir (Dodd et al. 2010; Kudla et al. 2010, 2018). Böylece iyon, bir Ca^{2+} sinyali oluşturmak için konsantrasyon gradyanını plazma veya iç zarlardaki kanal proteinleri yoluyla sitozole doğru hareket eder (Şekil 1.7).

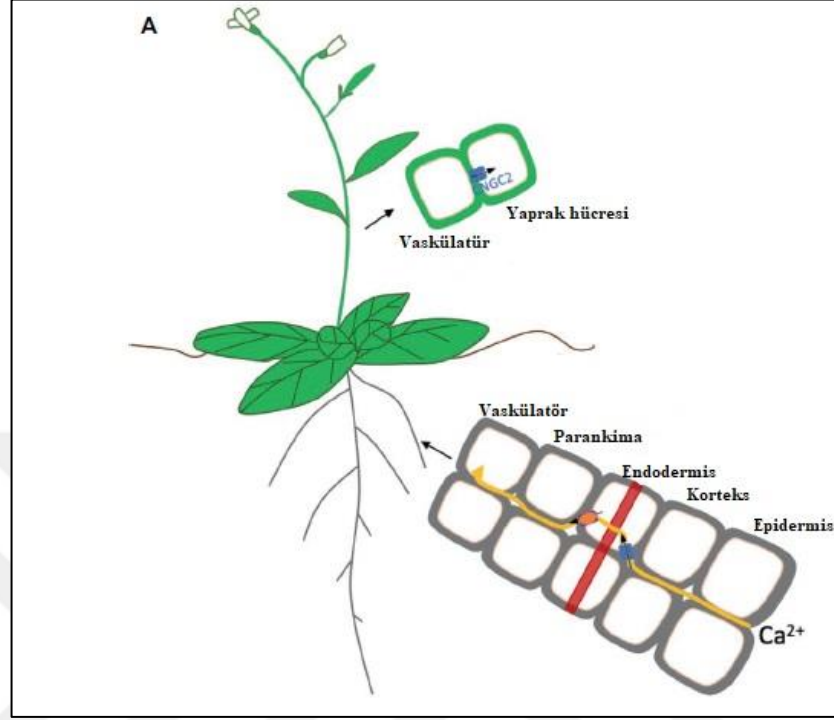
Kalsiyumun ikinci özelliği, hücre içi ikinci haberci olarak işlev görmesidir. Besleyici ve yapısal bir bileşen olarak kalsiyumun rolü üzerinde yoğunlaşırken, kalsiyumun ana işlevinin, çok çeşitli fizyolojik, gelişimsel ve stresle ilgili süreçleri kapsamaktadır. Bir Ca^{2+} sinyalinin oluşturulması, akış kanalları ve dış pompalar arasındaki karmaşık etkileşimin sonucudur. Kalsiyum sinyalleri çok çeşitli süreçlerde yer almıştır (Dodd et al. 2010). Farklı protein grupları, farklı uyaranlara farklı yanıtlar verir. Sinyali üreten uyaranlar önemli olduğu kadar sinyali aşağı akış yanıtına dönüştürülmesinde proteinlerin önemli işleve sahiptir. Bu proteinler:

- ✚ Kalmodulin (CaM),
- ✚ CaM benzeri proteinler (KML'ler),
- ✚ Kalsinörin B benzeri proteinler (CBL'ler),
- ✚ CBL etkileşimli protein kinazlar (CIPK'ler),
- ✚ Ca^{2+} 'ye bağlı kinazlardır (CDPK'ler veya *Arabidopsis*'te CPK'ler). CaM, KML'ler, CBL'ler ve CDPK'ler ve Ca^{2+} bağlayıcı motifler içerirken, CIPK'ler, CBL'lerle etkileşime girerek aktive edilmiştir (Kudla et al. 2018). Transkripsiyon faktörleri, taşıyıcılar veya kanallar gibi aşağı akış hedeflerinin aktivasyonu daha sonra sinyali gen ifadesi veya stoma kapanması gibi yanıtlarla dönüştürülmüştür.

Son zamanlardaki çalışmalarda, metal bazlı nanopartiküller arasında kalsiyum oksit (CaO) NP, mükemmel özellikleri ve çeşitli alanlardaki olası uygulamaları nedeniyle araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmüştür (Roy et al. 2013). Ek olarak CaO NPs'i ayrıca antifungal ve ayrıca antibakteriyel aktiviteye sahiptir (Pasupathy and Rajamanickam 2019). CaO NP düşük maliyetli bir malzeme olmakla birlikte, büyük

1. GİRİŞ

bazıklığe sahip ve aşındırıcı değil, çevreye zararsız ve diğer mineral bazlı NP kıyasla önemli işleve sahiptir.



Şekil 1.7. Ca^{2+} alımına ve bitkide yerine getirdiği işlevlere genel bakış. (A) Ca^{2+} kök tarafından alınır ve ikinci haberci işlevine müdahaleyi önlemek için esas olarak apoplastik bir şekilde sürgüne taşınır. Kaspari şeridini (kırmızı bant olarak gösterilir) atlatmak için, kanal proteinleri (mavi ile gösterilmiştir) yoluyla endodermal hücrelerin sitozolüne girer ve daha sonra Ca^{2+} -ATPazlar veya Ca^{2+}/H^+ antiporterleri (turuncu ile gösterilmiştir) yoluyla apoplast içine alınır (Clarkson 1993). *Arabidopsis*'te vaskülatürden boşaltıldıktan sonra yaprak hücrelere akışının CNGC2(Döngü Nükleotit-Geçitli Kanal 2) yoluyla meydana geldiği öne sürülmüştür. (B) Ca^{2+} bitkide iki işlevi yerine getirir: Hücre duvarları ve zarları üzerinde güçlendirici bir etkiye sahiptir, gelişme sırasında ve çevresel sorunlara yanıt olarak sinyal olaylarında ikinci bir haberci görevi görmüştür. Güçlendirilmiş bir hücre duvarı, patojenlere karşı koruma sağlamıştır (kör bir okla gösterilir). Ek olarak, farklı biyotik stres türleri, kalsiyumun ikinci haberci olarak hizmet ettiği sinyal kaskadlarını da indüklemiştir. Diğer olaylar tarafından indüklenenlerde olduğu gibi bu tür sinyal kaskadlarında Ca^{2+} , sitozolik kalsiyum konsantrasyonunda $[Ca^{2+}]_{cyt}$, Ca^{2+} sinyalinde bir artışı indüklemek için kanal proteinleri (mavi) yoluyla daha yüksek konsantrasyonlu bölmelerden (apoplast, organeller) sitozole girmiştir ve hücre dışına çıkarak uygun bir yanıtı dönüştürülmüştür. Sinyal, Ca^{2+} 'nın plazma veya organel zarlarında Ca^{2+} -ATPazlar (turuncuyla gösterilmiştir) veya H^+/Ca^{2+} antiporterleri (mor) yoluyla sitozol dışına taşınmasıyla sonlandırılmıştır. Bu dışarı salınan proteinlerinin varlığı, farklı organellerde farklılık göstermiştir. İlgili proteinlerin ve genlerin detayları metinde verilmiştir. Üstteki oklar, Ca^{2+} sinyallerini indükleyen olayları gösterir (Thor and Peiter 2014).

Oladoja et al. (2012) ve Luz Martínez et al. (2011), CaO NP'nin kısa reaksiyon sürelerinde maksimum ürün verimini üretmek için yalnızca minimum reaksiyon koşulları gerektirdiğini ve ayrıca geri dönüştürülebileceğini ileri sürdüler. Ayrıca, CaO kozmetikte, tıpta, atık iyileştirmede ve katalizörde yaygın olarak kullanılmaktadır (Roy et al. 2022). Sentezlenen CaO NPs ve NiO, FeO, ZnO, Ag ve Au gibi diğer nanomalzemeler için kimyasal çökeltme, hidrotermal, mikroemülsiyon, sol-jel, gaz fazı, mikrodalga sentezi ve elektrokimyasal yöntemlerde açıklanmaktadır. Hidrotermal sentez, nanomalzemelerin hazırlanmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Temelde çözüm reaksiyon tabanlı bir yaklaşımdır. Hidrotermal sentezde, nanomalzemelerin oluşumu, oda sıcaklığından çok yüksek sıcaklıklara kadar geniş bir sıcaklık aralığında gerçekleşir. Hazırlanacak malzemelerin morfolojisini kontrol etmek için reaksiyondaki ana bileşimin buhar basıncına bağlı olarak düşük basınç veya yüksek basınç koşulları kullanılır. Birçok nanomalzeme türü, bu yaklaşımın kullanılmasıyla başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Hidrotermal sentez yönteminin önemli avantajları şunlardır:

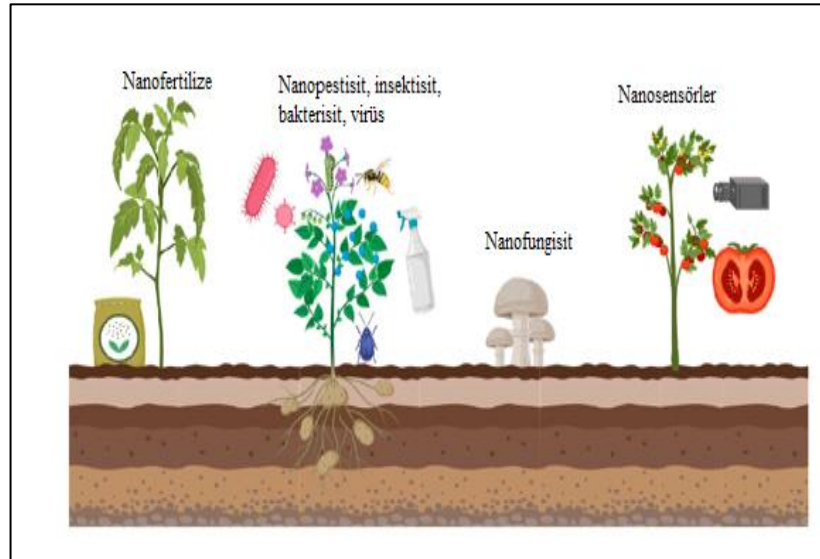
- Hidrotermal sentez, yüksek sıcaklıklarda kararlı olmayan nanomateryaller üretir.
- Yüksek buhar basınçlı nanomalzemeler, minimum malzeme kaybıyla hidrotermal yöntemle üretilir.
- Sentezlenecek nanomalzemelerin bileşimleri, sıvı faz veya çok fazlı kimyasal reaksiyonlar yoluyla hidrotermal sentezde iyi kontrol edilir.

Yeşil sentez yöntemi ise kimyasal ve fiziksel gibi diğer tüm yöntemlerden daha uygun maliyetli, zararsız ve çevre dostu olması açısından önemlidir (Kamboj et al. 2020). Literatüre göre, bitki ekstraktında bulunan fitoremediasyon kavramlarının bazıları nanomalzeme üretiminin kimyasal mekanizmasıyla ilgili olmuştur (Narayan et al. 2019). Metal/metal oksit NPs, gelecek nesiller için klinik bakım, tüketici ürünleri ve diğer endüstriyel uygulamalarda her yerde kullanmanın en iyi yolu olarak kabul edilir (Roy et al. 2022). CO₂ adsorpsiyonu, biyomedikal uygulamalar, gaz algılama ve CaO NPs'in fotokatalitik aktivitesi de çok dikkat çekmiştir (Tabrizi Hafez Moghaddas et al. 2022).

1.4.3. Nanoteknolojinin tarımda kullanılması

Son zamanlarda ortaya çıkan yeni teknolojilerden biri olan nanoteknoloji sayesinde nanocihazların ve nanomateriyallerin gelişimiyle bitki biyoteknolojisinde ve tarımda yeni uygulamalara umut olmuştur (Nair et al. 2010). Çeşitli nanoplatformların *in vitro* koşullar altında başarılı bir şekilde uygulanması, tarımda nanoteknolojiye olan ilgiyi artırmıştır. Nanomalzemelerin uygulamaları, geleneksel yaklaşımlara kıyasla daha çevre dostu olup bitkilerin daha hızlı çimlenmesini, abiyotik ve biyotik strese karşı daha dayanıklı bitkilerin üretilmesine yardımcı olmuştur.

Nanomateriyallerden biri olan nanopartiküller, tarımda çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır; en gelişmiş ülkelerden biri olan Çin'de 2011 ve 2015 yılları arasında 28 patent alınmıştır (Yata et al. 2018). Nanoteknoloji, nanogübreler, nanoherbisitler, nanofungisitler ve nanosensörler üreterek tarımda uygulanmıştır (Şekil 1.8). Nanogübreler, uygun bitki gelişimi için gerekli mikro besinlerin emilimine yardımcı olarak mahsulün iyi bir şekilde gelişmesini sağlar; çinko, silika ve titanyum dioksit, Cu NPs ve hatta nano-taşıyıcı görevi gören dendrimerler olarak polimerik NPs'den üretilmiştir (Vandevoort and Arai 2018; Kah et al. 2018). Nanopestisitler, abiyotik tip streslere karşı koruma sağlar, pestisitlerin seçiciliğini ve stabilitesini artırır. Bu, pestisitlerin masraflarını azaltmaya ve aktif kimyasal bileşiğin ömrünü uzatmaya izin vermiştir (Pascoli et al. 2018).



Şekil 1.8. Tarımda nanoteknoloji uygulamaları (Paramo et al. 2020)

Nanofertilize

Gübre, bitkilerin büyümesini ve mikro besinlerin eksikliklerini gidererek doğal üremeyi iyileştirmek için gerekli kimyasal elementleri içeren doğal veya yapay bir maddedir. Çinko oksit (ZnO) NP'in yaprağa uygulanmasıyla, özellikle pirinç (*Oryza sativa*) için çinko eksikliğinin üstesinden gelmek için mükemmel sonuçlar göstermiştir. ZnO ayrıca büyüme ve verim parametrelerini iyileştirmiştir. Ayrıca dehidrojenaz enzim aktivitesinde artırmıştır (Bala et al. 2019). Nanokompozitler ayrıca azot gibi mikro besinlerin taşınması için de kullanılmıştır; örneğin, montmorillonite (kil) katmanlarında kapsüllenmiş üre modifiye hidroksiapatit NP'dir (Madusanka et al. 2017). Bu bileşikler *O. sativa* verimi arttırmıştır ve azot salınımını yavaşlatmıştır. Membran kesecikleri gibi biyomühendislik ürünü NP, yaprak gübrelemesi yoluyla lahanaya (*Brassica oleracea*) Zn sağlamak için kullanılmıştır, bu da protoplastta yüksek verimlilikle sonuçlanmıştır (Rios et al. 2019).

Nanoherbisitler

Yeni nanoformülasyonlar, herbisitlerin ve insektisitlerin çevre üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmayı amaçlamaktadır. Polimerik NP, kimyasal bileşikleri kapsüllemek için en çok kullanılanlardır; kapsüllenmeleri, herbisitlerin difüzyon oranlarını etkilemiştir. Kitosan veya tripolifosfat NP, dünya çapında yaygın olarak kullanılan seçici olmayan bir herbisit olan parakuatı kapsüllemek için kullanılmıştır (Grillo et al. 2014). Bu nanoformülasyonun, kapsüllemeden sonra etkinliğini korurken saf bileşikten daha az toksik olduğu kanıtlanmış ve herbisit işleminden sonra diğer bitki türlerini korumak için gerçek potansiyeli göstermiştir. Öte yandan, fotokatalitik NP'in kullanımı, herbisit bozunmasına odaklanmıştır; ZnO NP, güneş ışığı altında herbisit dikuatın mineralizasyonunu oluşturmuştur ve herbisit-fotokatalizör oranına bağlı olarak glifosat bazlı herbisiti %70 ila %90 azaltmıştır (Shibin et al. 2015; Páez et al. 2019).

Nanopestisit

Pestisit toksisitesi kimyasal kararlılığa, çözünürlüğe, biyoyararlanıma, fotodekompozisyona ve toprak emilimine bağlıdır; nanoteknolojinin temel amacı,

pestisitlerin yavaş salınımına izin veren nanotaşıyıcılar tasarlayarak bu etkileri azaltmaktır (Kumar et al. 2019; Jampílek and Král'ová 2017). Cu, (Cu(OH)₂) bazlı nanopestisitler, ıspanak bitkilerinde (*Spinacia oleracea*) metabolik profillerde değişikliklere neden olarak, askorbik asit, alfa-tokoferol, treonik asit, 4-hidroksi bütirik asit, ferulik asit ve toplam fenolik bileşikler gibi antioksidan moleküllerin oranlarını (%29-85) azaltmıştır (Zhao et al. 2017). Bu sonuçlar, nanoteknoloji ve ekosistem arasında güvenli bir ilişki sağlamak için canlı organizmalarda nanopartiküllerin nasıl yanıt verdiğinin anlaşılması gerektiğini göstermektedir. Daha yüksek verim, dayanıklılık ve besin artışı, bitkilere uygulanan bazı nanoyapılı bileşiklerin sunduğu avantajlardır. Ancak bu malzemelerin uzun vadedeki etkileri henüz tam olarak anlaşılammıştır, çünkü bu nano-bileşikler besin sağlayabilir ve haşerelere (böcekler, bitkiler, bakteriler) karşı koruma sağlayabilir; ayrıca ekosistemin diğer türlerinde strese neden olarak ekolojik bir riske neden olabilirler.

1.5. miRNA'ların Keşfi, Biyosentezi ve Mekanizması

miRNA ilk olarak 1993 yılında nematod *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir ve bu sırada küçük geçici RNA'lar (stRNA'lar) olarak kabul edilmiştir (Lee et al. 1993). 2001'de miRNA'lar olarak adlandırılmıştır ve düzenleyici işlevlere sahip ayrı bir RNA sınıfı olarak kabul edilmiştir (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee and Ambros 2001). Bitki miRNA'ları, hayvan miRNA'larından 10 yıl sonra tanımlanmıştır. Şimdi, 72 bitki türünde 7385 olgun miRNA ve 6150 öncü miRNA (pre-miRNA) tanımlanmıştır (miRBase, 20 Haziran 2013). miRNA'lar, çok çeşitli organizmalarda gen düzenleyicileri olarak görev yapan, genellikle 20 ila 24 nükleotit (nt) arasında değişen, tek sarmallı kodlamayan RNA'lardır (Lee et al. 1993; Shabalina and Koonin 2008). Kök, gövde, yaprak ve çiçek eksplantların gelişimi dahil birçok biyolojik süreci etkileyebilmektedirler (Bian et al. 2012; Jouannet and Maizel 2012). Artan sayıda çalışmalar, miRNA'ların biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki yanıtlarında kilit roller oynadığını göstermiştir. miRNA'lar, endi miktarlarını, mRNA hedeflerinin miktarını veya miRNA-protein komplekslerinin aktivite ederek yanıtlara aracılık eder. Buna karşılık, bu değişiklikler, strese maruz kaldıktan sonra diğer genlerden ifade edilen proteinlerin zamanlamasını, yerini ve miktarını değiştirir. Bitki biyotik ve abiyotik streslerine yanıt olarak miRNA'lar tarafından yapılan gen düzenlemesinin çoğu, transkripsiyon sonrası

1. GİRİŞ

seviyede gerçekleşir (Ding et al. 2013; Feng et al. 2013; Wang et al. 2014; Xie et al. 2012).

Bitki miRNA'ları, RNA öncülerinin işlenmesiyle elde edilmiştir. Bu tür öncüler bir proteinin kodlama bölgesinin bir intronundan veya eksonundan kopyalar, ancak çoğu öncü genomların genler arası bölgelerinden kopyalanır (Jones-Rhoades et al. 2006). miRNA biyogenezini, miRNA genlerinden olgun miRNA'lar oluşturmak için birçok adım içermektedir (Kim 2005; Voinnet 2009). İntronlardan kaynaklanan bir tür miRNA olan mirtronlar, mikroproses kompleksini (RNase III enzimini içeren çok alt birimli bir kompleks) atlar ve pre-miRNA olgunlaşarak miRNA'ya dönüşür (Zhu et al. 2008). Splaysozomdan bağımsız olarak birkaç miRNA üretilir, ancak bunların olgunlaşmasının ayrıntıları belirsizdir (Johanson et al. 2013). Bir miRNA sarmalın her iki ipliği, hedefi susturmak için kullanılan Argonaute (AGO) içeren RISC kompleksine dahil edilmiştir (Okamura et al. 2013). Bu gerçekten, hangi sarmalın miRNA ve hangi sarmalın miRNA* olduğunu belirlemek zordur. Belki de bu nedenle, günümüzde miRNA ve miRNA* terimleri, öncü miRNA'lardaki (pre-miRNA'lar) konumlarına göre yaygın olarak '3p' ve '5p' uçlarıyla ile değiştirilmiştir. İlginçtir ki, döngüden türetilen miRNA'lar yakın zamanda tanımlanmıştır ve işlevsel oldukları gösterilmiştir (Okamura et al. 2013; Winter et al. 2013). miRNA aracılı transkripsiyon sonrası gen düzenlemesi yaygın olmakla birlikte, insan hücrelerinde miRNA'lar aynı zamanda transkripsiyon seviyesindeki genleri de düzenler. Etki mekanizması net değildir, ancak tüm sekans bağlamlarında sitozinde meydana gelen miRNA'ya yönelik DNA metilasyonu yoluyla olması muhtemeldir (Axtell 2013). Bu düzenleme şekli, siRNA'ya yönelik DNA metilasyonuna çok benzerdir (Matzke et al. 2009).

siRNA, RNA interferans (RNAi) yolunda önemli roller oynayan, 21-24 baz çifti uzunluğunda çift sarmallı küçük bir RNA sınıfıdır. siRNA'ların aksine, miRNA'ya yönelik DNA metilasyonu, Dicer üyesi, miRNA boyutu, AGO üyesi ve sarmal miRNA'nın stabilitesi gibi birçok faktörden etkilenir (Khraiwesh et al. 2010; Axtell 2013; Chellappan et al. 2010; Vazquez et al. 2008). Bitkilerde, miRNA'lar temel olarak transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) seviyesinde işlev görür ve AGO proteinini, hedef mRNA'yı 10 ve 11 konumları arasında (miRNA'nın 50 ucuna göre) kesmek için yönlendirilir. Translasyon inhibisyonu, miRNA'ların translasyon sırasında mRNA

bölünmesine yol açmadığı, ancak ribozomun okunmasını bloke ederek translasyonu durdurduğu varsayılmıştır (Wang et al. 2008). Son zamanlarda yapılan bir araştırma, miRNA ilişkili translasyon inhibitörü, endoplazmik retikulumda (ER) ve Değişim Meristem Programı (AMP1)'de meydana gelmiştir. AMP1 homologlarının hayvan genomlarında mevcut olduğu göz önüne alındığında, ER ile miRNA'lar tarafından translasyon inhibisyonu arasındaki bağlantının bitkiler ve hayvanlar arasında korunması mümkündür. Birlikte ele alındığında, miRNA'ların yukarıda belirtilen mekanizmaların bir kombinasyonu yoluyla hedef genlerinin ekspresyonunu düzenleyebileceği ileri sürülmüştür (Eulalio et al. 2008). Büyük miktarda veri, miRNA düzenleyici aktivitesinin büyüme ve gelişmenin yanı sıra çevresel streslere verilen tepkiler üzerinde de etkileri olduğunu göstermiştir (Llave 2004; Reyes and Chua 2007; Sunkar and Zhu 2004).

1.5.1. Kuraklık stresine miRNA seviyesinde yanıtları

Kuraklık stresinin, dehidrinler, vakuolar asit invertaz, glutatyon S-transferaz (GST), ABA ile indüklenebilir genler [LEA (geç embriyo bolluğu)], RAB (absisik asite yanıt), COR (soğuk düzenleyici), Rubisco (5-bifosfat karboksilaz-oksijenaz), helikaz, prolin ve karbonhidratlar dahil olmak üzere birçok metabolitin ekspresyonunu değiştirdiği ortaya çıkmıştır. Gen düzenleyicileri olarak miRNA'lar kuraklığa duyarlı genlerin düzenlenmesini sağlayabilir. Çalışmalar, miRNA'ların ifadesinin kuraklık stresine yanıt olarak değiştiğini göstermiştir. *Arabidopsis*, pirinç, börülce, tütün, soya fasulyesi, *Phaseolus vulgaris* ve benzeri birçok bitki türünde kuraklığa duyarlı miRNA'lar rapor edilmiştir (Sunkar and Zhu 2004; Zhou et al. 2010; Barrera-Figueroa et al. 2011; Frazier et al. 2011; Kulcheski et al. 2011; Arenas-Huertero et al. 2009). Kuraklık stresi altında olan *Arabidopsis*'te miR156, **miR159**, miR167, miR168, miR171, miR172, miR319, **miR393**, miR394a, miR395c, miR395e, miR396 ve miR397 yukarı regüle edilirken miR161, miR168a, miR168b, miR169, miR171a ve miR319c aşağı regüle edilmiştir (Sunkar and Zhu 2004). Yukarı regüle edilmiş miRNA'ların ayrıca farklı gelişim aşamalarında yer aldığı gösterilmiştir. Ayrıca, kuraklık toleransının düzenlenmesinde miRNA'nın farklı mekanizmalarıyla düzenlenmiştir (Alonso-Peral et al. 2012; Curaba et al. 2013; Vaucheret et al. 2006; Zhu and Hellawell 2011). Bir miRNA'nın ekspresyon seviyesinin veya kuraklığa duyarlılığının türe bağlı olması çok yaygındır

1. GİRİŞ

(Arenas-Huertero et al. 2009; Barrera-Figueroa et al. 2011; Frazier et al. 2011; Zhou et al. 2010).

Kuraklık stresine maruz kalan *Arabidopsis*, süs eriği, şeftali, arpa, *Panicum virgatum*, *Triticum dicoccoides* miR159'u yukarı regüle ederken, pirinç ve mısırı aşağı regüle etmiştir (Eldem et al. 2012; Kantar et al. 2011; Sunkar and Zhu 2004; Wei et al. 2009; Zhou et al. 2010). Bu tür farklılıklar, bitkilerin farklı yetiştirilme koşulları ve farklı derecelerde kuraklık stresini maruz kalması nedeniyle miRNA'ların regülasyonunda farklılık gözlemlenmiştir (Wang et al. 2011). Kuraklık stresine neden olan PEG, farklı konsantrasyonlarda ekzojen olarak uygulandığında, tütün bitkilerinde miR167, miR172, miR393, miR395, miR396, miR398 ve miR399 gibi aynı miRNA'lar farklı derecelerde yukarı veya aşağı regüle edilmesine neden olmuştur (Frazier et al. 2011). Kuraklık koşulları altında aynı bitki türünde aynı miRNA'nın farklı ifadesinin farklı yetiştirme koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

miR393 ekspresyonu, kuraklık stresi ile değişen *Arabidopsis*, pirinç, *M. truncatula*, *Pinguicula vulgaris* ve şeker kamışı gibi birçok bitki türünde F-box genlerinin düzenlenmesi için önemli işleve sahiptir. miR394 gibi, miR393 de çoğu bitki türünde kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık gibi abiyotik streslere yanıt olarak yukarı regüle edilmiştir (Arenas-Huertero et al. 2009; Sunkar and Zhu 2004; Trindade et al. 2010). Transgenik pirinçte miR393'ün aşırı ekspresyonu, tuzluluk toleransını artırmıştır (Gao et al. 2011). Transgenik pirinçte miR393'ün aşırı ekspresyonu, sentetik oksin analogu muamelerine karşı aşırı duyarlılığa neden olmuştur (Xia et al. 2012). miR393'ün oksin sinyalini düzenleyebileceğini ve dolayısıyla kuraklık stresi altında bitki büyümesini azaltabileceğini öne sürülmüştür. Kuraklık stresinde, endojen oksin, gibberellin ve sitokinin konsantrasyonları genellikle azalırken, ABA ve etilen miktarını artırmıştır. Bu hipotez doğrultusunda miR393'ün, bir oksin reseptörü olarak bilinen ve Aux/IAA proteinlerinin bozunması yoluyla etki eden oksin sinyalinin pozitif düzenleyicisi olarak bilinen taşıma inhibitörü yanıtı 1'i (TIR1) hedeflediği bulunmuştur (Dharmasiri and Estelle 2002; Windels and Vazquez 2011). Bununla birlikte, miR393'ün hedeflerini nasıl düzenlediği belirsizliğini korumaktadır.

1.6. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)

1. GİRİŞ

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), bitki yüzeylerini yüksek çözünürlükte incelemek için ideal bir tekniktir. Bitki dokuları, elektron mikroskobunda gözlem için dehidrasyon yoluyla korunur. Mikroskoplar yüksek vakum altında ve kaplama sistemiyle çalışmaktadır. Numunenin doğal yapısını incelemek ve donmuş hidratlı numuneleri görüntülemek için bazı mikroskoplar tasarlanmıştır. Günümüzde, numuneyi doğal hidratlı hallerinde görüntüleyebilen çevresel SEM mikroskopları geliştirilmiştir.

Dehidrasyon gerektiren numuneler için, sadece havayla kurutma dışında, numuneden suyu uzaklaştırmak için birçok teknik geliştirilmiştir, bunların tümü hücrenin minimum bozulmasını, orijinal biçim ve yapının maksimum düzeyde korunmasını amaçlamaktadır. Bu teknikler arasında dondurarak kurutma ve numunelerin dehidrasyonundan önce çeşitli kimyasal fiksasyon işlemleri yer almıştır. Bununla birlikte, kabul edilebilir yöntemler, bazı bitki türleri için idealden daha az koruma sağlamıştır ve tutarsızlığa neden olmuştur. Tutarsızlık büyük ölçüde bitkilerin doku tipleri, biçimleri, yapıları ve bileşimlerindeki çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Tutarsızlıklar, farklı laboratuvarlarda kullanılan bireysel beceri ve ekipmanlardaki farklılıklardan da kaynaklanmıştır. Bu nedenle, elektron mikroskopları altında görselleştirme için belirli bitki dokularının hazırlanması için modifiye edilmiş teknikler sürekli olarak test edilmiş ve geliştirilmiştir (Holloway and Baker 1974).

1.7. Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu (CLSM)

Konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM), son on yılda bitki biliminde yaygın olarak kullanılmıştır (Hepler and Gunning 1998). Bu teknik ayrıca, çok çeşitli fluoresan bileşiklerin yardımıyla ksenobiyotiklerin floem hareketlilik modelini doğrulamak için ve yüzey aktif madde çözeltilerinin yapraklara stomadan sızmasını görselleştirmek için de kullanılmıştır (Wright et al. 1996).

CLSM kavramı, 1980'lerin ortalarında, mevcut organizmaların hücresel bileşenlerinin floresans tabanlı üç boyutlu görüntülemesinde kullanılması için geliştirilmiştir (Amos and White 2003). CLSM, standart optik mikroskopi ile elde edilemeyen ince odak düzlemlerinin net bir görüntüsünü sağlamıştır. Böyle bir sistemin lazer ışını, analiz edilen malzemedeki fluoresansı harekete geçirmiştir. Kerojen fosilleri

1. GİRİŞ

içeren floresan birbirine bağlı polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), spektrumun kırmızı ila yakın kızılötesi bölgesinde maksimumdur. Bu lazerle indüklenen flüoresanstan çıkan sinyal daha sonra sistemin detektörü tarafından ince bir optik düzlemin net bir görüntüsünü elde etmek için toplanmıştır. Kesin olarak tanımlanmış artan optik derinliklerde kerojen bir fosil boyunca sistemin lazer ışını hızla taramayı içermiştir. Bilgisayar işleme, numunenin yüksek uzamsal çözünürlükte ($<0,2 \mu\text{m}$) üç boyutlu bir görüntüsünü üretebilen bir dizi görüntünün sayısallaştırılmasını içermektedir (Peyrot et al. 2007).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Soheilikhah et al. (2013) kuraklık stresi ve tuzluluğa maruz kalan aspir (*Carthamus tinctorius* L.) kalluslarının fizyolojik tepkileri değerlendirmiştir. Farklı aspir genotipleri olan G1 (LRV-51-51), G2 (Lesaf), G3 (Gila), G4 (Kino-76) ve G5 (Isfahan) kallusları, farklı konsantrasyonlarda mannitol ve NaCl ortamında bir ay maruz bırakılmıştır. Genotiplerin bağıl büyüme hızı, bağıl su içeriği, tolerans indeksi, Na^+/K^+ , prolin içeriği ve hücre canlılığını değerlendirilmiştir. Sonuçlar, kallus büyümesi, su içeriği ve hücre canlılığında önemli bir düşüşün her iki stres altında meydana geldiğini ve en yüksek azalmanın mannitol kaynaklı ozmotik stres altında olduğunu gösterilmiştir. Mannitol kaynaklı ozmotik stres altındayken, Na^+ değişmeden kalmıştır, ancak K^+ konsantrasyonu önemli ölçüde azalmıştır. Bu nedenle, genel sonuçlar, Na^+ iyonlarının ve osmolitlerin birikiminin, tuz stresi altındaki aspir hücrelerinde ozmotik dengede önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca çalışılan genotipler arasında Gila genotipi (G3) ve Kino-76 (G4) daha yüksek hücre canlılığı, daha yüksek K^+ , Na^+ ve prolin konsantrasyonu göstermiştir. Ayrıca, her iki genotipin de sırasıyla tuz stresine ve mannitol ozmotik streslere dirençli çeşitler olarak kabul edilebilmiş ve su tutmada iyi bir etkinliğe sahip olduğu görülmüştür.

Możdżeń et al. (2014) mannitolun (0,5 ve 1,5MPa) indüklediği kuraklık stresinin *Z. mays* L'de seçilen fizyolojik süreçler üzerindeki etkisini belirlenmiştir. İlk aşamada mannitolun çimlenme üzerindeki etkisini incelenmiştir. İkinci aşamada mannitolun distile suda çimlenen ve büyüme aşamasında mannitol ile sulanan bitkilerin büyümesi üzerindeki etkisi ölçülmüştür. Konsantrasyona bağlı olarak su içeriğini azaltan mannitol, fidelerin ve yetişkin bitkilerin çimlenmesini ve büyümesini inhibe edici bir etkiye sahiptir. *Z. mays* fidelerinin hücre zarlarının elektrolit sızıntısı, ozmotik kuraklık koşullarında zar yapılarının işleyişinde olumsuz etkiler göstermiştir. Her iki muamelede mısır kökleri, sürgünleri ve yaprakları için benzer sonuçlar elde edilmiştir. Klorofil içeriği, büyüme fazı sırasında muamele edilen bitkilerde önemli farklılıklar göstermiştir. Kuraklık stresi, kontrol bitkilerine kıyasla klorofil içeriğinde neredeyse yarı yarıya azalmaya neden olmuştur. Deneylerin ikinci aşamasından bitki yapraklarının klorofil floresansının ölçümleri, floresan aktivite parametreleri Fv/Fm, NPQ, Rfd, qP ve gaz değişimi ölçümleri ayrıca iki fazın her birinde aktivitede değişiklikler göstermiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Arshad et al. (2017) yoncanın kuraklık stresi üzerine yaptıkları bir çalışmada *miR156*'nın gen seviyesindeki değişikliğini belirlemiştir. Yabani tip (WT) kontrole kıyaslandığında *miR156* (*miR156OE*) yukarı regülasyon yonca genotiplerinin kuraklık toleransında önemli bir gelişme gözlemlenmiştir. *miR156OE*, yonca genotipleri kuraklık stresi sırasında WT'ye ile kıyaslandığında daha yüksek stoma iletkenliği olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, *miR156OE* genotiplerinde prolin birikimi, ABA ve antioksidan seviyeleri artış gözlenmiştir. Kuraklık toleransına dahil olduğu bilinen birkaç gen, *miR156* yukarı regülasyonu bitkilerinin yaprak ve kökünde farklı şekilde regüle edildiği gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, *miR156*'nın SPL13'ü susturarak yoncadaki kuraklık toleransını en azından kısmen iyileştirdiğini ortaya koymaktadır.

Pokoo et al. (2018) dokuya özgü miRNA profillerini belirlemek için üç farklı yonca genotipinin (Altet-4, NECS-141 ve NF08ALF06) sürgünleri ve kökleri kullanmıştır. Küçük RNA kütüphaneleri, yüksek verimli bir sıralama platformu kullanılarak oluşturulmuştur. Bol miktarda eksprese edilen altı miRNA ailesinin (*miR156*, *miR159*, *miR166*, *miR319*, *miR396* ve *miR398*) profilleri, bu üç *M.sativa* genotipinin tüm bitkileri, kökleri ve sürgünleri arasında nispeten benzerlik göstermiştir. Buna karşılık, *miR160* ve *miR408* seviyeleri için sürgünler ve kökler arasındaki önemli farklılıklar belirgin olup bunların ifadesi sürgünlerde gen seviyesinde önemli derecede değişiklik olduğunu bulunmuştur.

Zhang et al. (2018) üç farklı *M. sativa* çeşidi olan Longzhong (kuraklığa dayanıklı), Longdong (orta derecede kuraklığa dayanıklı) ve Gannong No. 3 (kuraklığa duyarlı) kullanmıştır. Farklı kuraklık konsantrasyonunda 12 gün muamele edildikten sonra morfolojik, fizyo-biyokimyasal ve transkripsiyonel seviyelerde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Uzun süreli kuraklık stresinin, üç yonca çeşidinin büyüme ve fotosentez kapasitesini önemli ölçüde azalttığını gösterirken, MDA, ROS, osmolitler, indirgenmiş askorbat, APX aktiviteleri ve gen ekspresyonunu (MsCu/Zn-SOD, MsFeSOD, MtPOD, MsGPX, MsAPX, MsMDAR, MtDHAR ve MsGR) artırmıştır. Yoncada farklı kuraklık stresi toleransının dokuz günlük muamelesinde MDA, H₂O₂, askorbat, glutatyonun redoks durumları, APX aktivitesi ve transkript seviyelerinde (MsFeSOD, MsGR ve MsMDAR) farklılaşmasına katkıda bulunabileceği bulunmuştur. Üç farklı yonca çeşitlerinden kuraklığa en dayanıklı Longzhong çeşidi bulunmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Feyissa et al. (2019) *M. sativa miR156* ile modüle edilmiş kuraklık stresi toleransının mekanizmasını anlamak için miR156 ile düzenlenmiş SPL13 ve WD40-1'i düzenleyen Dehidroflavonol-4-Redüktaz (DFR) ekspresyon seviyeleri değiştirilmiş genotipler kullanmıştır. Daha önce *miR156*'nın kuraklık toleransına dahil olduğunu bildirmiştir, ancak bu sürece dahil olan mekanizma ve aşağı akış genleri tam olarak çalışılmamıştır. Burada, gen ekspresyonunu metabolit ve fizyolojik stratejilerle koordine ederek kuraklık stresini düzenlemek için miR156/SPL13 ve WD40-1/DFR arasındaki etkileşimi gösterilmiştir.

López-Galiano et al. (2019) miR159'un *Solanum lycopersicum* bitkilerinin kuraklık stresine tepkisindeki rolünü ve onun hedef SIMYB transkripsiyon faktörü genlerinin ifadesini analiz ederek araştırmıştır. Sonuçlar, farklı streslere yanıt olarak domates bitkilerindeki sly-miR159 düzenleyici fonksiyonunun, diferansiyel strese özgü MYB transkripsiyon faktörü hedeflemesinin aracılık edebileceğini göstermiştir. SIMYB33 transkripsiyon faktörü transkriptinin miR159 hedeflemesi, kuraklığa toleransı artıran osmoprotektif bileşikler prolin birikimi ile ilişkilidir. Bu, sly-miR159'un domates bitkilerinin su eksikliği koşullarına adaptasyonundaki potansiyel rolünü vurgulamıştır.

Upadhyay et al. (2019) kuraklığa dayanıklı mısır hatlarında mikroRNA'ların diferansiyel ekspresyonu çalışmıştır. Çalışma için yedi mikroRNA ailesi seçilmiştir. miRNA'ların hedef genleri, hedef psRNA ve RNA hybrid kullanılarak bulunmuştur. 16 mRNA'yı hedefleyen toplam yedi mikroRNA tespit edilmiştir. Seçilen mikroRNA'ların kuraklık stresini farklı şekilde ifade ettiği hipotezi, qRT-PCR ile doğrulanmıştır. Kuraklık stresi altında, mikroRNA'ların diferansiyel ekspresyonu, hedef genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek mısırın kuraklık toleransına göre fizyolojik ve biyokimyasal yolların çoklu tepkilerine yol açmıştır. miR160, miR164, miR166, miR393, miR529, miR169 ve miR2275 aileleri önemli rol oynamıştır.

Abdelsalam et al. (2021) kuraklık toleransını değerlendirilmesinde doku kültürü yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışmalarında şeker kamışı genotiplerinin kuraklık stresine verdiği tepkiyi kallus model sistem olarak kullanarak araştırmayı amaçlamıştır. Şeker kamışı kallusunu indüklemek için, Murashige ve Skoog (MS) ortamında 3 şeker kamışı genotipinin (GT 54-9, G 84-47 ve pH 8013) kök ve gövde oluşum dışında kallus

2. KAYNAK ÖZETLERİ

frekansı, kallusun başlama günü, embriyogenik potansiyel, nispi büyüme oranı (RGR), su, prolin ve Na^+/K^+ içeriği üzerindeki etkilerini ölçmek için farklı mannitol konsantrasyonları (100, 200 ve 300 mM) kullanılmıştır. Diğer iki genotipe (G 84-47 ve pH 8013) kıyasla en yüksek kallus proliferasyonu, PGR, sürgün oluşumu değeri GT 54-9 genotipinde gözlemlenmiştir. 300 mM mannitol ile muamele edilen kalluslar, genotip GT 54-9 için en yüksek RGR, prolin ve su içeriklerini gösterirken, 100 mM ile muamele edilenler, genotip pH 8013 için bu parametrelerin en düşük değerlerini kaydetmiştir. Genotip G 84-47 en yüksek Na^+ birikimi gözlemlenirken, genotip pH 8013 en yüksek K^+ birikimi olmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, çalışılan tüm özelliklere dayalı olarak kuraklık stresine daha fazla tolerans gösteren, en umut verici genotip olarak kabul edilen GT 54-9 genotipidir.

Yazıcılar et al. (2021) *in vitro* şartlarda 3 farklı tritikale çeşidi (Tatlıcak, Alper Bey ve Ümran Hanım) kullanmıştır. CaO NP'in tritikale kallustaki fizyolojik ve biyokimyasal değişimleri kısa ve uzun süreli tuz uygulamalarında etkisi araştırılmıştır. CaO NP'in aktivasyonu, tritikale çeşitlerinin kalluslarında tuz stresi ile indüklenmiştir. Kallus dokularında MDA, H_2O_2 , POD ve protein aktiviteleri belirlenmiştir. MDA, H_2O_2 ve protein aktiviteleri ile ilgili olarak CaO NP uygulamasının önemli olduğu ve çeşitlerin tolerans seviyeleri ile yüksek korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. En iyi sonuç kısa süreli 1,5 ppm CaO NPs 100 g NaCl'de gözlemlenmiştir. CLSM analiziyle CaO NP muamele edilen kallus hücrelerinde stres şiddetinin inhibisyonu yoluyla tuz stresinin olumsuz etkilerini hafifletebileceğini kanıtlanmıştır. Bu çalışma, *in vitro* koşullar altında, CaO NP'in uygulanmasının, tuz stresinin tritikale kallus üzerindeki olumsuz etkilerini önemli ölçüde baskılayabildiğini göstermiştir; CaO NP konsantrasyonunun bu bitki için ortamdaki mikro besin içeriğinin ayarlanmasında dikkate alınması gereken önemli bir parametre olabileceği de doğrulanmıştır.

Abdelghany et al. (2022) Belirli nanopartiküllerin ve biyogübrelerin yer fıstığının (Cv. Giza 6) büyümesi, verimi ve biyokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi araştırılması için iki yıllık (2020–2021) bir saha deneyi yapmıştır. Ekimden önce, tohumlar iki biyolojik gübre, mikoriza ve fosfor ile aşılanmıştır. Alt plan, nanopartiküllerin yaprak spreylelerini, yani 200 ppm bor (B), 200 ppm Ca^{2+} , bunların kombinasyonunu ($\text{Ca}^{2+}+\text{B}$) ve kontrolü (sprey yok) içermiştir. Sonuçlar, kontrol ve fosfor karşılaştırıldığında tohum

2. KAYNAK ÖZETLERİ

verimini, biyolojik verimi, mahsul büyüme hızını (CGR), dallanma sayısı ve protein içeriği önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Nanopartiküller arasında $Ca^{2+}+B$, bitki boyunu, CGR'yi, 100 tane ağırlığını, kabuklanma yüzdesini, tohum verimini, yağ içeriğini ve tohum proteinini maksimum düzeyde iyileştirmiştir. Ca^{2+} ve B nanopartikülleri ile mikorizayla muamele edilen bitkiler, büyüme, verim ve biyokimyasal özelliklerde dikkate değer bir gelişme sergilemiştir.

Nazir et al. (2022) As toleransı farklı olan iki arpa genotipinde (LJZ ve Pu-9) As toksisitesini hafifletmede CaO NPs'in rollerini araştırmışlardır. Arpa fidelerinin As stresine maruz kalması, bitki büyümesinde, klorofil içeriğinde ve ROS, MDA ve toksik etkisini önemli bir azalma meydana gelmiştir. Arpa fideleri As stresine maruz bırakıldığında As taşıyıcı genleri olan HvPHT1;1, HvPHT1;3, HvPHT1;4 ve HvPHT1;6'nın ekspresyonu, önemli ölçüde artmış ama CaO NP muamelesinde gen ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitki Ekstratların Hazırlanması

3.1.1. CaO NPs'nin hidrotermal sentezi, GO'ların kimyasal sentezi ve karakterizasyonu

Hidrotermal sentez yöntemi: CaO NPs hidrotermal sentez yöntemiyle elde edilmiştir. Kısaca, reaksiyon karışımı 0,02 g üre, 0,3 g sitrik asit (CA) ve 1 mM CaCl₂ çözeltisinden 80 mL alınarak teflon astarlı paslanmaz çelik otoklava konuldu. Karışım iyice karıştırılıp, kimyasalların çözülmesi sağlandıktan sonra 6 saat süreyle 210°C, 1 atm basınçta reaksiyona sokuldu. Çökelek, 15.000 xg'de 30 dakika süreyle santrifüjlenerek ayrıldı ve 50 °C'deki etüvde 1 gece boyunca kurutuldu. Çalışmanın diğer kısımlarında kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi.

GO hummers sentez yöntemi: İşlemin ilk aşamasında buz banyosunda 5 g toz grafit, 2,5 g NaNO₃, 115 mL %96,4'lük sülfürik asit ilave edilmiş ve 1 saat manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Hazırlanan karışıma 15 g KMnO₄ dikkatli şekilde ilave edilmiştir. Karışım buz banyosundan çıkartıldıktan sonra 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 500 mL deiyonize su eklenerek 1 saat daha manyetik karıştırıcıda bekletilip, karışıma 8,4 mL H₂O₂ (%35,7) eklenip 2 saat karıştırılmıştır. Karışıma pH 7 olana kadar deiyonize su ilave edilerek filtrelenmiştir. Filtrelenen karışım 50 °C'de etüvde 1 gece inkübe edilmiştir ve toz halinde GO elde edilmiştir (Singh et al. 2015; Shoeb et al. 2015).

3.1.2. CaO NP'nin ve GO'ların yapısal karakterizasyonu

CaO NP yapısını karakterize etmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve X-ışını kırınımı (XRD) kromatografik analizleri kullanılmıştır. Sentezlenen CaO NPs'inin yüzey topografisinin belirlenmesi, SEM kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra CaO NPs'inin kristalinitesinin belirlenmesinde XRD analiziyle belirlenmiştir. X-ışını kırınım desenleri, 10⁰-80⁰ aralığında Ni-filtrelenmiş Cu K α radyasyonu ($\lambda_n= 0.1542$ nm) ile donatılmış Panalytical

empiren üzerinde 40 dk⁻¹ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. CaO NPs'inin FT-IR analizi, 4.000 ile 400 cm⁻¹ bölgesinde zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) tekniğine sahip Vertex 80 Model FT-IR Frontier spektrofotometresi kullanılarak kaydedilmiştir (Karaduman et al. 2017; Nadaroglu et al. 2017).

Sentezlenen GO yapısındaki fonksiyonel grupların tespiti için FT-IR analizi yapılmıştır. Grafit yapıdan GO yapıya geçişteki amorf yapıları gözlemlmek için Raman spektroskopi analizi yapılmıştır. SEM ile numuneler EHT= kV, WD=5,3 mm, signal A= InLens, Mag=10,42 K X görüntü alınmıştır. Sentezlenen GO'nun karakteristik ısıl özelliklerinin incelenmesinde termo gravimetrik (TG) analizi yapılmıştır. Sentez öncesi ve sonrası kristalin atomik ve moleküler yapıdaki değişiklikleri incelemek için XRD analizi yapılmıştır.

3.2. Kallus Oluşumu

Yonca (*M. sativa* L.) bitkisine ait Eruzrum ve Konya töresi ekotiplerine ait tohumlar %22'lik NaOCl ile 20 dakika yüzey sterilizasyonu yapılmış ve en az üç kez otoklavlanmış saf suyla yıkanmıştır. Daha sonra standart MS besiyeri (Murashige and Skoog 1962) (Çizelge 3.1) hazırlanarak 121 °C'de 1 atmosfer basınçta yaklaşık 90 dakika otoklav edilmiştir. Otoklavlanan standart MS besiyeri ılıdıktan sonra MS ve askorbik asit vitamini steril kabinde ilave edilip petri kaplarına (9x9 mm) yaklaşık 50 mL dökülmüştür. Tohumların ekimi steril kabinde standart MS ortamında yapılmıştır. Tohumların rejenerasyonu için iklimlendirme kabininde 25± 1°C'de, 16/8 gündüz/karanlık, 1.500 lux'de ve 30% nem'de yaklaşık 3 hafta bekletilmiştir. Rejenere olan *M. sativa* tohumlarının yaprak eksplantları MS besiyerinde pH 5.7 1mg/mL kinetin ve 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik Asit) aktarılarak 25 °C'de ve karanlık ortamda yaklaşık 3 hafta bekletilmiştir.

Çizelge 3.1. Standart MS besiyerinde kullanılan kimyasallar ve miktarları

KİMYASAL BİLEŞİMİ	MİKTAR (mg/L)
İnorganikler	
Makro elementler (20X)	
NH ₄ NO ₃	33.000
KNO ₃	38.000
CaCl ₂ .2H ₂ O veya CaCl ₂	8.792 veya 6.644
MgSO ₄ .7H ₂ O veya MgSO ₄	7.400 veya 3.614
KH ₂ PO ₄	3.400
Mikroelementler (100X)	
MnSO ₄ .H ₂ O veya MnSO ₄	1.690 veya 1.510
KI	83
H ₃ BO ₃	620
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5
Demir şelat (100X)	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O veya Na ₂ EDTA	4.049,6 veya 3.760
Fe ₂ (SO ₄). 7H ₂ O	2.780
Organikler (100X)	
Glisin	200
Myo-inositol	10.000
Nikotonik asit	50
Pridoksin-HCl	50
Tiamin-HCl	10

3.3. Kuraklığa Alıştırma Koşulları

Bu çalışmada yonca kalluslarında kuraklık koşullarını sağlamak için mannitol kullanılmıştır. Farklı seviyede kuraklık koşulu oluşturmak için mannitolün 50 ve 100 mM konsantrasyonları tercih edilmiştir. Kuraklık koşullarındaki kalluslarda stres cevabının düzenlenmesinde ise CaO NPs'nin 1 ve 2 ppm, GO'nun ise 0,5 ve 1,5 ppm konsantrasyonları kullanılmıştır. Yoncanın Erzurum ve Konya ekotiplerine ait kalluslar 11 farklı uygulama koşullarında 1 ay süreyle geliştirilmiştir. Bu uygulamaya ait deneme deseni aşağıda sunulmuştur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kuraklığa alıştırma koşulları

Erzurum	Konya
1. Kontrol	1. Kontrol
2. Ca-	2. Ca-
3. 2 ppm CaO	3. 2 ppm CaO
4. 1,5 ppm GO	4. 1,5 ppm GO
5. 50 mM mannitol	5. 50 mM mannitol
6. 50 mM mannitol/1 ppm CaO	6. 50 mM mannitol/0,5 ppm GO
7. 50 mM mannitol/2 ppm CaO/0,5 ppm GO	7. 50 mM mannitol/2 ppm CaO/0,5 ppm GO
8. 100 mM mannitol	8. 100 mM mannitol
9. 100 mM mannitol /1,5 ppm GO	9. 100 mM mannitol /1 ppm CaO
10. 100 mM mannitol/1 ppm CaO/0,5 ppm GO	10. 100 mM mannitol /1,5 ppm GO
11.) 100 mM mannitol/2 ppm CaO/1,5 ppm GO	11.) 100 mM mannitol/2 ppm CaO/1,5 ppm GO

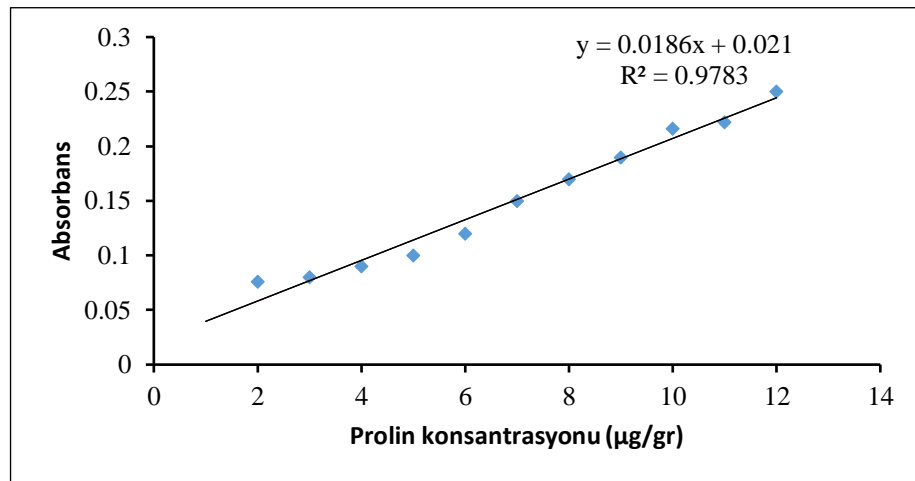
3.4. Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Analizleri

3.4.1. Kuru/yaş ağırlık

Oluşan Erzurum ve Konya kallusları en az üç tekrarlı olacak şekilde yaş ve 65 °C’de kurutulmuş kalluslar hassas terazide tartımı yapılmıştır. Kuru ağırlığın yaş ağırlığa oranı hesaplanmıştır.

3.4.2. Prolin içeriği

Prolin miktarını belirlemek için 100 mg kallus örneği alınarak sıvı azotla homojineze edilmiştir. Homojenize edilen örneklerin üzerine 10 mL 3%’lük sülfosalisilik asit ilave edilmiştir. Elde edilen homojenat 15.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet kısmı atılarak 2 mL supernatant başka bir tüpe aktarılarak 2 mL asit ninhidrin ilave edilmiştir. Su banyosunda 90 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Tüpler çıkarılarak buz banyosunda soğuması sağlanmıştır. Daha sonra 4 mL toluen ilave edilerek vorteks işlemi yapılmıştır. Örneklerin absorbansı 3 tekrarlı olacak şekilde 520 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Örneklerdeki prolin miktarı saf prolinle hazırlanan bir standart grafik üzerinden hesaplanmıştır (Şekil 3.1) (Ahmad et al. 2012).



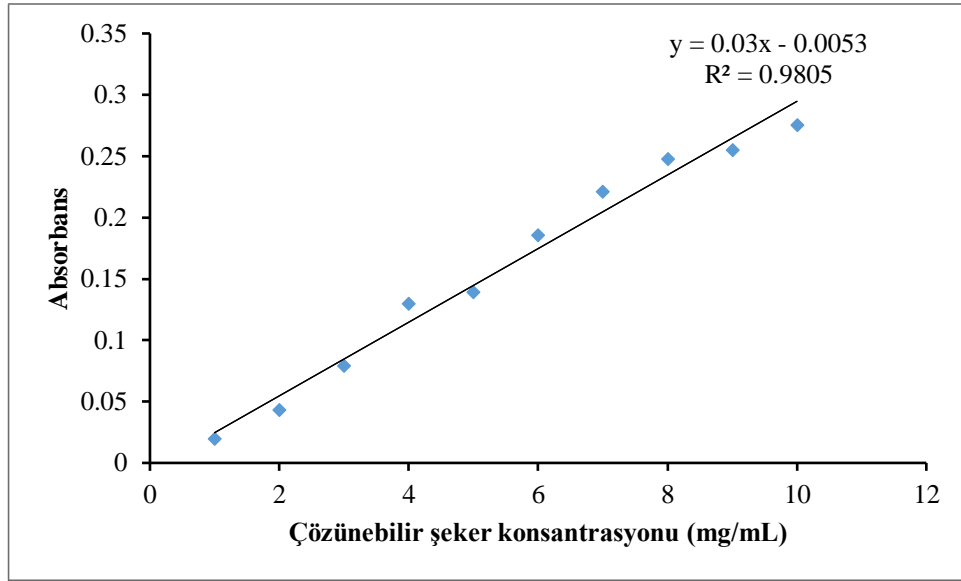
Şekil 3.1. Prolinin standart grafiği

3.4.3. Çözünabilir şeker içeriğinin belirlenmesi

Suda çözünabilir şeker tayini, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde indirgen şeker tayini Krivorotova and Sereikaite 2014 protokolü modifiye yapıldı. Çözünabilir şeker tayini için önce bir standart grafik hazırlanmıştır. Standart grafik oluşturulmasında totalde 11 tüp kullanılıp 1 tüp (kör) blank olarak kullanılmıştır. Bu işlem için 1mg/1 mL glukoz çözeltisi hazırlanmıştır. 1 mg/mL glukoz çözeltisi 1 mL'den başlanarak 10 mL'ye kadar seyreltme işlemi yapılmıştır. Seyreltilme yapılan her tüpe 2 mL DNSA eklenmiştir. Daha sonra 90 °C su banyosunda 20 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler süre tamamlandıktan sonra buz banyosuna alınarak soğutulmuştur. Blank ve çözeltilerin absorbansı üç tekrar şeklinde spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda okundu. Daha sonra, absorbansların ortalamaları kullanılarak çözünabilir şeker tayini için bir standart grafik hazırlanmıştır. Kallus dokularından 0,1 mL alınarak, üzerine 2 mL DNSA çözeltisi, blank için ise sadece 2 mL DNSA çözeltisi ilave edilmiştir. Örnekler, su banyosunda 90 °C'de 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra tüpler buz banyosuna alınarak soğuyana kadar bekletilmiştir. Örnekler, 550 nm'de absorbansı üç tekrar şeklinde ölçülmüştür ve daha önce hazırlanmış olan standart grafikten faydalanılarak çözünabilir şeker miktarı belirlenmiştir (Şekil 3.2).

DNSA reaktifi hazırlanışı;

1 g DNSA ve 30 g sodyum-potasyum tartarik asid tartılarak 80 mL 0,5N NaOH içinde 45 °C'de çözülmesiyle hazırlanmıştır. Çözünme sonrası çözelti oda sıcaklığına soğutulmuştur ve distile su yardımıyla 100 mL'ye seyreltilmiştir.



Şekil 3.2. Çözünabilir şeker standart grafiği

3.4.4. Lipid peroksidasyon içeriğinin belirlenmesi

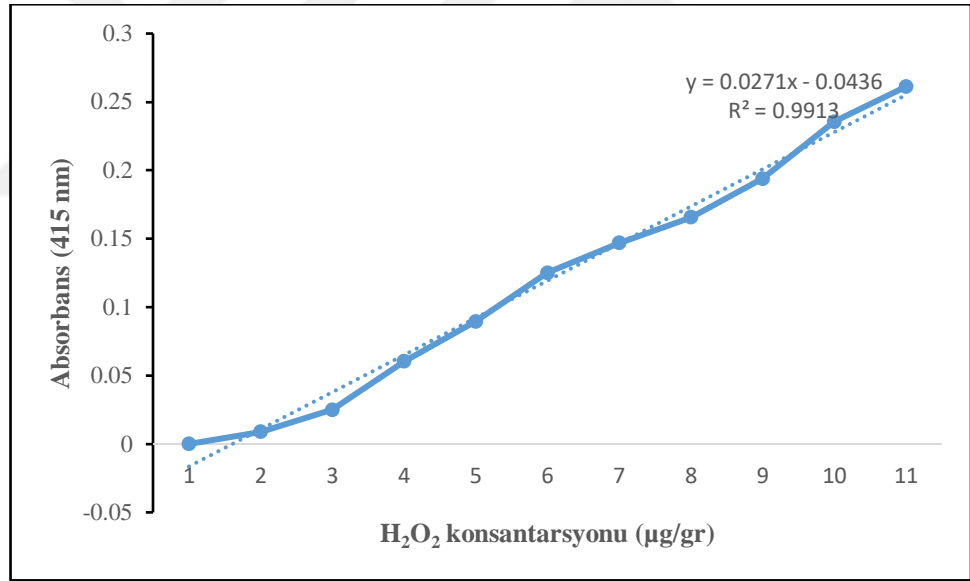
Lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesi, hücrelerin veya dokuların oksidatif hasarının bir göstergesi olarak kullanılan yaygın bir araçtır. MDA, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan bir yan üründür ve bu nedenle lipid peroksidasyonu seviyesinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan bir belirteçdir. Bu yöntemde TBA (Tiyobarbitürik asit), MDA ile reaksiyona girerek renk değişimine neden olan bir indikatördür. Çalışmamızda, her bir dozda muamele edilen *M.sativa* kallusları 3 tekrarlı şekilde 0,2 gram kallus örneği tartılmıştır. Kalluslar 2 mL 0.1%lik TCA (Trikloroasetik asit) ile homojenizite edilmiş ve 2 mL ependorf tüplerde 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sonra süpernatantın 2mL'si tüplere konulmuş ve üzerlerine 1 mL 20% TCA, 1 mL 0,5% TBA eklenmiştir. Örnekler 90 °C su banyosunda 40 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra buz banyosuna alınacak her örnekten üç tekrarlı olacak şekilde 100 µL alınıp 96 well plate'e ilave edilip 450, 532 ve 600 nm'de absorbanans ölçümü alınmıştır (Heath and Packer 1968; Erdal 2012). MDA içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$MDA \text{ içeriği } \left(\frac{nmol}{mL} \right) = [(A_{532} - A_{600}) - (A_{532} - A_{600}) \times 0,9571 / 157000] \times 10^6 \quad (3.1)$$

3.4.5. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

H₂O₂ içeriğini belirlemek için *M. sativa*'nın kalluslarından 0,2 gr alınarak sıvı azotta homojenize edilmiş ve sonra homojenizasyon 2 mL aseton (-18 °C) ile tamamlanmıştır. Daha sonra oluşan karışıma 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet kısmı uzaklaştırılarak, 1,5 mL süpernatant alınarak 150 µL %5'lik Ti(SO₄)₂ (titanyum disülfat) ve sonra 0,3 mL %19'luk NH₄OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılmıştır. Oluşan karışım 10.000 x g'de 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Pellet 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ içinde çözülerek iyice karıştırılmıştır. Son karışımın absorbansı 415 nm'de ölçülmüştür. Blank olarak 1,5 mL asetonla aynı işlemler yapılarak ölçülen değerdir. H₂O₂ içeriğinin hesaplanması için yöntemine uygun olarak sırasıyla 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 40 µg H₂O₂ içeren seri çözeltiler hazırlanmış ve bu seri çözeltiler kullanılarak elde edilen standart grafik örneklerdeki H₂O₂ içeriğinin hesaplamak için kullanılmıştır. Sonuçlar gr kallus başına düşen H₂O₂ miktarı (µg/gr kallus) olarak sunulmuştur (Şekil 3.4.5) (Hao et al. 2014).



Şekil 3.3. H₂O₂ standart grafiği

3.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM)

Her bir *M.sativa* kalluslarından alınan her örnekler 0,05 M tamponda (0,2 M Na₂HPO₄, 0,2 M NaH₂PO₄) 25 °C'de 1 saat, fiksatif tamponunda (0,05 M tampon, 3% lük glutaraldehit) 2 saat bekletilmiştir. Buz üzerinde 0,05 M tamponda 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra steril saf suda 30 dakika bekletilmiştir. Sırasıyla %10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 ve %100 etilalkolde 25 °C 15 dakika

bekletilmiştir (Fowke 1995). Görüntüleme YUTAM (Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi)'da bulunan Quante FEG 250 (ZEISS) markalı mikroskop ile yapılmıştır.

3.6. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (CLSM)

Mikrotomla kesit alma: Her bir *M.sativa* ekotip kallusları 10% formaldehitte 3 gün bekletilmiştir. 1 gece musluk suyunda yıkamaya bırakılıp, sırasıyla %70, 80, 96'lık etil alkolde, absol-I, absol-II, ksilol-I, ksilol-II 'de 1 saat bekletilmiştir. Parafilm gömülüp, Leica RM 2.125 RT mikrotomla (Atatürk Üniversitesi Veterinerlik bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından kesit alınmıştır) 6 µm kalınlığında kesit alınarak lamaların üzerine kesitler aktarılmıştır. Slaytlar 25 °C 'de saklanmıştır (Wallington 1979).

Slaytların boyanması: CaO NP'e özgü Rhodamine B (N-[9-2-karboksifenil-6-(dietilamino)-3H-ksanten-3-iliden]-N-etiletanaminium klorür) boyama yapılmıştır. Atatürk üniversitesinde DAYTAM (Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi)'da bulunan Lazer taramalı konfokal mikroskobunda (Nikon Eclips TE2000) görüntü alınmıştır (Tang et al. 2013).

3.7. mtr-miR159 ve mtr-miR393 Gen İfadelerindeki Değişikliğin RT-qPCR ile Değerlendirilmesi

Kuraklık stresine maruz bırakılan bazı yerel yonca çeşitlerinin kalluslarına CaO NPs ve GO uygulamalarının mtr-miR159 ve mtr-miR393 gen ifadelerindeki değişikliğin hesaplamak amacıyla iki aşamalı qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak RNA izolasyonu yapılmıştır:

RNA izolasyonu: Her bir dozda muamele edilen *M.sativa* kalluslarından 0,3 gram kallus örneği tartılmıştır. Her dozda uygulanan kallus örneğinden 500 µL Trizolle homojenize edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletip, 100 µL kloroform eklenip yavaş şekilde ters düz edilmiştir. Daha sonra örnekler 3 dakika oda sıcaklığında bekletip 12000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmından 250 µL alınıp

3. MATERYAL ve YÖNTEM

üzerine 250 µL izopropanol eklenerek nazikçe 10 kez ters düz edilmiştir. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilip 12.000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet kısmına %70 etanolden 1 mL eklenip 7.500 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet kısmına 50 µL RNaz Free eklenerek saf suda çözündürüp -20 °C'de muhafaza edilmiştir. RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) belirlenmiştir (Ma et al. 2015).

cDNA sentezi ve RT-qPCR: mtr-mRi159 ve mtr-miR393 için cDNA sentezi mikroRNA spesifik primerleri mirBase programı kullanılarak tasarlanmıştır (Çizelge 3.3) (Chen et al. 2005).

Çizelge 3.3. mtr-mRi159, mtr-miR393 ve 6U primer dizisi

mtr-miR159

Stem Loop GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAGAGC
Forward (5'-3') ACTGGGTTTGGATTGAAGGGAGC
Reverse (3'-5') CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

mtr-miR393

Stem Loop GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGATCAA
Forward (5'-3') ACCGGTCCAAAGGGATCGCA
Reverse (3'-5') CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

6U

Forward (5'-3') CGATAAAATTGGAACGATACAGA
Reverse (3'-5') ATTTGGACCATTTCTCGATTTGT

cDNA sentezi Hdrya kiti (5X buffer, dNTP, primerler, Cdna RTaz ve su) kullanılarak üretici firmanın protokollerine göre gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4). PCR

3. MATERYAL ve YÖNTEM

koşulları ise, 25 °C’de 10 dakika, 50 °C ‘de 30 dakika, 85 °C ‘de 5 dakika, 4 °C’de ∞ toplam 47 dakikada tamamlanmıştır. PCR’den sonra dimer oluşumu engellenmesi için 60 µL otoklavlanmış distile su ilave edilmiştir.

Çizelge 3.4. Hidra kitinin protokolü

İçeriği	Hacim
5X Buffer	4 µL
dNTP	1 µL
Primerler (Stem loop)	1 µL
cDNA RTaz	1 µL
Su ve RNA (500 ng/ µL)	Değişken
Total	20 µL

mtr-miR159 ve mtr-miR393’in ekspresyon analizi için 5x HOT FIREPol EvaGREEN qPCR Süpermiks ticari kiti kullanılmıştır (Şekil 4.5). RT-qPCR şartları, 95 °C’de 15 saniye, 58 °C ‘de 20 saniye ve 72 °C’de 20 saniye 40 döngüde toplam 92 dakikada tamamlanmıştır. RT-qPCR, RotorGene (Qiagen) gerçek zamanlı termal döngü cihazında, standart parametreler kullanılarak yürütülmüştür. Her deney üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır ve ekspresyon seviyesindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak değerlendirilmiştir (Chen et al. 2005).

Çizelge 3.5. 5x HOT FIREPol EvaGREEN qPCR Süpermiks kitinin protokolü

İçeriği	Hacim	Final Konsantrasyon
5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Süpermiks	2 µL	1x
Primer Forward (6U, mtr-miR159, mtr-miR393) (10 pmol/ µL)	0,2 µL	100 mM
Primer Reverse (10 pmol/ µL)	0,2 µL	100 mM
cDNA	2 µL	500 ng/ µL
H ₂ O	5,6 µL	
Total	10 µL	

3.8. İstatistiksel Analiz

3. MATERYAL ve YÖNTEM

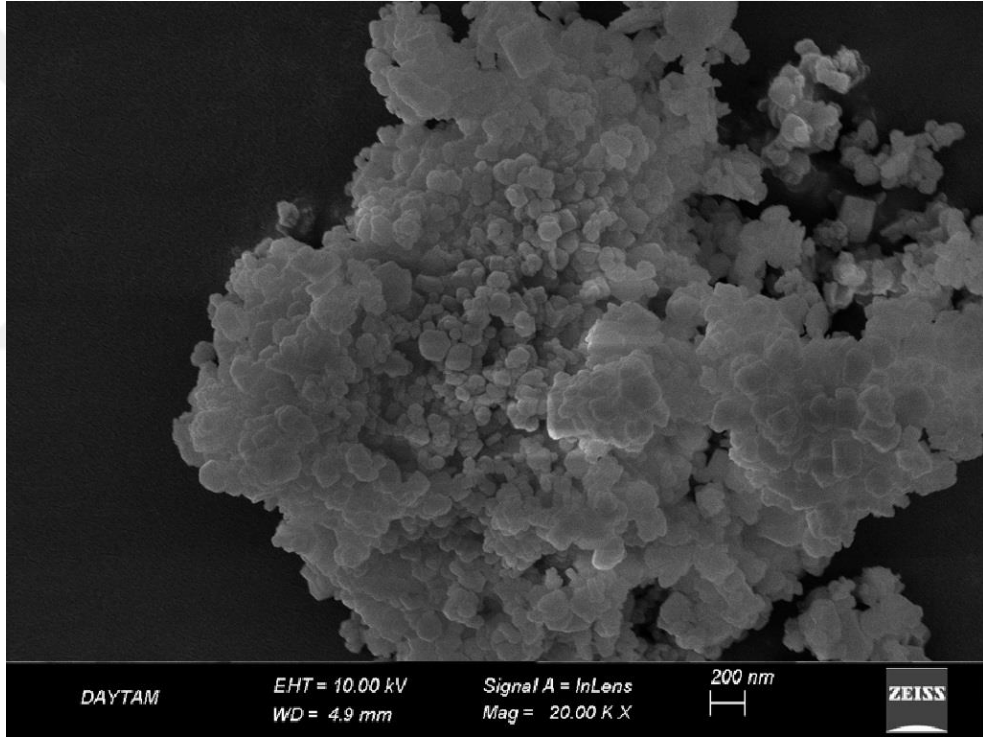
Proje deneme planı 3 tekerrürlü olarak 2 örnek üzerinden yapılacak sonuçların karşılaştırılması, SPSS 22.0 paket programı kullanılarak çift yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış, $P < 0.05$ önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

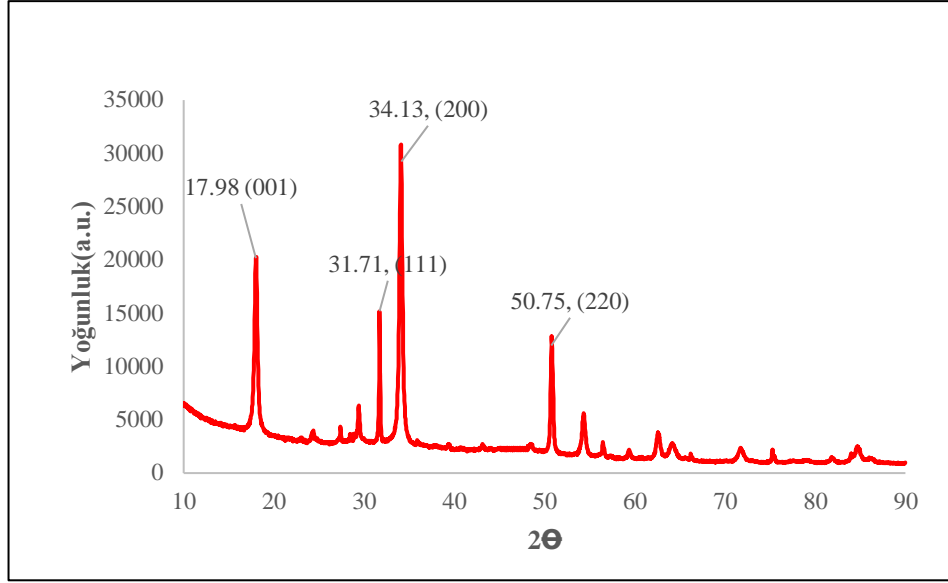
4.1. CaO NPs'nin ve GO'ların Yapısal Karakterizasyonu

CaO NPs hidrotermal sentez yöntemini kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen CaO NPs'in yüzey morfolojisi, Zeiss marka Sigma 300 model SEM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de verilen SEM görüntülerinden CaO NPs'in 66-145 nm arasında değişen bir parçacık boyutuna sahip olduğu görülmektedir. CaO'nun SEM görüntüleri, sentezlenen CaO NPs gözenekli olduğunu, fazla topaklanma yapmadığını ve çok katmanlı bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



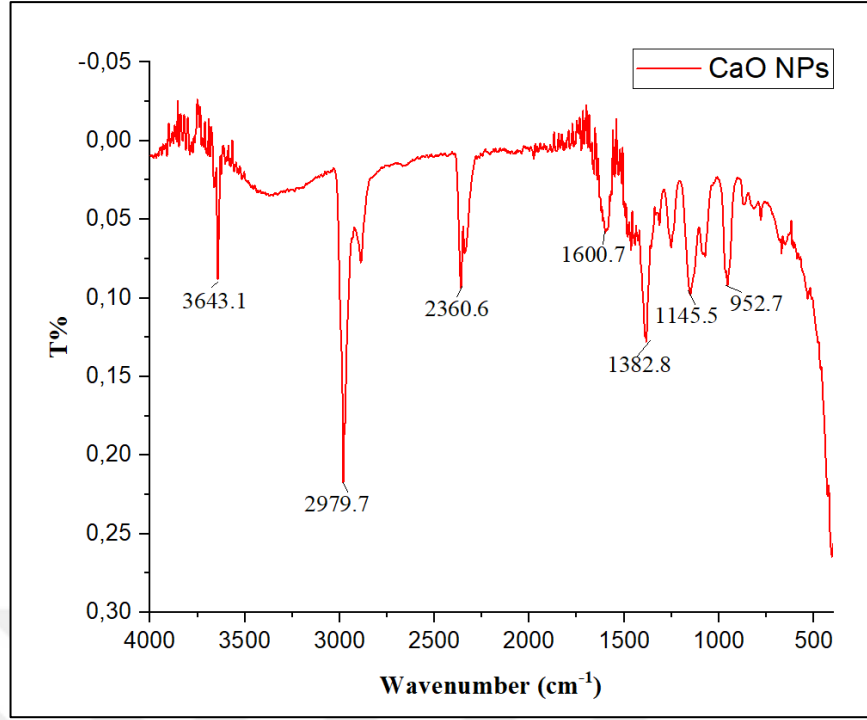
Şekil 4.1. CaO NPs'nin SEM görüntüsü

CaO NPs yapısının XRD analizi spektrumu Şekil 4.2'te gösterilmiştir. 17,98° (001), 31,71° (111), 34,13° (200), 50,75° (220), Ca(OH)₂ birimleri ile CaO NPs göstermektedir.



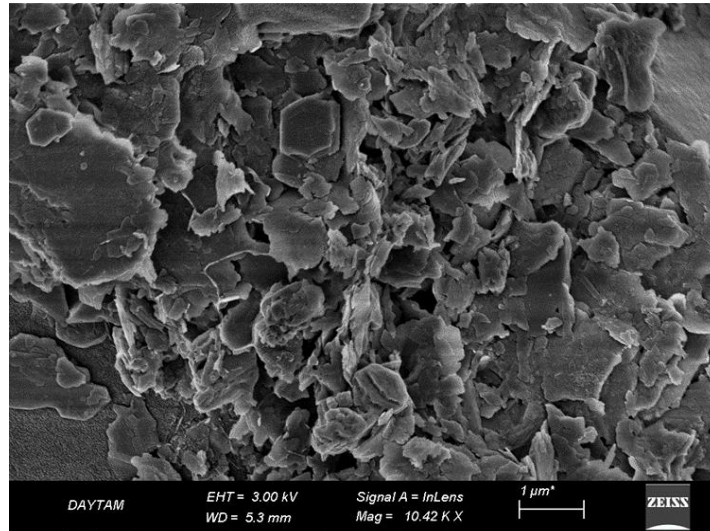
Şekil 4.2. CaO NPs yapısının XRD analizi spektrumu

CaO NPs ait F-TIR grafiği Şekil 4.3’de verilmiştir. 3643-3450 cm^{-1} civarındaki yayvan pik CaO NPs yapısındaki su yapısına ait olan -O-H gruplarına aittir. 952 cm^{-1} de yer alan güçlü IR absorpsiyon bandının görünümü, CaO'nun kafes titreşimlerine bağlanabilir. 1.382 cm^{-1} ve 1.600 cm^{-1} 'deki IR absorpsiyon bantları, özdeş olmayan karbonatın simetrik gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Bunun nedeni, kalsinasyon sırasında CaO'nun yüksek oranda reaktif yüzey alanının havaya maruz kalmasıdır ve CaO yüzeyindeki -OH ile beraber karbonat türleri şekline dönüşmesi şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.3. CaO NPs'nin FT-IR grafiği

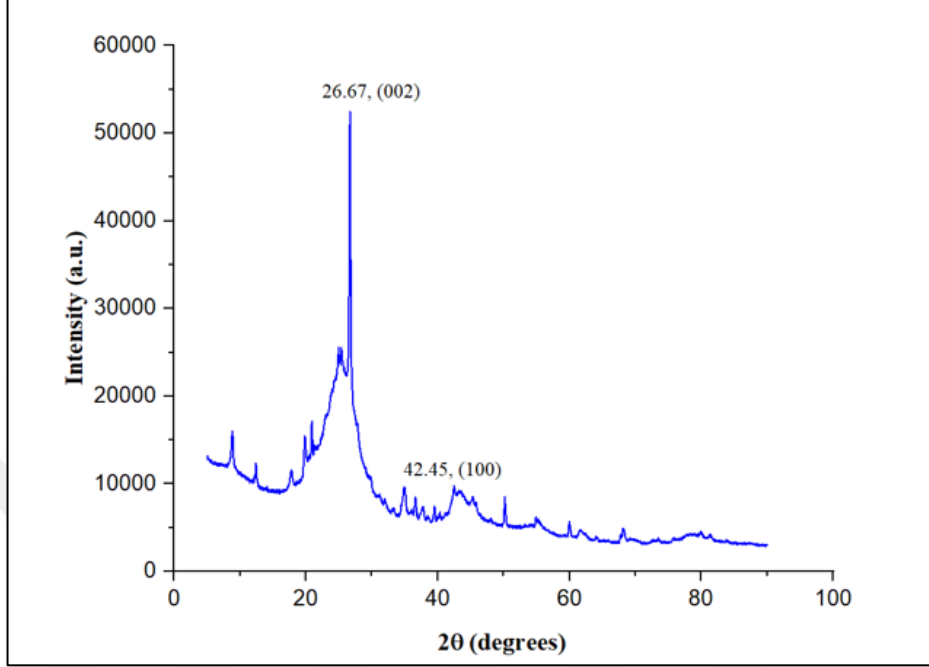
GO hummers yöntemiyle elde edilmiştir. GO, SEM cihazı ile 1 μm (10,42kx) yakınlştırılarak katmanlı GO yapılarının görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.4). SEM görüntüsünde tabakalı haldeki GO yapılarının birkaç katman ile bazen de dağınık halde üst üste binmiş olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4. Sentezlenen GO 'nun SEM görüntüsü

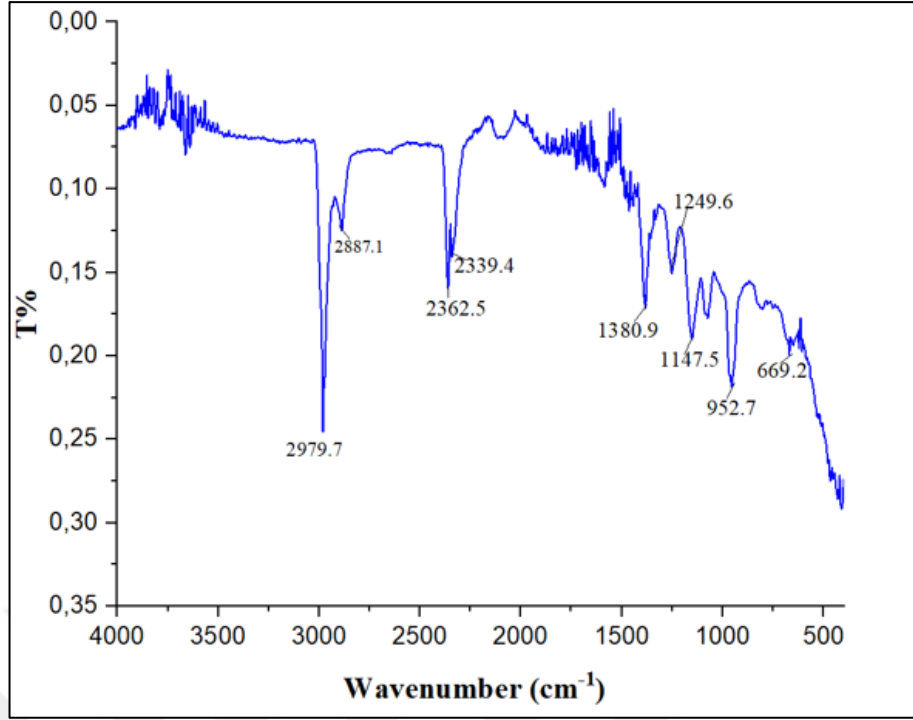
GO ve grafen nano levhaların XRD deseni Şekil 4.5'de gösterilebilir. Yapı içerisinde $26,67^\circ$ de yer alan pik (002) yapısı ile karakterize edilen grafitte aittir. $11,6^\circ$

civarında yer alan pik GO işaret etmektedir. GO tabakalar arasimesafenin artması karbon tabakası yapısında yer alan oksijen fonksiyonel gruplarının ve su moleküllerinin bulunmasını işaret etmektedir. Ayrıca $23,9^\circ$ ve $26,5^\circ$ GO'nun oksijen atomları ile tam olarak birbirine bağlı olmadığını göstergesidir.



Şekil 4.5. Grafen oksit yapısının XRD analizi spektrumu

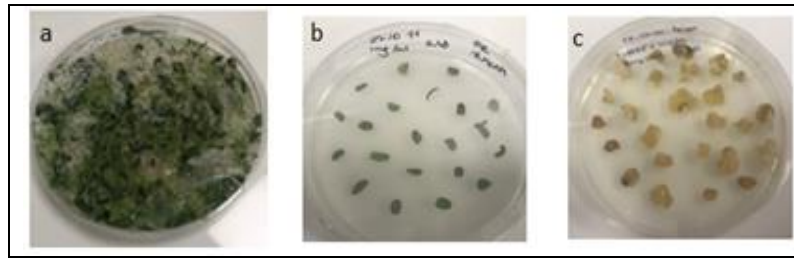
GO'nun FTIR spektrumu Şekil 4.6'da verilmiştir. 3.000 cm^{-1} civarında yer alan pik deoksijenizasyon nedeniyle azaltılmış olan indirgenmiş GO yapısında yer alan -OH gruplarına ait olan gerilme pikine aittir. 1.700 cm^{-1} de yer alan pik C=O yapısındaki gerilmeleri gösterirken, 1.150 cm^{-1} civarında yer alan pik iâşe grafen yapısında yer alan C-O gerilme piklerine aittir. $1.200\text{-}1.060$ aralığında yer alan zirveleroksitlenmemiş grafitik iskelet yapısını gösteren bağ titreşimlerine aittir.



Şekil 4.6. Sentezlenen GO'nun FT-IR grafiği

4.2. Kallus Oluşumu

Yoncanın Erzurum ve Konya ekotiplerine ait tohumları standart MS ortamına ekilerek 3 hafta rejenere edilmiştir. Rejenere edilen yonca yaprakları oksin (2,4-D) ve sitokininli (kinetin) ortamda kallus oluşumu için 4 hafta bekletilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *M. sativa* (Erzurum ve Konya) a: rejenerasyon, b: yaprak eksplantı ve c: kallus oluşumu.

4.2.1. Kalluslara kuraklık ve nanopartikül uygulamaları

Çalışmamızda yoncanın her iki çeşidi için kuraklık koşulları mannitole sağlanmıştır. Bunun için her iki kallus koşulları metodlarda açıklandığı şekilde 50 ve 100

mM mannitole maruz bırakılmıştır. CaO NPs ve GO ise 0,5 ile 1,5 ppm uygulanmıştır. Uygulamalardan elde edilen bulgular aşağıda değerlendirilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Oluşan kallus görüntüsü

4.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

İki farklı yerel yonca ekotiplerinde fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin belirlenmesi için en az 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.9, 10, 11). Erzurum için kuru/yaş ağırlığı 0,114 ile 0,062 gr arasında değişiklik göstermiştir. Kuraklık stresi arttıkça kuru/yaş ağırlıkta azalma meydana gelmiştir. Erzurum ekotipi için en olumlu etkiyi gösteren uygulama 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO (0,114 gr) olmuştur. CaO NPs ve GO uygulamalarının kuru ağırlık üzerinde iyileştirici etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Kuraklık stresi koşullarında (mannitol uygulaması) kontrolle kıyaslandığında, prolin konsantrasyonunda artış olurken, çözünebilir şeker konsantrasyonunda azalış olmuştur. Tek başına kuraklığa kıyasla, CaO NPs ile GO+ mannitol uygulamaları, prolin ve suda çözünebilir şeker konsantrasyonu üzerinde olumlu bir etki göstermiştir. Prolin içeriği 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO (0,968 µg/g YA), suda çözünebilir şeker miktarında ise 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs (0,398 mg/g YA) ve 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO (0,271 mg/g YA) uygulamasında olumlu etkileri olmuştur (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.9, 10, 11).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.1. Erzurum ekotipinde kuru/yaş ağırlık, prolin ve çözünebilir total şeker miktarında meydana gelen değişimler.

Uygulamalar	Erzurum		
	Kuru/Yaş Ağırlık (gr)	Prolin (µg/gr YA)	Çözünebilir şeker (mg/gr YA)
1	0,093±0,0009^d	0,906±0,06776^e	0,480±0,01375^b
2	0,072±0,00006 ^g	0,421±0,06776 ^e	0,560±0,01235 ^a
3	0,062±0,00006 ^f	1,537±0,08270 ^b	0,127±0,00088 ^e
4	0,093±0,00006 ^d	2,216±0,08061 ^a	0,222±0,00987 ^{cd}
5	0,091±0,00088^e	1,130±0,00577^{cd}	0,123±0,01126^e
6	0,091±0,00058 ^e	1,347±0,07196 ^{bc}	0,398±0,01900 ^b
7	0,114±0,00058 ^a	1,151±0,11516 ^{cd}	0,088±0,03550 ^e
8	0,084±0,00006^f	1,244±0,1634^c	0,199±0,01844^d
9	0,107±0,00006 ^b	1,313±0,07559 ^{bc}	0,022±0,01229 ^f
10	0,104±0,00003 ^c	1,505±0,06096 ^b	0,185±0,00491 ^d
11	0,106±0,00006 ^b	0,968±0,04917 ^{ef}	0,271±0,02053 ^c

*Veriler ortalama ± SE (n = 3) olarak rapor edilmiştir. Farklı küçük harfler, $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farkı göstermektedir. YA: yaş ağırlık

**1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/ 1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /1,5 ppm GO

Konya için kuru/yaş ağırlığı 0,053 ile 0,128 gr arasında değişiklik göstermiştir. Kuraklık stresi artıka ve kontrolle kıyaslandığında kuru/yaş ağırlığında azalış olduğu gözlemlenmiştir. Konya ekotipinde için en olumlu etkiyi gösteren uygulama 100 mM mannitol/ 1,5 ppm GO'dır (0,128 gr). Hem CaO NPs'nın hem de GO'nun olumlu etkisi vardır. Kuraklık stresi kontrolle kıyaslandığında, prolin konsantrasyonu artırırken, suda çözünebilir şeker konsantrasyonu azaltmıştır. Bununla birlikte CaO NPs ile GO stres faktörü kontrolle kıyaslandığında prolin ve suda çözünebilir şeker konsantrasyonu üzerinde olumlu bir etki yapmıştır. Prolin konsantrasyonunda 100 mM mannitol/ 1,5 ppm GO (0,989 µg/g YA), suda çözünebilir şeker miktarında ise 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs (0,470 mg/g YA) uygulamasında olumlu etkileri olmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.9, 10, 11).

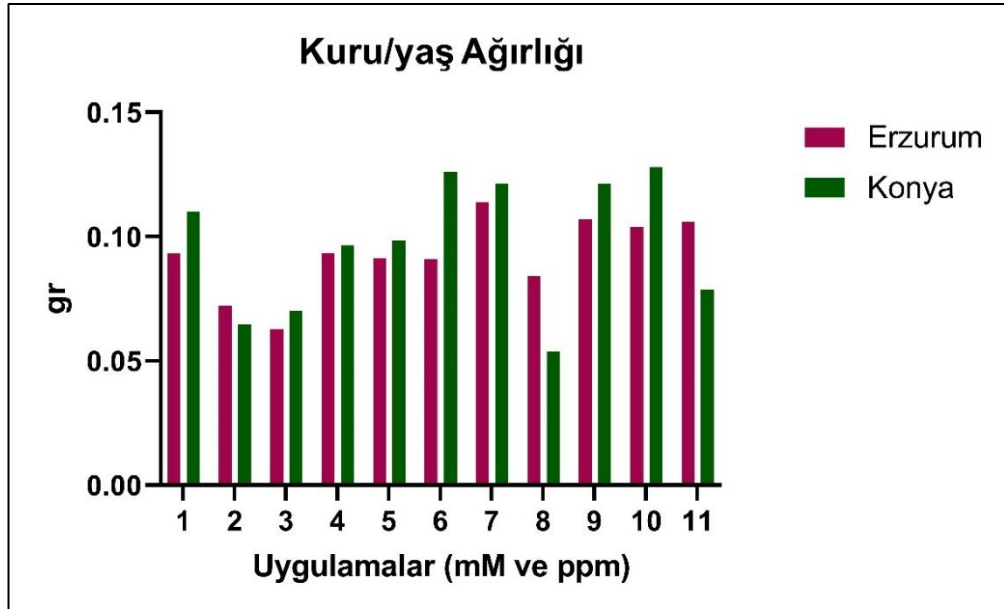
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.2. Konya ekotipinde kuru/yaş ağırlık, prolin ve çözünebilir total şeker miktarında meydana gelen değişimler.

Uygulamalar	Konya		
	Kuru/Yaş Ağırlık (gr)	Prolin (µg/g YA)	Çözünebilir şeker (mg/g YA)
1	0,110±0,00058 ^d	0,790±0,09433 ^d	0,712±0,02339 ^a
2	0,064±0,00006 ^j	1,1814±0,03211 ^a	0,3180±0,01039 ^d
3	0,070±0,00045 ⁱ	0,924±0,04305 ^{cd}	0,040±0,00033 ^g
4	0,096±0,00003 ^f	1,047±0,06482 ^{bc}	0,384±0,00231 ^e
5	0,098±0,00004 ^e	1,078±0,06718 ^{bc}	0,132±0,00473 ^f
6	0,126±0,00058 ^b	1,132±0,02555 ^b	0,042±0,00173 ^g
7	0,121±0,00034 ^c	0,160±0,01528 ^b	0,051±0,04040 ^g
8	0,053±0,00115 ^k	1,050±0,05393 ^{bc}	0,151±0,000088 ^f
9	0,121±0,00042 ^c	1,004±0,03345 ^{bc}	0,470±0,00529 ^b
10	0,128±0,00055 ^a	0,989±0,05045 ^{bc}	0,133±0,000052 ^e
11	0,078±0,00003 ^g	1,129±0,03179 ^b	0,262±0,00145 ^e

*Veriler ortalama ± SE (n = 3) olarak rapor edilmiştir. Farklı küçük harfler, $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farkı göstermektedir.

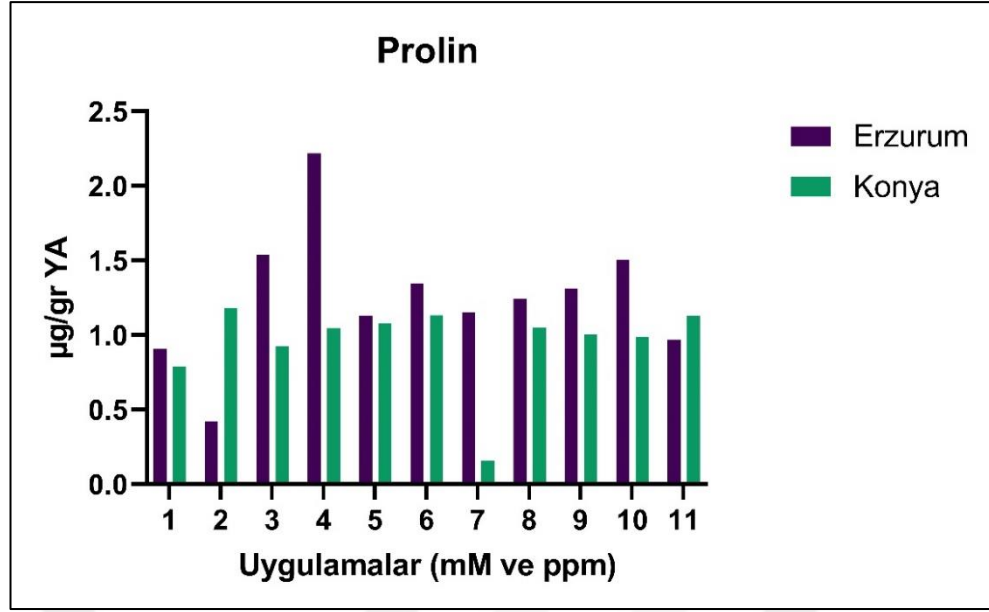
**1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1.5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO



Şekil 4.9. *M. sativa* yerel ekotiplerinde (Konya ve Erzurum) kuru/yaş ağırlık oranı

***Konya** 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO

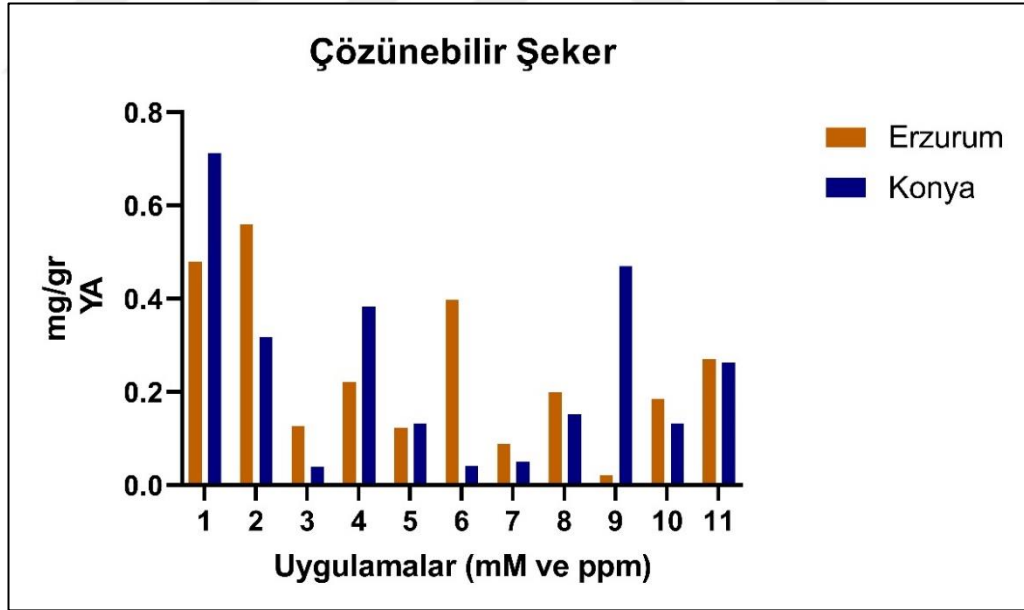
****Erzurum** 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO



Şekil 4.10. *M. sativa* yerel ekotiplerinde (*Konya* ve *Erzurum*) prolindeki değişimi

Konya 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO

Erzurum 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/ 1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /1,5 ppm GO.



Şekil 4.11. *M. sativa* yerel ekotiplerinde (*Konya* ve *Erzurum*) çözünebilir şeker miktarındaki değişimi.

Konya 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO

Erzurum 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/ 1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /1,5 ppm GO

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kuraklık stresine maruz kalan Erzurum ve Konya yerel ekotiplerinde kontrolle karşılaştırıldığında MDA ve H₂O₂ konsantrasyonu yükselmiştir. Fakat, CaO NPs ve GO uygulandığında ise MDA ve H₂O₂ konsantrasyonu düşmüştür. Erzurum çeşidinde MDA seviyesi 0,330 ile 0,968 nmol/mL değerleri arasında değişiklik göstermiştir. Erzurum ekotipi için MDA konsantrasyonun en düşük olduğu uygulama 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO (0,330 nmol/mL)'dır. H₂O₂ konsantrasyonu ise 0,0276 ile 0,1095 µg/gr arasında değişiklik göstermiştir. H₂O içeriği ise en düşük konsantrasyonu 100 mM mannitol/1,5 ppm GO (0,027 µg/gr)'dır. Kuraklık stresi kontrolle kıyaslandığında önemli farklılıklar görülmüştür (Çizelge 4.3 ve şekil 4.12, 13).

Çizelge 4.3. Erzurum yerel ekotipinde MDA ve H₂O₂ miktarında meydana gelen değişimler.

Uygulamalar	Erzurum	
	MDA (nmol/mL)	H ₂ O ₂ (µg/gr)
1	0,446±0,02863^{cd}	0,071±0,00092^{cd}
2	0,443±0,02609 ^{cd}	0,031±0,00100 ^{fg}
3	0,591±0,01863 ^{bc}	0,070±0,00040 ^{cd}
4	0,590±0,00577 ^{bc}	0,068±0,00102 ^d
5	0,724±0,03797^{bc}	0,075±0,00100^c
6	0,498±0,01424 ^{cd}	0,091±0,00153 ^b
7	0,330±0,03080 ^d	0,035±0,00181 ^f
8	0,968±0,02110^a	0,087±0,00236^b
9	0,422±0,02876 ^{cd}	0,027±0,00219 ^g
10	0,598±0,01978 ^{bc}	0,109±0,00050 ^a
11	0,624±0,02397 ^{bc}	0,054±0,00124 ^e

Veriler ortalama ± SE (n = 3) olarak rapor edilmiştir. Farklı küçük harfler, $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farkı göstermektedir.

1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1.5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /0.5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1.5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/ 1 ppm CaO NPs/0.5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /1.5 ppm GO

Kuraklık stresine maruz bırakılan Konya ekotipinde MDA 0,3357 ile 0,640 nmol/mL arasında değişiklik göstermiştir. MDA konsantrasyonu en düşük değerini gösteren uygulama 50 mM mannitol/0,5 ppm GO (0,335 nmol/mL)'dır. H₂O₂

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

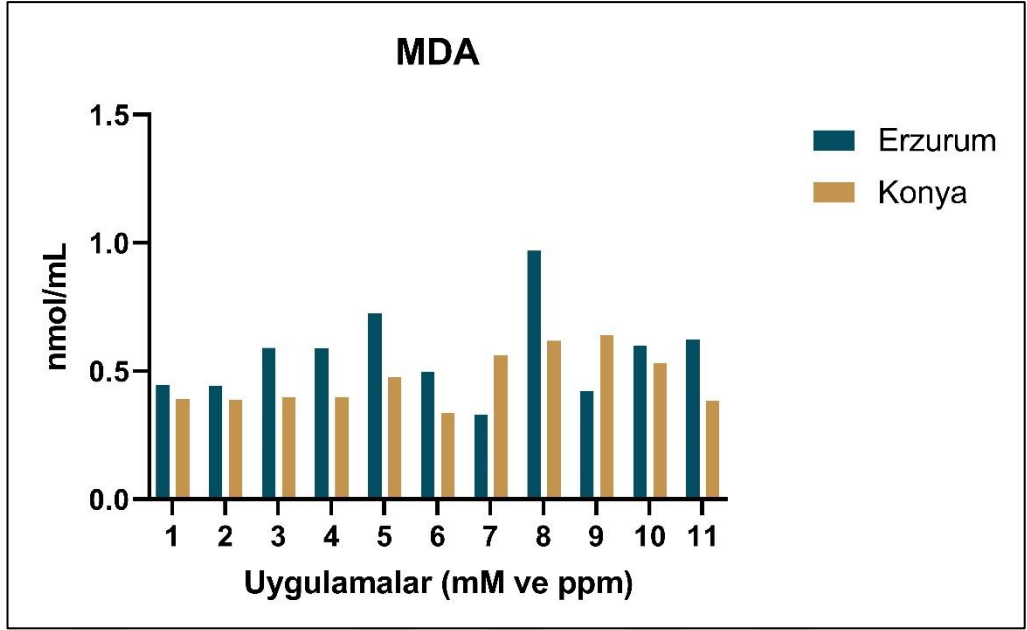
konsantrasyonu ise 0,014 ile 0,096 µg/gr arasında değişiklik göstermiştir. En düşük konsantrasyon 50 mM mannitol/0.5 ppm GO (0,014 µg/gr) uygulamasıdır (Çizelge 4.4 ve şekil 4.12, 13). H₂O₂ ve MDA bakıldığında en iyi sonucu veren **Erzurum ekotipinde için 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, Konya ekotipinde için ise 50 mM mannitol/0.5 ppm GO'dır.**

Çizelge 4.4. Konya yerel ekotipinde MDA ve H₂O₂ miktarında meydana gelen değişimler.

Uygulamalar	Konya	
	MDA (nmol/mL)	H ₂ O ₂ (µg/gr)
1	0,390±0,01000^e	0,079±0,00395^{ab}
2	0,388±0,05001 ^e	0,037±0,00283 ^c
3	0,398±0,05391 ^e	0,063±0,00064 ^b
4	0,398±0,08503 ^e	0,015±0,00015 ^d
5	0,475±0,05012^d	0,089±0,00000^a
6	0,335±0,02910 ^e	0,014±0,00192 ^d
7	0,562±0,03125 ^{bc}	0,066±0,00300 ^b
8	0,617±0,02170^{ab}	0,096±0,00100^a
9	0,640±0,01000 ^a	0,024±0,00017 ^{cd}
10	0,532±0,01634 ^{cd}	0,086±0,00651 ^a
11	0,384±0,02872 ^e	0,076±0,00252 ^{ab}

Veriler ortalama ± SE (n = 3) olarak rapor edilmiştir. Farklı küçük harfler, $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farkı göstermektedir.

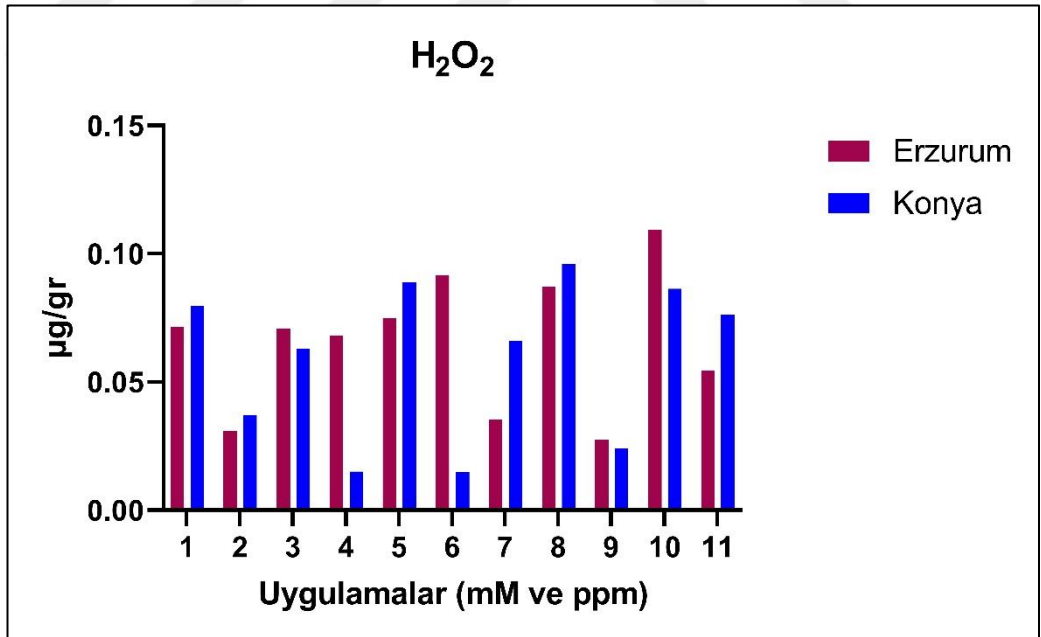
1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO



Şekil 4.12. *M. sativa* yerel ekotiplerinde (Konya ve Erzurum) MDA'daki değişimi

Konya 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO

Erzurum 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/ 1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /1,5 ppm GO



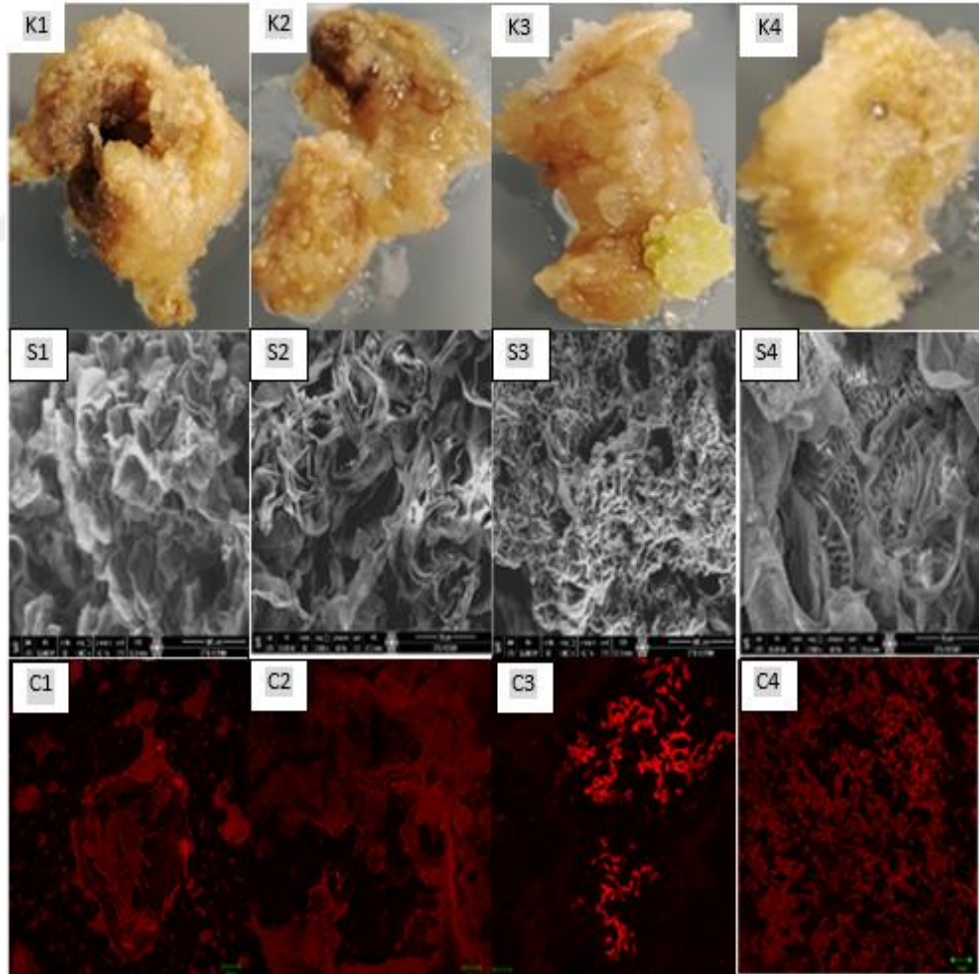
Şekil 4.13. *M. sativa* yerel ekotiplerinde (Konya ve Erzurum) H₂O₂'daki değişimi

Konya 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO

Erzurum 1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/ 1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs /1,5 ppm GO

4.4. SEM ve CLSM Analizi

In vitro koşullarda kuraklık stresine maruz kalan *M. sativa* kalluslarda, CaO NPs ve GO uygulanarak kallus, SEM ve CLSM görüntüleri alınmıştır. Böylece CaO NPs ve GO yoncanın embriyogenik kallus oluşumu ve Ca^{2+} hücreler tarafından alındığını gösterilmiştir. Erzurum yerel ekotipinde kontrolle kıyaslandığında 1,5 ppm GO kallusda kararmayı ve nekrozisi azaltmıştır (Şekil 4.14 K1, K3). SEM görüntüsünde, kontrol ve Ca bulunmayan membransı yapılara daha çok rastlanmıştır (Şekil 4.14S1, S2). 2 ppm CaO NPs'nin ipliksi yapıların yoğun olduğu, 1,5 ppm GO ise küresel yapılar gözlemlenmiştir (Şekil 4.14S3, S4). CLSM görüntüsünde, Ca^{2+} birikimi kontrolle kıyaslandığında en çok 2 ppm CaO NPs'de en az ise Ca noksanlığında ve 1,5 ppm GO gözlemlenmiştir (Şekil 14C1,2,3,4).

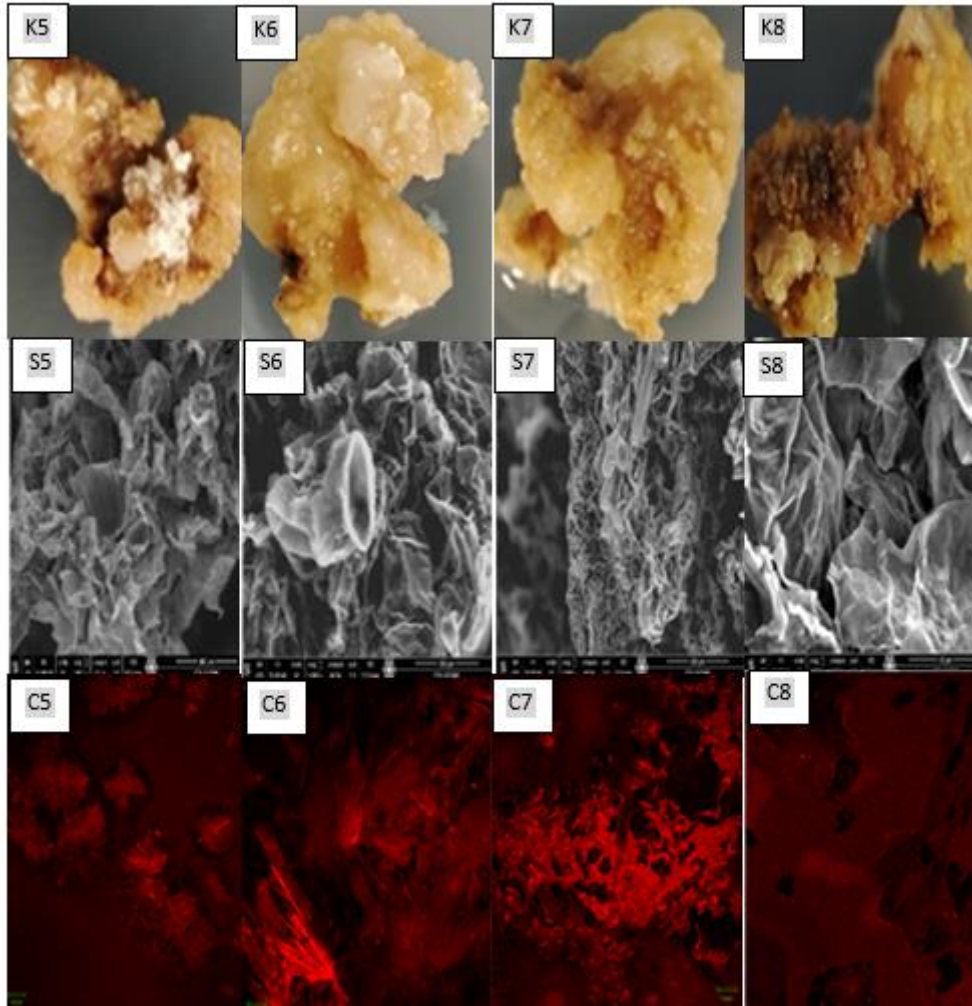


Şekil 4.14. Erzurum ekotipinde kallus, SEM ve CLSM görüntüleri (K: kallus, S: SEM, C: CLSM).

K1, S1, C1: Kontroller; K2, S2, C2: Ca-; K3, S3, C3: 2 ppm CaO NPs; K4, S4, C4: 1,5 ppm GO.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kallus görüntüsünde, 50 ile 100 mM mannitol uygulaması kıyaslandığında 100 mM mannitolde kararma ve nekrozise daha çok rastlanmıştır (Şekil 4.14K5, 8). 50 mM mannitolde 1 ppm CaO NPs ve 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO konsantrasyonunun iyileştirici etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.14K6, 7). SEM görüntüsünde, 50 mM mannitol ve 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs membran ve küresel (globular) yapılara rastlanmıştır (Şekil 4.14S5,6). 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO iplikli yapılara rastlanırken, 100 mM mannitolde amorf yapılar gözlemlenmiştir (Şekil 4.14S7, 8). CLSMde, Ca^{2+} birikimi en çoktan aza doğru, 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 50 mM mannitol ve 100 mM mannitoldur (Şekil 4.14C5,6,7,8).

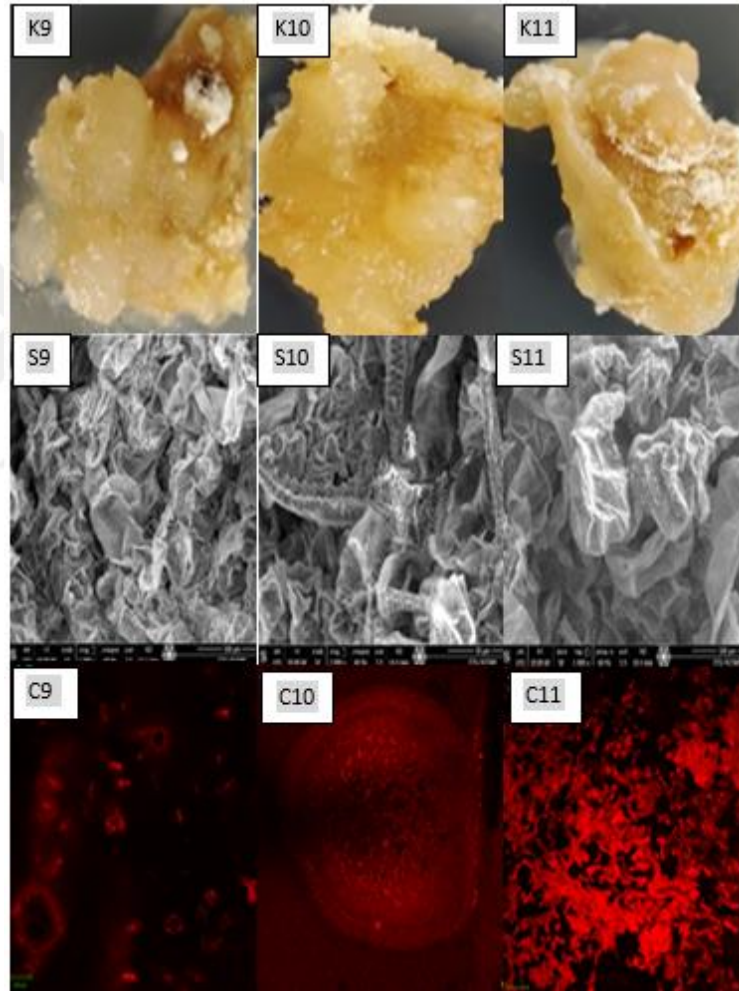


Şekil 4.14. (Devam)

K5, S5, C5: 50 mM mannitol; K6, S6, C6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs; K7, S7, C7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO; K8, S8, C8: 100 mM mannitol.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kallus görüntülerinde, kuraklık stresinin en yüksek konsantrasyonu olan 100 mM mannitol uygulamasında CaO NPs ve GO uygulamalarında iyileştirici etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.14K9, 10, 11). SEM görüntülerine bakıldığında, 100 mM mannitol/1,5 ppm GO ve 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO küresel (globular) yapıya rastlanırken, 100 mM mannitol/1ppm CaO NPs/0,5 ppm GO ipliksi ve kıvrımlı yapıya rastlanmıştır (Şekil 4.14S9, 11, 10). CLSMde Ca²⁺ birikimi en çoktan aza doğru 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO, 100 mM mannitol/1ppm CaO NPs/0,5 ppm GO ve 100 mM mannitol/1,5 ppm GO'dir (Şekil 4.14C9, 10, 11).



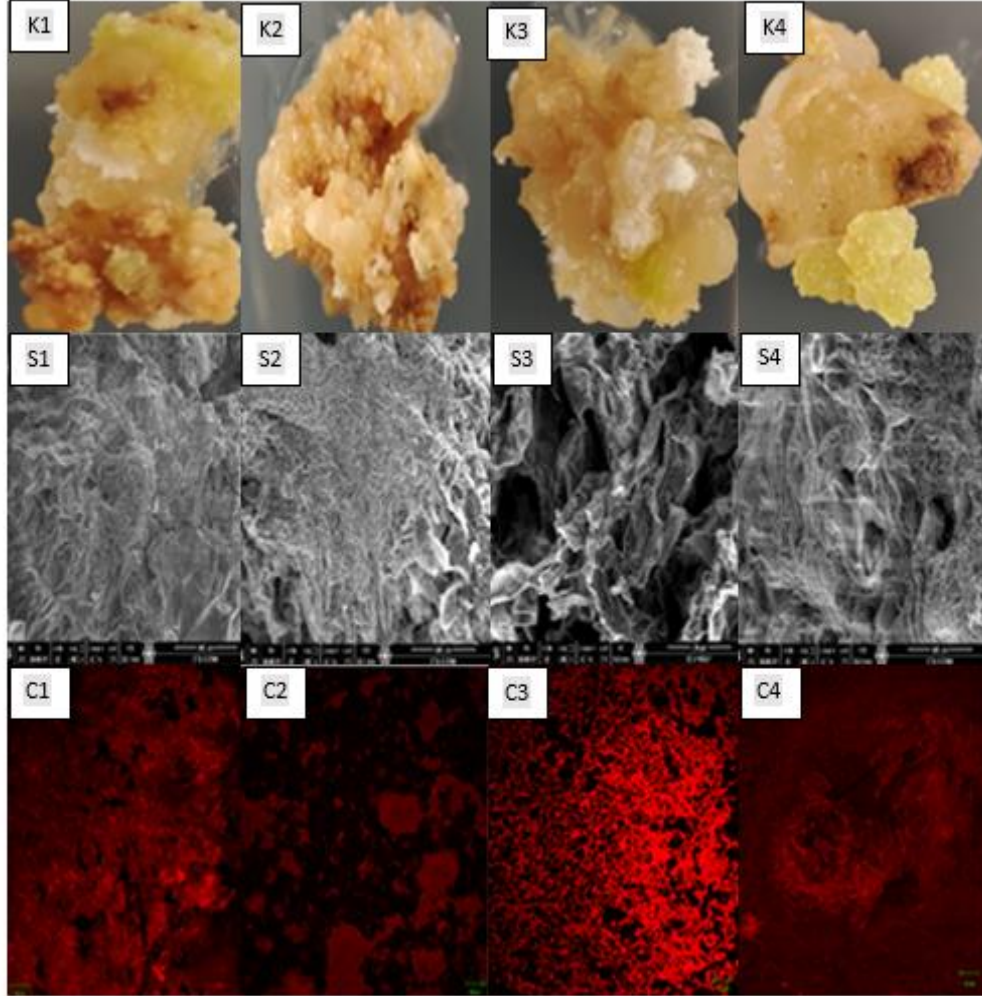
Şekil 4.14. (Devam)

K9, S9, C9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO; K10, S10, C10: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO; K11, S11, C11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO.

Konya yerel ekotipinde kallus görüntülerine bakıldığında CaO NPs ve GO embriyogenik kallus oluşumunun başlamasını indüklenmiştir (Şekil 4.15K3, 4). Ca bulunmayan kallus örnekleri kontrolle karşılaştırıldığında nekrozis ve kahverengi bir yapı

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

gözlemlenmiştir (Şekil 4.15K2,1). SEM görüntüsünde, kontrol ve Ca bulunmayan kallus örnekleri oldukça kompakt yapıya sahiptir. 2 ppm CaO NPs kallus küresel (globular) yapıya rastlanırken, 1,5 ppm GO de ise hem kompakt yapı hem de membransı yapıya rastlanmıştır (Şekil 4.15S1, 2, 3, 4). CLSM görüntüsünde, kontrolle kıyaslandığında Ca^{2+} birikimi en çok 2 ppm CaO NPs, en az ise Ca bulunmayan kallus örneklerinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.15C1, 2, 3, 4).



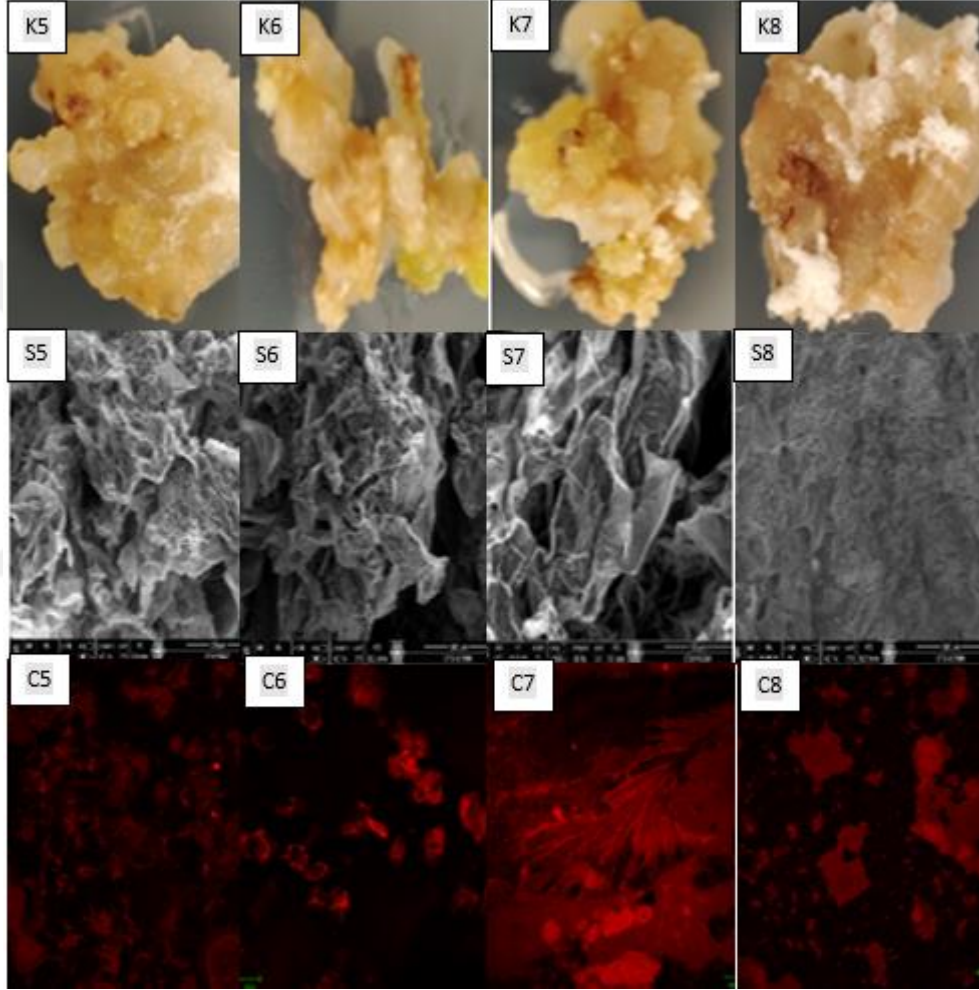
Şekil 4.15. Konya ekotipinde kallus, SEM ve CLSM görüntüleri (K: Kallus, S: SEM, C: CLSM).

K1, S1, C1: Kontrol; K2, S2, S2: Ca-; K3, S3, C3: 2 ppm CaO NPs; K4, S4, C4: 1,5 ppm GO.

Konya ekotipinde kallus görüntülerine bakıldığında kuraklık stresi artııkça nekrozis ve kahverengi yapıların artığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15K1, 4). Kuraklık etkisini tolere eden 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO ile 50 mM mannitol/0,5 ppm GO uygulamasıdır (Şekil 4.15K6, 7). SEM görüntüsünde, 50 mM

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 GO uygulamasında amorf ve 100 mM mannitol uygulamasında çok yoğun bir kompakt yapıya sahiptir (Şekil 4.15S7, 8). Kontrol ve 50 mM mannitol/0,5 ppm GO uygulamalarındaki küresel (globular) yapılar birbirine benzerdir (Şekil 4.15S5, 6). CLSM görüntülerinde ise, en fazla Ca^{2+} birikimi 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 GO ve 50 mM mannitol/0,5 ppm GO gözlemlenirken, en az ise 50 ve 100 mM mannitolda gözlemlenmiştir (Şekil 4.15C5, 6, 7, 8).



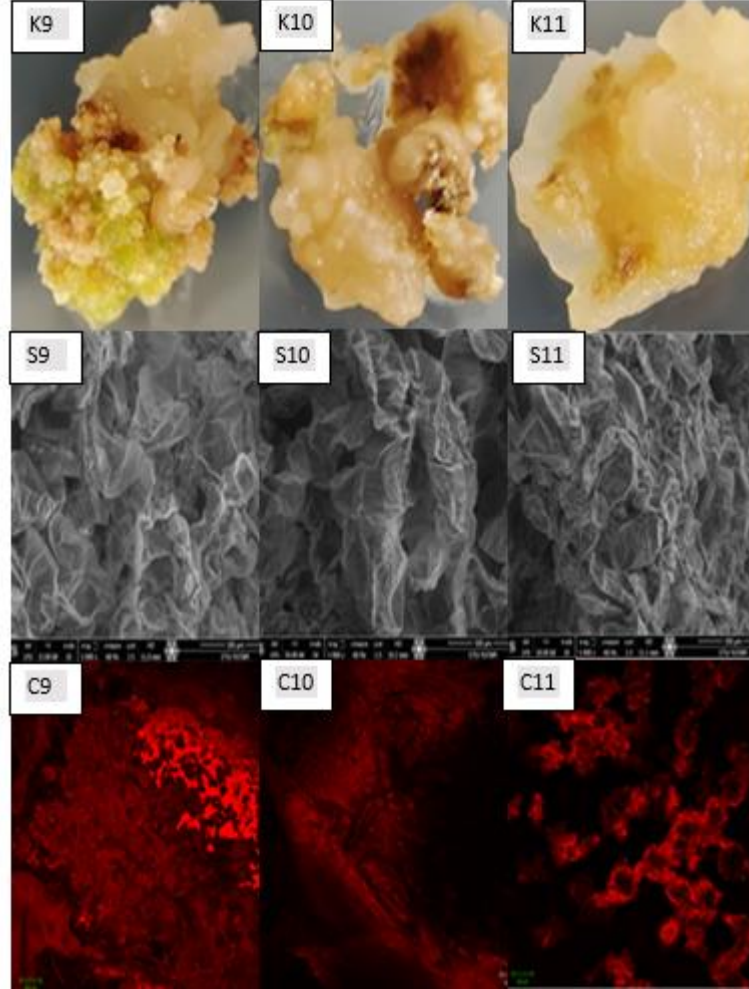
Şekil 4.15. (Devam)

K5, S5, C5: 50 mM mannitol; K6, S6, C6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO; K7, S7, C7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO; K8, S8, C8: 100 mM mannitol.

Kallus görüntülerinde, 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs uygulaması somatik embriyo oluşumunu teşvik ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.15K9). 100 mM mannitol/1,5 ppm GO ve 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO uygulamalarında da iyileştirici etkisi gözlemlenmiştir (Şekil 4.15K10, 11). SEM görüntüsünde, küresel (globular) yapılar rastlanmıştır ve en yoğunundan en az kompaktlığa doğru gözlemlenen

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

uygulamalar sırasıyla 100 mM mannitol/2 CaO NPs/1,5 ppm GO, 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs ve 100 mM mannitol/1,5 ppm GO'dir (Şekil 4.15S9, 10, 11). CLSM görüntülerinde ise Ca^{2+} en yoğun birikim 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO iken en az birikim ise 100 mM mannitol/1,5 ppm GO'dir (Şekil 4.15C9, 10, 11).



Şekil 4.15. (Devam)

K9, S9, C9: 100 mM mannitol/ 1 ppm CaO NPs; K10, S10, C10: 100 mM mannitol/1,5 GO; K11, S11, C11: 100 mM mannitol/ 2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO.

Erzurum ve Konya yerel ekotiplerinde, Ca^{2+} birikimi kontrolle kıyaslandığında ve artan CaO NPs uygulamalarında arttığı gözlemlenmiştir. Erzurum ekotipinde, kontrolle (%36) kıyaslandığında 2 ppm CaO NPs (%53) artış olduğu görülmüştür. Aynı şekilde 100 mM mannitol/1 CaO NPs/0,5 ppm GO (%40) iken, 100 mM mannitol/2 CaO NPs/1,5 ppm GO (%51) artış göstermiştir. Konya ekotipinde ise kontrolle (0,25) kıyaslandığında 2 ppm CaO NPs (%36) artış olduğu görülmüştür. Aynı şekilde 100 mM mannitol/1 CaO

NPs (%30) iken, 100 mM mannitol/2 CaO NPs/1,5 ppm GO (%35) artış göstermiştir (Çizelge 4.5).

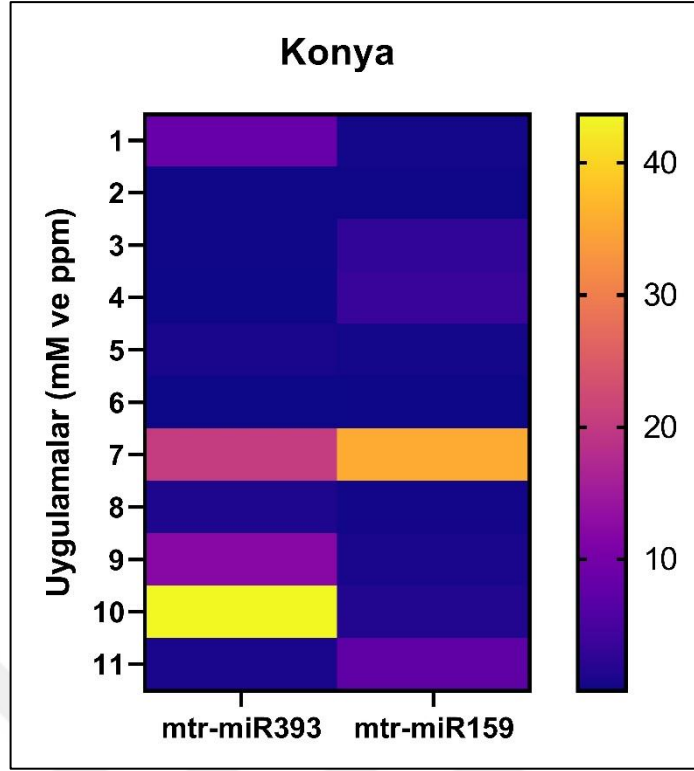
Çizelge 4.5. Erzurum ve Konya yerel ekotiplerinde SEM-EDX Ca birikme oranı

Konya	Ca (%)	Erzurum	Ca (%)
Kontrol	25	Kontrol	36
Ca-	16	Ca-	20
2 ppm CaO NPs	36	2 ppm CaO NPs	53
1,5 ppm GO	24	1,5 ppm GO	35
50 mM mannitol	23	50 mM mannitol	33
50 mM mannitol/0,5 ppm GO	40	50 mM mannitol/1 ppm CaO	46
50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO	42	50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO	52
100 mM mannitol	22	100 mM mannitol	30
100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs	30	100 mM mannitol/1,5 ppm GO	29
100 mM mannitol/1,5 ppm GO	21	100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO	40
100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO	35	100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO	51

4.5. mtr-miR159 ve mtr-miR393 Gen İfadelerindeki Değişikliğin RT-qPCR ile Değerlendirilmesi

mtr-miR159 ve mtr-miR393 gen seviyesindeki değişiklik kat değişim (fold change) $2^{-\Delta\Delta CT}$ göre hesaplanmıştır.

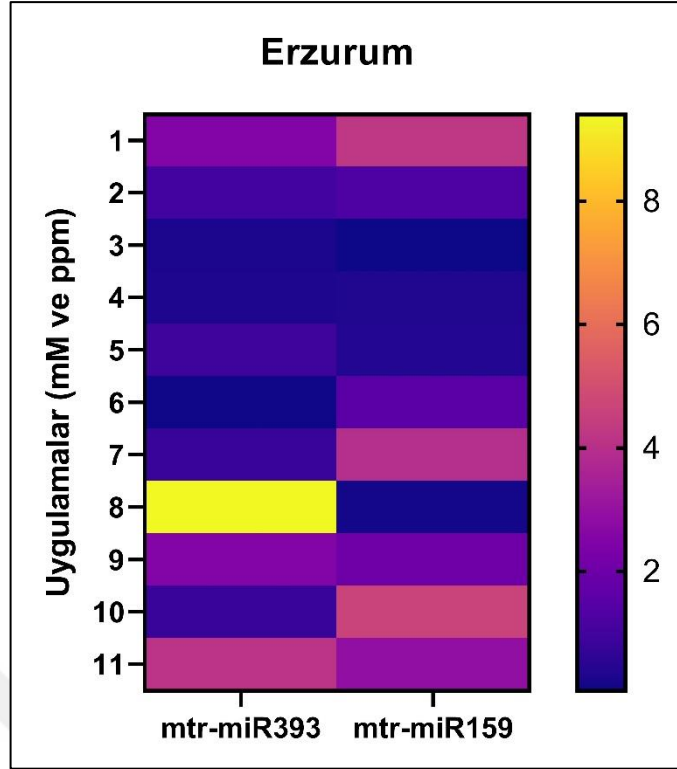
Konya ekotipinde mtr-miR159 kontrolle (0,381) ile kıyaslandığında 50mM/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO uygulamasında (35,405) artış göstermiştir. Konya ekotipinde mtr-miRNA393 kontrolle (8,324) ile kıyaslandığında 100mM/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO (43,630), 50mM/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO (20,284), 100mM/1 ppm CaO NPs uygulamasında (12,102) artış göstermiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Konya ekotipinde RT- qPCR ile analiz edilen kuraklık stres genleri için mtr-miR159 ve mtr-miR93 gen ekspresyon seviyelerinin değışikliği (Kat değışimi (fold change)).

1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/ 1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO

Erzurum ekotipinde mtr-miR159 kontrolle (4,208) ile kıyaslandığında 100mM/1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO uygulaması (4,605) artış göstermiştir. Erzurum ekotipinde mtr-miR393 kontrolle (2,483) 100mM (9,397), 100mM/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO (4,104) ve 100mM/1,5 ppm GO (2,5) artış göstermiştir (Şekil 4.17).

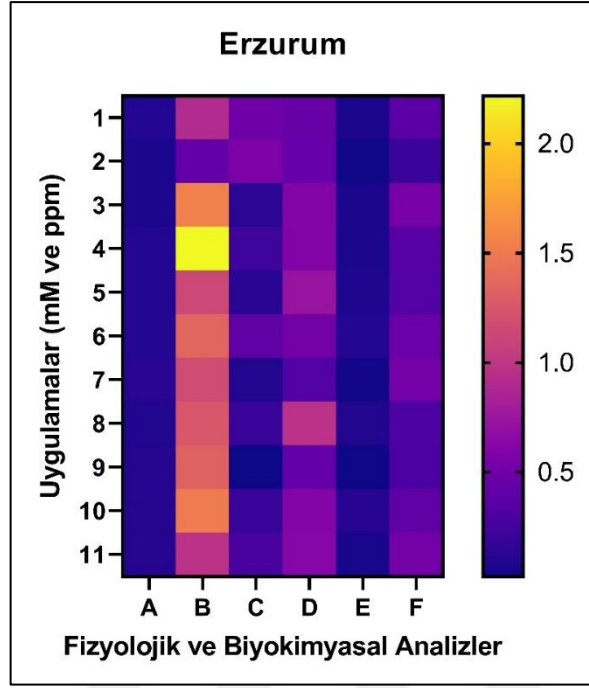


Şekil 4.17. Erzurum ekotipinde RT- qPCR ile analiz edilen kuraklık stres genleri için mtr-miR159 ve mtr-miR393 gen ekspresyon seviyelerinin değişikliği (kat değişimi (fold change)).

1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO/1,5 ppm GO

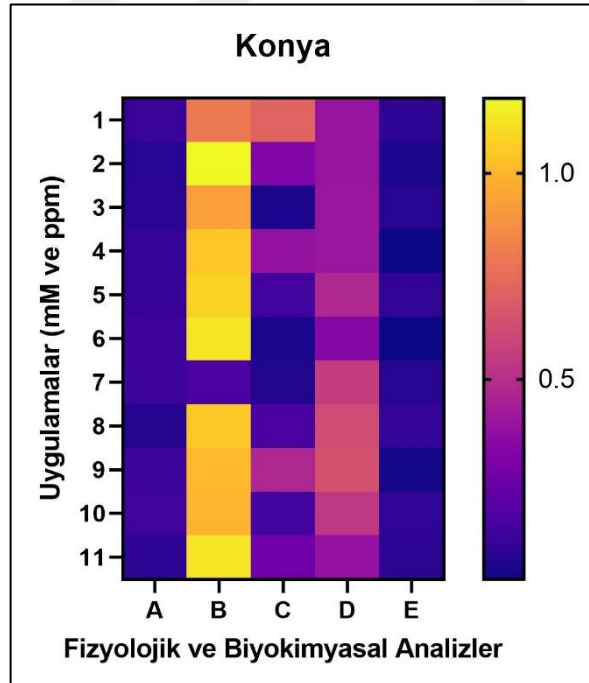
4.6. Bütün Analizlerin Değerlendirilmesi

Erzurum ve Konya yerel ekotiplerinde fizyolojik, biyokimyasal ve SEM analizlerin değerlendirilmesiyle elde edilen verilere göre Erzurum ekotipi için en iyi sonucu 100 mM mannitol/1,5ppm GO ve 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO; Konya ekotipi için ise 50 mM mannitol /0,5 ppm GO ve 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO göstermiştir (Şekil 4.18, 19).



Şekil 4.18. Erzurum ekotipindeki fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler (A: Kuru/yaş Ağırlık, B:Prolin, C:Çözünebilir Şeker, D: MDA, E: H₂O₂, F: SEM).

1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1,5 ppm GO, 10: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO/1,5 ppm GO



Şekil 4.19. Konya ekotipindeki fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler (A: Kuru/yaş Ağırlık, B:Prolin, C:Çözünebilir Şeker, D: MDA, E: H₂O₂, F: SEM).

1: Kontrol, 2: Ca-, 3: 2 ppm CaO NPs, 4: 1,5 ppm GO, 5: 50 mM mannitol, 6: 50 mM mannitol/0,5 ppm GO, 7: 50 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/0,5 ppm GO, 8: 100 mM mannitol, 9: 100 mM mannitol/1 ppm CaO NPs, 10: 100 mM mannitol/ 1,5 ppm GO, 11: 100 mM mannitol/2 ppm CaO NPs/1,5 ppm GO

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kuraklık stresi, bitkilerin yaprak alanı, gövde ve kök uzunluğu gibi morfolojik özellikleri, fizyolojik, biyokimyasal ve gen seviyesinde meydana gelen değişiklikleri kapsayan tüm hücrel olayları içermektedir (Gopal et al. 2008; Redmond and Tseng 1979). Kuraklık stresinin bitkilerdeki olumsuz etkileri çeşitli parametrelerle tanımlanabilir. Bu parametreler morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, gen seviyesindeki değişiklikler ve besin içeriği bitki büyümesinin kontrolünde kullanılmıştır. Son yıllarda, iklim değişikliği ile ilgili mevcut ve gelecekteki riskleri ele almak için bitkilerin kuraklığa verdiği tepkileri incelemek için çok çaba sarf edilmiştir (Chaves et al. 2002; Gray et al. 2012). Önceki çalışmalar, nanopartiküllerin tohum çimlenmesinde ve bitkinin gelişiminde olumlu etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Salama 2012; Zheng et al. 2005). Bununla birlikte, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için kalsiyuma ihtiyaç duyduğu gözlemlenmiştir. Yapılan son çalışmaların sonucuna göre, CaO NPs gelecek vaat eden tarımsal uygulamaları sayesinde dünya çapında büyük ilgi görmüştür. Bu çalışmada, CaO NPs, GO ve mannitol (kuraklık) varlığında stres toleransının değerlendirilmesi, kuru/yaş ağırlığı, prolin, çözünebilir şeker, MDA ve H₂O₂ içeriği tayininin yanı sıra gen seviyesindeki değişiklikler, CLSM ve SEM analizine dayanmaktadır. Kuraklık stresine maruz bırakılan yerel yonca ekotiplerinin kalluslarına CaO NPs'in, GO ve mannitol (kuraklık) uygulanması, kontrol kalluslarla kıyaslanarak yoncanın tüm gelişim süreçlerinde kuraklık hasarının azaltılmasıyla sonuçlanmıştır. CaO NPs ve GO ile muamele edilen Erzurum ve Konya kalluslarında Ca²⁺ birikimi kontrol kalluslarıyla kıyaslandığında artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.14 C3,7 ve Şekil 4.15 C3,7, Çizelge 4.5). Bitkinin gelişim aşamaları, doku kültür ortamının özellikleri, eksplant kaynakları, genotip ve ortam sıcaklığı gibi faktörlerden etkilenebilir. Sonuçlarımız, CaO NPs'in ila GO etkisinin genotipe ve mannitol seviyelerine bağlı olarak önemli ölçüde farklılık göstermiştir (Çizelge 4.1, 2, 3, 4 ve Şekil 4.9, 10, 11, 12, 13). Kuraklık stresinde sadece CaO NPs uygulamasında *Onobrychis viciifolia* rejenerasyon kapasitesinin benzer bir yanıt verdiği gözlemlenmiştir (Ertuş and Yazıcılar 2023). CaO NPs'in nohut (*Cicer arietinum* L.) büyümesi üzerindeki olumlu etkilerin olduğu gözlemlenmiştir (Gandhi et al. 2021). Ca²⁺ floemdeki hareketsizliği nedeniyle karmaşıktır, bu da bitkide Ca²⁺'nın floem yoluyla yaşlı dokulardan genç dokulara yeniden dağılımını kısıtlamıştır (Hamza et al. 2021). Konvansiyonel Ca²⁺ uygulamasıyla ilgili bu problem ışığında, nano boyutlu Ca

partikülleri yoncada Ca beslenmesi sağlamada daha etkili olmuştur. Ayrıca, düşük sülfonatlı grafen konsantrasyonu, mısır bitkisinin köklerdeki ROS'u temizler, kök morfolojisini değiştirir ve daha sağlıklı fide oluşumunu sağlamıştır (Liu et al. 2021). Besiyerine eklenen CaO NPs ve GO'indeki değişiklikler, kallus yapısında değişikliklere neden olmuştur. Kallus canlılığı aynı zamanda dokudaki vitrifikasyonla ilişkilidir; dolayısıyla kallus iyon gücünde veya su durumunda değişiklikler yapılabilir. *M.sativa* kallusunda yüksek dozda Ca²⁺ NPs'i böyle bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Ali et al. (2016) *in vitro* koşullar altında, Ag NPs uygulamalarının *Caralluma tuberculata* kallus yapıları için ortamın mikro besin içeriğini ayarlama konusunda önemli olabileceğini göstermiştir.

Konfokal lazer tarama analiz teknikleri, Ca²⁺ NPs'in lokalizasyonu, stres tepkisi ve bitki çeşitlerinin kuraklık stresine toleransını açıklığa kavuşturmak için yararlanılan en önemli analizlerden biridir. Konfokal lazer tarama mikroskobu, stres uygulanan hücrelerde Ca²⁺ birikimini gözlemlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve canlı hücrelerde Ca²⁺ lokalizasyonunu doğrulanmasında, hızlı bir şekilde tespit edilmesinde etkili bir tekniktir (Hussain et al. 2016; Sun et al. 2014). *M. sativa* kallusundaki konfokal lazer tarama analizleri, kuraklık stresine yanıt olarak toleransın anlaşılmasında önemli strateji olarak önerilebilir. Erzurum ve Konya kalluslarındaki Ca²⁺ birikimi net bir şekilde gözlemlenmiştir. Nanopartiküller, tek başına veya kuraklık stresi ile birlikte, bazı bitki türlerine uygulanmış ve bitki doku kültüründe biyotik ve abiyotik stresi kontrol etmek için ağırlıklı olarak TiO₂ ve Ag, Zn NPs'i içeren hücrelerde gözlenmiştir. XRD, SEM ve FT-IR analizlerinden CaO NPs'in ve GO'nun güçlü tekrarlanabilirlik ve yüksek stabilite sergilediği açıkça görülmektedir (Şekil 4.1, 2, 3, 4, 5, 6). Bu da Erzurum ve Konya kalluslarında CaO NPs'in ve GO'nun kuraklık stresine yanıtının ve iyileşme süresinin önemli bir göreve sahip olduğunu doğrulamaktadır. Çalışmamızda, mannitol de dahil olmak üzere CaO NPs ve GO yapılan muamelelerin ardından konfokal lazer taramalı mikroskop altında test edilen Erzurum ve Konya ekotiplerinde stres gelişimi farklı seviyelerde olmuştur. Kuraklık stresi gelişimi, CaO NPs ve GO 30 günlük uygulamalarda değerlendirilmiştir. Kallus hücreleri, 2 ppm CaO NPs uygulamasında Ca²⁺ alınımına bağlı olarak yoğun kırmızı renk sergilemiştir (Şekil 4.14 C1 ve Şekil 4.15 C1). Aynı şekilde, kuraklık faktörüyle 2 ppm CaO NPs uygulamasında Ca²⁺ birikimine çok rastlanırken, Ca bulunmayan, 50 ve 100 mM mannitollü kalluslarda Ca²⁺ yok denecek kadar azdır. Diğer

uygulamalarda ise Ca^{2+} birikimi orta seviyede gözlemlenmiştir. Kallus ve SEM görüntülerinde ise, kallus görüntülerinde CaO NPs ve GO uygulamsı somatik embriyonik oranın artırılması, kararma ve nekrozis yapılarının azaltılmasında önemli bir aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde SEM görüntülerinde ise amorf, kompakt, ipliksi, membranımsı, küresel (globular) yapılara rastlanmıştır (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). SEM, EDS analizinin sonucuna bağlı olarak Ca birikme oranları verilmiştir. Ca^{2+} birikim oranı ise 2 ppm ve artan CaO NPs bağlı olarak artış gösterirken, kuraklık stresinin şiddetine bağlı olarak azalış göstermiştir (Çizelge 4.5). Ertuş and Yazıcılar (2023) kuraklık stresine maruz bırakılan *Onobrycis viciifolia*'nın CaO NPs uygulaması çalışmamızla benzer sonuçlar sergilemiştir.

Prolin, stres koşullarına tepki olarak bitkilerde sentezlenen osmoprotektanlardan biridir (Grzesiak et al. 2013; Kumar et al. 2008; Nagesh Babu and Devraj 2008; Saradhi et al. 1995). Prolinin osmoprotektif rolünden bağımsız olarak, bazı çalışmalar bu molekülün hücrelerde redoks dengesini korumaya yardımcı olabileceğini göstermiştir (Mohammadkhani and Heidari 2008). Bu tez çalışmasında, kuraklık stresi artıkça prolin konsantrasyonu arttığı gözlemlenmiştir ve en yüksek prolin içeriği ise Erzurum ekotipinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.1). Cano et al. (1998), *in vitro* şartlarda yetiştirilen domateslerde strese duyarlı olanların strese dayanıklı genotiplere oranla yüksek prolin birikimi olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca prolin, stres direnci için bir belirteç olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Alvarez et al. 2003). Bitkilerde prolin birikimi ile abiyotik stres toleransı arasındaki ilişki her zaman belirgin değildir. Örneğin, tuz ve soğuğa aşırı duyarlı *Arabidopsis* mutantlarında yüksek prolin içeriği gözlemlenmiştir (Liu et al. 2017, 2018). Prolin içeriği de kuraklığa dayanıklı pirinç çeşitlerinde yüksektir, ancak arpada (*Hordeum vulgare*) tuz toleransı ile ilişkili değildir (Zhang et al. 2015; Allen et al. 2007).

Kuraklık stresi, bitki hücre membranına zarar vermektedir. Bitkilerin membran sistemi, hücreler ile dış ortam arasında, hücrelerin mikroçevresini ve normal metabolizmasını sürdürmek için çok önemli olan bir bariyer oluşturmuştur. Membran fosfolipidleri, membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olan ve MDA yol açan ROS hasarına karşı hassastır (Møller 2007). MDA'nın birikmesi, elektrolitlerin hücrelerden dışarı sızmasına neden olarak iletkenliğin artmasına neden olmuştur. Böylece, artan

elektrik iletkenliği (EC), bitkilerde hücre zarı hasarının ve kuraklık direncinin bir belirteci olarak kullanılmıştır. Ayrıca, Moore (2006) NPs'in plazma zarının lipid çift tabakası ile etkileşime girerek, ROS ve metabolik süreçlerde değişiklikler neden olduğunu gözlemlemiştir. MDA ve H₂O₂ içeriği, bitkilerde indüklenen oksidatif stresin iki önemli belirteçidir (Vosough et al. 2015). Stres koşullarında bu iki bileşiğin içeriği ne kadar düşükse, bu durumda bitkilere verilen hasarda o kadar düşük olmuştur (Pirasteh-Anosheh and Emam 2018). Stres koşullarında daha düşük MDA ve H₂O₂ içeriğine sahip genotipler ve çeşitler, strese karşı daha yüksek tolerans göstermiştir. Bu tez çalışmasında hem MDA hem H₂O₂ içeriği kuraklık stresinin şiddetine bağlı olarak artmıştır; bununla birlikte, ekotiplerin verdiği yanıt içerikleri değişkendir (Çizelge 4.3, 4 ve Şekil 4.12, 13). Ayrıca kuru/yaş ağırlığı ve çözünebilir şeker miktarında da strese bağlı olarak azalış gösterirken, CaO NPs ve GO uygulamasına bağlı olarak artış göstermiştir (Çizelge 4.1, 2 ve Şekil 4.9, 11).

miRNA'lar, bitki büyümesinin çeşitli aşamalarında önemli düzenleyici roller oynayan translasyonu durdurarak veya inhibe ederek hedef genlerin aşağı (down) ekspresyonunu negatif olarak düzenlenmesinin sağlamıştır (Bartel 2004; Achkar et al. 2016; Jones-Rhoades et al. 2006; Wani et al. 2020). Kuraklık stresine uyum sağlama yeteneğini geliştirmede düzenleyici rol oynamıştır (Liu et al. 2020; Fan et al. 2017). GO akuaporinlerin ve fosfat taşıyıcı ile ilgili genlerin ekspresyonunu yukarı regüle etmesini sağlamıştır (Cao et al. 2020). Grafen materyali, kök gelişimi ve oksin içeriği ile ilgili genlerin yukarı regülasyonunu düzenlemiştir. Domates fidelerinin köklerinde, sürgünlerinde ve gövdelerinde morfolojik gelişimi ve biyokütle birikimini desteklemiştir (Guo et al. 2021). GO'nun bitki savunma enzimlerini, hormon içeriğini ve kuraklıkla ilgili genlerin ifadesini doğrudan artırabileceğini ve böylece soya fasulyesinin kuraklığa direnme yeteneğini geliştirebileceğini ortaya koyulmuştur. Ayrıca, GO *Zea mays* L., *Paeonia ostii* ve *M. sativa*'nin kuraklık toleransını artmıştır (Lopes et al. 2022; Chen et al. 2021). miR159 ailesi, tek ve çift çenekli bitkiler arasında yüksek oranda korunmuştur, ancak kuraklığa maruz kalan bitkilerde, miR159 dokuya ve türe özgü değişiklik göstermiştir. miR159'un *Arabidopsis* ve mısırdaki kuraklık stresi tarafından yukarı regüle edildiği, ancak pamuk ve patatesteki aşağı regüle edilirken, arpa ve alflafa'nın kökünde aşağı regüle olurken yaprakta ise yukarı regüle edilmiştir (Liu et al. 2008; Wei et al. 2009; Xie et al. 2015; Hackenberg et al. 2015). LjmiR156, yoncada çözünebilir şeker içeriğini

arttırdı, MsmiR156d'nin aşırı ifade edildiği durum ise tam tersi olmuştur (Aung et al. 2015). miR159, rejenera olan *Arabidopsis* tohumlarında ABA ve kuraklık uygulamaları ile indüklenmiştir (Reyes and Chua 2007). *Arabidopsis*, miR159a MYB33'ün ve MYB101 transkriptlerin bölünmesine aracılık etmiştir (Reyes and Chua 2007; Allen et al. 2010). Reyes and Chua (2007) miR159a'nın aşırı ekspresyonu MYB33 ve MYB101 mRNA seviyelerini bastırmış ve bitkileri ABA'ya karşı aşırı duyarlı hale getirmiştir; MYB33 ve MYB101'in bölünmeye dirençli formlarını aşırı eksprese eden transgenik bitkiler ise ABA uygulamasına karşı aşırı duyarlıdır. MYB transkripsiyon faktörlerinin dehidrasyona yanıt veren Dehidrasyona Gen Tepkisi 22 (RD22) promotöründeki cis-elementlerini bağladığı ve RD22'yi birlikte aktive ettiği bulunmuştur. Hem MYC2 hem de MYB2'nin aşırı ekspresyonu transgenik bitkilerin ozmotik stres toleransını geliştirmiştir (Abe et al. 2003). Bizim çalışmamızda, mtr-miR159 Konya ve Erzurum ekotipinde aşağı regüle olmuştur. Konya ve Erzurum ekotipinde MYB transkripsiyon faktörlerinden MYB33 ve MYB10 mRNA seviyelerini bastırmıştır (Şekil 4.16, 17).

miR393, kuraklık stresinde bitki büyümesini ve gelişimini düzenlemek için oksin sinyalini kontrol etmede rol oynadığı gösterilmiştir. miR393'ün *Arabidopsis*, pirinç ve şeker kamışında (*Saccharum spp.*) kuraklık stresi sırasında yaygın olarak yukarı doğru düzenlendiği bilinmektedir (Sunkar and Zhu 2004; Ferreira et al. 2012; Zhao et al. 2007). *Arabidopsis*'te miR393'ün hedefi bir oksin reseptörü olan TIR1'i (taşıma inhibitörü yanıtı 1) kodlar. TIR1 enzimi, Aux/ IAA proteinlerinin ubiquitinasyon yoluyla parçalanmasını teşvik ederek oksin sinyallemesinin pozitif bir düzenleyicisidir (Dharmasiri and Estelle 2002). Xia et al. (2012) miR393 aşırı eksprese eden pirinç fidelerinin büyümesinin, kontrol bitkilerine kıyasla 1 günlük kuraklık uygulamasıyla baskılandığını bildirmiştir. Bu nedenle, artan miR393 seviyeleri oksin sinyalini aşağı doğru düzenler ve kuraklık stresinde bitki büyümesini azaltmıştır. Bu çalışmada, mtr-miR393 Konya ekotipinde aşağı regülasyon olurken Erzurum ekotipinde yukarı regülasyon olmuştur ve mRNA baskılayarak bitki büyümesini olumsuz etkilenmiştir. CaO NPs ile GO uygulamasıyla beraber Konya ekotipinde aşağı regülasyon olmuştur ve bitkinin büyümesini artırmıştır (Şekil 4.16, 17).

Bu tez çalışmasında, kuraklığa maruz bırakılan Erzurum ve Konya kalluslarına CaO NPs ve GO uygulanarak fiyolojik, biyokimyasal ve gen seviyesindeki değişikliklere

bakılmıştır. Organize olmamış hücre topluluğu tercih edilmiştir. Organize olmamış hücre topluluğu yani kalluslar *in vitro* şartlarda kuraklık stresinin etkisinin minimize edilmesi için CaO NPs ve GO kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirmesinin göz önüne alındığında kallus yapılarındaki kararmalar ve nekrozislerin azaldığı, embriyogenik kallus oluşumunun ise arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca mtr-miR393 ile mtr-miR159 kuraklık stresine bağlı olarak yukarı regüle edilirken, CaO NPs ve GO uygulamasında ise aşağı regüle edilmiştir. SEM ve CLSM sonuçlarına göre, kuraklık stresinde Ca oranında azalma meydana gelirken, CaO NPs ve GO uygulamasında ise artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında kallus da olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmanın devamında kallus yapılarını rejenere edilerek tam bir bitki oluşturulması amaçlanmıştır. Rejenere olan bitkilerde tüm doku ve organ yapıları geliştiği için bütün morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliğin ayrıntılı şekilde gözlemlenmesine imkan vermektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelghany, A. M., El-Banna, A. A., Salama, E. A., Ali, M. M., Al-Huqail, A. A., Ali, H. M., Lamtom, S. F. 2022. The individual and combined effect of nanoparticles and biofertilizers on growth, yield, and biochemical attributes of peanuts (*Arachis hypogea* L.). *Agronomy*, 12(2), 398.
- Abdelsalam, N. R., Grad, W. E., Ghura, N. S., Khalid, A. E., Ghareeb, R. Y., Desoky, E. S. M., Ali, E. F. 2021. Callus induction and regeneration in sugarcane under drought stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7432-7442.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(1), 63-78.
- Achkar, N. P., Cambiagno, D. A., Manavella, P. A. 2016. miRNA biogenesis: a dynamic pathway. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1034-1044.
- Ahmad, P., John, R., Sarwat, M., Umar, S. 2012. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal of Plant Production*, 2(4), 353-366.
- Ajithkumar, I. P., Panneerselvam, R. 2014. ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth. under drought stress. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68, 587-595.
- Akyol, T. Y., Yılmaz, O., Uzilday, B., Uzilday, R. Ö., Türkan, İ. (2020). Plant response to salinity: An analysis of ROS formation, signaling, and antioxidant defense. *Turkish Journal of Botany*, 44(1), 1-13.
- Al Mahmud, J., Bhuyan, M. B., Anee, T. I., Nahar, K., Fujita, M., Hasanuzzaman, M. 2019. Reactive oxygen species metabolism and antioxidant defense in plants under metal/metalloid stress. *Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches*, 221-257.
- Ali, A., Zafar, H., Zia, M., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., Hussain, A. 2016. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 49-67.
- Allen, R. S., Li, J., Alonso-Peral, M. M., White, R. G., Gubler, F., Millar, A. A. 2010. MicroR159 regulation of most conserved targets in Arabidopsis has negligible phenotypic effects. *Silence*, 1, 1-18.
- Allen, R. S., Li, J., Stahle, M. I., Dubroué, A., Gubler, F., Millar, A. A. 2007. Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41), 16371-16376.
- Almodares, A., Hadi, M. R., Dosti, B. 2008. The effects of salt stress on growth parameters and carbohydrates contents in sweet sorghum. *Research Journal of Environmental Sciences*, 2(4), 298-304.

- Alonso-Peral, M. M., Sun, C., Millar, A. A. 2012. MicroRNA159 can act as a switch or tuning microRNA independently of its abundance in *Arabidopsis*. PLoS One, 7(4), e34751.
- Alvarez, I., Tomaro, M. L., Benavides, M. P. 2003. Changes in polyamines, proline and ethylene in sunflower calluses treated with NaCl. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74, 51-59.
- Amos, W. B., White, J. G. 2003. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. Biology of the Cell, 95(6), 335-342.
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Zohaib, A., Tanveer, M., Naeem, M., Ali, I., Nazir, U. 2017. Growth and developmental responses of crop plants under water deficit: a review. Zemdirbyste-Agriculture, 104, 267-276.
- Arenas-Huertero, C., Pérez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Reyes, J. L. 2009. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. Plant Molecular Biology, 70, 385-401.
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-de March, G., Savauré, A. 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. Physiologia Plantarum, 120(3), 442-450.
- Arshad, M., Feyissa, B. A., Amyot, L., Aung, B., Hannoufa, A. 2017. MicroRNA156 improves drought stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by silencing SPL13. Plant Science, 258, 122-136.
- AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., Valiyaveetil, S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano, 3(2), 279-290.
- Atkin, O. K., Macherel, D. 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. Annals of Botany, 103(4), 581-597.
- Aung, B., Gruber, M. Y., Amyot, L., Omari, K., Bertrand, A., Hannoufa, A. (2015). Ectopic expression of LjmiR156 delays flowering, enhances shoot branching, and improves forage quality in alfalfa. Plant Biotechnology Reports, 9, 379-393.
- Axtell, M. J. 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. Annual Review of Plant Biology, 64, 137-159.
- Bala, R., Kalia, A., Dhaliwal, S. S. 2019. Evaluation of efficacy of ZnO nanoparticles as remedial zinc nanofertilizer for rice. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 19, 379-389.
- Barrera-Figueroa, B. E., Gao, L., Diop, N. N., Wu, Z., Ehlers, J. D., Roberts, P. A., Liu, R. 2011. Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. BMC Plant Biology, 11, 1-11.
- Barreto, P., Yassitepe, J. E., Wilson, Z. A., Arruda, P. 2017. Mitochondrial uncoupling protein 1 overexpression increases yield in *Nicotiana tabacum* under drought stress by improving source and sink metabolism. Frontiers in Plant Science, 8, 1836.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116(2), 281-297.

- Bartels, D., Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23-58.
- Bartoli, C. G., Gomez, F., Gergoff, G., Guiamét, J. J., Puntarulo, S. 2005. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany*, 56(415), 1269-1276.
- Berger, J., Palta, J., Vadez, V. 2016. An integrated framework for crop adaptation to dry environments: Responses to transient and terminal drought. *Plant Science*, 253, 58-67.
- Bian, H., Xie, Y., Guo, F., Han, N., Ma, S., Zeng, Z., Zhu, M. 2012. Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/TIR1 homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 196(1), 149-161.
- Blum, A. 2017. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, Cell Environment*, 40(1), 4-10.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D. 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant Cell*, 12(8), 1425-1440.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E., Jensen, R. G. 1995. Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell*, 7(7), 1099.
- Bray, E. A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2), 48-54.
- Brodribb, T. J., McAdam, S. A. 2011. Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science*, 331(6017), 582-585.
- Brown, A. D., Simpson, J. R. 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Microbiology*, 72(3), 589-591.
- C Thomas, S., Kumar Mishra, P., Talegaonkar, S. 2015. Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 21(42), 6165-6188.
- Cano, E. A., Pérez-Alfocea, F., Moreno, V., Caro, M., Bolarín, M. C. 1998. Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53, 19-26.
- Cao, W., He, L., Cao, W., Huang, X., Jia, K., Dai, J. 2020. Recent progress of graphene oxide as a potential vaccine carrier and adjuvant. *Acta Biomaterialia*, 112, 14-28.
- Castañeda, V., de la Peña, M., Azcárate, L., Aranjuelo, I., Gonzalez, E. M. 2019. Functional analysis of the taproot and fibrous roots of *Medicago truncatula*: Sucrose and proline catabolism primary response to water deficit. *Agricultural Water Management*, 216, 473-483.
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., Pinheiro, C. 2002. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89(7), 907-916.

- Chebet, D. K., Okeno, J. A., Mathenge, P. 2002. Biotechnological approaches to improve horticultural crop production. In XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and 625, 473-477.
- Chellappan, P., Xia, J., Zhou, X., Gao, S., Zhang, X., Coutino, G., Jin, H. 2010. siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 6883-6894.
- Chen, H. W., Chen, J. J., Yu, S. L., Li, H. N., Yang, P. C., Su, C. M., Tzeng, C. R. (2005). Transcriptome analysis in blastocyst hatching by cDNA microarray. *Human Reproduction*, 20(9), 2492-2501.
- Chen, Z., Niu, J., Guo, Z., Sui, X., Xu, N., Kareem, H. A., Wang, Q. 2021. Integrating transcriptome and physiological analyses to elucidate the essential biological mechanisms of graphene phytotoxicity of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112348.
- Christmann, A., Grill, E., Huang, J. 2013. Hydraulic signals in long-distance signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 293-300.
- Christmann, A., Weiler, E. W., Steudle, E., Grill, E. 2007. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal*, 52(1), 167-174.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. 2015. Functions of nitric oxide (NO) in roots during development and under adverse stress conditions. *Plants*, 4(2), 240-252.
- Curaba, J., Talbot, M., Li, Z., Helliwell, C. 2013. Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1-10.
- Dai, A. 2013. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change*, 3(1), 52-58.
- Delgoda, R., Murray, J. E. 2017. Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. In *Pharmacognosy*, 93-100.
- Desoky, E. S. M., El-maghraby, L. M., Awad, A. E., Abdo, A. I., Rady, M. M., Semida, W. M. 2020. Fennel and ammi seed extracts modulate antioxidant defence system and alleviate salinity stress in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Scientia Horticulturae*, 272, 109576.
- Desoky, E. S. M., Mansour, E., Ali, M. M., Yasin, M. A., Abdul-Hamid, M. I., Rady, M. M., Ali, E. F. 2021. Exogenously used 24-epibrassinolide promotes drought tolerance in maize hybrids by improving plant and water productivity in an arid environment. *Plants*, 10(2), 354.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Däschner, K., Binder, S., Frommer, W. B. 2001. A nuclear gene encoding mitochondrial $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal*, 27(4), 345-356.

- Devireddy, A. R., Zandalinas, S. I., Gómez-Cadenas, A., Blumwald, E., Mittler, R. 2018. Coordinating the overall stomatal response of plants: Rapid leaf-to-leaf communication during light stress. *Science Signaling*, 11(518), eaam9514.
- Dharmasiri, S., Estelle, M. 2002. The role of regulated protein degradation in auxin response. *Auxin Molecular Biology*, 401-409.
- Dietz, K. J., Herth, S. 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11), 582-589.
- Ding, Y., Tao, Y., Zhu, C. 2013. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *Journal of Experimental Botany*, 64(11), 3077-3086.
- Dodd, A. N., Kudla, J., Sanders, D. 2010. The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593-620.
- Ealia, S. A. M., Saravanakumar, M. P. 2017. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(3), 032019.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U., Goldbach, H. E. 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum*, 134(1), 151-160.
- Eldem, V., Çelikkol Akçay, U., Ozhuner, E., Bakır, Y., Uranbey, S., Unver, T. 2012. Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. *PLoS One*, 7(12), e50298.
- Elumalai, E. K., Prasad, T. N. V. K. V., Hemachandran, J., Therasa, S. V., Thirumalai, T., David, E. 2010. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities. *Journal Pharmacology Science Research*, 2(9), 549-554.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., Ikegami, K., Koiwai, H., Nambara, E. 2008. Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiology*, 147(4), 1984-1993.
- Erdal, S. 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 1-7.
- Ertuğ, M. M., Yazıcılar, B. 2023. CaO nanoparticle enhances the seedling growth of *Onobrychis viciifolia* under drought stress via mannitol use. *Biologia*, 1-9.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E. 2008. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 132(1), 9-14.
- Evans, M. J., Choi, W. G., Gilroy, S., Morris, R. J. 2016. A ROS-assisted calcium wave dependent on the AtRBOHD NADPH oxidase and TPC1 cation channel propagates the systemic response to salt stress. *Plant Physiology*, 171(3), 1771-1784.
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L., Alvarez, M. E. 2004. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 343-350.

- Fan, G., Wang, L., Dong, Y., Zhao, Z., Deng, M., Niu, S., Cao, X. 2017. Genome of *Paulownia fortunei* illuminates the related transcripts, miRNA and proteins for salt resistance. *Scientific Reports*, 7(1), 1-17.
- Feng, H., Zhang, Q., Wang, Q., Wang, X., Liu, J., Li, M., Kang, Z. 2013. Target of tae-miR408, a chemocyanin-like protein gene (TaCLP1), plays positive roles in wheat response to high-salinity, heavy cupric stress and stripe rust. *Plant Molecular Biology*, 83, 433-443.
- Ferreira, T. H., Gentile, A., Vilela, R. D., Costa, G. G. L., Dias, L. I., Endres, L., Menossi, M. 2012. microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plos One*, 7(10), e46703.
- Feyissa, B. A., Arshad, M., Gruber, M. Y., Kohalmi, S. E., Hannoufa, A. 2019. The interplay between miR156/SPL13 and DFR/WD40-1 regulate drought tolerance in alfalfa. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1-19.
- Foryer, C., Noctor, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol*, 146, 359-388.
- Fowke, L. C. 1995. Transmission and scanning electron microscopy for plant protoplasts, cultured cells and tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*, 229-238.
- Frazier, T. P., Sun, G., Burklew, C. E., Zhang, B. 2011. Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. *Molecular Biotechnology*, 49, 159-165.
- Galinski, E. A., Trüper, H. G. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(2-3), 95-108.
- Gandhi, N., Shruthi, Y., Sirisha, G., Anusha, C. R. 2021. Facile and eco-friendly method for synthesis of calcium oxide (CaO) nanoparticles and its potential application in agriculture. *The Saudi Journal of Life Sciences*, 6(5), 89-103.
- Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Pan, X., Li, Y., Zhu, Y. 2011. osa-MIR393: a salinity-and alkaline stress-related microRNA gene. *Molecular Biology Reports*, 38, 237-242.
- Ghars, M. A., Parre, E., Leprince, A. S., Bordenave, M., Vos, D. L. D., Richard, L., Saviouré, A. 2008. Opposite lipid signaling pathways tightly control proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. In *Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance*, 317-324.
- Gill, P. K., Sharma, A. D., Singh, P., Bhullar, S. S. 2001. Effect of various abiotic stresses on the growth, soluble sugars and water relations of sorghum seedlings grown in light and darkness. *Bulgarian Journal Plant Physiology*, 27(1-2), 72-84.
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W. G., Toyota, M., Devireddy, A. R., Mittler, R. 2014. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science*, 19(10), 623-630.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., Zhang, C. 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 169(2), 313-321.

- Gopal, J., Iwama, K., Jitsuyama, Y. 2008. Effect of water stress mediated through agar on in vitro growth of potato. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 44, 221-228.
- Graham, P. H., Vance, C. P. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3), 872-877.
- Gray, J., Caparrós-Ruiz, D., Grotewold, E. 2012. Grass phenylpropanoids: regulate before using. *Plant Science*, 184, 112-120.
- Greenway, H., Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 149-190.
- Grillo, R., Pereira, A. E., Nishisaka, C. S., De Lima, R., Oehlke, K., Greiner, R., Fraceto, L. F. 2014. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: an environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials*, 278, 163-171.
- Grzesiak, M., Filek, M., Barbasz, A., Kreczmer, B., Hartikainen, H. 2013. Relationships between polyamines, ethylene, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in wheat seedlings after short-term PEG-and NaCl-induced stresses. *Plant Growth Regulation*, 69, 177-189.
- Guo, X., Zhao, J., Wang, R., Zhang, H., Xing, B., Naeem, M., Wu, J. 2021. Effects of graphene oxide on tomato growth in different stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 447-455.
- Gupta, A. K., Kaur, N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences*, 30, 761-776.
- Haak, D. C., Fukao, T., Grene, R., Hua, Z., Ivanov, R., Perrella, G., Li, S. 2017. Multilevel regulation of abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1564.
- Hackenbarg, M., Gustafson, P., Langridge, P., Shi, B. J. 2015. Differential expression of micro RNA s and other small RNA s in barley between water and drought conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 13(1), 2-13.
- Hamza, M., Abbas, M., Abd Elrahman, A., Helal, M., Shahba, M. 2021. Conventional versus nano calcium forms on peanut production under sandy soil conditions. *Agriculture*, 11(8), 767.
- Hao, W., Guo, H., Zhang, J., Hu, G., Yao, Y., Dong, J. 2014. Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *The Scientific World Journal*, 7, 843764.
- Hayashi, F., Ichino, T., Osanai, M., Wada, K. 2000. Oscillation and regulation of proline content by P5CS and ProDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant and Cell Physiology*, 41(10), 1096-1101.
- Heath, R. L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.

- Hepler, P. K., Gunning, B. E. 1998. Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma*, 201, 121-157.
- Hilal, M., Parrado, M. F., Rosa, M., Gallardo, M., Orce, L., Massa, E. M., Prado, F. E. 2004. Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 79(2), 205-210.
- Hirabayashi, J. 1996. On the origin of elementary hexoses. *The Quarterly Review of Biology*, 71(3), 365-380.
- Hirschi, K. D. 2004. The calcium conundrum both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiology*, 136(1), 2438-2442.
- Holbrook, N. M., Shashidhar, V. R., James, R. A., Munns, R. 2002. Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany*, 53(373), 1503-1514.
- Holloway, P. J., Baker, E. A. 1974. The aerial surfaces of higher plants. *Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy*, 1, 181-201.
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., Tran, L. S. P. 2015. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6, 420.
- Husen, A., Siddiqi, K. S. 2014. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), 1-10.
- Hussain, M., Malik, M. A., Farooq, M., Ashraf, M. Y., Cheema, M. A. 2008. Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(3), 193-199.
- Hussain, S., Khan, F., Hussain, H. A., Nie, L. 2016. Physiological and biochemical mechanisms of seed priming-induced chilling tolerance in rice cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 7, 116.
- Iavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D. H., Shvedova, A. A. 2017. Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 96-111.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Shinozaki, K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 27(4), 325-333.
- Jampílek, J., Kráľová, K. 2017. Nanopesticides: preparation, targeting, and controlled release. In *New Pesticides and Soil Sensors*, 81-127.
- Jennings, D. H., Burke, R. M. 1990. Compatible solutes—the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytologist*, 116(2), 277-283.
- Johanson, T. M., Lew, A. M., Chong, M. M. 2013. MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Droscha and Dicer. *Open Biology*, 3(10), 130144.

- Jones, M. M., Turner, N. C., Osmond, C. B. 1981. Mechanisms of drought resistance. In 'The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Eds LG Paleg, D Aspinall 15–37.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Bartel, B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review Plant Biology* 57, 19-53.
- Jouannet, V., Maizel, A. 2012. Trans-acting small interfering RNAs: biogenesis, mode of action, and role in plant development. *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses*, 83-108.
- Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., Bucheli, T. D. 2018. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature Nanotechnology*, 13(8), 677-684.
- Kamboj, A., Amjad, M., Ahmad, W., Singh, A. 2020. A general survey on Green synthesis and application of calcium oxide nanoparticles. *International Journal of Health and Clinical Research*, 3, 41-48.
- Kantar, M., Lucas, S. J., Budak, H. 2011. miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta*, 233, 471-484.
- Karaduman, I., Güngör, A. A., Nadaroğlu, H., Altundaş, A., Acar, S. 2017. Green synthesis of γ -Fe₂O₃ nanoparticles for methane gas sensing. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 28, 16094-16105.
- Kaur, A., Mann, S., Goyal, B., Pal, B., Goyal, D. 2016. CuO nanostructures of variable shapes as an efficient catalyst for [3+ 2] cycloaddition of azides with terminal alkyne. *RSC Advances*, 6(104), 102733-102743.
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khraiwesh, B., Arif, M. A., Seumel, G. I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., Frank, W. 2010. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, 140(1), 111-122.
- Kim, K. S., Park, S. H., Jenks, M. A. 2007. Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 164(9), 1134-1143.
- Kim, V. N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 376-385.
- Kingston-Smith, A. H., Marshall, A. H., Moorby, J. M. 2013. Breeding for genetic improvement of forage plants in relation to increasing animal production with reduced environmental footprint. *Animal*, 7(s1), 79-88.
- Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 8(8), 1323-1335.

- Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Lead, J. R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1825-1851.
- Krivorotova, T., Sereikaite, J. 2014. Determination of fructan exohydrolase activity in the crude extracts of plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(6), 329-333.
- Kudla, J., Batistič, O., Hashimoto, K. 2010. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell*, 22(3), 541-563.
- Kudla, J., Becker, D., Grill, E., Hedrich, R., Hippler, M., Kummer, U., Schumacher, K. 2018. Advances and current challenges in calcium signaling. *New Phytologist*, 218(2), 414-431.
- Kulcheski, F. R., de Oliveira, L. F., Molina, L. G., Almerão, M. P., Rodrigues, F. A., Marcolino, J., Margis, R. 2011. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*, 12(1), 1-17.
- Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A. A., Kim, K. H. 2019. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, 294, 131-153.
- Kumar, V., Shriram, V., Nikam, T. D., Jawali, N., Shitole, M. G. 2008. Sodium chloride-induced changes in mineral nutrients and proline accumulation in indica rice cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, 31(11), 1999-2017.
- Kurepa, J., Paunesku, T., Vogt, S., Arora, H., Rabatic, B. M., Lu, J., Smalle, J. A. 2010. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Letters*, 10(7), 2296-2302.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., Bartel, D. P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 858-862.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., Dietz, K. J. 2019. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4), 94.
- Lee, R. C., Ambros, V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862-864.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Lee, W. M., Kwak, J. I., An, Y. J. 2012. Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86(5), 491-499.
- Lipshutz, B. H., Ghorai, S. 2012. Organocatalysis in water at room temperature with in-flask catalyst recycling. *Organic Letters*, 14(1), 422-425.

- Liu, G., Xiong, Z., Yang, L., Shi, H., Fang, D., Wang, M., Luo, X. 2021. Electrochemical approach toward reduced graphene oxide-based electrodes for environmental applications: A review. *Science of The Total Environment*, 778, 146301.
- Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., Zheng, C. C. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna*, 14(5), 836-843.
- Liu, M., Yu, H., Zhao, G., Huang, Q., Lu, Y., Ouyang, B. 2018. Identification of drought-responsive microRNAs in tomato using high-throughput sequencing. *Functional Integrative Genomics*, 18, 67-78.
- Liu, Y., Pan, B., Li, H., Lang, D., Zhao, Q., Zhang, D., Xing, B. 2020. Can the properties of engineered nanoparticles be indicative of their functions and effects in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111128.
- Liu, Y., Wang, K., Li, D., Yan, J., Zhang, W. 2017. Enhanced cold tolerance and tillering in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) by heterologous expression of Osa-miR393a. *Plant and Cell Physiology*, 58(12), 2226-2240.
- Llave, C. 2004. MicroRNAs: more than a role in plant development. *Molecular Plant Pathology*, 5(4), 361-366.
- Lopes, T., Cardoso, P., Matos, D., Rocha, R., Pires, A., Marques, P., Figueira, E. 2022. Graphene oxide influence in soil bacteria is dose dependent and changes at osmotic stress: growth variation, oxidative damage, antioxidant response, and plant growth promotion traits of a *Rhizobium* strain. *Nanotoxicology*, 16(5), 549-565.
- López-Galiano, M. J., García-Robles, I., González-Hernández, A. I., Camañes, G., Vicedo, B., Real, M. D., Rausell, C. 2019. Expression of miR159 is altered in tomato plants undergoing drought stress. *Plants*, 8(7), 201.
- Lushchak, V. I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 153(2), 175-190.
- Luther, G. W., Rickard, D. T. 2005. Metal sulfide cluster complexes and their biogeochemical importance in the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 389-407.
- Luz Martinez, S., Romero, R., López, J. C., Romero, A., Sanchez Mendieta, V., Natividad, R. 2011. Preparation and characterization of CaO nanoparticles/NaX zeolite catalysts for the transesterification of sunflower oil. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 50(5), 2665-2670.
- Lü, P., Kang, M., Jiang, X., Dai, F., Gao, J., Zhang, C. 2013. RhEXPA4, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis*. *Planta*, 237, 1547-1559.
- Ma, Z., Huang, B., Xu, S., Chen, Y., Li, S., Lin, S. 2015. Isolation of high-quality total RNA from chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). *PLoS One*, 10(6), e0130234.

- Madusanka, N., Sandaruwan, C., Kottegoda, N., Sirisena, D., Munaweera, I., De Alwis, A., Amaratunga, G. A. 2017. Urea–hydroxyapatite-montmorillonite nanohybrid composites as slow release nitrogen compositions. *Applied Clay Science*, 150, 303-308.
- Mahanty, A., Mishra, S., Bosu, R., Maurya, U. K., Netam, S. P., Sarkar, B. 2013. Phytoextracts-synthesized silver nanoparticles inhibit bacterial fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Indian Journal of Microbiology*, 53, 438-446.
- Maier, J., Hecker, R., Rockel, P., Ninnemann, H. 2001. Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*. *Plant Physiology*, 126(3), 1323-1330.
- Manzoor, N., Ahmed, T., Noman, M., Shahid, M., Nazir, M. M., Ali, L., Wang, G. 2021. Iron oxide nanoparticles ameliorated the cadmium and salinity stresses in wheat plants, facilitating photosynthetic pigments and restricting cadmium uptake. *Science of the Total Environment*, 769, 145221
- Mattioli, R., Falasca, G., Sabatini, S., Altamura, M. M., Costantino, P., Trovato, M. 2009. The proline biosynthetic genes P5CS1 and P5CS2 play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development. *Physiologia Plantarum*, 137(1), 72-85.
- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., Matzke, A. J. 2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3), 367-376.
- McAdam, S. A., Brodribb, T. J., Ross, J. J. 2016. Shoot-derived abscisic acid promotes root growth. *Plant, Cell Environment*, 39(3), 652-659.
- McLachlan, D. H., Pridgeon, A. J., Hetherington, A. M. 2018. How *Arabidopsis* talks to it self about its water supply. *Molecular Cell*, 70(6), 991-992.
- Meza, I., Siebert, S., Döll, P., Kusche, J., Herbert, C., Eyshi Rezaei, E., Hagenlocher, M. 2020. Global-scale drought risk assessment for agricultural systems. *Natural Hazards and Earth System Sciences*, 20(2), 695-712.
- Mhamdi, A., Van Breusegem, F. 2018. Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15), dev164376.
- Michard, E., Lima, P. T., Borges, F., Silva, A. C., Portes, M. T., Carvalho, J. E., Feijó, J. A. 2011. Glutamate receptor–like genes form Ca²⁺ channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*, 332(6028), 434-437.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. O. N. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environment*, 33(4), 453-467.
- Milosavljevic, V., Haddad, Y., Merlos Rodrigo, M. A., Moulick, A., Polanska, H., Hynek, D., Adam, V. 2016. The zinc-schiff base-novicidin complex as a potential prostate cancer therapy. *PLoS One*, 11(10), e0163983.
- Mishra, M., Dashora, K., Srivastava, A., Fasake, V. D., Nag, R. H. 2019. Prospects, challenges and need for regulation of nanotechnology with special reference to India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 677-682.

- Mohammadkhani, N., Heidari, R. 2008. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal*, 3(3), 448-453.
- Moletti, A., Coluccini, C., Pasini, D., Taglietti, A. 2007. A chiral probe for the detection of Cu (II) by UV, CD and emission spectroscopies. *Dalton Transactions*, (16), 1588-1592.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review Plant Biology* 58, 459-481.
- Monshausen, G. B., Miller, N. D., Murphy, A. S., Gilroy, S. 2011. Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *The Plant Journal*, 65(2), 309-318.
- Moore, M. N. 2006. Environmental risk management—The state of the art. *Environmental International* 32(8), 967-976.
- Morgan, J. M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 299-319.
- Morsy, M. R., Jouve, L., Hausman, J. F., Hoffmann, L., Stewart, J. M. 2007. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 164(2), 157-167.
- Możdżeń, K., Bojarski, B., Rut, G., Migdałek, G., Repka, P., Rzepka, A. 2021. Effect of drought stress induced by mannitol on physiological parameters of maize (*Zea mays* L.) seedlings and plants. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 86-91.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. Un medio para un crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tejidos de tabaco. *Inglés*). *Physiology Plant*, 15, 473-497.
- Nadaroglu, H., Güngör, A. A., Selvi, İ. 2017. Synthesis of nanoparticles by green synthesis method. *International Journal of Innovative Research and Reviews*, 1(1), 6-9.
- Nagesh Babu, R., Devaraj, V. R. 2008. High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science*, 2(2), 40-48.
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., Kumar, D. S. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179(3), 154-163.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2014. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in Plant Science*, 5, 170.
- Narayan, N., Meiyazhagan, A., Vajtai, R. 2019. Metal nanoparticles as green catalysts. *Materials*, 12(21), 3602.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Sigg, L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17, 372-386.

- Nazir, M. M., Li, Q., Noman, M., Ulhassan, Z., Ali, S., Ahmed, T., Zhang, G. (2022). Calcium oxide nanoparticles have the role of alleviating arsenic toxicity of barley. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S. O. N. J. A., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C. H. 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration. *Annals of Botany*, 89(7), 841-850.
- Nowack, B., Bucheli, T. D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150(1), 5-22.
- Okamura, K., Ladewig, E., Zhou, L., Lai, E. C. 2013. Functional small RNAs are generated from select miRNA hairpin loops in flies and mammals. *Genes Development*, 27(7), 778-792.
- Oladoja, N. A., Ololade, I. A., Olaseni, S. E., Olatujoye, V. O., Jegede, O. S., Agunloye, A. O. 2012. Synthesis of nano calcium oxide from a gastropod shell and the performance evaluation for Cr (VI) removal from aqua system. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 51(2), 639-648.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L. S. P. 2014. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*, 202(1), 35-49.
- Páez, M. R., Ochoa-Muñoz, Y., Rodriguez-Páez, J. E. 2019. Efficient removal of a glyphosate-based herbicide from water using ZnO nanoparticles (ZnO-NPs). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101434.
- Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., Esquivel, K. 2020. Nanoparticles in agroindustry: Applications, toxicity, challenges, and trends. *Nanomaterials*, 10(9), 1654.
- Parre, E., Ghars, M. A., Leprince, A. S., Thiery, L., Lefebvre, D., Bordenave, M., Savouré, A. 2007. Calcium signaling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not nonionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 144(1), 503-512.
- Pascoli, M., Lopes-Oliveira, P. J., Fraceto, L. F., Seabra, A. B., Oliveira, H. C. 2018. State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications: a minireview. *Energy, Ecology and Environment*, 3, 137-148.
- Pasupathy, S., Rajamanickam, M. 2019. Synthesis of pure and bio modified calcium oxide (CaO) nanoparticles using waste chicken egg shells and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, 230.
- Peyrot, D., Barrón, E., Comas-Rengifo, M. J., Thouand, E., Tafforeau, P. 2007. A confocal laser scanning and conventional wide field light microscopy study of *Classopollis* from the Toarcian-Aalenian of the Fuentelsaz section (Spain). *Grana*, 46(4), 217-226.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 1-11.

- Pirasteh-Anosheh, H., Emam, Y. 2018. Modulation of oxidative damage due to salt stress using salicylic acid in *Hordeum vulgare*. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64(9), 1268-1277.
- Pirasteh-Anosheh, H., Saed-Moucheshi, A., Pakniyat, H., Pessarakli, M. 2016. Stomatal responses to drought stress. *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach*, 1, 24-40.
- Pokoo, R., Ren, S., Wang, Q., Motes, C. M., Hernandez, T. D., Ahmadi, S., Sunkar, R. 2018. Genotype-and tissue-specific miRNA profiles and their targets in three alfalfa (*Medicago sativa* L) genotypes. *BMC Genomics*, 19(10), 115-131.
- Pornsiriwong, W., Estavillo, G. M., Chan, K. X., Tee, E. E., Ganguly, D., Crisp, P. A., Pogson, B. J. 2017. A chloroplast retrograde signal, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate, acts as a secondary messenger in abscisic acid signaling in stomatal closure and germination. *Elife*, 6, e23361.
- Prochazkova, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., Singh, D. V. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161(4), 765-771.
- Radović, J., Sokolović, D., Marković, J. 2009. Lucerka-najvažnija višegodišnja krmna leguminoza u ishrani domaćih životinja. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25, 5-6.
- Rady, M. M., Elrys, A. S., El-Maati, M. F. A., Desoky, E. S. M. 2019. Interplaying roles of silicon and proline effectively improve salt and cadmium stress tolerance in *Phaseolus vulgaris* plant. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 558-568.
- Rastogi, A., Zivcak, M., Tripathi, D. K., Yadav, S., Kalaji, H. M., Brestic, M. 2019. Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum*: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast. *Photosynthetica*, 57(1), 209-216.
- Redmond, J. W., Tseng, A. 1979. High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *Journal of Chromatography A*, 170(2), 479-481.
- Reyes, J. L., Chua, N. H. 2007. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 49(4), 592-606.
- Rios, J. J., Garcia-Ibañez, P., Carvajal, M. 2019. The use of biovesicles to improve the efficiency of Zn foliar fertilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 899-905.
- Roy, A., Gauri, S. S., Bhattacharya, M., Bhattacharya, J. 2013. Antimicrobial activity of CaO nanoparticles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9(9), 1570-1578.
- Roy, A., Singh, V., Sharma, S., Ali, D., Azad, A. K., Kumar, G., Emran, T. B. 2022. Antibacterial and dye degradation activity of green synthesized iron nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2022, 1-6.
- Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A., Pessarakli, M. 2014. Reactive oxygen species (ROS) generation and detoxifying in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 37(10), 1573-1585.

- Salama, H. M. 2012. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology*, 3(10), 190-197.
- Salerno, G. L., Curatti, L. 2003. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why. *Trends in Plant Science*, 8(2), 63-69.
- Santos, H. P., Buckeridge, M. S. 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany*, 94(6), 819-830.
- Saradhi, P. P., AliaArora, S., Prasad, K. V. S. K. 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV-induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209(1), 1-5.
- Segal, L. M., Wilson, R. A. 2018. Reactive oxygen species metabolism and plant-fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 110, 1-9.
- Selinski, J., Scheibe, R., Day, D. A., Whelan, J. 2018. Alternative oxidase is positive for plant performance. *Trends in Plant Science*, 23(7), 588-597.
- Shabalina, S. A., Koonin, E. V. 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology Evolution*, 23(10), 578-587.
- Shatnawi, M. A., Johnson, K. A., Torpy, F. R. 2004. In vitro propagation and cryostorage of *Syzygium francissi* (Myrtaceae) by the encapsulation-dehydration method. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 40, 403-407.
- Shibin, O. M., Yesodharan, S., Yesodharan, E. P. 2015. Sunlight induced photocatalytic degradation of herbicide diquat in water in presence of ZnO. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(2), 1107-1116.
- Shibli, R. A., Kushad, M., Yousef, G. G., Lila, M. A. 2007. Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant Growth Regulation*, 51, 159-169.
- Shoeb, M., Mobin, M., Ali, A., Zaman, S., Naqvi, A. H. 2018. Graphene-mesoporous anatase TiO₂ nanocomposite: A highly efficient and recyclable heterogeneous catalyst for one-pot multicomponent synthesis of benzodiazepine derivatives. *Applied Organometallic Chemistry*, 32(1), e3961.
- Shoeb, M., Singh, B. R., Mobin, M., Afreen, G., Khan, W., Naqvi, A. H. 2015. Kinetic study on mutagenic chemical degradation through three pot synthesized graphene@ ZnO nanocomposite. *PLoS One*, 10(8), e0135055.
- Sierla, M., Waszczak, C., Vahisalu, T., Kangasjärvi, J. 2016. Reactive oxygen species in the regulation of stomatal movements. *Plant Physiology*, 171(3), 1569-1580.
- Silva, D. D., Kane, M. E., Beeson, R. C. 2012. Changes in Root and Shoot Growth and Biomass Partition Resulting from Different Irrigation Intervals for *Ligustrum japonicum* Thunb. *Hort Science*, 47(11), 1634-1640.

- Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N., Feller, U. 2009. Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. *Plant Growth Regulation*, 58, 107-117.
- Singh, B. R., Shoeb, M., Khan, W., Naqvi, A. H. 2015. Synthesis of graphene/zirconium oxide nanocomposite photocatalyst for the removal of rhodamineB dye from aqueous environment. *Journal of Alloys and Compounds*, 651, 598-607.
- Skirycz, A., Claeys, H., De Bodt, S., Oikawa, A., Shinoda, S., Andrianakaja, M., Inzé, D. 2011. Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *The Plant Cell*, 23(5), 1876-1888.
- Soheilikhah, Z., Karimi, N., Ghasmpour, H. R., Zebarjadi, A. R. 2013. Effects of saline and mannitol induced stress on some biochemical and physiological parameters of *Carthamus tinctorius* L. varieties callus cultures. *Australian Journal of Crop Science*, 7(12), 1866-1874.
- Solomon, M. M., Gerengi, H., Umoren, S. A. 2017. Carboxymethyl cellulose/silver nanoparticles composite: synthesis, characterization and application as a benign corrosion inhibitor for St37 steel in 15% H₂SO₄ medium. *ACS Applied Materials Interfaces*, 9(7), 6376-6389.
- Stoop, J. M., Williamson, J. D., Pharr, D. M. 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, 1(5), 139-144.
- Sun, D., Hussain, H. I., Yi, Z., Siegele, R., Cresswell, T., Kong, L., Cahill, D. M. 2014. Uptake and cellular distribution, in four plant species, of fluorescently labeled mesoporous silica nanoparticles. *Plant Cell Reports*, 33, 1389-1402.
- Sunkar, R., Zhu, J. K. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2001-2019.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43.
- Szabados, L., Savouré, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Tabrizi Hafez Moghaddas, S. S., Samareh Moosavi, S., Kazemi Oskuee, R. 2022. Green synthesis of calcium oxide nanoparticles in *Linum usitatissimum* extract and investigation of their photocatalytic and cytotoxicity effects. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10.
- Takahashi, F., Shinozaki, K. 2019. Long-distance signaling in plant stress response. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 106-111.
- Takahashi, F., Kuromori, T., Sato, H., Shinozaki, K. 2018. Regulatory gene networks in drought stress responses and resistance in plants. *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation: Adaptation Mechanisms and Their Applications*, 189-214.

- Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2020. Drought stress responses and resistance in plants: From cellular responses to long-distance intercellular communication. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1407.
- Tang, G., Du, L., Su, X. 2013. Detection of melamine based on the fluorescence resonance energy transfer between CdTe QDs and Rhodamine B. *Food Chemistry*, 141(4), 4060-4065.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., Puri, S. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1-12.
- Thiery, L., Leprince, A. S., Lefebvre, D., Ghars, M. A., Debarbieux, E., Savouré, A. 2004. Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14812-14818.
- Thor, K., Peiter, E. 2014. Cytosolic calcium signals elicited by the pathogen-associated molecular pattern flg22 in stomatal guard cells are of an oscillatory nature. *New Phytologist*, 204(4), 873-881.
- Tombesi, S., Nardini, A., Frioni, T., Soccolini, M., Zadra, C., Farinelli, D., Palliotti, A. 2015. Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine. *Scientific Reports*, 5(1), 12449.
- Tran, L. S. P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51), 20623-20628.
- Trindade, I., Capitão, C., Dalmay, T., Fevereço, M. P., Santos, D. M. D. 2010. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 231, 705-716.
- Upadhyay, U., Singh, P., Verma, O. P. 2019. Role of microRNAs in regulating drought stress tolerance in maize. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 328-331.
- Van den Broeck, L., Dubois, M., Vermeersch, M., Storme, V., Matsui, M., Inzé, D. 2017. From network to phenotype: the dynamic wiring of an *Arabidopsis* transcriptional network induced by osmotic stress. *Molecular Systems Biology*, 13(12), 961.
- Vance, C. P., Graham, P. H., Allan, D. L. 2000. Biological nitrogen fixation: phosphorus-a critical future need. *Nitrogen fixation: From Molecules to Crop Productivity*, 509-514.
- Vandervoort, A. R., Arai, Y. 2018. Macroscopic observation of soil nitrification kinetics impacted by copper nanoparticles: Implications for micronutrient nanofertilizer. *Nanomaterials*, 8(11), 927.
- Vaucheret, H., Mallory, A. C., Bartel, D. P. 2006. AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular Cell*, 22(1), 129-136.
- Vazquez, F., Blevins, T., Ailhas, J., Boller, T., Meins Jr, F. 2008. Evolution of *Arabidopsis* MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Research*, 36(20), 6429-6438.

- Verslues, P. E., Sharma, S. 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book*/American Society of Plant Biologists, 8.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J. K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539.
- Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669-687.
- Vosough, A., Ghouchani, R., Saed-Moucheshi, A. 2015. Genotypic variation and heritability of antioxidant related traits in wheat landraces of Iran. In *Biological Forum*, 7(2), 43-47.
- Wallington, E. A. (1979). Artifacts in tissue sections. *Medical Laboratory Sciences*, 36(1), 3-61.
- Wang, B., Sun, Y. F., Song, N., Wei, J. P., Wang, X. J., Feng, H., Kang, Z. S. 2014. MicroRNAs involving in cold, wounding and salt stresses in *Triticum aestivum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 90-96.
- Wang, B., Yanez, A., Novina, C. D. 2008. MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5343-5348.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., Zhang, W. H. 2011. Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 12(1), 1-11.
- Wani, S. H., Kumar, V., Khare, T., Guddimalli, R., Parveda, M., Solymosi, K., Kavi Kishor, P. B. 2020. Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. *Planta*, 251, 1-29.
- Wei, L., Zhang, D., Xiang, F., Zhang, Z. 2009. Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *International Journal of Plant Sciences*, 170(8), 979-989.
- Weijers, E. P., Khlystov, A. Y., Kos, G. P. A., Erisman, J. W. 2004. Variability of particulate matter concentrations along roads and motorways determined by a moving measurement unit. *Atmospheric Environment*, 38(19), 2993-3002.
- Windels, D., Vazquez, F. 2011. miR393: integrator of environmental cues in auxin signaling. *Plant Signaling Behavior*, 6(11), 1672-1675.
- Winter, J., Link, S., Witzigmann, D., Hildenbrand, C., Previti, C., Diederichs, S. 2013. Loop-miRs: active microRNAs generated from single-stranded loop regions. *Nucleic Acids Research*, 41(10), 5503-5512.
- Wohlbach, D. J., Quirino, B. F., Sussman, M. R. 2008. Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase *ATHK1* reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *The Plant Cell*, 20(4), 1101-1117.
- Wright, K. M., Horobin, R. W., Oparka, K. J. 1996. Phloem mobility of fluorescent xenobiotics in *Arabidopsis* in relation to their physicochemical properties. *Journal of Experimental Botany*, 47(11), 1779-1787.

- Wu, F., Chi, Y., Jiang, Z., Xu, Y., Xie, L., Huang, F., Pei, Z. M. 2020. Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature*, 578(7796), 577-581.
- Wu, S. G., Huang, L., Head, J., Chen, D. R., Kong, I. C., Tang, Y. J. 2012. Phytotoxicity of metal oxide nanoparticles is related to both dissolved metals ions and adsorption of particles on seed surfaces. *Journal Petroleum Environmental Biotechnology*, 3(4), 126.
- Xia, K., Wang, R., Ou, X., Fang, Z., Tian, C., Duan, J., Zhang, M. 2012. OsTIR1 and OsAFB2 downregulation via OsmiR393 overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PloS One*, 7(1), e30039.
- Xie, F., Wang, Q., Sun, R., Zhang, B. 2015. Deep sequencing reveals important roles of microRNAs in response to drought and salinity stress in cotton. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 789-804.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80, 75-84.
- Xu, C., Shi, L., Ji, A., Shi, X., Wang, X., Wang, X. 2016. Synthesis and characterization of reduced graphene oxide with D-fructose and D-galactose as reductants. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(9), 9914-9918.
- Xue, X., Liu, A., Hua, X. 2009. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. *BMB Reports*, 42(1), 28-34
- Yata, V. K., Tiwari, B. C., Ahmad, I. 2018. Nanoscience in food and agriculture: research, industries and patents. *Environmental Chemistry Letters*, 16, 79-84.
- Yazıcılar, B., Böke, F., Alaylı, A., Nadaroglu, H., Gedikli, S., Bezirganoglu, I. 2021. *In vitro* effects of CaO nanoparticles on Triticale callus exposed to short and long-term salt stress. *Plant Cell Reports*, 40, 29-42.
- Yoo, J. H., Park, C. Y., Kim, J. C., Do Heo, W., Cheong, M. S., Park, H. C., Cho, M. J. 2005. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3697-3706.
- Yoshida, Y. 1995. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal*, 7, 101-110.
- Yoshida, T., Fernie, A. R. 2018. Remote control of transpiration via ABA. *Trends in Plant Science*, 23(9), 755-758.
- Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, 162(1), 2-12.
- Zhang, C., Shi, S., Wang, B., Zhao, J. 2018. Physiological and biochemical changes in different drought-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties under PEG-induced drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-15.

- Zhang, T., Yu, L. X., Zheng, P., Li, Y., Rivera, M., Main, D., Greene, S. L. 2015. Identification of loci associated with drought resistance traits in heterozygous autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) using genome-wide association studies with genotyping by sequencing. *PLoS One*, 10(9), e0138931.
- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., Jin, Y. 2007. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 585-590.
- Zhao, L., Huang, Y., Adeleye, A. S., Keller, A. A. 2017. Metabolomics reveals Cu(OH)₂ nanopesticide-activated anti-oxidative pathways and decreased beneficial antioxidants in spinach leaves. *Environmental Science Technology*, 51(17), 10184-10194.
- Zheng, L., Hong, F., Lu, S., Liu, C. 2005. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*, 104, 83-91.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., Luo, L. 2010. Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4157-4168.
- Zhu, C., Guo, S., Fang, Y., Dong, S. 2010. Reducing sugar: new functional molecules for the green synthesis of graphene nanosheets. *ACS Nano*, 4(4), 2429-2437.
- Zhu, J., Zou, Z., Shen, Y., Li, J., Shi, S., Han, S., Zhan, X. 2019. Increased ZnO nanoparticle toxicity to wheat upon co-exposure to phenanthrene. *Environmental Pollution*, 247, 108-117.
- Zhu, Q. H., Helliwell, C. A. 2011. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *Journal of Experimental Botany*, 62(2), 487-495.
- Zhu, Q. H., Spriggs, A., Matthew, L., Fan, L., Kennedy, G., Gubler, F., Helliwell, C. 2008. A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome Research*, 18(9), 1456-1465.