



**SOĞUK STRESİ ALTINDAKİ YONCA (*MEDİCAGO SATİVA* L.) GENOTİPLERİNDE SALİSİLİK ASİT VE  
MAGNEZYUM OKSİT NANOPARTİKÜL  
UYGULAMALARININ SOĞUK STRESİ TOLERANSI  
VE MİRNA156, MİRNA173 GEN ANLATIM  
SEVİYELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Mustafa AKÇAY**

**Doktora Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRĐANOĐLU**

**Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Doğan İLHAN**

**2023**

**Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DOKTORA TEZİ**

**SOĞUK STRESİ ALTINDAKİ YONCA (*MEDİCAGO SATİVA* L.)  
GENOTİPLERİNDE SALİSİLİK ASİT VE MAGNEZYUM OKSİT  
NANOPARTİKÜL UYGULAMALARININ SOĞUK STRESİ TOLERANSI VE  
MİRNA156, MİRNA173 GEN ANLATIM SEVİYELERİNE ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**Mustafa AKÇAY**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU**

**Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Doğan İLHAN**

**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.

09 / 11 / 2023

Mustafa AKÇAY

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

# SOĞUK STRESİ ALTINDAKİ YONCA (*MEDİCAGO SATİVA* L.) GENOTİPLERİNDE SALİSİLİK ASİT VE MAGNEZYUM OKSİT NANOPARTİKÜL UYGULAMALARININ SOĞUK STRESİ TOLERANSI VE MİRNA156, MİRNA173 GEN ANLATIM SEVİYELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Mustafa AKÇAY

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Doğan İLHAN

Bu çalışmanın amacı, yonca (*Medicago sativa* L.) genotiplerinin (Van/Denizli) soğuk stresine karşı tepkilerini değerlendirmek ve fidelere uygulanan eksojen salisilik asit (SA), magnezyum oksit nanopartikülü (MgO NPs) ile bunların kombinasyonunun (SA+MgO NPs) bu tepkiler üzerindeki etkilerini incelemektir. Bu amaçla, 30 gün süreyle büyütülen yonca genotiplerinin yapraklarına eksojen olarak SA (1 ve 2 mM), MgO NPs (5 ve 20 ppm) ve SA+MgO NPs uygulanmış ve 14'er gün boyunca bitkiler sırasıyla 10 °C ve 4 °C soğuk stresine maruz bırakılmıştır. Yapılan uygulamaların soğuk hasarını yatıştırıcı etkilerini belirlemede, bazı biyokimyasal parametrelerin yanı sıra taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntü analizi ve miRNA (miRNA156 ve miRNA173) gen anlatım seviyelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Kontrol grubuna göre her iki düşük sıcaklık uygulaması total şeker, lipid peroksidasyonu (LPO), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve prolin içeriklerini artırmıştır. Düşük sıcaklık koşullarında, tek başına SA ve MgO NPs uygulamaları LPO ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinde belirgin bir düşüş ile prolin miktarında artış sağlarken, total şeker içeriğini etkilememiştir. Çalışılan her iki düşük sıcaklıkta soğuk stresin olumsuz etkilerini yatıştırma konusunda en etkili uygulama, 2 mM SA+20 ppm MgO NPs içeren yüksek konsantrasyonlu kombinasyon olmuştur. miRNA gen anlatım seviyeleri değerlendirildiğinde miR156, Van genotipinde 10 °C'de, Denizli ekotipi 10 °C / 4 °C koşullarında aşağı regüle olurken, Van genotipinde 4 °C'de yukarı regüle olmuştur. miR173, Van genotipinde 10 °C'de, Denizli ekotipi 10 °C / 4 °C'de yukarı regüle olurken, Van genotipinde 4 °C'de aşağı regüle olmuştur. 2 mM SA+20 ppm MgO NPs uygulaması her iki genotipin düşük sıcaklıklarında (10 / 4 °C) miR156 yukarı, miR173'ün aşağı regüle olmasına neden olmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, 2 mM SA+20 ppm MgO NPs kombinasyonunun, çalışılan yonca genotiplerinin düşük sıcaklıklara karşı gösterdiği bazı biyokimyasal ve gen düzeyindeki adaptasyon mekanizmalarını güçlendirdiğini ve soğuk stresine karşı etkili bir koruma sağladığını göstermektedir.

2023, 141 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Medicago sativa*, soğuk stresi, salisilik asit, MgO nanopartikül, miR156, miR173

## ABSTRACT

Ph.D

### THE EFFECT OF SALICYLIC ACID AND MAGNESIUM OXIDE NANOPARTICLE APPLICATIONS ON COLD STRESS TOLERANCE AND MİRNA156, MİRNA173 GENE EXPRESSION LEVELS IN ALFALFA (*MEDİCAGO SATİVA L.*) GENOTYPES UNDER COLD STRESS

Mustafa AKÇAY

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İsmail BEZİRĞANOĞLU

Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Doğan İLHAN

This study aims to evaluate the responses of alfalfa (*Medicago sativa L.*) genotypes (Van/Denizli) to cold stress and investigate the effects of exogenous salicylic acid (SA), magnesium oxide nanoparticles (MgO NPs), and their combination (SA+MgO NPs) on these responses. For this aim, alfalfa genotypes grown for 30 days were subjected to exogenous application of SA (1 and 2 mM), MgO NPs (5 and 20 ppm), and SA+MgO NPs, and the plants were exposed to cold stress at 10 °C and 4 °C for 14 days each, respectively. To determine the alleviating effects of the treatments on cold damage, changes in some biochemical parameters, scanning electron microscope (SEM) image analysis, and alterations in miRNA (miRNA156 and miRNA173) gene expression levels were examined. Both low-temperature applications increased total sugar, lipid peroxidation (LPO), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and proline contents compared to the control. Under the cold conditions, SA and MgO NPs alone led to a significant decrease in LPO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents and an increase in proline content, while not affecting total sugar content. The most effective application in alleviating the adverse effects of cold stress at both temperatures was the high-concentration combination containing 2 mM SA+20 ppm MgO NPs. When evaluating miRNA gene expression levels, miR156 was down-regulated in the Van genotype at 10 °C and in the Denizli ecotype at 10 °C / 4 °C, while it was up-regulated in the Van genotype at 4 °C. miR173 was up-regulated in the Van genotype at 10 °C and in the Denizli ecotype at 10 °C / 4 °C, while it was down-regulated in the Van genotype at 4 °C. The application of 2 mM SA+20 ppm MgO NPs resulted in up-regulation of miR156 and down-regulation of miR173 at both low temperatures (10 / 4 °C) in both genotypes. The results of this study indicate that the combination of 2 mM SA+20 ppm MgO NPs enhances some biochemical and genetic adaptation mechanisms of the studied alfalfa genotypes to low temperatures, providing effective protection against cold stress.

2023, 141 page

**Keywords:** *Medicago sativa*, cold stress, salicylic acid, MgO nanoparticle, miR156, miR173

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. İsmail BEZİRĖANOĐLU ile eő danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Doğan İLHAN'a,

Tez çalıőmasının ilk gününden itibaren her konuda destek sağlayarak yol gösteren Dr. Büőra YAZICILAR ile laboratuvar tez çalışması süresince yardımları ile katkı sunan Doç. Dr. Evren KOÇ, Doç. Dr. Musa ERDOĐAN, Dr. Barıő YILDIZ, Dr. Öğr. Üyesi Cem Öziç ve doktora öğrencileri Merve ŐİMŐEK GEYİK ile Ümmü Gülsüm KOÇ'a,

Tez çalıőmasının gerçekteőmesine maddi destek sağlayan Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tez çalıőmasının önemli bir bölümünün gerçekteőtirilmesine imkân sağlayan Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Kafkas Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezine,

Son olarak hayatım boyunca destekleri ile her zaman yanımda olan annem, babam ve kız kardeőim ile varlığıyla hayatıma anlam katan sevgili eőime teşekkür ediyor, Őükranlarımı sunuyorum.

**Mustafa AKÇAY**  
**Kasım 2023**

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Yonca ( <i>Medicago sativa</i> L.).....	3
1.2. Stres ve Bitkiler.....	5
1.3. Bitkilerin Strese Karşı Geliştirdikleri Yanıtlar.....	7
1.4. Soğuk Stresi.....	10
1.4.1. Bitkiler üzerinde soğuk stresinin etkileri.....	11
1.4.2. Bitkilerin soğuk strese karşı yanıtları.....	15
1.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	16
1.5.1. Lipid peroksidasyonu.....	18
1.5.2. Soğuk stresinde osmoprotektanlar.....	19
1.6. Hormonlar / Salisilik Asit.....	21
1.6.1. Salisilik asidin biyosentezi ve bitkilerdeki rolleri.....	23
1.7. Nanobilim ve Nanoteknoloji.....	26
1.7.1. Tarımda nanoteknoloji.....	28
1.7.2. Nanopartikül sentezi.....	28
1.7.3. Yeşil sentez (biyolojik yöntemler).....	29
1.8. Magnezyum (Mg) ve Bitkideki Fonksiyonları.....	30
1.9. Magnezyum Oksit (MgO) Nanopartikülü.....	32
1.9.1. MgO nanopartikülünün uygulama alanları.....	33
1.10. Nanopartiküllerin Bitkiler Tarafından Alınımı.....	34
1.11. Nanopartikül Karakterizasyonu.....	36
1.11.1. SEM (Taramalı elektron mikroskobu).....	37
1.12. miRNA (Mikro RNA).....	38
1.12.1. Bitkide miRNA sentezi.....	38

1.12.2. miRNA'ların hedef genlerin anlatımını düzenlemeleri .....	39
1.12.3. Stres ve miRNA .....	40
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>44</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>54</b>
3.1. Materyal .....	54
3.1.1. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri .....	54
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihaz ve modelleri .....	54
3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal ve kitler .....	55
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanma aşamaları.....	56
3.2. Yöntem.....	58
3.2.1. Siyah frenk üzümü ( <i>Ribes nigrum</i> ) meyve özlerinin hazırlanması.....	58
3.2.2. MgO nanopartiküllerinin yeşil sentezi .....	58
3.2.3. MgO nanopartiküllerinin karakterizasyonu .....	59
3.2.4. Van/Denizli çeşitleri yonca tohumlarının ekimi ve bitkilerin yetiştirilmesi .....	60
3.2.5. SA ve MgO nanopartikül konsantrasyonları deney tasarımı ve uygulaması .....	61
3.2.6. Soğuk stresi, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül uygulaması .....	63
3.2.6.1. 10 °C soğuk stresi uygulaması .....	63
3.2.6.2. 4 °C soğuk stresi uygulaması .....	64
3.2.7. Biyokimyasal Analizler.....	65
3.2.7.1. Toplam çözünebilir şeker içeriğinin belirlenmesi.....	65
3.2.7.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriğinin belirlenmesi .....	66
3.2.7.3. Lipid peroksidasyonu içeriğinin belirlenmesi .....	66
3.2.7.4. Prolin miktarının belirlenmesi .....	67
3.2.8. SEM analizi (Taramalı elektron mikroskobu ile görüntü alınması).....	68
3.2.9. Moleküler analizler ile mtr-miR156a ve ath-miR173-5p gen anlatım seviyelerinin belirlenmesi.....	68
3.2.9.1. Total RNA izolasyonu .....	69
3.2.9.2. cDNA sentezi .....	70
3.2.9.3. Real-Time PCR (RT-qPCR) .....	71
3.2.9.4. Real-Time PCR (RT-qPCR) analiz metodu .....	72
3.2.10. İstatistiksel Analiz.....	73
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>74</b>
4.1. MgO Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	74
4.1.1. X-ışını kırınım analizi (XRD) .....	74

4.1.2. FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) analizi.....	75
4.1.3. SEM ve EDX analizi.....	76
4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	77
4.2.1. Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarının toplam çözünebilir şeker içeriği üzerine etkisi.....	77
4.2.2. Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi .....	81
4.2.3. Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarının MDA içeriği üzerine etkisi .....	85
4.2.4. Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarının prolin içeriği üzerine etkisi .....	89
4.3. SEM Analizi.....	93
4.4. Moleküler analizler ile mtr-miR156a ve ath-miR173-5p gen anlatım seviyelerinin değerlendirilmesi .....	95
4.4.1. Total RNA izolasyonu sonuçları.....	95
4.4.2. Real-Time PCR (qRT-PCR) Gen İfadesi Analiz Sonuçları.....	96
4.4.2.1. Van ve Denizli çeşitlerine ait yaprak örneklerindeki mtr-miR156a gen seviyesindeki kat değişimi .....	97
4.4.2.2. Van ve Denizli çeşitlerine ait yaprak örneklerindeki ath-miR173-5p gen seviyesindeki kat değişimi .....	99
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>110</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>112</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>140</b>
EK 1.....	140

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

%	Yüzde
µl	Mikrolitre
Å	Angström
dk	Dakika
g	Gram
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
N	Normal
nm	Nanometre
Θ	Teta
°C	Santigrat derece
ppm	Milyonda bir
rpm	Dakikada devir sayısı
sn	Saniye

### Kısaltmalar

ABA	Absisik Asit
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Alüminyum Oksit
CDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
DAG	Diasil gliserol
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNSA	3,5-Dinitrosalisilik Asit
EL	Elektrolit Sızıntısı
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit

HCl	Hidroklorik Asit
HEN1	RNA 2'-O- Metiltransferaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HST1	Protein Asetillizin N-asetiltransferaz
ICS	İzokromat
IP3	İnositol Trifosfat
KI	Potasyum İyodür
MDA	Malondialdehit
MgO	Magnezyum Oksit
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı RNA
NaOH	Sodyum Hidroksit
NPs	Nanopartikül
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süper oksit Radikali
OH <sup>-</sup>	Hidroksil Radikali
PA	Fosfotidik Asit
PAL	Fenilalanin Amonyak Lipaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-qPCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SA	Salisilik Asit
SAG	Salisilik Asit-β-glukozit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SiO <sub>2</sub>	Silisyum Dioksit
TBA	Tiyobarbutirik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
TiO <sub>2</sub>	Titanyum Dioksit
XRD	X-ışını Spektroskopi
ZnO	Çinko Oksit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitkileri etkileyen bazı abiyotik stres faktörleri .....	7
Şekil 1.2. Bitkinin strese karşı verdiği tepkinin aşamaları.....	8
Şekil 1.3. Soğuk stresin bitkilerdeki fizyolojik, sitolojik ve biyokimyasal etkileri.....	13
Şekil 1.4. Serbest radikaller ve reaktiflerin oluşumu.....	18
Şekil 1.5. Oksidatif stres ve biyolojik sonuçları .....	18
Şekil 1.6. Bitkilerde soğuk stres tepkilerinin hormonal kontrolü .....	22
Şekil 1.7. Salisilik asit kimyasal yapısı.....	23
Şekil 1.8. Bitkilerde salisilik asit biyosentezinin metabolik yolu .....	24
Şekil 1.9. Bitkilerde salisilik asidin biyolojik anlamda fonksiyonları.....	25
Şekil 1.10. Nanoteknolojide kullanılan bazı nanopartiküller .....	27
Şekil 1.11. Nanopartikül sentezinde kullanılan 2 yaklaşım.....	29
Şekil 1.12. Nanopartikül sentezinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler.....	29
Şekil 1.13. Mg'nin bitkilerdeki fonksiyonları .....	32
Şekil 1.14. MgO nanopartikülünün uygulama alanları .....	34
Şekil 1.15. Bitkilerde nanopartiküllerin emilimi, alınımı ve taşınması .....	35
Şekil 1.16. Nanoparçacıkların karakterizasyonunda kullanılan bazı teknikler.....	37
Şekil 1.17. Bitkilerde Mikro RNA (miRNA) sentezi .....	39
Şekil 1.18. Abiyotik streslere karşı yardım eli olarak miRNA'lar .....	41
Şekil 3.1. Yeşil sentez MgO nanopartiküllerinin siyah frenk üzümü meyve özü kullanılarak eldesi .....	59
Şekil 3.2. Van / Denizli çeşitlerine ait yonca tohumlarının ekimi .....	60
Şekil 3.3. Van çeşidi 7. 15. ve 30. günlerin morfolojisi .....	61
Şekil 3.4. Denizli çeşidi 7. 15. ve 30. günlerin morfolojisi .....	61
Şekil 3.5. SA ve MgO nanopartikül çözeltilerinin eksojen uygulaması .....	63
Şekil 3.6. Bitki yaprak örnekleri alınımı.....	64
Şekil 3.7. Çözünabilir şeker içeriğini belirlemede kullanılan standart grafiği .....	65
Şekil 3.8. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarını belirlemede kullanılan standart grafiği.....	66
Şekil 3.9. Prolin miktarını belirlemede kullanılan standart grafiği.....	68
Şekil 4.1. Yeşil sentez MgO nanoparçacıklarının XRD spektrumu .....	75
Şekil 4.2. Yeşil sentez MgO nanoparçacıklarının FTIR spektrumu .....	76
Şekil 4.3. Yeşil sentez MgO NPs'nin SEM görüntüsü ve EDX spektrumu .....	77

Şekil 4.4. Van ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi toplam çözünebilir şeker içeriği .....	78
Şekil 4.5. Van ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi çözünebilir şeker içeriği ısı haritası .....	79
Şekil 4.6. Denizli ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi toplam çözünebilir şeker içeriği.....	80
Şekil 4.7. Denizli ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi çözünebilir şeker içeriği ısı haritası .....	81
Şekil 4.8. Van ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği .....	82
Şekil 4.9. Van ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği ısı haritası .....	83
Şekil 4.10. Denizli ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği .....	84
Şekil 4.11. Denizli ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği ısı haritası .....	85
Şekil 4.12. Van ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi MDA içeriği .....	86
Şekil 4.13. Van ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi MDA içeriği ısı haritası .....	87
Şekil 4.14. Denizli ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi MDA içeriği .....	88
Şekil 4.15. Denizli ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi MDA içeriği ısı haritası.....	89
Şekil 4.16. Van ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi prolin içeriği .....	90
Şekil 4.17. Van ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi prolin içeriği ısı haritası.....	91
Şekil 4.18. Denizli ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi prolin içeriği .....	92
Şekil 4.19. Denizli ( <i>Medicago sativa</i> L.) çeşidi prolin içeriği ısı haritası.....	93
Şekil 4.20. Van çeşidi 10 °C SEM görüntüleri .....	93
Şekil 4.21. Denizli çeşidi 10 °C SEM görüntüleri .....	94
Şekil 4.22. Van çeşidi 4 °C SEM görüntüleri .....	94
Şekil 4.23. Denizli çeşidi 4 °C SEM görüntüleri .....	95
Şekil 4.24. Van/Denizli çeşitlerine ait mtr-miR156a gen seviyesindeki değişiklikler ...	98
Şekil 4.25. Van/Denizli çeşitlerinin mtr-miR156a gen anlatım seviyelerinin ısı haritası .....	99
Şekil 4.26. Van/Denizli çeşitlerine ait ath-miR173-5p gen seviyesindeki değişiklikler .....	101
Şekil 4.27. Van/Denizli çeşitlerinin ath-miR173-5p gen anlatım seviyelerinin ısı haritası .....	101

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yonca'nın önemli türleri.....	5
Çizelge 3.1. Tez çalışması boyunca kullanılan cihaz ve modelleri .....	54
Çizelge 3.2. Tez çalışması boyunca kullanılan kimyasal ve kitler .....	60
Çizelge 3.3. SA ve MgO nanopartikül uygulama konsantrasyonları deney tasarımı .....	62
Çizelge 3.4. cDNA sentezi için kullanılan mix bileşenleri .....	70
Çizelge 3.5. cDNA sentezi için gerekli reaksiyon koşulları .....	70
Çizelge 3.6. Kullanılan primerlerin sekans bilgileri .....	71
Çizelge 3.7. Real-Time qPCR için kullanılan reaksiyon bileşenleri .....	72
Çizelge 3.8. Real-Time qPCR için gerekli reaksiyon koşulları .....	72
Çizelge 4.1. MgO nanopartikülü XRD kırınımından elde edilen kristal boyut.....	75
Çizelge 4.2. Van çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin çözünebilir şeker içeriği üzerine etkisi .....	78
Çizelge 4.3. Denizli çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin çözünebilir şeker içeriği üzerine etkisi .....	80
Çizelge 4.4. Van çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi .....	82
Çizelge 4.5. Denizli çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi .....	84
Çizelge 4.6. Van çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin malondialdehit (MDA) analizi.....	86
Çizelge 4.7. Denizli çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin malondialdehit (MDA) analizi.....	88
Çizelge 4.8. Van çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin prolin miktar analizi.....	90
Çizelge 4.9. Denizli çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin prolin miktar analizi.....	92
Çizelge 4.10. Van ve Denizli çeşitlerinden izole edilen RNA konsantrasyonları .....	95
Çizelge 4.11. 2 <sup>-ΔΔCT</sup> yöntemi ile elde edilen mtr-miR156a gen seviyesindeki kat değişimi .....	98
Çizelge 4.12. 2 <sup>-ΔΔCT</sup> yöntemi ile elde edilen ath-miR173-5p gen seviyesindeki kat değişimi .....	100

### 1. GİRİŞ

Tarım alanlarındaki azalış ile beraber nüfusun da artması hem bitkisel hem de hayvansal üretimde kaliteli bir verimin artışına ihtiyaç duyulmaktadır. Nüfusun beslenme ihtiyaçlarını karşılamak adına bitkisel ve hayvansal üretimi artırmak zorunlu hale gelmiştir. Hayvansal üretimin artırılması, yem bitkilerinin artırılmasına üretim içerisindeki yıllık dalgalanmaların azaltılmasına aynı şekilde üretimde maliyetlerin azaltılmasına bağlıdır. Hayvansal üretim içerisindeki maliyetler içerisinde %70-%75 oranında yem masrafı bulunmaktadır (Arslan ve Erdurmuş 2012). Yem bitkilerinin ekimi hayvansal üretimde çok önemli bir yere sahiptir. Dünya da ve ülkemizde yem bitkilerinin tarımının önemi gittikçe artmaktadır (Yolcu ve Tan 2008). Yem bitkilerinin, kültür bitkilerinin veriminin kaliteli olması aynı şekilde toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerine pozitif yönde etki ettiği bilinmektedir (Açıkgöz 2001). Ülkemiz, yem bitkileri yetiştirme açısından bölge olarak şanslı bir konumda yer almaktadır. Fakat verimli kaba yem açısından yetersizdir (Semerci ve Kurt 2006). Dünyaya baktığımızda yem kaynaklarının ilk sırasında buğdaygiller ve baklagiller familyası gelmektedir. Fakat ülkemizde baklagiller familyası içerisinde olan yem bitki üretimine maalesef yeteri kadar önem verilmemektedir (Eren 2014). Buğdaygiller familyasından sonra hem insanların ihtiyaçlarını karşılamada hem de hayvan beslemede baklagiller familyası önemli bir yere sahiptir. Nüfus artışı baklagiller familyasını daha da önemli hale getirmiştir (Kaçar vd 2005). Ülkemizde tarımı en fazla yapıлып, beslenmede kullanılan yem bitki türü baklagillerdir. Baklagil familyası, insan ve hayvan beslemenin yanında toprak gelişimine katkıda bulunan, gübrelemede, peyzaj alanlarında ve endüstride de süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Shultze and Kondorosi 1998; Verdier et al. 2008). Baklagiller önemli bir yem kaynağıdır; çünkü yüksek miktarda protein, karbonhidrat ve yeterli miktarda yağ oranına sahiptir (Ferber 1999; Phillips 2006). Azot için gerekli olan besin ihtiyacı baklagillerden, insanlar için gerekli olan protein ihtiyacı 1/3'ü bitkisel yani baklagillerden sağlanmaktadır (Açıkgöz 2001). Gelişmiş ülkelerde baklagiller familyası tarımsal anlamda insan ve hayvan beslemesi bakımından önemli bir yere sahiptir (Graham and Vance 2003). Baklagiller familyası morfolojik ve tarımsal anlamda farklılık göstermektedir. Bitkinin cinslerinde özellikle çeşitlilik mevcuttur. Baklagiller familyası Dünyada 600 cins ve 15.000 tür iken ülkemizde 61 cins ve 900 üzeri tür olarak tespit edilmiştir. Baklagiller familyasına ait bazı türler ise yonca

## 1. GİRİŞ

---

(*Medicago* spp.), taş yonca (*Melilotus* spp.), yer fıstığı (*Arachis hypogae*), üçgül (*Trifolium* spp.) bezelye (*Pisum* spp.) söylenebilir (Seçmen vd 2008). Yaşamın sürekliliği için büyük önem taşıyan baklagiller familyasından olan yonca çevresel faktörlere maruz kalabilmektedir. Bu faktörler hem bitki büyümesini hem de ürünlerin verimliliğini etkileyebilmektedir. Biyotik ve abiyotik olarak isimlendirilen bu faktörler strese neden olabilmektedir. Stres, bitkide önemli fizyolojik ve metabolik değişikliklere neden olan bitkide büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkileyen bir faktördür. Stres faktörüne maruz kalan bitkilerde hücrel redoks dengesi bozularak oksidatif hasar ve reaktif oksijen türlerinin fazla üretilmesi durumu söz konusu olmaktadır. Reaktif oksijen türleri, bitki hücresinin sitoplazma, mitokondri, kloroplast gibi kısımlarında meydana gelerek hücrede lipid, zar, klorofil, protein, DNA gibi önemli hücre yapılarının bozulmalarına neden olmaktadır. Bitkiler bu bozulmalardan kendilerini korumak için antioksidan savunma sistemlerini çalıştırlar. Abiyotik faktörler içerisinde yer alan sıcaklık stresi bitkinin gelişimini ve verimliliğini sınırlandıran bir stres türüdür. Bitkilerin gelişimlerini sürdürebilmeleri için gerekli olan optimum sıcaklık derecesinin üstü yüksek, altı ise düşük sıcaklık yani soğuk stresi olarak kabul edilmektedir. Tarım alanlarında meydana gelen stres faktörleri içerisinde soğuk ve don stresinin %15'lik bir alanda olduğu görülmektedir. Soğuk stresi, bitkide soğuğa maruz kalma süresine, soğuğa hassas bitki çeşidine ve iklimasyona bağlı olarak üşüme-donma hasarları ortaya çıkarak, baklagil bitkilerinin kalite ve veriminin azalmasına neden olabilmektedir. Bitkilerin soğuk stresine nasıl yanıt verdiği ve olumsuz stres iklim şartlarıyla baş edebilmek için hangi savunma mekanizmalarını çalıştırdıklarının araştırılması önem arz etmektedir. Bu mekanizmalardan biri olan miRNA'lar gen ifadesini yeniden düzenleyen, protein kodlamayan RNA molekülleridir. Bazı miRNA'lar bitki türleri içerisinde soğuk stresi ile düzenlenmiştir.

Nüfusun ve maliyetlerin artmasına karşılık beslenme ihtiyaçlarının giderilmesi ve ürün kalitesinin artırılması amacıyla bu çalışmada baklagiller familyasına ait olan Van ve Denizli yonca bitki çeşitlerinin soğuk stresi altında, salisilik asit ve MgO nanopartikül eksojen uygulamalarının verdiği biyokimyasal yanıtlar ile miRNA156 ve miRNA173 gen anlatım seviyeleri üzerindeki etkisi araştırılmaya çalışılmıştır.

### 1.1. Yonca (*Medicago sativa* L.)

Baklagiller familyasına ait türler ve yem bitkileri içerisinde önemli bir yere sahip olan yonca, ülkemizde yetiştiriciliği yapılmakta olan ekim alanı en fazla yapılan bir bitkidir (%36,6) (Yolcu ve Tan 2008). Yonca, halk dilince kaba uluslararası alanda ise *Medicago sativa* L.(lucerne) veya *alfalfa* olarak kullanılmaktadır. *Medicago* cinsine ait olan yonca (*Medicago sativa*), *Fabaceae* familyasının da *Faboideae* alt familyasına özgüdür. *Medicago* kelimesinin kökeni Media'dır. Kökeni yond yani attan geldiği kabul edilir. Arapçada yonca en iyi at yemi olarak bilinmektedir (Michaud et al. 1988; Mikaili and Shayegh 2011; Putnam and Orlof 2014; Chaudhary et al. 2020; Tan and Yolcu 2021). Yem bitkilerinin kraliçesi olarak bilinen yonca, dünya genelinde yaklaşık olarak 32 milyon hektar içerisinde yetiştirilen ve tarım alanlarının da %2,5'luk oranını oluşturan üstün kaliteli bir baklagil yem bitkisidir (Anower et al. 2013; Song et al. 2019; Hossain et al. 2020; Ikhajiagbe et al. 2021). Yoncanın anavatanı Anadolu-Orta Asya arasında kalan bölgedir. Kültüre alınan ilk yem bitkisi olma özelliği gösterir (Tan and Yolcu 2021). İlk kullanımı M.Ö. 1400 yılları (Bronz-Tunç Çağı), demir dönemi ise M.Ö. 700 yıllarına dayanmaktadır. Orta Asya'dan getirilen atların beslenmeleri için yetiştirildiği düşünülür (Putnam and Orlof 2014).

Yonca, düşük lif yapısına sahip olup çiftlik hayvanları açısından yüksek besin değerli protein, vitamin, mineral ve sindirilebilirlik bakımından oldukça zengindir. Vitaminler, yağda eriyenler (A, D, E, K) ile suda eriyenler (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9) ve mineraller ise K, P, Cl, Ca, Mg ve Cu yoncada yaygın şekilde bulunmaktadır. Dolayısıyla hayvanlarda lezzetli bir yem oluşturur (Garrett 1995; Marković et al. 2009; Mezni et al. 2010; Norouzi and Khademi 2010; Acharya et al. 2020). Total protein miktarı yonca da %17-21 arasındadır (Arinze et al. 2003). Soyadan 3 kat buğdaydan ise 4 kat daha fazla protein üreten baklagildir (Arinze et al. 2003; Hossain et al. 2020; Mbarki et al. 2020). Yonca yıl içerisinde birkaç kez hasat edilebilen, işlenebilir, verimi yüksek güçlü bir bitkidir. Bundan dolayı yonca hayvancılıkta saman, silaj, yonca unu, yeşil gübre ve direkt yem (pelet, silo) olarak kullanılmaktadır (Peltekova and Broderick 1996; Radovic et al. 2009; Ozkose 2018). Yonca hayvancılığı desteklemekte kritik öneme sahiptir (Dhakal et al. 2020).

## 1. GİRİŞ

---

Yonca, kök sistemi derin 8-10 ile 20-30 metre derinliklere kadar gidebilen, yabancı dölllenme gerçekleştiren bir bitkidir. Farklı toprak ve iklim şartlarına uyum sağlayabilmektedir. Örneğin, Kaliforniya +60 derece ile Sibirya -50 derece (Gençkan 1992; Mikaili and Shayegh 2011; Putnam and Orlof 2014; Chaudhary et al. 2020; Uslu ve Kaya 2021). Yoncanın köklerinin derine nüfuz etmesinden dolayı topraktan Ca, K ve P sağlayarak üst toprağın zenginleşmesini sağlar. Örtücülük yapma özelliğiyle de toprağı suya ve sönmeye karşı korur (Zhang et al. 2019). Yonca, çeşitli bakteri türleri *Rhizobium*, *Sinorhizobium meliloti* gibi bakteriler ile ortak yaşam (simbiyotik) sürdürebilme özellikleriyle nitrojeni (azot) emme yeteneği sayesinde toprağın verimliliğini artırarak sürdürülebilir tarımda da önemli bir yere sahip olmuştur (Wang et al. 2011; Li et al. 2014; Ghnaya et al. 2015; Tabande et al. 2022). Yonca ortak yaşam (simbiyoz) ile atmosferik azotu yılda 60 ile 80 kg arasında bağlayabilmektedir (Lindström and Mousavi 2019). Yonca kendine tozlaşabilme özelliğine sahiptir. Tozlaşma çeşitli arılar (bal, kesici, bombus ve alkali arılar), rüzgâr ve yağmur gibi doğa olayları ile sağlanmaktadır. Ayrıca bal üretiminde bal arılarının, çiçeklenme esnasında yonca tarlalarını sık sık ziyaret etmesinden dolayı önemli rol oynamaktadır. Yoncanın özel bir statüsü vardır. Çünkü yüksek bir kantitatif özelliğe sahiptir ve çevresel faktörlere karşı yüksek bir tolerans göstermektedir (Radovic et al. 2009; Putnam and Orloff 2014; Mastinu et al. 2021). Yonca, antikanserojen ve detoksifiye edici özellikler sergilemektedir (Jamil et al. 2007; Singh and Rawat 2021).

Yoncanın 54 türü vardır. Bunlardan ikisi iki yıllık, on yedisi çok yıllık ve otuz beş türü de tek yıllıktır. Yoncanın Türkiye’de 40, dünyada da 87 türünün olduğu da ileri sürülmektedir. Tarımsal anlamda yoncanın on önemli türü vardır ve bunlardan *Medicago sativa* %90-95 oranında en çok kullanılmaktadır. Diğer türler ise Çizelge 1.1.’de verilmiştir (Gençkan 1992; Mikaili and Shayegh 2011; Gholami et al. 2014; Putnam and Orlof 2014; Chaudhary et al. 2020; Tan and Yolcu 2021; Uslu ve Kaya 2021).

## 1. GİRİŞ

**Çizelge 1.1.**Yonca'nın önemli türleri

<i>Medicago</i>	Yonca
<i>Medicago elegans</i>	Zarif
<i>Medicago hispida</i>	Sert tüylü
<i>Medicago scutellata</i>	Çanakvari
<i>Medicago tuberculata</i>	Pürtüklü
<i>Medicago orbicularis</i>	Dişkvari
<i>Medicago maculata</i>	Benekli
<i>Medicago varia</i>	Melez

### 1.2. Stres ve Bitkiler

Canlılar doğa içerisinde birbirleri ile etkileşim içerisindeyler. Bu etkileşim içerisinde bitkilerin iyi derecede gelişim gösterebilmeleri için çevre faktörlerinin optimum seviyede olması gerekmektedir. Bitkiler buldukları çevrede olumsuz koşullarla karşılaştıklarında adaptasyon eksikliği ve bitkinin belirli bir metabolizma tolerans kabiliyetinin olması ile strese girebilmektedir. Dış ortama bağlı olarak gelişen etkenlerin uzun sürmesi durumunda bitkide büyüme ve gelişme olumsuz yönde etkilenir ve bitkiler etkenlere biyolojik hasar, fizyolojik değişim ve hastalıklar ile yanıt verir. Bu olumsuz durumların tamamı bitkilerde stres olarak tanımlanmaktadır. Stresin tanımı hayvanlarda, insanlarda ve bitkide oldukça farklıdır (Shao et al. 2008).

Stres kelimesi, ilk kez 1936 yılında Hans Selye tarafından geliştirilmiş ve bitkilerdeki çevresel kısıtlamaların tanımlanmasında uygulanmıştır. Hans Selye stresi, her türlü değişmeye yanıt olarak tanımlamıştır (Selye 1936). J. Levitt stresi, canlı organizmalar için elverişsiz çevresel faktör olarak ifade ederken, Larcher ise stresi, bitkinin işlevlerinin istikrarsızlaşmasına neden olduğu bir durum olarak tanımlamaktadır (Levitt 1980; Larcher 1987). Lichtenthaler stresi, eu-stres ve dis-stres olarak sınıflandırmıştır. Eu-stres bitki için uyarıcı, aktive edici ve gelişim için olumludur. Fakat dis-stres ise hasara sebep olan bitkiyi olumsuz etkileyen sıkıntı demektir. Stresin hafif olması bitkide fizyolojik aktiviteyi artırarak, hücre metabolizmasını harekete geçirir yani bitki açısından olumludur (Lichtenthaler 1996).

## 1. GİRİŞ

---

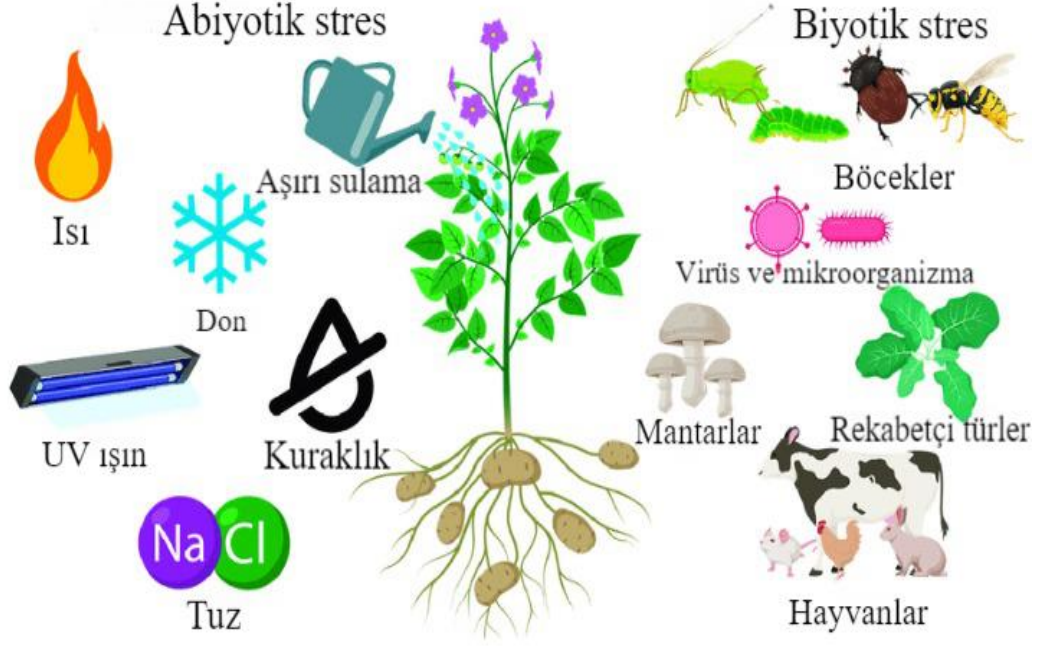
Bitkileri etkileyen stres faktörleri biyotik ve abiyotik faktörler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (Gorovits and Czosnek 2007; Fraire-Velazquez et al. 2011; Paramo et al. 2020).

### **Biyotik stres faktörleri;**

- Virüsler
- Bakteriler
- Mantarlar
- Parazit böcekler
- Herbivorlar

### **Abiyotik stres faktörleri;**

- Sıcaklık (düşük-yüksek)
- Kuraklık (su eksikliği)
- Tuzluluk
- Soğuk (üşüme-donma)
- Su fazlalığı (sel stresi)
- Çeşitli kimyasallar
- Işık (yüksek ışık)
- Radyasyon (İnfrared, ultraviyole)
- Oksidatif stres
- Rüzgâr, basınç, manyetizma, pH vs.



Şekil 1.1. Bitkileri etkileyen bazı abiyotik stres faktörleri

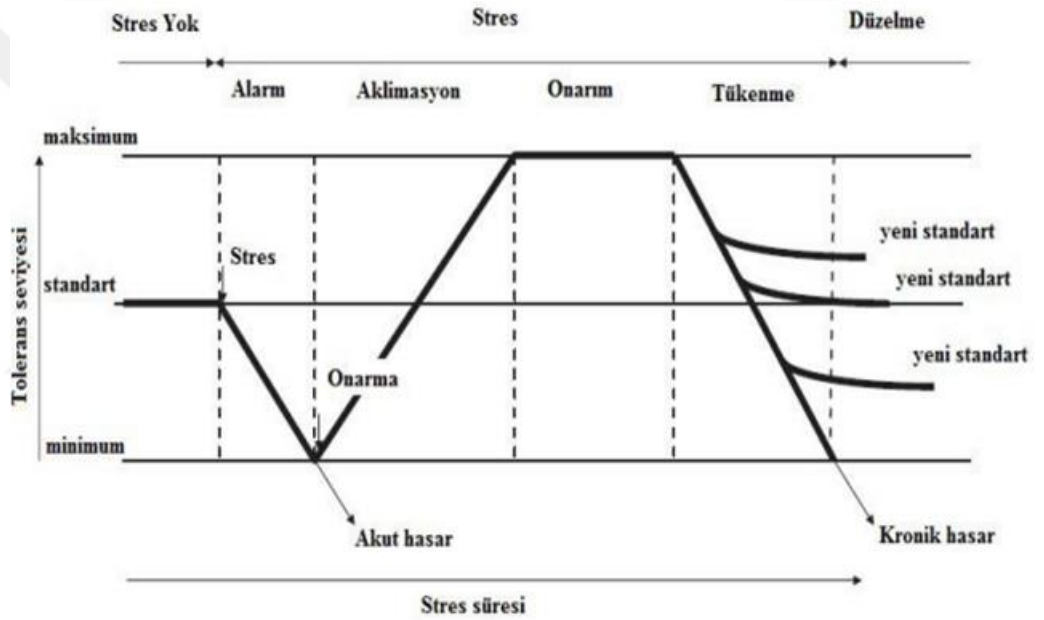
### 1.3. Bitkilerin Strese Karşı Geliştirdikleri Yanıtlar

Bitkiler yaşam alanlarına bağlı oldukları için hareket edemezler ve çevresel stres ya da insanın doğaya etkileri (antropojenik) stresinden kaçamazlar. Bitkiler dolayısıyla stres ile uyum veya stresten kaçmak adına özel mekanizmalara ihtiyaç duymaktadırlar. Strese karşı çok fazla tepki alternatifi bulunmayan bitkiler düşük ya da yüksek ışık tipi, büyüme ve adaptasyon tepkisi ile yanıt verirler (Lichtenthaler 1985). Bitkilerin büyüme ve gelişmesindeki herhangi bir değişiklik ya da metabolik yollarındaki değişiklikler stresin vermiş olduğu etkiye, tepkiye ya da stresle mücadele etme çabası olarak görülmemelidir. Bununla birlikte stres kelimesi yine sıcaklıktaki değişikliğe, foton akışı yoğunluğundaki artış ile tetiklenen metabolik olayların değişimine ya da terleme ve fotosentetik hızların artmasına ya da hava nemindeki azalma durumlarına bağlanmamalıdır. Bütün bunlar bitkilerin ortama adapte olduğu, çevre koşullarına esnek olarak yanıt vermesidir. Bitkilerdeki büyüme ve fizyolojik farklılaşmalar düzenli olarak gece gündüz değişimlerde ortaya çıkan metabolik ve büyüme tepkilerinin yönlendirilmesi olarak kabul edilir. Bitkiler ayrıca düşük ışık ya da yüksek ışık koşullarına stres metabolitleri ve foto koruyucu enzimlerin seviyelerini artırarak yapraklarının boyutunu ve kalınlığını, stoma sayılarını ve yoğunluklarını, kloroplastların ultra yapısını değiştirerek uzun vadede adaptasyon yoluyla çevresel

## 1. GİRİŞ

faktörlere cevap verebilirler. Adaptasyon süreci bir, iki gün ya da en geç bir haftada gerçekleşebilir. Bitkiler adaptasyon tepkileri ile stresten kaçarken ayrıca dış mekân büyüme koşullarına da uyarlar. Bitkilerin strese maruz kalması ani, kısa süreli ya da uzun süreli olabilir. Bu süre zarfında bitkinin hücre aktivitesi ve büyüme süreci yavaşlar. Bitkilerin stresle olan mücadelesi ve onarım mekanizmalarının aşırı çalışması durumu hücre ölümüne neden olabilir. Stres faktörleri süreye ve yoğunluk durumlarına bağlı olarak bitkilere zarar verir (Lichtenthaler et al. 1981; Meier and Lichtenthaler 1981; Lichtenthaler and Meier 1984).

Bitkilerin strese karşı yanıtları 4 aşama da ifade edilebilir:



Şekil 1.2. Bitkinin strese karşı verdiği tepkinin aşamaları (Kosova et al. 2011)

### Birinci aşama,

- ✓ Stresin başlangıç aşamasıdır. Yani alarm (müdahale) aşamasıdır.
- ✓ Canlılık azalır.
- ✓ Katabolizmanın anabolizma sürecini aştığı aşamadır.

### **İkinci aşama,**

- ◆ Sürekli stresin olduğu (direnc) aşamasıdır.
- ◆ Onarım ve sertleşme söz konusudur.

### **Üçüncü aşama,**

- ✖ Yenilenme (rejenerasyon) aşamasıdır.
- ✖ Stresin ortadan kalktığı ve hasarın az olduğu durumlarda fizyolojik yenilenmenin olması durumudur.

### **Dördüncü aşama,**

- ★ Uzun süreli stresin olduğu tükenme yani bitiş aşamasıdır.
- ★ Stres yoğunluğunun çok olduğu aşamadır.
- ★ Ölüm aşamasıdır.

İlk aşamada yani stresin başlangıcında bitkinin fizyolojik fonksiyonlarında (fotosentez yapması, iyonların alınması, taşınması ile metabolitlerin taşınması) düşüş görülür. Bu şekilde ilk olarak yanıt verir. Fizyolojik olarak değişiklikler canlılığının azalmasına neden olur. Strese tolerans göstermeyen bitkilerde bu durumda akut hasarlar, yaşlanmalar hızlı bir şekilde meydana gelmektedir. Birinci aşama olan alarm aşamasında bitkilerin çoğu stresle başa çıkma mekanizmalarını etkinleştirirler. Örneğin, metabolik değişikliklere uyum sağlama, onarım süreçlerinin etkinleştirilmesi, morfolojik adaptasyon uzun vadede metabolik adaptasyonlar gibi. Alarm aşaması bitkilerde maksimum direnc gösterebilecek yeni fizyolojik bir yapı oluşturarak bitkilerin sertleşmesine neden olacaktır. Bu sertleşme ikinci aşama olan direnc aşamasıdır. Başka bir ifadeyle alışma (aklimasyon) süreci bitkinin bulunduğu ortama alışmış olduğu durumdur. Bu aşama genetiksel olarak belirlenmiş direnc düzeyidir. Aklimasyon aşaması morfolojik, anatomik, hücresel, moleküler, biyokimyasal süreçlerin uyumlu olduğu mekanizmaları ifade etmektedir.

Üçüncü aşama, stres faktörlerinin doğru zamanda bitkiden uzaklaştırıldığı, bitkinin kendini yenilediği aşama yani rejenerasyon aşamasıdır. Bu aşama yeni fizyolojik standartların oluştuğu aşamadır. Bitkinin minimum ve maksimum direnç aralığında kendini yönlendirdiği aşamadır. Bitkinin bu aşamada yaşaması ne kadar kalacağı iç ve dış etkenlere bağlıdır. Bitkilerin strese maruz kalması sıradan bir olay olmayıp, stres kaynaklarının çok olması nedeniyle bitkilerin stres faktörleriyle karşılaşması rutin bir olaydır. Bitkinin sürekli strese maruz kalması durumu zarar oluşturacağı anlamına gelmemelidir. Çünkü stresin süresi ve yoğunluğu burada önemlidir. Eğer çok yüksek ve uzun bir stres söz konusu değil ise bitkilerin minimum ve maksimum direnç aralığında bu stresi tolere ederek, yönlendirerek hasar oluşumunu engelleyebilmeleri söz konusudur. Dördüncü aşama ise uzun süreli strese maruz kalma durumudur. Bitkinin fizyolojisinin ve canlılığının giderek kaybolduğu son aşamadır. Bu aşama sonrası bitkide önemli hasarlar oluşur hatta ölümle bile sonuçlanabilir (Kosová et al. 2011).

### 1.4. Soğuk Stresi

Bitkiler büyüme ve gelişmelerini sağlayabildikleri optimum bir sıcaklık aralığına sahiptirler. Bitki için ideal olan sıcaklık koşulları bir başka bitki için stres ifade edebilir. Bitkilerin büyüme ve gelişmelerini sağlayabildikleri sıcaklığın altında yer alan sıcaklıklar soğuk stresi olarak tanımlanır. Soğuk stresi ya da düşük sıcaklık bitkilerin morfolojik, fizyolojik ve metabolik olaylarını olumsuz olarak etkileyen bir abiyotik stres faktörüdür (McKersie et al. 1974; Mahajan and Tuteja 2005). Düşük sıcaklık stresi, bitkinin çeşidine göre, stresin süresi ve şiddetine göre ve gelişim evresine göre hafif, orta ya da şiddetli olarak farklı derecelerde etkilere yol açmaktadır (Kratsch and Wise 2000). Bitkiler düşük sıcaklıklara maruz kalmalarına göre 3 grupta sınıflandırılırlar (Guo et al. 2018; Liu et al. 2018).

1. Soğuğa duyarlı olanlar: Stresin başlangıcında stres şartlarına dayanamayarak ölürlür. 12 °C'nin altındaki sıcaklıklarda strese girmiş olurlar.
2. Soğuğa dayanıklı olanlar: 12 °C'nin altındaki sıcaklıklara dayanabilir ancak donma seviyesindeki sıcaklıklarda yaşayamazlar.

3. Donmaya dayanıklı olanlar: Soğuk stresiyle karşı karşıyadırlar. Donma sıcaklığının altındaki sıcaklıklara uyumlu ve toleranslıdırlar.

İki ana yaklaşım söz konusudur. Bunlar stresten kaçınma ile strese karşı tolerans göstermektir (Levitt 1980). Bitkilerin stresli ortamlardan kendilerini kurtarmaları kaçınma olarak ifade edilirken, stres toleransında ise bitkiler zorlu koşullarla başa çıkar. Bitkiler düşük sıcaklığa maruz kaldıklarında sertleşir ve hayatta kalmak için stres koşullarına alışırlar. Bitkiler soğuk strese karşı tolerans kazanırlar. Alışma süresince meydana gelen değişiklikler tersinirdir yani olumsuz durumlar ortadan kalktığında kaybolurken, uyum süreci ise kalıcıdır, kalıtsaldır. Donma stresi su kaybına ve bitkinin ölmesine neden olur. Bitkiler soğuma (0-15) ve (<0 °C) donma stresine göre farklı tolerans gösterirler. Özellikle ılıman bölge bitkileri soğuğa uyum sağlayabilen ve üşüme stresine dayanıklıdırlar. Dolayısıyla abiyotik faktörler içinde soğuk stresi ürünlerde kayıplara yol açtığından kritiktir (Wan et al. 2009; Kosová et al. 2012). Bitkilerin dondurucu olmayan sıcaklıklarda bir süre maruz kalmasıyla soğuğa karşı tolerans göstermesi “soğuk aklimasyonu” olarak ifade edilir ve meydana gelen hasarları azalttığı bilinmektedir (Thomashow 1998).

### 1.4.1. Bitkiler üzerinde soğuk stresinin etkileri

Bitkiler maruz kaldıkları soğuk stresinin olumsuz etkilerini minimuma indirebilmek için farklı farklı stratejiler geliştirirler. Fakat tolere edebileceklerinin üzerinde bir durum söz konusu olduğunda geliştirmiş oldukları stratejiler yeterli olamayabilmektedir. Bu durum bitkide biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere neden olarak hasarlara yol açmaktadır. Fizyolojik değişiklikleri geri dönüşümlü birincil (primer) ile geri dönüşümsüz ikincil (sekonder) hasar olarak ifade etmek mümkündür. Primer (geri dönüşümlü) hasarlar, bitkideki ilk hızlı tepki olup, sıcaklığa bağlı olarak geri dönüşümü mümkün olan hasarların düzeltilebildiği bölümdür. Sekonder (geri dönüşümsüz) değişimler ise, primer hasarlardan sonra ve stresin devam etmesi durumunda ortaya çıkan ve geri dönüşümü olmayan değişimlerdir (Wang 1982; Turan ve Ekmekçi 2008). Bitkideki hasar sekonder değişim ile birlikte soğuk stresinin derecesine, şiddetine, çevresel koşullara ve son olarak bitkinin maruz kaldığı süreye göre değişiklik gösterebilmektedir (Rab and Saltveit 1996). Bu faktörler soğuk stresi

## 1. GİRİŞ

---

etkileyerek bitkide büyüme hızında yavaşlama, yaprak boyutlarında değişim, klorofil yıkımı, hücre zarının yapısında bozulma, programlı hücre ölümünün başlaması, rotasyon hareketlerinde kısıtlama son olarak ölümlere neden olabilmektedir (Saltveit and Morris 1990; Kratsch and Wise 2000; Mahajan and Tuteja 2005; Bertamini et al. 2007; Rymen et al. 2007).

Soğuk stresinin bitkideki en olumsuz etkisi plazma membran (hücre zarı yapısı) hasarına neden olmasıdır. Plazma membran hasarına neden olan durum dehidrasyondur. Plazma membranının yapısında proteinler ve fosfolipidler bulunmaktadır. Fosfolipidler, doymuş ve doymamış yağ asitlerden oluşmaktadır. Doymamış yağ asitleri, 2 C (karbon) atomu arasında bir ya da daha fazla çift bağa sahiptir. Doymuş yağ asitleri ise H atomuyla doymuştur. Doymuş yağ asidine sahip lipidler doymamış yağ asidine sahip lipidlere göre daha yüksek bir sıcaklıklarda katılışlırlar. Bu durum doymamış yağ asitlerinin bağıl oranı zarın akışkanlığını etkilemektedir (Bakht et al. 2006; Uemura et al. 2006; Wang et al. 2006; Turan ve Ekmekçi 2008). Hücre zarının yapısındaki lipidlerin içeriği bitkinin soğuğa dayanıklılık ve tolere göstermesinde önemlidir. Hücre zarlarının tamamında lipid çeşitleri aynıdır fakat farklı bitki türlerinde hücre zarının yapısında bulunan sterol, fosfolipit ve serebrosid oranları değişiklik gösterebilmektedir (Mahajan and Tuteja 2005). Soğuk strese maruz kalan bitkilerin hücre zarlarında yer alan lipid içeriklerinde önemli derece değişimler söz konusu olmaktadır. İlk olarak bütün bitkilerde bulunan fosfolipid oranında artış meydana gelir ve soğuğa maruz kalma süresi devam ettikçe serebrosid oranı azalır, azalma miktarı bitki türlerine göre değişmektedir (Uemura and Steponkus 1999). Soğuğa duyarlı bitkilerin soğuğa maruz kalma süreci bittiğinde ise fosfolipidlerin bozulmasından dolayı sterol fosfolipid oranı ile serbest yağ asidi miktarı artmaktadır (Lukatkin et al. 2012). Hücre zarının sıvı mozaik fazından jel fazına geçmesi geçiş sıcaklığı olarak tanımlanmaktadır. Soğuğa hassas olan bitkilerde doymuş yağ asidi oranı yüksektir ve bundan dolayı yüksek geçiş sıcaklığına sahiptir. Soğuğa hassas olan bitkilerde sıvı mozaik fazdan jel fazına geçiş, geçiş sıcaklığının yüksek olmasına bağlıdır ve bu da hücre zarında iyon sızıntısının oluşumuna neden olmaktadır. Soğuğa karşı toleranslı, dayanıklı bitki türlerinde ise doymamış yağ asitleri oranı yüksektir ve bundan dolayı düşük geçiş sıcaklığına sahiptir (Yadav 2010).



**Şekil 1.3.** Soğuk stresin bitkilerdeki fizyolojik, sitolojik ve biyokimyasal etkileri

Soğuk stresi bitkilerin organelleri üzerinde de etki göstermektedir. Kloroplast, soğuk stresi sırasında ilk ve en şiddetli olarak etkilenen organeldir. Kloroplastta soğuk hasarının neden olduğu tipik belirtiler; kloroplast ve tilakoid şişmesi, nişasta granül sayı ve ebatlarında azalma ve periferik retikulum adı verilen küçük çıkıntı oluşumu söylenebilir (Kratsch and Wise 2000). Soğukun hücredeki belirtisi olan kloroplast şişmesi evrenseldir ve stromal osmolitlerin artış göstermeleri ile ortaya çıkmaktadır (Sfakianaki et al. 2006). Kloroplastların şişmesine neden olan ajanlar nişastanın bozulma ürünleriyle yakından ilişkilidir. Soğuk stresi süresince nişasta çözünebilir şekerlere dönüşür ve soğuk stresi boyunca yaprak çözünebilir şekerleri yukarı doğru artış gösterir (Strand et al. 1997; Kaplan et al. 2006). Kloroplastın aksine soğuk stresine tolerans gösteren organel ise mitokondridir. Soğuğa duyarlı bitkilerde mitokondri organeli görünür şekilde oldukça etkilenir. Soğuk stresi mitokondrinin şişmesine, matriksinin genişlemesine, kıvrılma sayısının azalmasına, kristalinin kısılmasına, zarlarda oluşturduğu hasar ile elektron taşıma sisteminin bozulmasına, protein ve enzimlerin yapısında hasarlara yol açmaktadır (Davy de Virville et al. 2002).

Çekirdek (nukleus) ise donma derecesinin üzerindeki soğuk stresinde nadir değişiklikler gösterirken, soğuğa aşırı duyarlı bitkilerde çekirdekçik ve kromatinlerde meydana gelen parçalanma sonrası çekirdekte şişme meydana gelmektedir. Golginin

## 1. GİRİŞ

---

soğuk stresinde vezikülleri genişler, endoplazmik retikulum ise irileşme gösterir (Ishikawa 1996; Yun et al. 1996).

Donma derecesi üzerindeki soğuk stresine maruz bırakılan soğuğa duyarlı bitkilerde su alınımı, kök iletimi ve kök büyümesinde azalmalar meydana gelmektedir. Soğuk stresinin vermiş olduğu hasarın ilk belirtilerden bir tanesi de terleme ile kökten su alımı arasındaki dengenin değişmesi nedeniyle oluşan gövde dehidrasyonudur (Vernieri et al. 2001). Soğuk stresi ile gövde büyümesi ve yaprak genişliği azalmaktadır. Aynı şekilde soğuk stresi fotooksidasyonun sonucu klorofil bozulması ile yapraklarda klorozis (sararma) oluşur (Saltveit and Morris 1990).

Soğuk stresi ve şiddeti, bitkilerin fotosentez hızlarında düşüş meydana getirmektedir. Fotosentez, biyokimyasal olarak ışık enerjisini kullanabilen kloroplast bileşeni olan tilakoid aracılığı ile redoks potansiyel (NADPH) ve kimyasal potansiyel enerjiye (ATP) dönüştürebilen mekanizma olarak tanımlanır. Birincil reaksiyonu sıcaklık olmayan fotosentezin ışık enerjisini yakalayıp redoks potansiyel enerjiye aktarmak amaçlı PS I ve PS II fotosistem tarafından katalizlenir (Ensminger et al. 2006). Düşük sıcaklık, metabolik reaksiyonların tümünde yavaşlamaya neden olur. CO<sub>2</sub> fiksasyonu ile stoma açıklığı düzenleyicisi fotosentez ile ilgili önemli 2 metabolik reaksiyonlardır. Soğuk stresine maruz bırakılan bitki yapraklarının önemli iki sonucu CO<sub>2</sub> değişiminin engellenmesi ile stomada su kaybının düzenlenmesidir. Düşük sıcaklıklarda bitki yapraklarında stoma açıklıkları, kök zarındaki su geçirgenliğinin azalmasından dolayı azalma göstermektedir. Aynı şekilde azalan fotosentezin tek nedeni azalan stoma kontrolü görülmemelidir. Soğuk stresi stomaların karanlık ya da ışık ortamında kapanmasına neden olmaktadır. Bu kapanmanın 2 nedeni vardır. Birinci nedeni, mezofil fotosentezinin inhibisyonu nedeniyle CO<sub>2</sub> artış gösterir ve böylelikle stoma kapanır, ikinci nedeni ise soğuk stresinin neden olduğu köklerdeki iletkenliğin azalması ve su alınımının engellenmesi ile su kaybını önlemek için stomaların kapanması durumudur. Bu durumda da CO<sub>2</sub> azalır ve fotosentezin inhibisyonu gerçekleşir (Yang et al. 2005). Ayrıca CO<sub>2</sub> oranının azalması, enzim aktiviteleri düşüklüğü, fotosentez de inhibisyon sağlamada görevli şekerlerin yapraklardan havuzlara yer değişiminde fotosentez hızının düşmesine neden olabilmektedir (Vernieri et al. 2001). Fotoinhibisyon, fotosentezin ışık ile inhibe olmasına denir ve soğuk

stresine verilen erken bir cevap niteliğindedir. Düşük sıcaklık arttıkça fotoinhibisyon artar. Bu artışın sebebi, karbon metabolizmasında soğuk eksitasyon enerjisinin kullanılmasıdır. Bitkiler için ışığın aşırı olması durumunda fotoinhibisyon meydana gelir. Düşük sıcaklığın artması ile Calvin döngüsünde yer alan enzimlerin de aktivitesi düştüğü için kullanılan fotonların azalmasıyla birlikte fotoinhibisyon artış gösterir (Sfakianaki et al. 2006).

### 1.4.2. Bitkilerin soğuk strese karşı yanıtları

Bitkinin büyümesinde, ürün veriminde ve bitki türlerinin coğrafik olarak dağılımında soğuk stresin olumsuz etkileri vardır (Pearce 2001; Ding et al. 2019). Bitkiler soğuk stresine karşı mekanizmalar geliştirmiştir (Rihan et al. 2017). Bitkide stres yanıtı genel anlamda sinyallerin transkripsiyonel kaskad aracılığı ile algılanması ve aktarılması esasına dayanır. Bitkilerin soğuk sinyalleri algılaması ve iletilmesi ile ilgili son yıllarda önemli çalışmalar kaydedilmiştir. Bitkiler soğuk sinyal iletimi boyunca ilk önce membran akışkanlığındaki değişiklikler ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ile sıcaklık dalgalanmalarını sonra da kalsiyumun akışını algırlar (Guo et al. 2018; Ding et al. 2019; Ding et al. 2020).

Stres koşullarında küçük sinyal moleküllerinin sinyal yollarını düzenlemede önemli rolleri vardır (Sharma et al. 2012; Steinhorst and Kudla 2014). Küçük sinyal molekülleri bitkilerin çevresel stresleri sinyal iletim yollarıyla algılamaları ile üretilirler. Sinyal molekülleri aşağı akış tepkilerini tetiklemek amacıyla stres sinyallerini yükselterek iletirler (Domingos et al. 2015). Aşağı akış tepki reaksiyonu sinyal molekülleri tarafından başlatılır ve küçük sinyal molekülleri antioksidan enzim aktivitelerini, gen ekspresyonunu ve canlılığın sıvı osmotik basıncını (osmoregülasyon) aktif olarak düzenlenmesini sağlayarak, sinyal yolları arasında çapraz geçiş ile bitkinin soğuk strese tepkisine aracılık eder (Steinhorst and Kudla 2014). Sinyal molekülleri;  $Ca^{+2}$ , ROS (reaktif oksijen türleri), NO (nitrik oksit), cGMP (siklik guanozin monofosfat),  $H_2S$  (hidrojen sülfür), lipit türevi sinyali PA (fosfotidik asit), DAG (diasil gliserol),  $IP_3$  (inositol trifosfat) ve sfingolipidlerdir (Franklin 2009; Ruelland et al. 2009; Santner et al. 2009; Dong et al. 2012; Isner and Maathuis 2018; Rodas-Junco et al. 2021; Zhang et al. 2021).

Düşük sıcaklıkta bitkilerin membran akışkanlığında, zar proteinlerinde ve nükleik asit konformasyonlarında azalmalar meydana gelmektedir. Bitkide soğuk stresi algılandığında Cold Responsive (COR) genlerinin hücre zarı katılaşmaya başlamadan önce indüklendikleri bilinmektedir. Soğuğa uyumun sağlanması anlamına gelen bu durum yonca ve kanolada ifade edilmiştir. Bitkide soğuğa tepki olarak membranda nicel ve nitel değişiklikler meydana geldiği için soğuk algılamasının olduğu ilk yer olarak ileri sürülmüştür (Wang et al. 2006). Oda sıcaklığında membranın katılaşması soğuk ile indüklenebilir ve böylelikle genlerin uyarılmasına neden olabilir. Membran katılaşması soğuğu algılamada önem arz etmektedir. Ayrıca membran içerisindeki proteinlerin soğuğa cevap verme anlamında sensör görevi gördükleri de ileri sürülmüştür (Orvar et al. 2000; Sangwan et al. 2002; Inaba et al. 2003).

Soğuk sinyallerinin aşağı yönlü aktarımında kalsiyum kanalları, histidin kinaz, reseptör kinaz ve fosfolipaz önemli rol oynamaktadır. Bitkilerin soğuğa maruz kalması durumunda öncelikle soğukun bitkideki membran reseptörleri tarafından algılandığı, tepki geliştirmek adına ikinci moleküller ( $Ca^{+2}$ , ROT), protein kinazlar ve transkripsiyon faktörlerini içeren kompleks bir sinyalleme aktive etmektedirler (Koc et al. 2015).

### 1.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

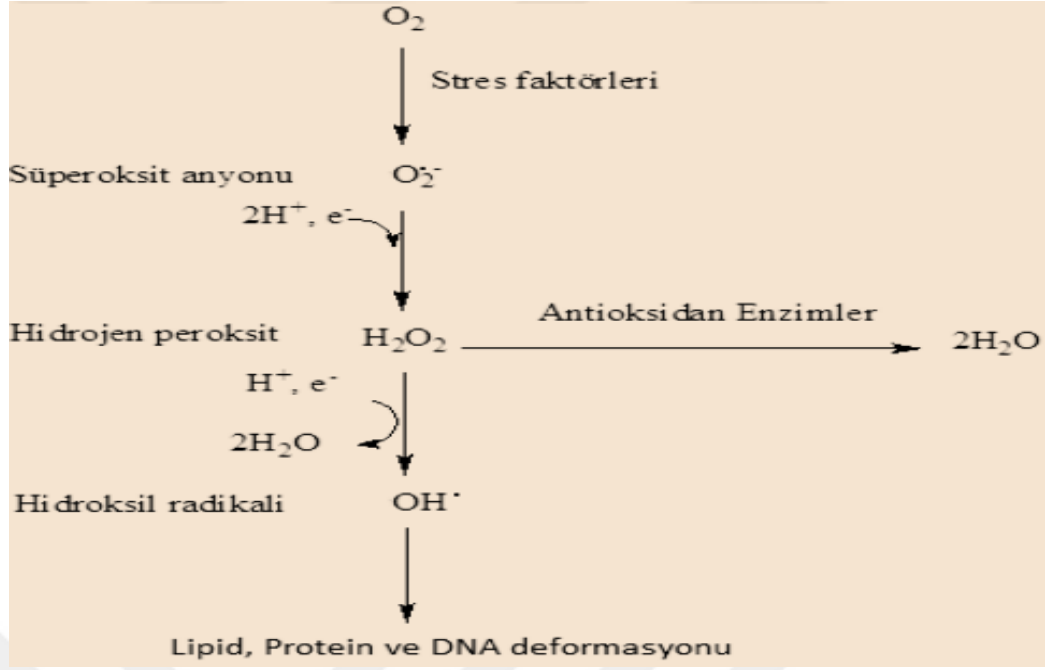
Soğuk ile güneş ışığı birlikte yapraklarda fotooksidatif zararlanmaya yol açar. Toksik oksijen türevleri tuzluluk, kuraklık, düşük ya da yüksek sıcaklık gibi hücrede hasar oluşturan çevresel faktörler ile fotooksidatif zararları katalize etmektedir (Asada 2000; Cakmak 2000). Toksik oksijen türevleri bitkilerde kloroplast organelinde fotosentez sırasında ortaya çıkan kimyasal radikal bir formdur. Düşük sıcaklık stresinde de fotosentez süresince ortaya çıkan pigment ve elektronlarla absorbe edilen ışık enerjisi, fotosentetik  $CO_2$  indirgenmesinde kullanılmayıp birikmektedir. Birikim gösteren enerji ve elektron  $CO_2$  yerine alternatif olarak  $O_2$  (oksijene) transfer olarak yüksek toksik etinlik gösteren oksijen türevlerine dönüşüm gösterir (süperoksit radikali  $O_2^-$ , hidrojen peroksit  $H_2O_2$ , hidroksil radikali  $OH^{\cdot}$ ) (Kuk et al. 2003; Nayyar et al. 2005). Strese maruz kalan bitkilerde kloroplast ve mitokondri içerisinde yer alan elektron taşıma sisteminde meydana gelen kusurlar (aşırı indirgenme), reaktif oksijen

## 1. GİRİŞ

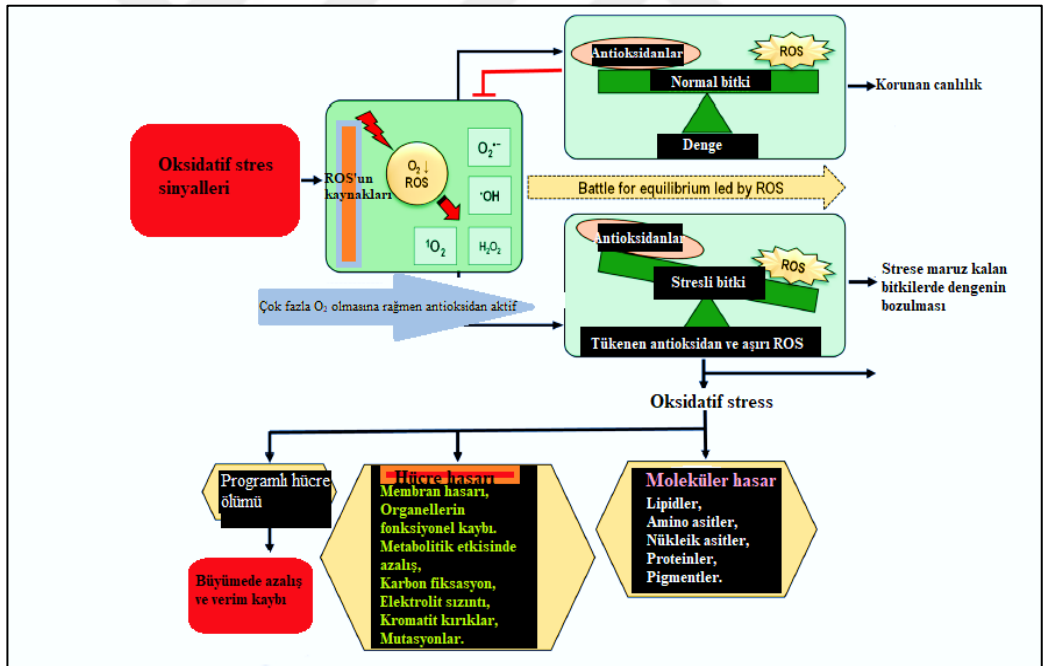
---

türlerinin (ROS) aşırı birikmesine neden olur ve bitkiler oksidatif strese maruz kalır. ROS (reaktif oksijen türleri), soğuk stresinde maruz kalan bitki hücrelerinde yanıt olarak birikir ve bununla beraber gen ifadelerinin seviyelerinde düzenlenme gerçekleşir (Suzuki and Mittler 2006). Toksik etki gösteren reaktif oksijen türleri biyolojik moleküllerle (protein, karbonhidrat, lipid, nükleik asit) reaksiyona girerek canlılarda birçok zarar oluşturmaktadır (Navrot et al. 2007). Reaktif oksijen türleri mitokondri, kloroplast ve peroksizom hücre organellerinde üretilirler. Reaktif oksijen türlerinden özellikle bitkilerdeki enerji tüketim merkezi olan mitokondri de  $H_2O_2$  çok fazla oluşmaktadır (Rasmusson et al. 2004; Sweetlove and Foyer 2004). Bu durum mitokondri organelindeki elektron taşıma sisteminde yer alan elektronların fazla serbest enerjiye sahip olmalarından  $O_2$ 'yi (oksijen) indirgemeleri ve ROS oluşuma neden olması ile ilişkilidir. ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve ( $^1O_2$ ) radikalleri bitkilerde bulunan kloroplastlardaki fotosistem (PS I ve PS II) boyunca elektron alınması ile oluşmaktadır.  $O_2^{\cdot-}$  mitokondrideki elektron taşıma sistemi içerisinde bulunan kompleks I, kompleks III ve Ubikinon'da oluşmaktadır.  $H_2O_2$ , mitokondride tüketimi olan  $O_2$ 'nin %1-5'lik kısmından oluşur ve indirgenmiş  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^+$  ile reaksiyona girerek yüksek toksisite gösteren OH. radikalini oluşturmaktadır. OH. radikalinin başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerinin peroksidasyonu ile zarın yapısını bozar, lipid peroksidasyon ürünleri oluşturarak mitokondri membranına ayrıca nükleik asit ve proteinlere zarar vermektedir (Şekil 1.5.) (Jing et al. 2000; Moller 2001; Yong et al. 2008; Kanbur 2012; Al Mahmud et al. 2019). Düşük sıcaklıklarda kloroplast organelinde  $CO_2$  fiksasyonunun sınırlandırılması ve mitokondri organelinde elektron taşıma sisteminin indirgenmesi sonucu reaktif oksijen türleri anormal derecede artış gösterirler. Reaktif oksijen türleri düşük sıcaklıklarda savunma mekanizmaları tarafından uzaklaştırılmadıklarında bitkilerde oksidatif hasara yol açmaktadır (Suzuki and Mittler 2006). Aşırı üretilen reaktif oksijen türleri, DNA zincirlerinde kırılmaya, enzimlerin inaktivasyonuna ve membranlarda lipid peroksidasyonu gibi hasarlara neden olmaktadır (Cheng et al. 2006).

## 1. GİRİŞ



Şekil 1.4. Serbest radikaller ve reaktiflerin oluşumu (Kanbur 2012)



Şekil 1.5. Oksidatif stres ve biyolojik sonuçları (Al Mahmud et al. 2019)

### 1.5.1. Lipid peroksidasyonu

Reaktif oksijen türleri, doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Lipid peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olur ve hücre fonksiyonları ile zar lipidlerinin yapısını değiştirir.

## 1. GİRİŞ

---

Lipid peroksidasyonunun neden olduğu membran hasar geri dönüşümsüzdür. (Thomashow 1999). Biyolojik yapılarda lipid peroksidasyonunu başlatan süper oksit ve hidroksil radikalidir. (OH.) Serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asidi zincirinde yer alan alfa metilen gruplarından H uzaklaştırılması ile lipid peroksidasyonu başlar ve H uzaklaştırılmasıyla yağ asidi radikal özellik kazanır. Lipid peroksit radikali, lipid radikalinin moleküler oksijen ile reaksiyonu sonucu oluşmaktadır ve bu radikal kararsız bir yapıya sahiptir. Kararlı hale gelebilmesi için de konjuge dien yapısındaki molekül içi bağlarını düzenleyerek dönüşüm gerçekleştirir. Lipid radikali ile moleküler oksijenin etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali oluşmaktadır. Bu radikal ise diğer çoklu doymamış yağ asitlerinin zincirlerini etkiler, yeni lipid radikallerinin oluşmasını sağlar ve H atomu alarak lipid hidroperoksite dönüşür. Lipid peroksitlerin yıkılmaları durumunda aldehitler oluşmaktadır. Bu aldehitler hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da hücrenin diğer kısımlarına hasar yayarlar. Malondialdehit, 3 ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun derecesi ile MDA çok iyi bir korelasyon göstermektedir. Bundan dolayı lipid peroksidasyon düzeylerini ölçmekte MDA miktarları ölçümü çok sık tercih edilen bir yöntemdir. Tiobarbütirik asit ile MDA pembe renkli bir yapı oluşturur ve çözeltinin absorbans değerleriyle de lipid peroksidasyon derecesi belirlenmektedir (Yılmaz ve Ozan 2003; Kuru 2007; Erdal 2010).

Bitkiler reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı koymak adına farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Bunlardan en önemlisi enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan güçlü bir antioksidan savunma sistemidir. Bununla beraber prolin, çözünebilir protein, glisin ve çözünebilir karbonhidratlar gibi birbirlerinin yerine geçebilen, bitki çeşidine göre değişebilen osmolitlerin sentezi artırılarak soğuk stresinin vermiş olduğu zararlı etkilere karşı konulmaya çalışılmaktadır (Shao et al. 2008).

### 1.5.2. Soğuk stresinde osmoprotektanlar

Düşük sıcaklık bitkilerde su kaybına neden olmakta ve bitkiler osmotik dengelerini, dehidrasyon sırasında birbirleri yerine geçebilen osmotik koruyucuların sentezi ve topraktaki çözünen maddelerin alımı ile sürdürmeye çalışırlar (Eruçar 2006). Bu maddeler osmolitler olarak adlandırılır ve yüksek birikim göstererek bitkilerin su

## 1. GİRİŞ

---

alınımını, proteinler ve zarlar gibi bileşenlerin yapısal bütünlüklerin korunmalarını ve serbest radikallerin uzaklaştırılmalarını sağlamaktadır. Bitkilerde osmolitlerin birikmesi düşük sıcaklığa verilen yanıtlardan bir tanesidir (Tester and Davenport 2003). Osmolitlerin soğuk stresine uyum sürecinde nasıl hareket ettikleri ile ilgili farklı mekanizmalar söz konusudur. Hücre içerisindeki osmotik ayarlamayı osmolitlerin yaptığı görüşü bu mekanizmalardan biri olarak söylenebilir. Hücrenin osmotik potansiyeli karbonhidrat ve çözünen diğer madde birikimleriyle değişmektedir. Şeker birikimi, suyun donma sıcaklığını düşürmekte ve bitki soğuk ile karşılaştığında bitkide oluşacak buz oluşumu daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Soğuk stresine adapte olma sürecinde eriyikler, buz çözülmesi esnasında plazma membranlarının korunmasını da sağlamaktadır. Hücreler hızlı buz tutmayan su ihtiva ederler. Membran ile ilgili su, hidrofilik bir alan oluşumu sağlayarak çift katlı lipid tabakalarını korurlar. Şekerler, buz ile uyarılmış dehidrasyon esnasında su kaybının yerine geçer ve böylelikle bitkiler fazla su eksikliğinden etkilenmezler. Eriyikler ayrıca buz yerine cam oluşturabilme kabiliyetine sahiptirler. Bir katının sahip olduğu vizkositesiteye sahip olan cam aslında bir sıvıdır ve bitkilerin soğuk stresine karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır (Karabudak 2011). Düşük sıcaklık streslerine yanıt olarak üretilen çözünebilir şekerler, organik moleküller olup düşük molekül ağırlıklarına sahiptirler. Çözünebilir şekerler, osmotik potansiyeli artırma yeteneği ile hücre dehidrasyonun artmasını engelleyerek bitkileri strese karşı korurlar (Yokoi et al. 2002).

Strese maruz kalan bitkiler betain, prolin, glisin, şeker alkoller gibi çeşitli osmolitler biriktirmektedir. Prolin, osmolitler içerisinde en yaygın olarak bilinen bir bileşiktir. Prolin bakteriler, protozoa, deniz omurgasızları ve çeşitli bitki türleri de dahil farklı organizma türleri ile farklı stres koşulları altında birikim gösteren bir amino asittir. Prolinin stres faktörlerine karşı uyum sağlayabilme, sinyal ve iyileşme gibi fonksiyonları söz konusudur. Prolin bitkilerin strese karşı verdiği bir yanıt olarak kabul görülür ve sitozolde biriktirilir. Dışarıdan bitkilere prolin uygulamaları da soğuktan koruma ve osmo koruyucu etki gösterebilir. (Vassey and Sharkey 1989; Yordanov et al. 2000). Artan prolin kloroplastlarda olumsuz stres koşullarında redoks dengesi ile hücresel homeostazın korunmasına katkıda bulunur. Mitokondride ise prolin katabolizması oksidatif solunum ile yakından ilişkilidir ve stres sonrası tekrardan büyüme için enerji sağlamaktadır. Prolin ayrıca mitokondriyal ROS seviyelerini ve

## 1. GİRİŞ

---

redoks dengesini düzenleyen, gen ifadelerini kontrol edebilen, bitkilerin büyüme ve gelişmelerinde sinyal görevinde bulunabilen bir bileşiktir (Szabados and Saviouré 2010).

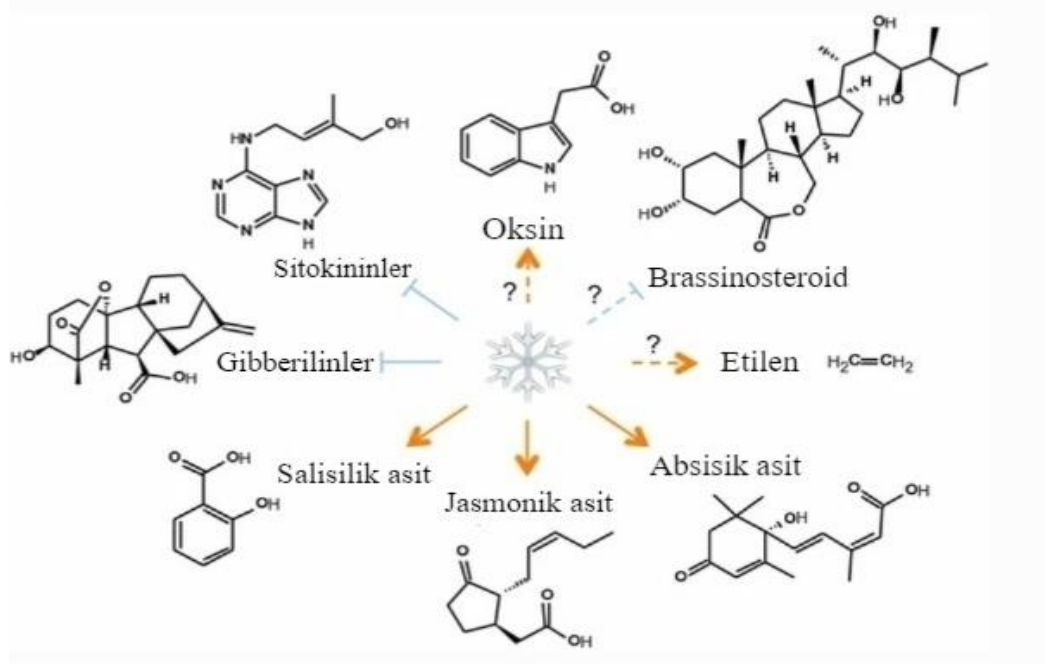
Prolin sentezi bir mekanizma olarak metabolizma ile uyumlu olacak şekilde sitoplazmik asitliğin hafifletilmesi için  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  oranının sürdürülebilmesinde fonksiyon görevi görebilir. Aynı şekilde stresin uzaklaşması durumunda prolinin hızla yıkılması durumu olacağından, onarım ve iyileşmenin sağlanması için mitokondrial oksidatif fosforilasyonu destekleyen indirgeyici ajanlar ile ATP'nin üretimini sağlayabilir (Santarius 1992). Ayrıca düşük sıcaklıklarda prolin miktarlarının artması prolin biyosentezindeki enzimlerin [P5CS1 ve 2 (ö-pirrolin-5-C sentaz 1 ve 2)] soğuk ile indüksiyonuyla açıklanmaktadır (Hare et al. 1998). Prolin biyosentezi, bitkilerde korunmuş housekeeping gen ve strese özgü Pirolin-5-Karboksilat Sentetaz (P5CS) izoformunu kodlayan iki P5CS geninin aktivitesi ile kontrol edilmektedir. Kopyalanmış P5CS genlerinin transkripsiyonel düzenlemeleri kodlama bölgelerinde farklıdır (Armengaud et al. 2004; Xue et al. 2009). P5CS2, *Arabidopsis*'te kök ve sürgün uçları, çiçek salkımları ve meristematik dokularda aktif olan housekeeping genidir. İki P5CS geni de çiçek sürgünlerinin apikal meristemlerinde aktif olup prolin çiçek gelişimini sağlamıştır (Mattioli et al. 2009).

### 1.6. Hormonlar / Salisilik Asit

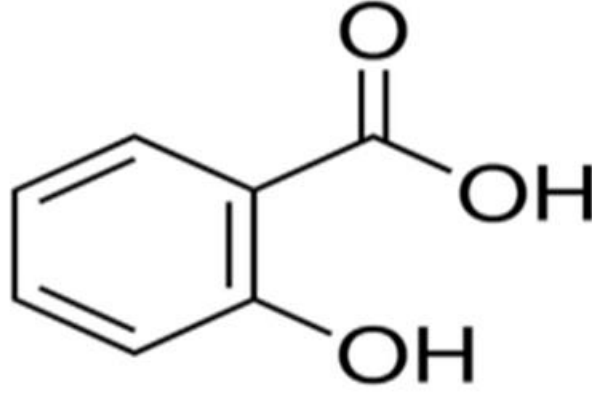
Bitkiler, çetin çevre şartlarına uyum sağlamak, abiyotik streslerin olduğu yaşam alanlarında gelişmek için önemli yetenekler geliştirmişlerdir (Penfield 2008). Küçük moleküler yapıya sahip olan hormonlar, sentez bölgesinden etki bölgesine sinyal gönderen bileşiklerdir. Kendine spesifik ya da ortak etkilere sahip çeşitli hormon sınıfları vardır. Hormonlar biyosentez sırasında birbirleri ile sinerjistik veya antagonistik etkiler göstererek, karmaşık bir hormonal etkileşimler ağı oluştururlar (Chen et al. 2018). Hormonlar arasındaki bu sinyal etkileşim ağı stres tepkisi yolunu açmak için kullanılır. Bundan dolayı bitkilerin stres tepkilerini belirlemek için hormonları kullanması şaşırtıcı olmamalıdır. Hormonlar aşağıdaki Şekil 1.6.'da gösterilmiştir.

## 1. GİRİŞ

Salisiliğin sözcük anlamı “*salix*”ten türetilmiştir. “*Salix alba*” söğüt ağacının latince karşılığıdır. Salisin, söğüt ağacının kabuğundan izole edilmiş ve yüzyıllar önce ağrı ve ateşe iyi geldiğinden bu kabuklar Yunanlılar ve Amerikalı yerliler tarafından kullanılmıştır. Salisin, salisilik alkolün glikozitidir ve ilk olarak 1826 yılında söğüt kabuğundan izole edilmiş, maddenin büyük çoğunluğu ise 1828 yılında izole edilmiştir. Salisin sonrasında ise oksidasyon üzerine SA olan aromatik bir bileşik ve şekere dönüştürülmüştür. 1838 yılında İtalyan kimyager Raffaele Piria tarafından laboratuvarında ilk kez suda asidik özelliği göstermesinden dolayı salisilik asit adı kullanılmıştır. 2-hidroksi benzoik asit olarak bilinen SA renksizdir. Kristal bir yapısı mevcuttur.  $C_7H_6O_3$  kimyasal formülüne sahiptir. Salisilik asidin erime noktası 159, kaynama noktası ise 200 °C olup su içerisinde az çözünmektedir. pH’sı 2,4’tür. Aspirin sentezi olarak bilinen asetilsalisilik asit dâhil olmak üzere organik sentezlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Raskin 1992; Arteca 1996).



**Şekil 1.6.** Bitkilerde soğuk stres tepkilerinin hormonal kontrolü. Turuncu oklar aktivasyonu temsil ederken, mavi inhibisyon çizgileri, baskılama süreçlerini temsil eder. Hormon seviyelerine ilişkin hiç veya tartışmalı verilerin yayınlanmaması durumunda noktalı çizgiler kullanılır. Türe özgü farklılıkları meydana gelebilir (Puhakainen et al. 2004; Zhang et al. 2011).

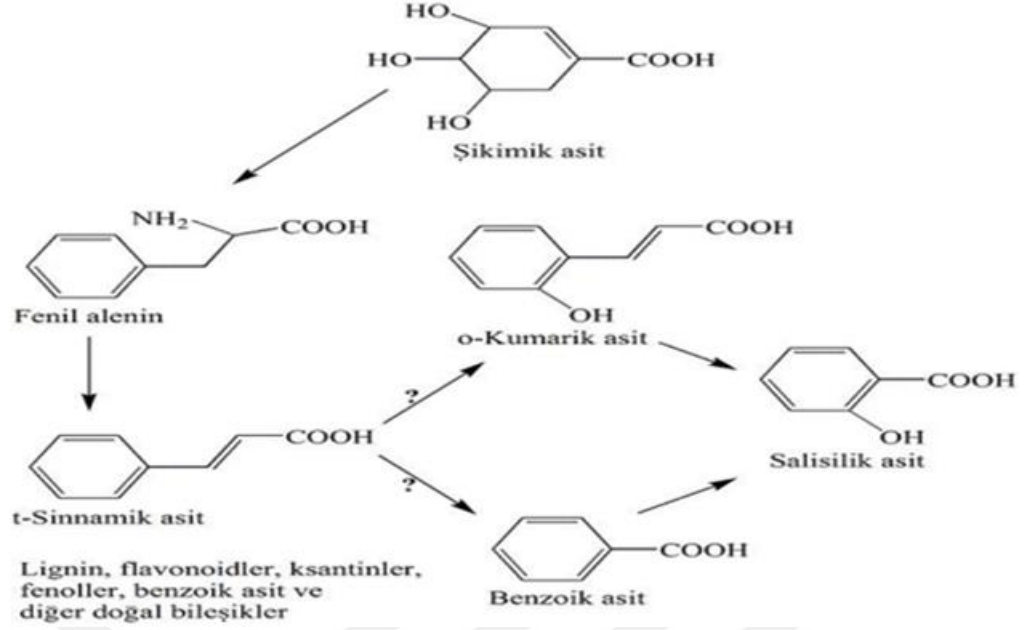


**Şekil 1.7.** Salisilik asit kimyasal yapısı

Aromatik halkadan oluşan SA fenolik bileşikler grubuna ait olup, (hidroksil) OH grubu veya fonksiyonel türevini taşırlar. Salisilik asit ve türevleri salisilatlar olarak adlandırılırlar. Salisilatlar salisilik asidin metalik tuzlarıdır. Tıp alanında, sanayi alanında bu kimyasallar önemlidir. Örneğin; sodyum salisilat sanayide koruyucu ve boya üretiminde tıpta ise romatizma tedavisinde ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Fenil salisilatla ilaç üretimi, güneş yağı kremlerinin üretiminde kullanılmaktadır.

### 1.6.1. Salisilik asidin biyosentezi ve bitkilerdeki rolleri

Salisilik asit, bitkiler tarafından sentezlenir. Salisilik asit bitkinin tüm organlarında bulunmaktadır ve taşınımı ile ilgili kesin bilgi olmamakla beraber dışarıdan uygulandığı yerden floem yoluyla farklı organlara taşınması ile ilgili güçlü kanıtlar mevcuttur (Raskin 1992). SA bitkilerde 2 şekilde sentezlenir. Birincisi, stres altında olanlar ICS (izokromat) ikincisi ise stres altında olmayan bitkiler için PAL (fenillanin amonyak lipaz) yolu ile sentezlenir (Yalpani et al. 1993; Kumar 2014). SA'nın bitkilerdeki sentezi şikimik asitten benzoik asit ve kumarik asit yoludur. SA'nın sağlıklı bitkilerdeki biyosentez yolu ise sırasıyla sinnamik asit, benzoik asit ve salisilik asit şeklindedir (Davies 1995).



**Şekil 1.8.** Bitkilerde salisilik asit biyosentezinin metabolik yolu (Yalpani et al. 1993)

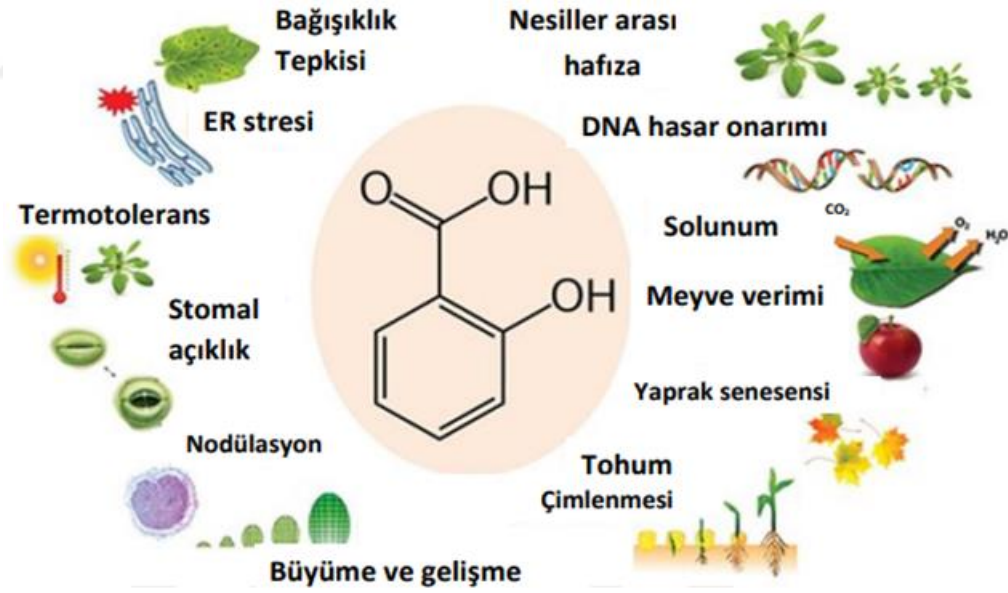
SA, bitkilerde serbest formunun dışında, esterler ve glukozidler olarak bağlı formlarda da bulunabilir. Bitkilerde salisilik asit genellikle şeker bileşiği olan salisilik asit- $\beta$ -glukozit (SAG) şeklinde, yani depo formunda bulunmaktadır.  $\beta$ -glukozidaz enziminin bitkilerdeki rolü fitohormonların sinyal aktivitelerini kontrol ederek, salisilik asidin bağlı formdan serbest forma dönüşümünü katalizleyerek, bitkide serbest SA seviyesini düzenlemektedir. Büyük çoğunluğu, SAG'ın, hücreler arası boşluklarda iken SA ise hücrelerin içerisinde yer alır. Çünkü SAG'ın salisilik asitten meydana gelmesi hücre içerisinde gerçekleşmektedir. Böylelikle salisilik asit uygulaması dışarıdan yapıldığında doğrudan hücre içerisine girmektedir. Salisilik asit- $\beta$ -glukozit yani SAG hücreler arasındaki boşluklar yardımıyla uzak dokulara taşınabilen, sinyal görevi üstlenen salisilik asite göre uzun mesafelerde taşınım için uygun olup yine salisilik aside göre daha az toksik etki ve daha fazla çözünebilirlik özelliği gösterirler (Seo et al. 1995).

Salisilik asit ve türevleri, stresle karşı karşıya kaldıklarında bitki savunma genlerini aktive eden bitki tarafından üretilen sinyaller olarak adlandırılır ve böylelikle bitkiye koruma görevi sağlarlar (Li et al. 2002). SA bitkinin büyümesi, gelişmesi, olgunlaşması, çiçeklenmesi ve hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı tepkilerinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bitki hormonlarından biridir (Nazar et al. 2011; Rivas-San Vicente and Plasencia 2011; Hara et al. 2012). SA, canlıda ısı üretimi

## 1. GİRİŞ

(termojenez) ile hastalıklara karşı direnç göstermede anahtar rol oynamaktadır (Vlot et al. 2009). SA hücre büyümesini, stoma kapanmasını, yaşlanma ile ilgili gen ekspresyonunu ve meyve verimini etkiler (Fu et al. 2012). SA, bitkide gravitropizma (yer çekimine yönelim), fotosentetik ve kloroplastların oluşumunda etkilidir (Uzunova and Popova, 2000; Fariduddin et al. 2003). Salisilik asit, ağır metallerin neden olduğu ROT hasarlarına karşı antioksidan savunma sistemini çalıştırarak bitkinin kendini korumasını sağlar (Chen et al. 2016). SA, vejetatif bir hormon ve otsu bitkilerde uygun konsantrasyonlarda stoma iletkenliğini ve elektron taşınımını artırır.

SA'nın bitkideki etkisi çevresel faktörlere, uygulanan yönteme, bitkinin çeşidine ve uygulama dozuna bağlı olarak değişebilmektedir. SA düşük dozlarda büyümeyi sağlarken yüksek dozlarda büyümeyi engelleyebilmektedir. Çevre koşullarının yetersiz olması endojen salisilik asit miktarının artmasına ve dışarıdan eksojen olarak yapılan uygulamalarda ise stresi azaltarak çevreye uyumu sağlayabilmektedir (Janda et al. 2014; Bagautdinova et al. 2022; Sharma et al. 2022).



**Şekil 1.9.** Bitkilerde salisilik asidin biyolojik anlamda fonksiyonları (Guilfoyle et al. 2015).

### 1.7. Nanobilim ve Nanoteknoloji

Nano ön eki Latince "Nanus" olarak ifade edilirken sözcük anlamı cüce veya çok küçük, küçücük bir şey anlamına gelir. Bir Yunan öneğine atıfta bulunur ve metrenin milyarda birini ( $10^{-9}$  m) gösterir (Pal et al. 2011). Nanobilim ve nanoteknoloji arasında ayırım yapılmalıdır. Nanobilim, 1 ile 100 nm arasında değişen nanometre ölçeklerinde yapıların ve moleküllerin incelenmesine denirken, nanoteknoloji ise hızlı uygulamalarda cihazları kullanan teknolojiye denir. Nanobilimin gelişimi ise bilim insanlarının günümüzde atom olarak ifade ettiği ama o dönemde madde olarak düşündükleri, sürekliliğinin olup olmadığını daha küçük parçalara sonsuza kadar bölünebilir ya da bölünemez veya yok edilemez parçacıklardan bir araya gelip gelmediği sorusunu düşündükleri ve M.Ö. 5. yüzyılda Yunanlılar ve Demokritos zamanına kadar olduğu dönem olarak ifade edilebilir.

Nanoteknoloji ise 21. yüzyılın gelecek vadeden teknolojilerinden biridir. Maddeyi nanometre ölçekli gözlemleyen, manipüle eden, monte, kontrol ve üretim yaparak nanobilimin yararlı uygulamalara dönüşmesini sağlayan yetenektir. Nanoteknolojiyi ABD'deki Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI), benzersiz fenomenlerin fizikten, kimyadan, biyolojiden, tıp ve elektroniğe kadar çok çeşitli alanlarda nano boyutta (1-100 nm) yeni uygulamalara fayda ve olanak sağladığı bir bilim, mühendislik ve teknoloji olarak tanımlar. Bu tanım nanoteknoloji için ölçek ve yenilik olmak üzere iki koşulun olduğunu göstermektedir. Birinci konu olan ölçek, nanoteknolojinin yapıları nanometre ölçeğinde şekil ve boyutlarını kontrol etmesidir. İkinci konu yenilikle ilgilidir, nanoölçekten dolayı nanoteknolojinin bazı özelliklerden yararlanacak şekilde küçük şeylerle ilgilenmesidir (Allhoff 2007).

Nobel ödülüne sahip Amerikalı Fizikçi Richard Feynman 1959 yılında nanoteknoloji kavramını tanıtmıştır. Richard Feynman Amerika Fizik Derneğinin her yıl düzenlediği toplantısında California Teknoloji Enstitüsü'nde "Aşağıda daha çok yer var" isimli bir konferans vererek bu konferansta Richard Feynman, "Britannica Ansiklopedisi'nin 24 cildinin tamamını neden bir toplu iğnenin başına yazamıyoruz?" hipotezini ortaya atmış ve daha küçük makineleri yapmak adına moleküler düzeye inmeyi ve makineleri kullanma vizyonunu anlatmıştır. Richard Feynman hipotezini



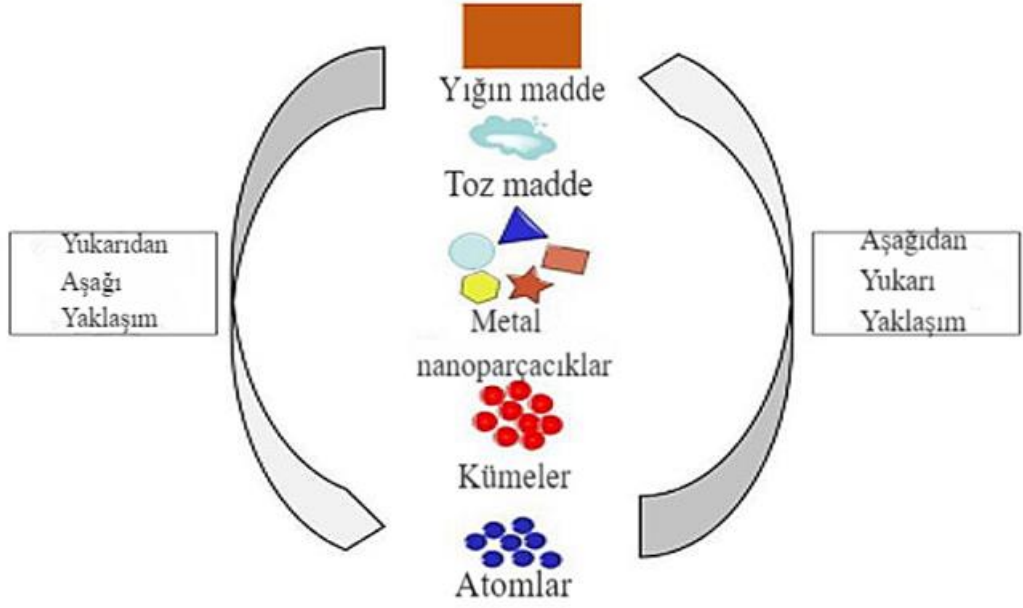
uzay endüstrisi ve çevre gibi birçok alanda uygulamaları mevcuttur (Demirbilek 2015; Mboniyiryivuze et al. 2015).

### 1.7.1. Tarımda nanoteknoloji

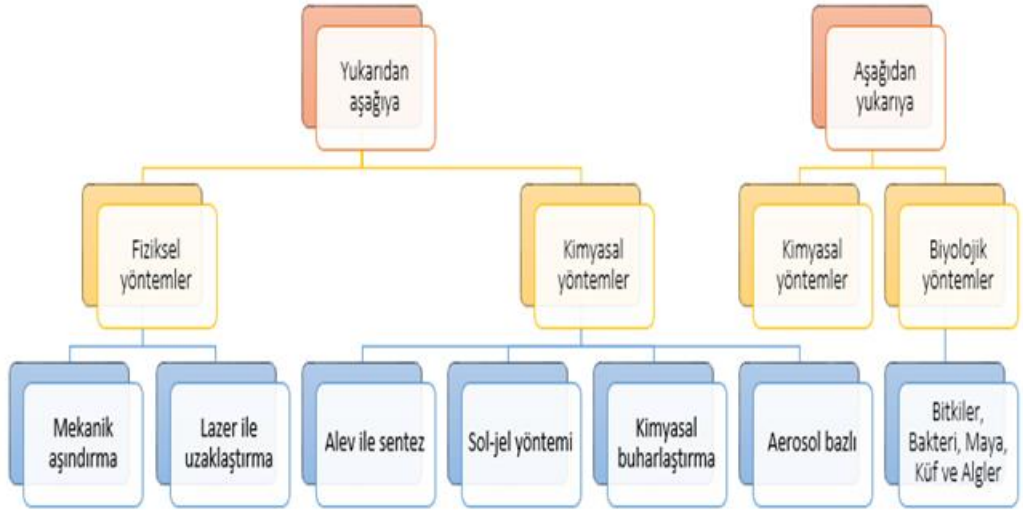
Birim alanda minimum girdi ile yüksek verim elde etmek artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamada önem arz etmektedir. Tarım ve gıda alanında nano materyal kullanımı ihtiyaçları karşılamada esasen önemlidir. Nanoteknolojinin her geçen gün önem kazanması ve bu şekilde üretilen materyallerin gelecekte tarım alanında önemli bir yere sahip olacağı düşünülmektedir. Tarımda nanoteknolojinin kullanılması ürünlerin üretim maliyetlerinin azaltılması, bitkilerin gelişmelerinin sağlanması, kimyasal kullanımının azaltılmasıyla çevre kirliliğini minimize edilmesi gibi imkânlar sunacağı önerilmektedir (Dağhan 2015).

### 1.7.2. Nanopartikül sentezi

Sentez, nanomalzemeler hakkında bilgi elde etmede “ruh yöntemi” olarak kabul edilmektedir. Nanoparçacıkların eldesinde fiziksel, kimyasal ve yeşil sentez gibi farklı yöntemler tercih edilmektedir. Nanoyapıların sentezi adına iki farklı yaklaşım söz konusudur. Bu yaklaşımlar maliyet, kalite ve hız açısından farklılık teşkil eden aşağıdan yukarıya (bottom up) ve yukarıdan aşağıya (top down) şeklindedir. Nano boyutta parçacık elde etmek adına dökme malzemenin parçalanması yukarıdan aşağıya yaklaşımının esasını oluşturmaktadır. Bu endüstri tarafından son yıllarda geliştirilen ve optimize edilen litografi ve hassas mühendislik gibi ileri teknikler kullanılarak başarılabılır. Litografi bir yüzeyin ışığa, iyonlara veya elektronlara maruz bırakılarak modellenmesini ve malzeme üretmek adına malzemenin bu yüzey üzerinde biriktirilmesini içerir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı ise 1-100 nm aralığında manipüle aracılığı ile nanoyapıların aşağıdan oluşturulmasıdır. Atom ve moleküllerin toplanması anlamına da gelmektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımında hem kimyasal hem de yeşil sentez (biyolojik) yöntemler kullanılmaktadır (Mittal et al. 2013; Beykaya ve Çağlar 2016).



Şekil 1.11. Nanopartikül sentezinde kullanılan 2 yaklaşım



Şekil 1.12. Nanopartikül sentezinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler

### 1.7.3. Yeşil sentez (biyolojik yöntemler)

Nanomalzemelerin sentezi için kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemler yüksek maliyete, düşük verime ve toksik çözücülerin kimyasalların kullanımları nedeniyle dezavantajlara sahiptir. Çevre dostu yöntem toksik elementlerin fiziksel ve kimyasal sentezlerde olumsuz etki göstermesinden dolayı harika bir alternatiftir. Çevre dostu yöntem aynı zaman da biyolojik ya da “yeşil sentez” yöntemidir (P-Singh et al. 2011; Devatha and Thalla 2018). Nanoparçacıkların biyosentezi olarak da isimlendirilen yeşil

## 1. GİRİŞ

---

sentez bitki ve bitki özlerini, enzimleri, mikroorganizmaları içeren nanoparçacıkların hazırlanması için kimyasal yöntem kullanılmayan bir yöntemdir (Shukla et al. 2010). Yeşil sentez, nanoparçacık sentezi sırasında oluşabilecek çevreyle ilgili ve teknik sorunları minimuma indirebilen hatta önleyebilen bir yöntemdir. Yeşil sentez ile birlikte ayrıca çöktürme, hidrotermal ve sol-jel teknikleri de mevcuttur (Umaralikhan and Jamal Mohamed Jaffar 2018). Yeşil sentez verimli, temiz ve çözücü olarak suyu kullanan bir prosedürdür. Bu sentez sayesinde fizikokimyasal üretimlerden daha iyi bir boyut ve morfolojiye sahip nanopartiküller üretilmektedir (Dahl et al. 2007; Hussain et al. 2016; Hutchison 2008). Yeşil sentezde kullanılan biyomoleküller bakteri, mantar, maya, algler ve bunun yanında en çok kullanılanı bitki özütleridir. Metal bazlı nanopartiküllerin sentezi için biyomoleküller metal tuzlarına ilave edilir (Roy et al. 2016). Metal bazlı nanopartiküllerin yeşil sentezinde kök, çiçek, kabuk, meyve, tohum, yaprak vs. kullanılmaktadır (Parsons et al. 2007). Bitki materyalleri arasında en çok yapraklar kullanılmaktadır. Bitki özütleri ayrıca yüksek karbonhidrat, protein, aminoasit, fenolik asitler, flavonoidler, saponinler, terpenoidler içermeleri nedeniyle yeşil sentezde önemli rol oynamaktadır (Patil and Chandrasekaran 2020; Soni et al. 2021).

### 1.8. Magnezyum (Mg) ve Bitkideki Fonksiyonları

Magnezyum (Mg), yerkabuğunda en çok bulunan 8. element olup aynı zamanda bitkilerde de en çok bulunan ikinci katyondur. Bununla birlikte, çoğu toprak Mg'si (%90-98) minerallerin kristal kafes yapısına dâhil edilir ve doğrudan bitki alımı için elverişli değildir (Senbayram et al. 2015). Doğrudan bitki alımı için elverişli tek Mg formu,  $Mg^{+2}$  iyonudur.  $Mg^{+2}$  iyonu katyonlar arasında en küçük iyon yarıçapına sahip iken aynı zamanda da en büyük hidratlı yarıçapa sahiptir (Maguire and Cowan 2002). Bu eşsiz kimyasal özellik,  $Mg^{+2}$ 'nin kök hücre duvarlarına ve negatif yüklü toprak kolloidlerine zayıf bir şekilde bağlanmasını sağlarken, değiştirilebilir Mg'ninde topraktan kolayca kaybolmasına neden olur (Aitken et al. 1999; Grzebisz 2011).

Mg enzim aktivasyonu, fotosenteze katılım, protein ve nükleik asitlerin sentezi gibi fonksiyonları olan bitkinin büyümesi için gerekli makro elementlerden birisidir (Cowan 2002; Shaul 2002). Mg'nin kısıtlı olması bitkinin büyüme ve gelişmesini büyük

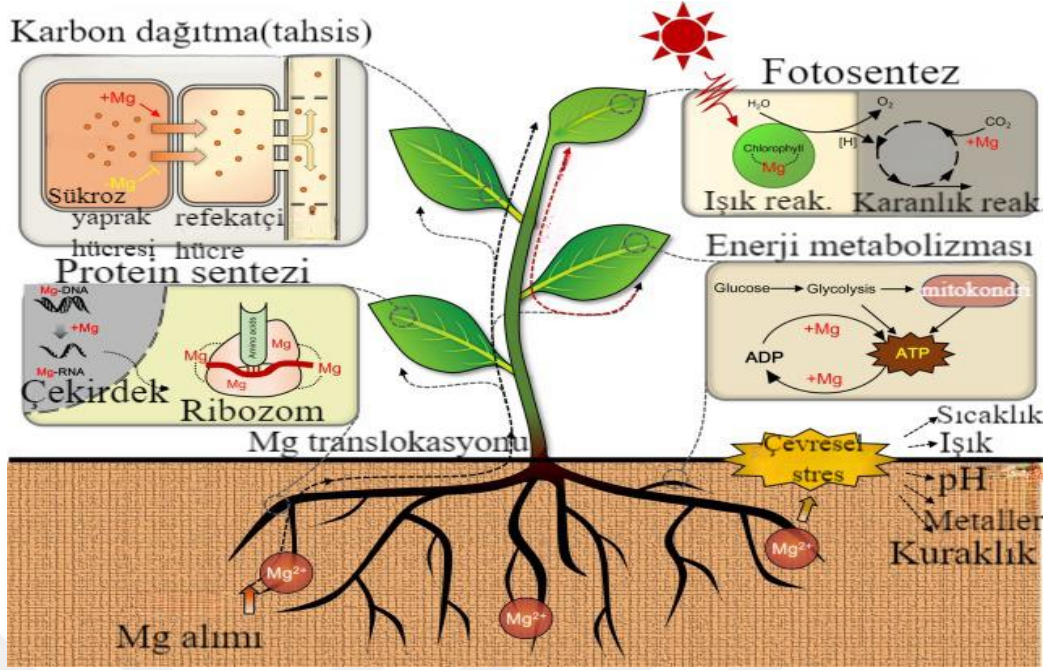
## 1. GİRİŞ

---

ölçüde engelleyebilir ve bu da ürünün kalite ve verimliliği üzerinde zararlı ve olumsuz etkilere yol açabilmektedir (Aitken et al.1999; Verbruggen and Hermans 2013). Büyüme ve gelişme süresince magnezyum, fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde yer almaktadır.  $Mg^{+2}$  klorofilin bileşeni olan fotosentez için önemli iyonudur. Çünkü enerji transferi sırasında klorofilin bir bileşeni olarak magnezyumun %15 ile %35'i kloroplastlara bağlanır (Rissler et al. 2002; Karley and White 2009; Cakmak and Yazici 2010). Fotosentez basamaklarında yer alan enzimlerin aktive edilmesi  $Mg^{+2}$  iyonu tarafından yapılmaktadır (Pierce et al. 1986; Lundqvist and Schneider 1991). Magnezyumun karbon bölüştürmede rolü vardır. Hidroliz reaksiyonu için magnezyum gereklidir. ATP ve protein sentezi için magnezyum gereklidir. Protein sentezinin sorumlusu olan ve iki alt birimden oluşan ribozomun bu alt birimlerinin birleşmesi ve aktivitesi için hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda magnezyuma ihtiyacı vardır (Weiss and Morris 1973; Sperrazza and Spremulli 1983; Schuwirth et al. 2005; Shenvi et al. 2005).

Yeterli miktarda magnezyuma sahip bitkilerin abiyotik faktörlere karşı daha toleranslı olduğu bilinmektedir (Leonard and Hotchkiss 1976; Sperrazza and Spremulli 1983; Gout et al. 2014). Mg eksikliğinin olması durumunda bitkinin büyümesi durabilir ve tarımsal açıdan ürünün kalitesi ve veriminde olumsuz sonuçlara neden olur (Aitken et al.1999; Verbruggen and Hermans 2013). Fizyolojik süreçlerde yer alan ve fotosentezden sorumlu magnezyumun eksikliği durumunda fotosentez hızının azalmasına, karbonhidratların alımının engellenmesine ve dolayısıyla da büyümeyi ve üretkenliğin azalmasına neden olur (Mehne-Jakobs 1995; Fischer 1997;Hermans et al. 2005; Yang et al. 2012). Ayrıca gizli Mg eksikliği de söz konusu olabilmektedir. Bu durumda bitkinin metabolizmasını etkileyerek, süs bitkilerinde, meyvelerde, sebzelerde yani tarımsal ürünlerdeki parametreleri etkilemiş olur (Gerendás and Führs 2013).

Mg eksikliği yalnızca büyüme geriliği değil, aynı zamanda bitkide damarlar arasında kloroza (sararmaya) neden olmaktadır. Genellikle yaşlı yapraklarda görsel anlamda eksikliğin belirtisi ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber erken gelişim dönemlerinde görsel belirti olmadan gizli Mg eksikliği bitkinin ışık, ısı, düşük pH, kuraklık, metal toksisite gibi abiyotik faktörlere karşı duyarlılığı artırabilir (Cakmak and Kirkby 2008).



Şekil 1.13. Mg'nin bitkilerdeki fonksiyonları (Cowan 2002)

## 1.9. Magnezyum Oksit (MgO) Nanopartikülü

Magnezyum oksit nanoparçacıklarının boyutu genellikle 5 ile 120 nm aralığında olup ve 25-50 m<sup>2</sup>/g'lik bir spesifik yüzey alanı içinde olduğu bulunmuştur. Bu metal oksit nanoparçacıklarının boyutu son derece küçüktür. Erime noktası 2.852 °C iken kaynama noktası 3.600 °C'dir. Element ölçüsü, kristal yapısı, iyonik olarak yüksek karakterli olması gibi yeni özelliklerinden dolayı magnezyum nanoparçacıklarının büyük kullanım alanları bulunmaktadır (Bindhu et al. 2016). MgO deneysel (ampirik) formüle ve iyonik bağda Mg<sup>+2</sup> iyonları O<sup>2-</sup> iyonlarının kafes düzenine sahip kübik bir yapıda olduğu bilinmektedir. Suda az çözünürler (100 ml su içerisinde 0,0086 g) (Taurian et al. 1985).

Magnezyum oksit nanoparçacıklarının büyük ilgi görmesi çeşitli metal oksit nanoparçacıklarının uygulamalarının artması ile gerçekleşmiş ve bu nanoparçacıklar eşsiz özelliklere sahip olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır. Magnezyum oksit nanoparçacıkları kolay sentezlenebilen, toksik olmayan, ucuz ve antimikrobiyal özelliklere sahiptir (Cai et al. 2018). Magnezyum oksit nanoparçacıkları, anti-biyofilm ajanları olarak hareket etmeleri, atık sudan fosforun giderilmesini sağlayarak bitki büyümesine yardımcı olmaları, kendi kendini temizleme aktivitesi göstermeleri gibi

sayısız özelliklere sahiptirler (Chimenos et al. 2003; Mahdavi et al. 2013; Hikku et al. 2017).

### 1.9.1. MgO nanopartikülünün uygulama alanları

Yeşil ve sürdürülebilir tarımda MgO nanoparçacıkları genotoksisite ve biyotoksisite göstermemesi, göz ardı edilebilir fitotoksisiteye sahip olması bunun yanında da fide gelişimini sağlaması, bitki büyümesini artırması, bitki korumasını sağlaması gibi çok çeşitli beklentileri karşılamaktadır. MgO nanoparçacıklarının nano ölçekli gübreler ve ışık absorpsiyon destekçisi olarak bitkilere yapraktan uygulamasının yapılması ile birkaç mahsulde büyüme ve gelişmede önemli destek sağladığı belirtilmektedir (Imada et al. 2016; Cai et al. 2018).

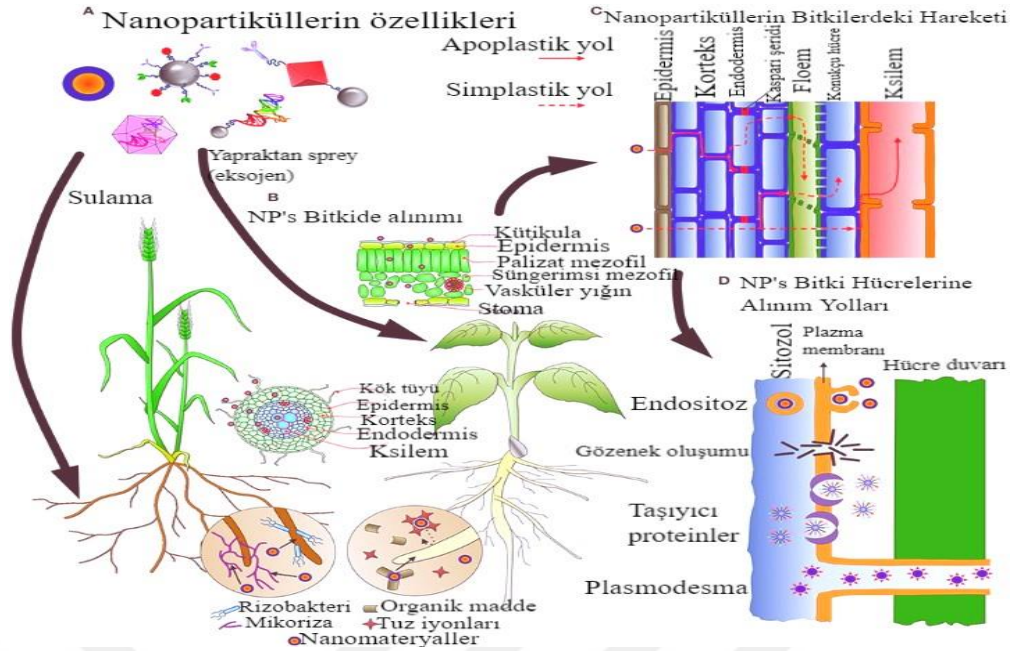
MgO nanoparçacıkları onaylanmış bir gıda katkı maddesi, gıda takviyesi, renk koruyucu vb. olarak kullanılmaktadır (Štengl et al. 2003; Liang et al. 2004; Park et al. 2006). MgO nanoparçacıkları çok fazla klinik alanlarda kullanılmaktadır. Hastalık teşhisi, bitki ve mikroorganizmalar ile ilgili konular ve hastalıkları iyileştirme, gıda kaynaklı patojenler, kemik yenilenmesi, ilaç ve karın ağrısı iyileştirmelerinde vs. magnezyum oksit nanoparçacıkları oldukça başarılıdır (Bertinetti et al. 2009; Tang and Lv 2014). Dünya genelinde çevresel kirlenme gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin karşılaştığı son derece önemli bir sorundur. Çevresel kirlenmeyle başa çıkmanın birçok yolu vardır. MgO nanoparçacıkları çevresel iyileştirmelerde hayati bir rol oynamaktadır (Khin et al. 2012). Nanoparçacıklar, çevre temizliğinin çeşitli yolları içerisinde harika bir alternatiftir. MgO nanopartikülleri, kısa bir süre içinde çevresel uygulamalarda varlık göstermeye başlamıştır. MgO nanopartikülleri yüksek emici özellikte olduklarından SO<sub>2</sub> ve NO<sub>2</sub> gibi toksik gazların potansiyel bir emicisi olarak kullanılmaktadır (Štengl et al. 2003; Liang et al. 2004; Yu et al. 2004; Park et al. 2006). Magnezyum oksit nanoparçacıkları fotonik uygulamalar için harika lüminesansa sahiptir. Saflaştırılmış haldeki magnezyum oksitin nanotoz formu, bir alaşım olarak alüminyumun mekanik ve üretim özelliklerini geliştirmek aynı zamanda yenilebilir ve hafif olmasından dolayı füzelerin ve diyet takviyelerinin imalatında da kullanılırlar (Ramanujam and Sundrarajan 2014; Anilkumar et al. 2015).

MgO Nanopartikül Uygulama Alanları		
<b>Tarım</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Gıda Katkı Maddesi</li><li>• Ekin iyileştirme</li><li>• Stres toleransı</li><li>• Tarımsal üretimin artırılması</li><li>• Bitki savunma yollarını aktive edilmesi</li><li>• Anti bakteriyel, anti pestisit aktivite</li><li>• Hassas tarım</li></ul>	<b>Çevre</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ağır metal giderme</li><li>• Zehirli gaz emici</li><li>• Fotokatalist</li><li>• Atık su kirlenmelerinin uzaklaştırılması</li><li>• Pestisit tespiti ve uzaklaştırılması</li></ul>	<b>Klinik</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• İlaç ve gen teslimi</li><li>• Nano-kriyocerrahi</li><li>• Tespit ve teşhis</li><li>• Anti-kanser</li><li>• Yara ve cilt iyileşmesi</li></ul>

Şekil 1.14. MgO nanopartikülünün uygulama alanları

### 1.10. Nanopartiküllerin Bitkiler Tarafından Alınımı

Nanopartiküllerin bitki tarafından alınımı, nanoparçacığın kendisiyle ilgili birçok faktörleri olan boyutu, kimyasal bileşimi, net yükü, yüzey işlevselliği, toprak yapısı, su durumu vs. bağlı olarak pek tahmin edilememektedir (González-Melendi et al. 2008). Nanopartiküller, bitkilere tercihen yaprakları başta olmak üzere, köklere ya da vejetatif kısımlarına uygulanabilir. Nanopartiküller pasif olarak ifade edebileceğimiz şekilde bitki tarafından alınabilir. Yani nano ya da mikro boyuttaki parçacıklar stoma, hidatod (stoma benzeri yapı), stigma (tepecik) ve kabuk dokusu gibi bitkinin açıklıkları aracılığı ile alınabilir (Eichert et al. 2008; Kurepa et al. 2010). Bitkide dış koruyucu katmanlar söz konusudur. Örneğin, trikomal yani tüyler bunlar nanopartikülleri bitki yüzeyinde tutar ve böylece eksojen materyallerin dokular üzerindeki kalıcılık süresini artırarak bitki yüzeyindeki dinamikleri etkileyebilmektedir (Al-Salim et al. 2011).



**Şekil 1.15.** Bitkilerde nanopartiküllerin emilimi, alınımı ve taşınması A) Uygulama yöntemi ile farklı nanopartikül yapılarının bitki tarafından alınımı. B) Nanopartiküller bitkiler tarafından emilimini kolaylaştıran ya da engelleyen mikroorganizmalar ve bileşikler ile toprakta etkileşime girebilirler. Giriş noktasına bağlı olarak (kök veya yaprak) vasküler dokulara ulaşmadan önce çeşitli dokular (endodermis, epidermis) ve bariyerleri (kaspari şeridi vs.) geçmelidir. C) Nanopartiküller kök veya yaprağa ulaşmak için apoplastik ya da simplastik yolları tercih edebilir. D) Hücrelerin içindeki nanopartiküllerin özüksenebilmesi için, çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. (Gözenek oluşumu, taşıyıcı proteinler, plasmodesmata ve endositoz gibi) (Perezde-Luque 2017).

Nanopartiküllerin bitkide 2 hareket yolu vardır. Bunlar, apoplastik ve simplastik yollardır. Apoplastik yol, hücre çeperlerini ve hücreler arası alanları kapsar. Bu yolda su ve çözünen maddeler hücreye girmeden kök ya da diğer bir organın içinde bir yerden başka bir yere taşınabilir. Yani plazma dışında meydana gelmektedir. Simplastik yol ise, bitişik hücrelerin sitoplazmaları arasında su ve çözünenlerin taşınmasını içerir. Başka bir ifadeyle simplastik taşınmada nanopartiküllerin hücrelerin içine nüfuz etmeleri gerekir. Bir bitki hücresinin duvarı fiziksel olarak engel oluşturur ve nanopartiküllerin hücre içerisine alınımını hayvan hücrelerine göre daha zor kılmaktadır. Bir hücre duvarının yapısında selüloz ve hemiselüloz mikrofibrilleri ile proteinler vardır. Çok katmanlıdır. İstisna dışında ortalama çapı 10 nanometreden küçük 20 nm'ye kadar olan dar seçici bir filtreye sahip gözenekli bir ortamlara imkân tanır (Carpita et al. 1979). Bununla beraber, birçok bitki türünün hücre duvarından çapları 3 ile 50 nanometre arasında olan farklı tipteki nanopartiküllerin ve karbon nanotüplerin kolayca geçtiği

gösterilmiştir (Liu et al. 2009; Kurepa et al. 2010; Chang et al. 2013; Etxeberria et al. 2019).

### 1.11. Nanopartikül Karakterizasyonu

Karakterizasyon, nanopartiküllerin özellikleri ve uygulamaları hakkında bilgi almak için temel teşkil etmektedir. Nanopartikül karakterizasyon işleminde farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler; morfoloji, boyut, kaplama ve bileşim gibi karakterizasyon içerirler. Nanopartiküllerin karakterizasyonu süreci 3 grupta yapılabilir. Bunlar; ayırma tekniklerine dayalı, mikroskopi tekniklerine dayalı ve spektrometrik tekniklerdir (Hassellöv et al. 2008; Fabrega et al. 2011). Ayırma tekniklerine dayalı teknik, nanopartiküllerin boyutu ve şeklini karakterize eder. Bu teknikte 10 nm den küçük nanopartiküller için HPLC tekniği kullanılır (Soto-Alvaredo et al. 2013). En yaygın kullanılan teknik ise kapiler (CE) ve jel elektroforezidir (López-Lorente et al. 2011). Mikroskopi teknikleri, nanopartiküllerin karakterizasyonu için en çok kullanılan tekniklerden bir tanesidir. Partikül, boyut ve şekil değerlendirilmesinde kullanılır. En büyük avantajı standardı ile karşılaştırılma yapılmamasıdır. Çünkü görüntü, hatta 3 boyutlu görüntü elde edilmektedir (Hassellöv et al. 2008; Fabrega et al. 2011; López-Lorente et al. 2011). Mikroskopi tekniklerinde SEM, TEM ve AFM kullanılmaktadır. Spektrometrik teknik UV-vis spektrometrisinin çalışmasında çok kullanılmaktadır. Partikülün ortalama boyutu hakkında bilgi verir. Ayrıca ICP-MS, XRD (X ışınımı kırınımı) kullanılan tekniklerdir (Liu et al. 2005; Rajasekharreddy et al. 2010; Véron et al. 2013).



**Şekil 1.16.** Nanoparçacıkların karakterizasyonunda kullanılan bazı teknikler (SEM: Taramalı elektron mikroskobu, TEM: Transmisyon elektron mikroskobu, NIR: Yakın kızılötesi, FTIR: Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektrometrisi, AFM: Atomik kuvvet mikroskobu, HPLC: Yüksek performans sıvı kromatografisi, XRD: X-ışını kırınımı, SP-ICP-MS: Plazma kütle spektrometrisi).

### 1.11.1. SEM (Taramalı elektron mikroskobu)

Nanoparçacıkların morfolojik özelliklerini belirlemede elektron mikroskobu tekniği kullanılmaktadır. SEM bu tekniklerden biri olup, nanoparçacıkların morfolojik ve boyut analizinde büyük avantaj sağlamaktadır. Buna karşılık zaman alıcı, maliyetli ve boyut dağılımı ile ilgili sınırlı bilgiler verdiği için dezavantajlıdır (Pal et al. 2011). SEM analizinde üç boyutlu yüzey görüntülemesi yapılabilmektedir. Elektron tabancası, kondenser mercek ve vakum sistemine sahip olan SEM cihazı, üç farklı tipte görüntü oluşturmaktadır. Bunlar; harici X-ışını haritaları, ikincil elektron görüntüleri ve geri saçılmış elektron görüntüleridir. SEM analizi sırasında toz ürünler numune tutucu üzerine yerleştirilir ve platin, altın, altın/paladyum alaşımı, tungsten, grafit, krom gibi metallerle kaplanır. Vakum sistemi ile nanopartiküllerin farklılaşma özellikleri kısmen engellenebilmektedir. Daha sonra yüksek enerjili elektron demeti numuneler üzerine gönderilir ve çeşitli sinyaller üretilir. Elektron demeti ışınlarına maruz kalan numunelerden alınan sinyaller (dış morfoloji) numune üzerindeki materyallerin kimyasal bileşimi, kristal yapısı gibi numuneler hakkında bilgiler bir dedektör tarafından kaydedilir (Rao and Savithramma 2011).

### 1.12. miRNA (Mikro RNA)

Mikro RNA'lar ilk olarak 1993 yılında Ruvkun ve Ambros tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta (ipliksi solucan) lin-4 geninde keşfedilmiştir. Aynı yıl içerisinde aynı ekip lin-4 geninin lin-14 geninin negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığını bulmuşlardır. lin-4 ve lin-14 üzerine çalışmalar devam etmiş, bir süre sonra lin-4'ün protein kodlayan RNA olmadığı, küçük protein kodlamayan RNA olduğu keşfedilmiştir. miRNA'ların tümü hayvanlar üzerinde tespit edilirken, 2002 yılında bitki miRNA'ları ilk kez *Arabidopsis*'te keşfedilmiştir (Lee et al. 1993; Reinhart et al. 2002). Şimdiye kadar ise en az 1280 bitki miRNA'sı keşfedilmişse de buna rağmen bitki miRNA'ların küçük bir kısmı sınırlı miktarda tanımlanmıştır (Griffiths-Jones et al. 2006).

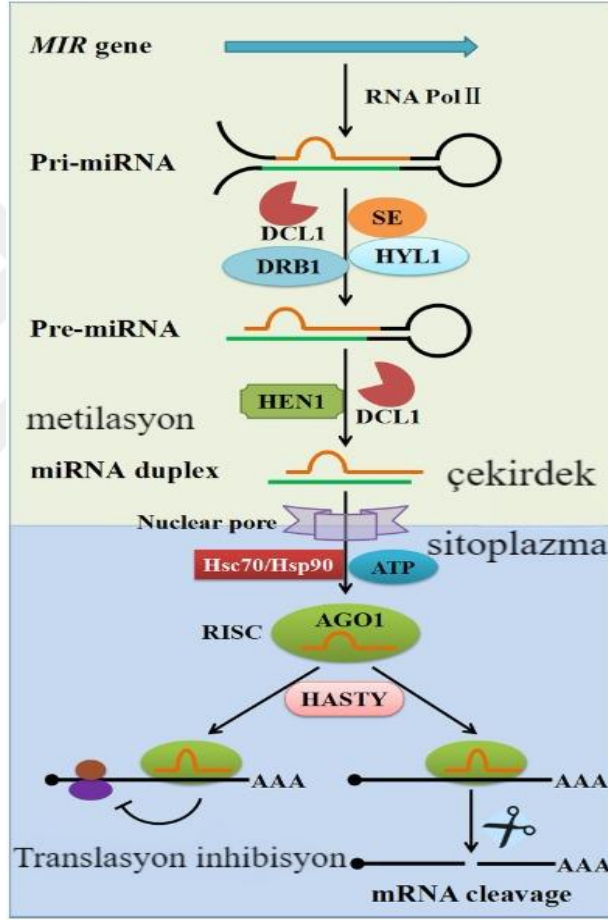
Mikro RNA'lar 20-25 nükleotit uzunluğa sahip, tek sarmallı, küçük ve protein kodlamayan RNA molekülleridir. Mikro RNA'lar hedef mRNA'lara bağlanır ve mRNA yıkımı veya baskılanması yoluyla gen ifadesinin negatif yönde düzenlenmesini sağlarlar (Jones-Rhoades 2012).

#### 1.12.1. Bitkide miRNA sentezi

Bitkilerde mikro RNA'lar, RNA öncülerinin işlenmesiyle elde edilmektedir. Sentezin birinci basamağı, RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi aracılığıyla genomik DNA'dan (öncül) pri-miRNA'ların sentezidir (Noman and Aqeel 2017). Birincil transkripsiyonel ürün olan pri-miRNA'ların yapısı saç tokasına sahip olup uzun ve tek zincirli RNA'lardır (Yang et al. 2019). Pri-miRNA'ların 5' ucu metillenmiş şapka iken 3' ucunda poli A kuyruğu bulunur (Axtell and Bartel 2005). Sentezin ikinci basamağında ise (Dicer-like1 DCL-1) RNAZ III enzimleri aracılığıyla, birinci basamakta sentezlenen pri-miRNA, nükleotit uzunluğu daha kısa olan (olgun) pre-miRNA'ya dönüştürülür. Enzim, DCL-1 bitkilerde iken hayvanlarda Drosha'dır. Sentezin üçüncü basamağında ise öncü miRNA çift zincirinin HEN1 (RNA 2'-O-metiltransferaz) tarafından 3' ucundan metillenir ve HST1 (Protein asetillizin N-asetiltransferaz) tarafından sitoplazmaya taşınır. Sentezin son basamağında ise olgun ve birincil miRNA duplesi bölünür ve ortaya olgun miRNA çıkmaktadır. Hedefteki mRNA'yı inhibe etmek için ya da kesmek

## 1. GİRİŞ

için arganoute proteini (AGO1) RNAZ devreye girer ve iki iplikçi arasından uygun olan iplikçi seçilir diğeri parçalanır. RISC (RNA-indüklenmiş susturma kompleksi) ile birleşen miRNA'lar protein sentezinin durdurulmasına ve mRNA yıkımına sebep olmaktadır (Gautam and Gupta 2020; Narjala et al. 2020; Parmar et al. 2020). Olgun bir miRNA, proteinlerin translasyon işlemini doğrudan durdurabilir ya da dolaylı yünden aynı kökenli mRNA'ları hedefleyerek gen ekspresyonunu inhibe edebilir. Bitkilerde miRNA işlenmesi sadece çekirdekte gerçekleşirken hayvanlarda ise hem çekirdekte hem de sitoplazmada gerçekleşir.



Şekil 1.17. Bitkilerde Mikro RNA (miRNA) sentezi (Liu et al. 2017)

### 1.12.2. miRNA'ların hedef genlerin anlatımını düzenlemeleri

Transkripsiyon sonrası bitki miRNA'ları hedef genleri iki şekilde düzenler. Birincisi transkriptlerin bölünmesi ikincisi de translasyonun baskılanmasıdır. Transkriptlerin bölünmesi mRNA'da belirli bir yerde gerçekleşmektedir. Translasyon baskılanması transkript bölünmesine nazaran az gerçekleşmektedir. miRNA'lar

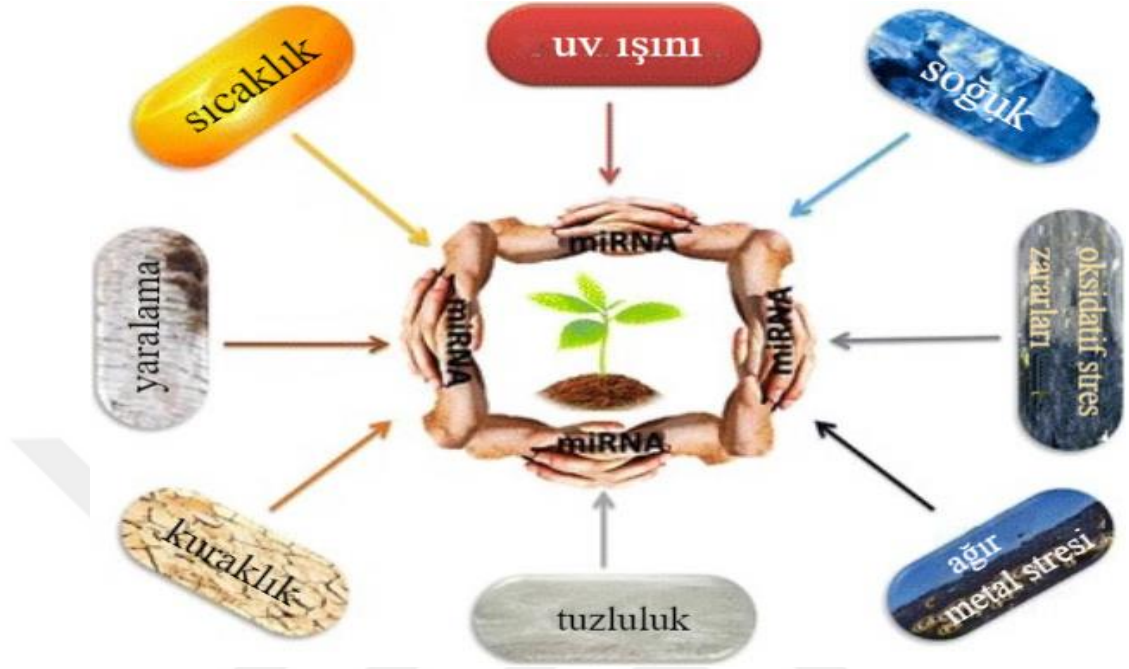
transkripsiyon sonrası gen susturulmasını yönlendirmek için AGO1 proteinleriyle birleşirler. AGO1 yani ARGONAUTE miRNA hedeflerini parçalayarak onları bozar. Translasyon baskısı AMP1 yardımıyla ER (Endoplazmik Retikulum) polizomlarda gerçekleşir. AGO7 sonrasında SGS3 ve RDR6 (RNA Bağımlı RNA Polimeraz) ile birlikte miRNA hedeflerini parçalayarak siRNA yapılarını oluşturur. miRNA'lar hedef transkriptlerine uygun bir şekilde bağlanarak, mRNA molekülünün parçalanması veya bozulması yoluyla translasyonlarını inhibe ederler. Gelişmiş ökaryotlarda hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesinde miRNA'lar çok büyük rol oynarlar (Chen et al.2019).

### 1.12.3. Stres ve miRNA

Stres, bitkilerdeki miRNA'ların gen ifadelerinin düzenlenmesini (çok ya da az ifade etme) ya da bitkinin stresle mücadelesinde yeni miRNA'ların sentezlenmesine neden olabilmektedir. Son yıllarda yüksek verimli dizileme teknolojisi kullanılarak biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı çeşitli bitki türlerinde çok sayıda miRNA'lar tanımlanmıştır (Kuraklık, tuzluluk, soğuk, mekanik stres, ağır metal gibi) (Zhou et al. 2008). Son dönemlerde artan miRNA çalışmaları, miRNA'ların bitkide stres faktörlerine karşı önemli rol oynadığını açıkça göstermektedir. Bu nedenle de miRNA gen düzenleme sürecinin günümüzdeki kullanımı istikrarlı ve güvenilir hale gelmiştir (Noman et al. 2017). Son on yıldaki çalışmaların bazıları bir ya da birden fazla çevresel stres faktörlerine yanıt veren miRNA'ların tanımlanması üzerine olup, bununla birlikte miRNA'ların ekspresyon profillerini ve bitki toleranslarına katılımı ile strese yanıtlarını tam olarak aydınlatmak olmuştur. Düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, kuraklık, tuz, beslenme eksikliği ve metal elementler gibi birçok abiyotik stres faktörün çeşitli bitkilerde bitki büyüme ilerlemesinde yer alan miRNA'ların ifadelerini değiştirdiği gösterilmiştir (Shriram et al. 2016). Bu bulgular mahsul bitkilerde miRNA'ların genetik modifikasyonlar aracılığı ile abiyotik stres toleransının mühendisliğinin anahtarını tutabileceğini göstermiştir (Wani et al. 2020). Abiyotik stres faktörlere dayanabilen mahsul ürünlerin yetiştirilmesi bitkilerin dış ortama karşı kullandıkları gen düzenlemelerinin daha derin araştırılmasını ve deşifre edilmesini gerektirir. miRNA'ların moleküler düzeyde stres toleransını anlamak için muazzam bir kapasiteye sahip genetik havzalar olduğunu ve sonunda bitki stres düzenlemesinde çok belirleyici hale geldiğini göstermektedir. Şimdi bitkilerde stres toleransının uyarılması için miRNA

## 1. GİRİŞ

aracılı gen düzenlemesini kullanma seçeneklerinin daha tutarlı ve güvenilir hale geleceği açıktır.



**Şekil 1.18.** Abiyotik streslere karşı yardım eli olarak miRNA'lar (Noman et al. 2017)

Bitkilerde son yıllarda düşük sıcaklığın neden olduğu etkiye dayanma ve transkripsiyon sonrası seviye birikmesine yardımcı olan strese duyarlı miRNA'lar keşfedilmiştir. Bu miRNA'lar soğuğa duyarlı genlerin düzenlemesini sağlayabilir ve araştırmalar miRNA ifadelerinin soğuk strese yanıt olarak değiştiğini göstermektedir. *Arabidopsis*, *Populus*, *Brachypodium*, pirinç, domates, sorgum, soya fasulyesi, mısır, yonca, tütün gibi birçok bitki türü soğuğa duyarlı miRNA'lar olarak rapor edilmiştir. Soğuk strese maruz kalan *Populus* bitkisinde miR156, miR475 ve miR476 ifadelerinin aşağı doğru düzenlendiği ancak miR168 ve miR477 ifadelerinin yukarı doğru düzenlendiği bildirilmiştir. *Arabidopsis* bitkisinde ise miR165/166, miR408, miR393 ve miR396'nın soğuk strese maruz kaldıklarında yukarı regüle edildikleri, miR398, miR394, miR159, miR319, miR164, miR157 ve miR156'nın geçici ya da çok az regüle edildikleri rapor edilmiştir (Sunkar and Zhu 2004; Li et al. 2008).

miR156, bitkilerde bol bulunur ve miRNA ailesi içerisinde yüksek oranda korunan üyelerden biridir. İlk olarak *Arabidopsis*'te keşfedilen miR156, 20 nükleotidden oluşmaktadır. Hedef genleri, SPL (SQUAMOSA promoter bağlayıcı

## 1. GİRİŞ

---

protein) ve SBP (SQUAMOSA promoter bağlayıcı protein) ailesidir (Reinhart et al. 2002). SPL, büyük bir gen ailesi olup bir düzineden fazla (*Arabidopsis*, mısır (*Zea mays* L.), pirinç (*Oryza sativa* L.) vs. bitki türünde tanımlanmıştır. miR156, SPL gen ailesi üyelerinin ekspresyonunu düzenler ve bitkinin büyüme, üreme ve gelişmesini sağlar (Xie et al. 2006). Bitkilerin vejetatif olarak büyümesi kök, gövde ve yaprak gibi bitkisel organlarının büyüme ve gelişme göstermesi anlamına gelmektedir. miR156, bitkilerin vejetatif olarak büyümelerinde ve kök gelişimlerinde rol oynamaktadır. Aşırı ekspre olan miR156, hedef genlerin ekspresyonunu inhibe ederek yan köklerin gelişimini teşvik eder, sayılarını artırır, gövde büyümesini ve gelişimini destekler. miR156'nın *Arabidopsis* genç fidelerinde yüksek oranda ekspre edilmesi tesadüfi kök gelişimini azaltır ve miR156'nın SPL genlerinin ekspresyonunu bloke etmesi kök büyümesini sağlamaktadır (Xu et al. 2016). Aynı şekilde domates, mısır ve tütünde aşırı ekspre olan miR156 kök oluşumunu teşvik eder (Chuck et al. 2007; Zhang et al. 2011; Feng et al. 2016). Bu kanıtlar miR156'nın hedef SPL genlerini düzenleyerek köklerin büyüme ve gelişmesini sağladığını göstermektedir. miR156-SPL modülü, yan kök gelişiminde de rol oynamaktadır. *Arabidopsis*'in miR156'yı aşırı eksprese eden hatlarında, SPL10 ve AGL79 ekspresyonu önemli ölçüde aşağı regüle edildi ve fazla yan kök oluşumu gerçekleşti (Gao et al. 2018). Stu-miR156-susturulmuş patates hatlarında (*Solanum tuberosum*)L.) miR156 bitki gövdelerinin, yapraklarının ve diğer organlarının büyümesini ve gelişmesini düzenlemede de rol oynamaktadır. miR156 bitkilerin stres tepkilerinde önemli rol oynamaktadır. *Arabidopsis*'te düşük sıcaklık, miR156'nın aşağı regülasyonuna neden oldu bu da hedef genlerinin yukarı regüle edilmiş bir ekspresyonuyla sonuçlandı ve bu da düşük sıcaklığa tepkisini düzenledi (Wu and Poethig 2006). Şeker kamışında (*Saccharum officinarum*), düşük sıcaklık muamelesinden sonra miR156 ekspresyonunun azaldığı, bununda şeker kamışının metabolizmasını ve büyümesini yavaşlattığını ve SBP transkripsiyon faktörlerini negatif olarak düzenleyerek soğuğa toleransı artırdığını gösterdi (Zhu et al. 2021).

Küçük düzenleyici RNA'lar arasında miRNA'lar dışında heterokromatik siRNA'lar (hc-siRNA'lar), tekrarlı ilişkili siRNA'lar (ra-siRNA'lar), doğal duyu-antisens transkript siRNA'lar, trans-etkili siRNA'lar (ta-siRNA'lar) ve yakın zamanda tanımlanan Piwi ile etkileşime giren RNA'larda yer almaktadır. Trans-etkili siRNA'ların (ta-siRNA'lar) *Arabidopsis*'te tanımlanması miRNA ve siRNA yolları arasında köprü

oluşturmuştur. Ta-siRNA'lar ilk kez RDR6 ve gen susturma bastırıcısı (SGS3) genleri üzerinde yapılan çalışma ile tanımlanmıştır. Ta-siRNA'ların üretimi, ilk olarak miRNA'lar tarafından hedeflenen birincil TAS transkriptlerinin bölünmesiyle tetiklenir daha sonra RDR6 ve SGS3'ün yardımıyla 5' veya 3'bölünme ürünleri dsRNA'ya dönüştürülür. Son olarak ta-siRNA'lar üretmek üzere DCL4 tarafından işlenir (Peragine et al. 2004; Vazquez et al. 2004; Allen et al. 2005; Borsani et al. 2005; Xie et al. 2005; Yoshikawa et al. 2005; Lau et al. 2006).

Arabidopsis'te dört TAS gen ailesi tanımlanmıştır. TAS1a, TAS1b ve TAS1c, miR173 tarafından hedeflenir ve bunların 3'bölünme ürünleri, işlevi bilinmeyen bir grup geni ve potansiyel olarak bir grup pentatrikopeptid (PPR) genleri tekrarını hedef alarak aynı veya çok yakın ilişkili ta-siRNA'lar üretir (Yoshikawa et al. 2005). TAS1 lokuslarına ek olarak TAS2, miR173 tarafından hedeflenir ve 3'bölünme ürünü, bir grup PPR genini hedef alan ta-siRNA'lar üretir (Allen et al. 2005).

Pentatrikopeptid tekrar (PPR) proteinleri, kara bitkilerindeki en büyük protein ailelerinden birini oluşturur. Geçtiğimiz on yılda PPR proteinlerin moleküler işlevleri, bitki büyümesi ve gelişmesi sırasında oynadıkları fizyolojik roller hakkında çok şey öğrenildi. Tipik bir PPR proteini mitokondri veya kloroplastları hedef alır, bir veya daha fazla organel transkriptini bağlar ve RNA dizisini, işlenmesini, dönüşümünü veya translasyonunu değiştirerek bunların ekspresyonunu etkiler. Ayrıca fotosentez, bitki gelişimi, solunum ve çevresel faktörler üzerinde derin etkileri vardır (Barkan and Small 2014). *Arabidopsis*'te PPR gen ailesinin genel ifadesi çok düşüktür. Bunun nedeni, ekspresyon analizinin bitki büyümesinin tüm aşamalarında değil, yalnızca yapraklar ve çiçekler gibi birkaç bitki organında gerçekleştirilmesi olabilir. Bununla birlikte, bazı bitki kısımlarında PPR genlerinin lokalize ekspresyonuna ilişkin raporlar, bunların farklı bitki dokuları veya hücrelerindeki spesifik rollerine işaret etmektedir. Örneğin, *Arabidopsis thaliana*'nın yaprak ve çiçeklerinde PPR geni P67'nin ekspresyonu kök ve çiçek tomurcuklarından daha yüksek seviyelerdeydi (Lahmy et al. 2000).

### 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kang et al. (2003) muz fideleri (*Musa acuminata*) üzerinde soğuk stresi (5 °C) altında yapmış oldukları çalışmada 0,5 mM salisilik asit (SA) uygulamışlardır. Öncelikle soğuk stres 5 derecede 3 gün kalan bitkiler 30/22 °C'de (gündüz/gece) 2 günlük bir iyileşmeye bırakılmıştır. SA ön işleme tabi tutulmamış bitkilerde görsel olarak ciddi soğutma hasarı semptomları gözlemlendiğini yaprakların çoğunun solup ve öldüklerini bildirmişlerdir. Buna karşın 1 gün boyunca 0,5 mM SA ile ön işleme tabi tutulan bitkilerin, düşük sıcaklıktan neredeyse hiç etkilenmediklerini ve bu bitkilerin, soğuk işlemiden öncekiyle hemen hemen aynı göründüklerini açıklamışlardır. SA'nın koruyucu enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri ise SA'nın ön işlemi 30/22 °C'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi ile sonuçlanmış fakat soğuk stres altında 5 °C'de SA ön işlemi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aşırı üretimini azalttığını bildirmişlerdir.

Taşkın et al. (2003) yılında kışlık buğdayda (*Triticum aestivum*) eksojen olarak uygulanan salisilik asidin (SA) (0,01- 0,1 ve 1 mM) ve soğukun donma toleransı (donma hasarı ve buz çekirdeklenme aktivitesi) üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Kışlık buğday soğuğa (15/10 °C 15 gün, 10/5 °C 30 gün ve 5/3 °C) olarak maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak da soğuğa alıştırmamanın donma koşullarına maruz bırakılan yaprak segmentlerinde yaralanmanın azalmasına neden olduğu ayrıca eksojen SA soğuk (15/10 °C) ve kontrol (15 ve 30 günlük) koşullarında yetiştirilen yapraklarda donma hasarını azalttığı, soğuk koşul (10/5 ve 5/3 °C), yapraklardan izole edilen apoplastik proteinler tarafından buz çekirdeklenme aktivitesinde artışa neden olduğu, ilk kez ekzojen SA'nın soğuk (15/10 ve 10/5 °C) ve kontrol koşullarında buz çekirdeklenme aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Klotke et al. (2004) soğuk adaptasyona zıt olan *Arabidopsis thaliana* çeşitlerinde (Col-0 ve C24) donma toleransının kazanılmasında çözünür şeker konsantrasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Bitkiler büyütüldükten sonra (4 °C) büyüme kabine almışlar ve 14 gün boyunca soğuğa maruz bırakmışlardır. Sonuç olarak her iki türde de, donmaya dayanıklı Col-0'da rafinoz ve hassas C24'te fruktoz daha yüksek olmak üzere soğuğa maruz kaldıktan 24 saat sonra çözünür şekerlerin arttığını, glikozun her iki örnekte de hızla biriktiğini ve ilk 7 gün boyunca yüksek kaldığını daha sonra C24'te

gerilediğini belirtmişlerdir. İki haftalık soğuğa maruz kalmanın sonunda, her iki genotipte toplam heksoz konsantrasyonu, uyum sağlamayan koşullardakinden daha yüksek olduğunu açıklamışlardır. Sükroz ise, her iki genotipte de soğuğun ilk 24 saatinde en büyük artışı gösterdiğini ve 2 hafta soğuğa maruz kaldıktan sonra yaklaşık üç kat daha yükseldiğini bildirmişlerdir. Son olarak da prolin ve glutamin gibi diğer uyumlu solütlerin konsantrasyonlarının da soğuğa alışmış Col-0'da C24 bitkilerinden daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir.

Wu and Poething (2006) *Arabidopsis thaliana*'da yapmış oldukları çalışmada miR156'nın sorumluluğunu araştırmışlardır. Bitkiler, büyütüldükten sonra (4 °C) soğuk stresinde 2 gün (48 saat) bekletilmiştir. Sürgün gelişimi sırasında miR156 seviyesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Liu et al. (2008) yılında *Arabidopsis thaliana*'da yapmış oldukları çalışmada 300 mM NaCl ve 200 mM mannitolü (4°C)'lik soğuk stres uygulamalarına tabi tutmuşlardır. Soğuk stres tedavisi sırasında, çoğu miRNA seviyesinin 6 saat sonra daha yüksek olduğunu ve daha uzun stresle azaldığını istisna olarak da 24 saatte maksimum ifadeye sahip olan miR156a'nın olduğunu bildirmişlerdir.

Lu and Huang (2008) abiyotik stres faktörleri altında bir dizi mikroRNA'yı araştırmış ve soğuk sıcaklığının çevresel bir etken olduğuna ve bu strese karşı toleransın bitkinin büyüme ve gelişiminde önemli bir etki gösterdiğine inanıldığını belirtmişlerdir.

Zhou et al. (2009) (*Medicago sativa*) köklerinde Hg kaynaklı oksidatif stresi düzenlemede SA'nın rolünü araştırmışlardır. Bitkiler 12 saat boyunca 0,2 mM SA ile ön işleme tabi tutulmuş ve ardından 24 saat boyunca 10 uM Hg<sup>2+</sup>'ye maruz bırakılmıştır. Sonuçlarda ise yonca köklerinde prolin birikiminin olduğunu hatta Hg varlığında SA ile muamele edilmiş köklerde yalnızca Hg ile tedavi edilenlere göre prolin miktarının daha fazla olduğu açıklanmıştır. Salisilik asidin (SA) cıvanın neden olduğu toksisiteyi hafiflettiğini ve *M. sativa*'nın köklerini koruduğunu ifade etmişlerdir. Cıvanın neden olduğu oksidatif hasardan yazarlar, oksidatif hasara karşı bu korumanın, çeşitli antioksidan enzimlerin artan aktivitesine aracılık ettiğini bildirmişlerdir.

Sahu and Sabat (2011) yılında eksojen salisilik asidin etkisi altında buğday bitkilerinin kök ve yaprak dokularındaki büyüme, pigment içeriği ve antioksidanlardaki değişiklikleri araştırmışlardır. SA'nın (50, 500 ve 1.000  $\mu\text{M}$ ) ile 5 ve 10 mM konsantrasyonlarını uygulamışlardır. Sonuç olarak ise kök ve sürgün büyümesi, büyümenin ilk günlerinde daha yüksek SA konsantrasyonunda etkilenildiğini, yüksek SA konsantrasyonu hem kök hem de yaprak dokularında  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve malondialdehit (MDA) seviyesini artırdığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak da SA'nın bitkilerde çeşitli fizyolojik ve morfolojik özellikleri indüklemek için bir sinyal molekülü olduğu bildirilmiş olsada bu çalışmada bileşiğin büyüme ve başlıca enzimatik antioksidanların aktivitesi üzerindeki olumsuz etkisini gösterdiğini açıklamışlardır.

Burklew et al. (2012) Alüminyum Oksit ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) nanopartiküllerinin tütünün (*Nicotiana tabacum*) miRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmış ve alüminyum oksit nanopartiküllerin, tütündeki belirli miRNA'ların ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde değiştirdiğini açıklamışlardır. Alüminyum oksit nanopartiküllerine maruz bırakılan *Nicotiana tabacum*, 0,1% oranında miR156, miR157 ve miR172 aşağı regüle edilirken, 0,5 % ve 1 % oranında ise yukarı regüle edilmiştir. Üç miRNA'nın (miR156, miR157 ve miR172) ekspresyonu, artan alüminyum nanopartikül muamelesine yanıt olarak arttığını, ancak miRNA'nin ekspresyonundaki değişimlerin önemli ölçüde anlamlı olmadığı açıklanmıştır.

Zeng et al. (2012) Al stresi altında yapmış oldukları bir çalışmada yabani soya (*Glycine soja*) fasulyesindeki üç miRNA'nın (miR156, miR164 ve miR1507) aşağı regüle edildiklerini ve yedi miRNA'nın miR2218, miR862, miR1514, miR4415, miR396, miR403, miR1509) ise 50  $\mu\text{M}$  Al stresi altında yukarı regüle edildiklerini belirtmişlerdir.

Zhou et al. (2012) *Brassica napus* (kanola) üzerine yapmış oldukları çalışmada 0, 6, 24 ve 48 saat boyunca 0, 40 veya 80  $\mu\text{M}$  kadmiyum (Cd) stresi uygulamışlar ve miR156, miR171 ve miR396a transkriptlerinin aşağı regüle edildiğini bildirmişlerdir. Farklı Cd seviyelerine tabi tutulan *Medicago* bitkilerinde ise miRNA'ların değiştirilmiş ekspresyon profilleri sergilediği ve miR393, miR171, miR319 ve miR529'un yukarı regüle edildiği, miR166'nın ise aşağı regüle edildiği bildirilmiştir.

Burman et al. (2013) nohut (*Cicer arietinum*) fideleri üzerine yapmış oldukları çalışmada yapraktan 1,5 ve 10 ppm sulu çinko oksit (ZnO), ZnO nanopartikülü ve çinko sülfat çözeltisini eksojen olarak püskürtmüşler ve on beş gün sonra bitkileri hasat ederek karşılaştırma yapmışlardır. Sonuçlarda ise nano boyutlu ZnO olarak çinkonun yaprak spreyleri bitki büyümesini daha da iyileştirdiğini fakat yüksek dozda nano-ZnO'da nohut fidelerinin erken büyümesinde gerileme kaydedildiğini, çinko sülfat ve nano ZnO'nun MDA içeriğinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Frazier et al. (2014) tütün (*Nicotiana tabacum*) üzerine titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO<sub>2</sub> NPs) uygulaması yaparak miRNA gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikleri tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, TiO<sub>2</sub> nanopartikül maruziyeti, miRNA ekspresyonunda önemli ölçüde değişiklik meydana getirmiştir. Araştırılan 11 miRNA arasında, yüksek konsantrasyonda (%1) TiO<sub>2</sub> NP's miR156 hariç tüm miRNA'lar için ve her iki konsantrasyonda da (0,1% ve 1,0%) yukarı regüle edildiğini belirtmişlerdir.

Raliya et al. (2014) Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) salkım fasülyesi yapraklarına yeşil sentez 5,8 nanometre boyutunda MgO nanopartikülü 15 mg/L uygulamış ve sürgün ve kök büyümesini araştırmışlardır. Biyolojik olarak sentezlenen MgO nanopartikülünün uygulanmasıyla sürgün kökü büyümesinde (%18,2 ile %49,2) ve klorofil fotosentetik pigmentinde (%76,1) daha fazla iyileşme görüldüğünü belirtmişlerdir. Sonuç olarak biyolojik olarak sentezlenen bu nanopartiküllerin, bitki beslenmesi için yapraklardaki klorofil içeriğini artıran, fotosentez işlemi için bitkiler tarafından ışık emiliminin artırılmasına yardımcı olabileceğinin de düşünülebileceğini vurgulamışlardır.

Hasanpour et al. (2015) soğuk stresi altında (4 °C) iki nohut (*Cicer arietinum* L.) genotip bitkilerine TiO<sub>2</sub> nanopartikülü uygulandığında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinde soğuğa uyumlu çeşide göre önemli bir azalma olduğunu ve nohut bitkilerinin soğuk stresine karşı toleransının, bitki büyümesi için sıcaklık düşüşü hasarının ve değişen metabolizmanın basıncını kontrol ederek gelişebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Dolata et al. (2016) yapmış oldukları bir çalışmada bitkilerde miRNA ekspresyonunun düzenlenmesinin altında yatan mekanizmaları anlamak için, tuzluluk stresinin miRNA *Arabidopsis* transkriptomu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak da tuzluluk stresi sırasında miRNA161 ve miRNA173 seviyelerinin arttığını pri-miRNA161 ve pri-miRNA173'ün ekspresyonunun ise aşağı regüle edildiğini bildirmişlerdir.

Gao et al. (2016) *Medicago sativa*'da miR156'nın ekspresyon seviyesi üzerine yapmış oldukları çalışmada kısa günlerde, miR156 seviyeleri genç fidelerde en yüksek seviyede olduğunu fakat ardından birkaç hafta içinde düştüğünü bildirmişlerdir.

Karimi and Mohsenzadeh (2016) yılında yapmış oldukları çalışmalarında 50, 100, 200, 400 ve 800 mg/L konsantrasyonlarındaki silikon dioksit (SiO<sub>2</sub>) nanoparçacıklarının buğday (*Triticum aestivum* L.) fideleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 200 ve üzeri olan konsantrasyonların buğday fideleri üzerine olumsuz etki gösterdiklerini, SiO<sub>2</sub> nanoparçacıklarının önemli ölçüde kök ve sürgün taze ağırlığını, kök ve sürgün kuru ağırlığını, klorofil a ve b miktarlarını önemli ölçüde azalttığını, yapraklarda karotenoid miktarında azalma, yapraklarda prolin içeriğinde artış, yapraklarda lipid peroksidasyonunda (MDA) artış ve katalaz aktivitesinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda 50 ve 100 mg/L SiO<sub>2</sub> nanoparçacıklarının olumlu etkilerinin olabileceğini düşünmüşlerdir.

Shu et al. (2016) yonca bitkisinde donma toleransının karmaşık düzenleme mekanizmalarını anlamak için 3'er saatliğine soğuk (4 °C) ve donma (-8 °C) stresi altında küçük RNA dizileme analizi yapmışlardır. Sıralama sonuçlarında 173 bilinen ve 24 yeni miRNA'nın ifade edildiğini ve 35 miRNA'nın ifadesinin soğuk ve/veya donma stresinden etkilendiğini ve çoğu miRNA'ların aşağı doğru regüle (miR156, miR159, miR167, miR172, miR396 ve miR398) olduğunu açıklamışlardır.

Arshad et al. (2017) kuraklık stresi altında yoncada (*Medicago Sativa*) miR156'd'nin kuraklık tepkisindeki rolünü test etmişlerdir. Sonuç olarak kontrole kıyasla miR156 aşırı ekspresyonu (miR156OE) ile yonca genotiplerinin kuraklık toleransında önemli bir gelişme gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Daha yüksek hayatta kalma ve

daha az su kaybına ek olarak, miR156OE genotipleri ayrıca kuraklık stresi sırasında kontrole kıyasla daha yüksek stoma iletkenliğini koruduğunu, ayrıca, miR156OE genotiplerinde uyumlu çözünen madde (prolin) birikimi ve absisik asit (ABA) ve antioksidan seviyelerinde artış gözlemlediklerini açıklamışlardır.

Jhansi et al. (2017) yer fıstığı (*Arachis hypogaea* L) tohum çimlenmesi üzerine yapmış oldukları çalışmada 15-16,5-18-18,5 ve 20 nm boyutlarında MgO nanopartikülü uygulamışlar ve düşük olan 15 nanometre uygulamasının tohumun çimlenmesini, fide gelişimini ve büyüme parametrelerini artırdığını bildirmişlerdir.

Noman and Aqell (2017) yılında bitkilerde ağır metal uygulaması sonucunda miR156 ile yapılan çalışmalarda kadmiyum (Cd) ve cıva (Hg) streslerine yanıt olarak aşağı regüle edildiği, alüminyum (Al), mangan (Mn) ve arsenik (As) stresi altında yukarı regüle edildiğini bildirmişlerdir.

Elmer et al. (2018) karpuzu *Fusarium solgunluğuna* karşı korumak için B, CuO, MnO, SiO, TiO ve ZnO nanoparçacıkları (NPs) içeren yaprak sprelerinin kullanımını araştırmıştır. Genç karpuz bitkilerinin yapraklarına NPs süspansiyonları (500 ile 1.000 ug/ml) püskürtülmüş (bitki başına 1 ile 2 ml) ve *Fusarium oxysporum f* ile istila edilmiş saksı karışımına ekilmiştir. Sonuç olarak sp. niveum sekiz sera deneyinin beşinde CuO NPs hastalığı bastırdığı ve sekiz deneyin altısında CuO NPs biyokütleyi veya verimi işlenmemiş kontrollere veya test edilen diğer NPs'ye göre daha fazla artırdığı bildirilmiş ve CuO NPs ile muamele edilmiş bitkilerde diğer muamelelere göre daha fazla kök Cu tespit edildiğini açıklamışlardır.

Shin et al. (2018) yılında yapmış oldukları çalışmada soğuk stres altında (-6,5,-7,5 ve -8,5 °C) ispanak (*Spinacia oleracea* L.) yapraklarına eksojen 0,5 mM SA uygulamışlardır. Sonuç olarak SA'nın yaprak büyümesini engellemediği, hafifletilmiş oksidatif stres (daha düşük  $O^{2\cdot-}$  ve  $H_2O_2$  birikimi) ile kanıtlandığı üzere donma toleransını önemli ölçüde iyileştirdiğini açıklamışlardır. SA ile muamele edilmiş yaprakların gelişmiş donma toleransı, artan prolin ile paralel olduğu yani SA ile prolin birikiminin olduğu bildirilmiştir.

Dai et al. (2019) salisilik asidin (SA), Al stresinin *Panax notoginseng*'de kuru madde birikimi üzerindeki inhibitör etkilerini hafifletip hafifletemeyeceğini belirlemek ve SA'nın fotosentezi ve karbonhidrat metabolizmasını düzenlediği mekanizmayı araştırmak amacıyla çalışma yapmışlardır. Al stresi altında yapraklara uygulanan 50 uM SA'nın konsantrasyonu sonrası üçüncü ve on beşinci gün örnekler toplanmıştır. SA'nın yapraklardaki Al stresini %13,23 oranında azalttığını, karbonhidratların sentezini ve köklere taşınmasını teşvik ettiğini son olarak da Al stresi altında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunu %12,22 oranında önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

Xiao et al. (2019) greyfurt pomelo (*Citrus maxima*) bitki fidelerini 250 mg/L 500 mg/L ve 1.000 mg/L konsantrasyonlarındaki MgO ve ZnO nanoparçacık maruziyetine bırakmışlar, nanopartiküllerin zehir tesirini nano-gübre olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. Köklerden sürgünlere MgO nanopartikülünün yer değiştirmesi yüksek iken ZnO nanopartikülünün yer değiştirmesinin yavaş olduğu ifade edilmiştir. Konsantrasyonların hepsinde MgO nanopartikülüne maruz kalma çok şiddetli toksisite ve güçlü oksidatif strese neden olmuştur. ZnO nanopartikülüne maruz kalan konsantrasyonlarda ise hafif derecede toksisite görülürken sürgünlerde güçlü oksidatif strese neden olduğu açıklanmıştır. MgO nanopartiküllerinin bitkiye toksisitesinin çözülmüş Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonundan kaynaklandığı, ZnO nanopartiküllerinin çözülmüş Zn<sup>+2</sup> konsantrasyonu ile ilişkili olmadığı sonucuna varmışlardır.

Aydınoglu (2020) düşük sıcaklık stresinde (4 °C) mısır büyümesi ve gelişmesi üzerine yapmış olduğu çalışmada mısır yaprağında ekspresyonu değiştirilmiş çok sayıda miRNA olduğunu ve miRNA'ların bitkiye düşük sıcaklığa karşı adaptasyon için gerekli olan yaprak gelişimsel ayarlamalarını modüle etmede hayati bir rol oynadığını düşündüğünü belirtmiştir. miR160 ile ve miR319'un ifadesinin olgun bölgede önemli derecede azaldığını, miR408a ve miR528, meristem ve uzama bölgelerinde ise yukarı doğru düzenlendiğini kontrol ile karşılaştırarak soğuk stresi altında mısırdaki miRNA seviyelerinin değiştiğini belirtmiştir.

Cheng et al. (2020) Alüminyum (Al) toksisitesine karşı yonca (*Medicago sativa* L.) toleransı için fotosentetik fotosistemlerin bütünlüğünü ve fonksiyonlarını korumada salisilik asidin (SA) koruyucu rollerini araştırmışlardır. Bitkiler Al stresi altında (100

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

$\mu\text{M}$ ) muamele edilmiş ve SA 15  $\mu\text{M}$  yonca yapraklarına eksojen olarak püskürtülmüştür. Sonuç olarak da SA'nın yaprağa püskürtülmesi, köklerde ve yapraklarda Al içeriğini azalttığı ve kloroplastlardaki Al hasarlarını hafiflettiği belirtilmiştir.

Kanjana (2020) Magnezyum oksit nanopartiküllerinin (MgO) pamuk üzerinde büyüme ve gelişmesi üzerine yapmış olduğu çalışmada saksı kültürü denemesi yapmıştır. Uygulama için 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm konsantrasyonlarındaki MgO nanoparçacıklarını yapraktan eksojen olarak uygulamıştır. Sonuç olarak 60 ppm 50 nm boyutunun diğer uygulamalara göre pamuğun lif uzunluğu ve lif mukavemeti gibi lif kalite parametrelerini iyileştirdiğini belirtmiştir.

Wassie et al. (2020) yılında yapmış oldukları çalışmada ısı stresinden beş gün önce yonca (*Medicago Sativa* L.) yapraklarına eksojen olarak salisilik asit (SA) üç gün boyunca 0,25 mM veya 0,5 mM konsantrasyonlarında uygulamışlar ve çeşitli büyüme ve fizyolojik özellikleri ölçmüşlerdir. Sonuç olarak, özellikle 0,25 mM eksojen SA'nın bitki boyu, biyokütle, klorofil içeriği ve ısı stresi altında yoncanın fotosentetik etkinliğini, yaprak morfolojisini iyileştirdiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca SA uygulamasının elektrolit sızıntısını (EL) ve malondialdehit (MDA) içeriğini azaltarak ısı kaynaklı zar hasarını hafiflettiği ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini (CAT, SOD, POD) düzenlediğini açıklamışlardır.

Ahmed et al. (2021) yapmış oldukları çalışmalarında pirinç (*Oryza sativa* L.) bitkilerini As (arsenik) maruz bırakmışlar ve yeşil sentez MgO nanopartikülünü 50, 100 ve 200  $\text{mg}/\text{kg}^{-1}$  konsantrasyonlarını topraktan uygulamışlardır. Biyojenik MgO nanopartiküllerin uygulanması, kontrol işlemine kıyasla pirinç bitkilerinin uzunluğunu ve biyokütlesini büyük ölçüde artırdığını, MgO nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarında (karşılık gelen 50, 100 ve 200  $\text{mg}/\text{kg}^{-1}$  toprak) bitki boyunda (%18,7- %25,2 ve %32,7) kontrol uygulamasına kıyasla önemli bir gelişme gösterdiğini ve fizyolojik olarak MgO nanopartiküllerin uygulanmasının ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) birikimini ve MDA birikimini önemli ölçüde azalttığını ve antioksidanı artırdığını belirtmişlerdir.

Huo et al. (2021) yapmış oldukları çalışmada Osa-miR156, Osa-miR319 ve Osa-miR528'in aşırı ekspresyonu nedeniyle pirinç bitkilerinde soğuga dayanıklılıkta bir gelişme olduğunu ifade etmişlerdir.

Song et al. (2021) pirinç bitkilerini üzerine yapmış oldukları çalışmada ZnO (0, 25, 50 ve 100 mg/L) NP'lerini yaprağa eksojen olarak uygulamış ve (10 °C) 5 gün boyunca bitkileri soğuk stresine maruz bırakmışlardır. Sonuçlarda, ciddi şekilde toksik olan ve bitki hücrelerinde ciddi hasara neden olan radikal olmayan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formundaki artan ROS'un gösterdiği gibi, soğutma stresinin şiddetli oksidatif strese neden olduğunu bulmuşlardır. Soğutma stresi uygulamasının kontrole kıyasla pirinç yapraklarındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA ve prolin seviyelerini sırasıyla 2,42-2,60 ve 3,33 kat güçlü bir şekilde artırdığını ve 100 mg/L ZnO NP'lerin eklenmesinin ise tekli soğutma stresine kıyasla yapraklardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA ve prolin içeriklerini sırasıyla %41,2-%40,9 ve %50 oranında önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Son söz olarak da antioksidatif sistem ve soğutma tepkisinde yer alan transkripsiyon faktörleri yoluyla soğutma stresini azaltabileceğini vurgulamışlardır.

Wang et al. (2021) yılında yapmış oldukları çalışmada soğuk stresi (5 °C) altında 72 saat Chitosan (kitosan) (CH-NP'ler) nanoparçacıklarını eksojen olarak (0, 100, 200 ve 400 mg/L) muz bitkisi yapraklarına eksojen püskürtme olarak uygulamışlardır. Sonuç olarak muz bitkilerine CH-NP'ler püskürtmenin, malondialdehit (MDA) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) seviyesini azalttığını ve ozmoprotektanları (çözünür karbonhidratlar, prolin ve aminoasitler) biriktirerek muz bitkilerinde soğuk stresi toleransının artmasına katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Li et al. (2022) yılında şeker pancarı üzerine yapmış oldukları çalışmada fomesafen (herbisit) stresi altında eksojen olarak SA (salisilik asit) konsantrasyonlarını (0,025-0,25-0,5-1,5 ve 10 mM) uygulayarak şeker pancarı fidelerinde morfolojik parametreler, fotosentetik performans ve antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkilerini aydınlatmak için bir saksı çalışması yapmışlardır. Sonuç olarak eksojen SA, fomesafen stresini hafiflettiği ve şeker pancarı yapraklarında bitki boyu, biyokütle, fotosentetik pigment içerikleri, net fotosentetik oran ve fotokimyasal etkinliğini arttırdığını belirtmişlerdir. Aynı şekilde eksojen SA uygulamasının malondialdehit

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

(MDA) içeriğini ve elektrolit geçirgenliğini azaltarak, antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek hücre zarı bütünlüğünü koruduğunu ve son olarak da eksojen SA'nın, fomesafenin şeker pancarı fidelerinin büyümesi üzerindeki olumsuz etkilerini, 1 mM SA'da belirgin bir etki ile iyileştirdiği sonucunu bildirmişlerdir.

Ahamad et al. (2023) yılında limon meyvesi ekstraktlarından sentezlenmiş MgO nanopartiküllerini 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarında havuçta (*Daucus carota* L.) *Alternaria dauci* enfeksiyonuna karşı eksojen olarak uygulamışlardır ve *A. dauci* enfeksiyonu olan ve olmayan havuçların bitki büyümesinde, fotosentetik pigmentlerde, fenol ve prolin içeriklerinde ve savunma enzim aktivitelerinde önemli gelişmeler sağlandığını ve 100 mg/L MgO nanopartiküllerin püskürtülmesi, *A. dauci* ile mücadele edildiğinde havuçta daha fazla bitki uzunluğuna (%17,11), sürgün kuru ağırlığına (%34,38), bitki taze ağırlığına (%20,46) ve kök kuru ağırlığına (%49,09) sahip olduğunu belirtmişlerdir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri

Bu tez çalışmasında kullanılan, ülkemizde de yaygın bir şekilde tarımı yapılan yonca (*Medicago sativa* L.)'nın Van ve Denizli genotiplerine ait tohumları yerel çiftçilerden temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan cihaz ve modelleri

**Çizelge 3.1.** Tez çalışması boyunca kullanılan cihaz ve modelleri

Cihaz	Model
Biyogüvenlik Kabini	X Bio, MSC CLASS II- KF/1500
Buz makinesi	ITV, Icemakers/102204
Hassas Terazi	OHAUS/PR224
İklimlendirme Kabini	Panasonic MLR-352H-PE
Manyetik Isıtıcı ve Karıştırıcı	Velp scientifica/SA20500061
Otoklav	WiseClave WAC-47
Pipetler	Eppendorf ve RAININ
pH Metre	OHAUS ST3100F
Real Time PCR Cihazı	Applied Biosystems, StepOne PlusTMS/N: 720012158
Santrifüj / Soğutmalı	HERMLE/Z 130 M/Z 216 MK/Z 326K
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiscan SkyHigh /A51119700
Spin mini santrifüj	Onilab D1008
Taramalı Elektron Mikroskobu	Quante FEG 250
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	Velp scientifica/F202A0173
+4 °C ve -20 °C Soğutucu	Panasonic, Pharmaceutical Refrigeratör/MPR-215F-PE
-80 °C Derin Dondurucu	Panasonic/MDF-DU300H-PE

#### 3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal ve kitler

**Çizelge 3.2.** Tez çalışması boyunca kullanılan kimyasal ve kitler

Kimyasal ve Kitler	Marka
2-propanol (izopropanol alkol)	Honeywell Riedel-de 24137
3,5-Dinitrosalisilik asit	Sigma-Aldrich MFCD00007104
Asetik asit (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck 100063
cDNA Sentez Kiti	Thermoscientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 01275918
Chloroform	EMSURE <sup>®</sup> ACS, ISO, Reagent Ph Eur 1024452500
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Sigma-Aldrich MFCD00003568
Fosforik asit (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich 79622
Gluteraldehit	Merck 104239
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma-Aldrich MFCD00011324
Hot Firepol Evagreen Real-Time qPCR Supermix, 5x	Solis Biodyne
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich MFCD00011401
KI	Merck 105043
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Merck 108087
NaClO	Merck 105614
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich MFCD00003527
Ninhidrin (C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> )	TEKKİM 217-705-6
Sülfosalisilik asit	ChemBio CB3250.1000
Tiyobarbütirik asit (TBA)	Sigma-Aldrich MFCD00006674
Toluen (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> )	Merck 108325
TRIzol <sup>™</sup> Reagent	ThermoFisher Scientific 15596026
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma-Aldrich MFCD00004177

#### 3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanma aşamaları

##### Tohum yüzey sterilizasyonu için kullanılan çözeltiler

**%70'lik etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH):** 700 ml etil alkol üzerine 300 ml saf su ilave edilerek 1.000 ml tamamlanmıştır.

**%22'lik sodyum hipoklorit (NaClO):** 220 ml sodyum hipoklorit üzerine 780 ml saf su ilave edilerek 1.000 ml tamamlanmıştır.

##### Salisilik asit uygulamasında kullanılan çözeltiler

**1 mM ve 2 mM salisilik asit:** 1.000'er ml saf su içerisinde 138,2 ve 276,24 mg salisilik asit çözülmüştür.

##### MgO nanopartikül uygulamasında kullanılan çözeltiler

**5 ve 20 ppm Magnezyum oksit nanopartikül:** 5 ve 20 mg magnezyum oksit nanopartikülü %1'lik asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) ile çözülmüş saf su ile 1.000'er ml tamamlanmıştır.

##### Lipid Peroksidasyonu (Malondialdehit) belirlemede kullanılan çözeltiler

**Homojenat çözelti:** 150 ml saf su içerisinde 0,15 g TCA (trikloro asetik asit) çözülmüştür. (%1 TCA)

**Reaksiyon çözelti:** 100 ml saf su içerisinde 0,5 g TCA çözülmüş üzerine %0,5'lik 20 g TBA (tiyo barbüirik asit) ilave edilerek hazırlanmıştır (%20 TCA + %0,5 TBA).

#### **Toplam çözünebilir karbonhidrat (DNSA) belirlemede kullanılan çözeltiler**

**DNSA reaktifi hazırlanışı:** 1 g DNSA ile 2 M 20 ml NaOH iyice çalkalanmış daha sonra 30 g  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  (sodyum potasyum tartarat) 50 ml su ile eklenmiştir. Daha sonra 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  ile tamamlanmıştır.

**2,5 N HCl:** 238 ml saf su üzerine yavaş yavaş 62 ml HCl (hidroklorik asit) ilave edilmiştir.

#### **Prolin miktarının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler**

**Asit ninhidrin çözeltisi:** Isı altında 1,25 g  $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$  (ninhidrin) üzerine 30 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (asetik asit) ve 20 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (fosforik asit) eklenerek toplamda 50 ml çözeltisi hazırlanmıştır.

**%3 sülfosalisilik asit:** 13,5 ml sülfosalisilik asit üzerine 436,5 ml saf su ilave edilmiştir.

#### **$\text{H}_2\text{O}_2$ (Hidrojen peroksit) belirlenmesinde kullanılan çözeltiler**

**$\text{KH}_2\text{PO}_4$ :** 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  içerisinde 0,136 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Potasyum dihidrojen fosfat) (pH 7)

**KI:** 50 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  içerisinde 8,3 g KI çözünmüştür.

#### **SEM görüntüsü için kullanılan çözeltiler**

**Fiksasif tampon:** pH 6,8 olan 49 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (fosfat) tamponu ile %3'lük gluteraldehit'ten 1 ml ilave edilmiş çözülerek hazırlanmıştır. %10 ile %100 arasında hazırlanan etanol: Sırasıyla yüzde %10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 etanol ile sırasıyla yüzde %90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0 saf su karıştırılarak hazırlanmıştır.

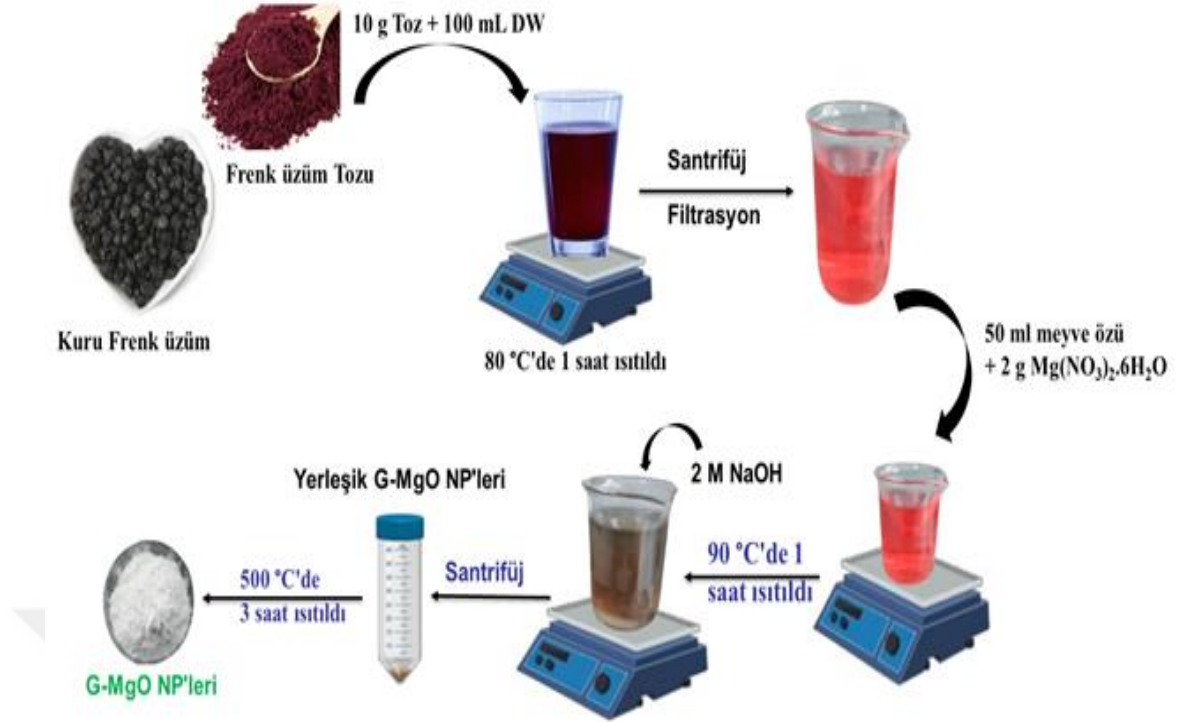
#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Siyah frenk üzümü (*Ribes nigrum*) meyve özlerinin hazırlanması

Frenk üzümü (*Ribes nigrum*) Atatürk Üniversitesi Kampüsü Türkiye'den hasat edilmiş ve musluk suyunda defalarca yıkandıktan sonra distile suda da 3-4 kez yıkandıktan sonra -40 °C'de dondurularak kurutulmuştur. On gram kuru meyve ezilerek toz haline getirilmiş ve 100 ml distile suya ilave edilerek 80 °C'de 1 saat karıştırılarak ısıtılmıştır. Soğutulduktan sonra karışım 8.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve Whatman filtre kağıdı kullanılarak süzülerek saf meyve sıvısı özü elde edilmiştir.

##### 3.2.2. MgO nanopartiküllerinin yeşil sentezi

Oda sıcaklığında 2 g magnezyum nitrat ( $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ) ile 50 ml siyah frenk üzümü meyve özü 30 dakika karıştırılmış ve karışım 90 °C' de 2 saat ısıtılmıştır. 2 M NaOH çözeltisi ile pH 11 olarak ayarlandıktan sonra çözelti karışımının rengi koyu kahverengiye dönmüştür. Soğutulma işlemi yapılmış ardından 20 dk 8.500 rpm'de 2 kez santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrası deiyonize su ile birden fazla yıkama işlemi yapılmıştır. MgO katı nanoparçacıkları 60 °C'de etüv içerisinde 1 gece kurutulduktan sonra kurutulmuş nanoparçacıklar 500 °C'lik ısıtma fırınında 3 saat boyunca kalsine (yakarak toz haline getirme) edilmiş ve elde edilen yeşil sentez MgO nanopartikülleri karakterizasyon ve uygulamalar için kullanılmıştır. MgO nanopartiküllerinin yeşil sentezi Şekil 3.1.'de verilmiştir (Nijalingappa et al. 2019).



**Şekil 3.1.** Yeşil sentez MgO nanopartiküllerinin siyah frenk üzümü meyve özü kullanılarak eldesi.

#### 3.2.3. MgO nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Yeşil sentez olarak elde edilen MgO nanoparçacıklarının kristal yapısı ve yönelimini incelemek için Cu Ka radyasyonu (1,5406 Å) kullanan Rigaku Miniflex kırınım ölçer cihazı kullanılmıştır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile nanoparçacıkların morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır. SEM'e bağlı enerji dağıtıcı (EDS) X-ışını spektroskopisi ile de kimyasal bileşim analizi gerçekleştirilmiştir. Metal oksit nanoparçacıklarının 400-4.000  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki fonksiyonel gruplara ait FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) verileri katı örnekler için kullanılan KBr pellet yöntemi ile PerkinElmer Spectrum One spektrofotometresi ile kaydedilmiştir.

#### 3.2.4. Van/Denizli çeşitleri yonca tohumlarının ekimi ve bitkilerin yetiştirilmesi

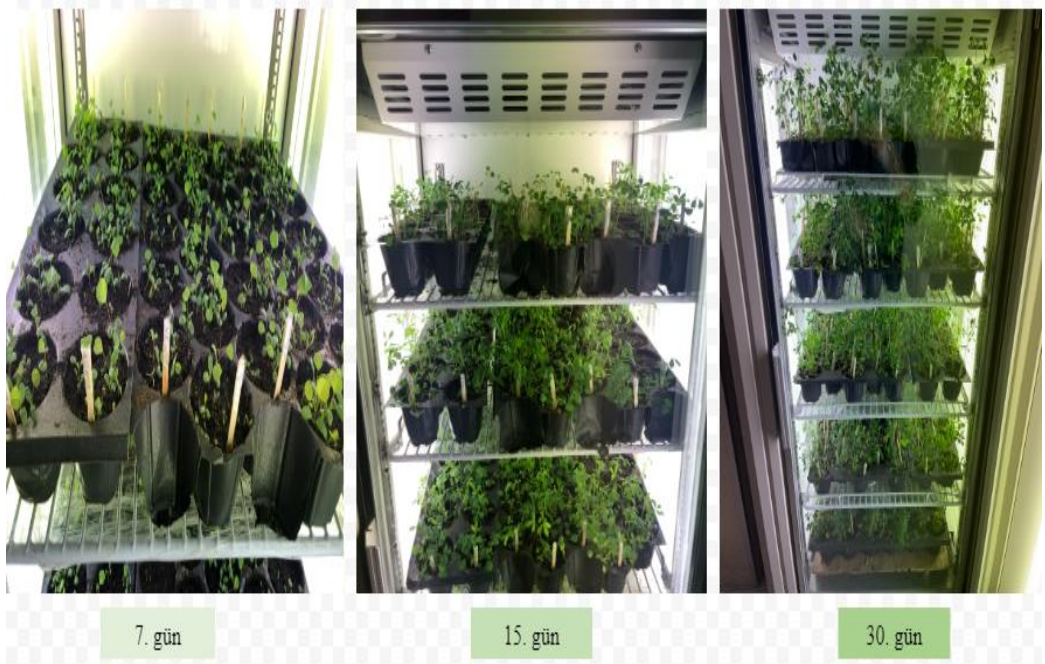
Van ve Denizli çeşidi yonca bitkisine ait tohumlar ekim yapılmadan önce %22'lik NaClO (sodyum hipoklorit) çözeltisi içerisinde 20 dk bekletilerek yüzey sterilizasyonu sağlanmıştır. 2-3 kere çeşme suyuyla ardından 2-3 kerede distile su ile yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından oda koşullarında saf su içerisinde 3 saat şişmeye bırakılmıştır. Çimlenme aşamasına gelmiş olan tohumlar, daha önceden içleri idealtorf bitki toprağı ile doldurularak hazır hale getirilen fide viyollerine ilave edilerek, can suyu verilmiş ve ekim süreci tamamlanmıştır. Ekim süreci tamamlanan tohumların bulunduğu viyoller, sıcaklığı 25 °C nem oranı %60 ve aydınlatma periyodu 16/8 (gündüz/gece) 15.000 lüks olarak ayarlanmış bitki büyütme (iklimlendirme) kabininin içerisine yerleştirilmiştir. Bitkilerin yetiştirilmesi süreci 30 gün sonunda tamamlanmıştır. Bitkinin büyütülmesi süresince yani hasat edilinceye kadar herhangi bir çözelti kullanılmamış, yalnızca bölgesel olarak bitkilerin su ihtiyacı karşılanmıştır. Büyüme işlemi tamamlandıktan sonra yapılacak olan çalışma için deney tasarımında yer alan grupların konsantrasyonlarını gösteren etiketlendirme işlemi yapılmıştır. 30 günlük büyüme süresi içerisindeki Van ve Denizli çeşitlerinin 7. 15. ve 30. gün sonundaki morfolojik görüntüleri Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.'te verilmiştir.



Şekil 3.2. Van / Denizli çeşitlerine ait yonca tohumlarının ekimi



Şekil 3.3. Van çeşidi 7. 15. ve 30. günlerin morfolojisi



Şekil 3.4. Denizli çeşidi 7. 15. ve 30. günlerin morfolojisi

### 3.2.5. SA ve MgO nanopartikül konsantrasyonları deney tasarımı ve uygulaması

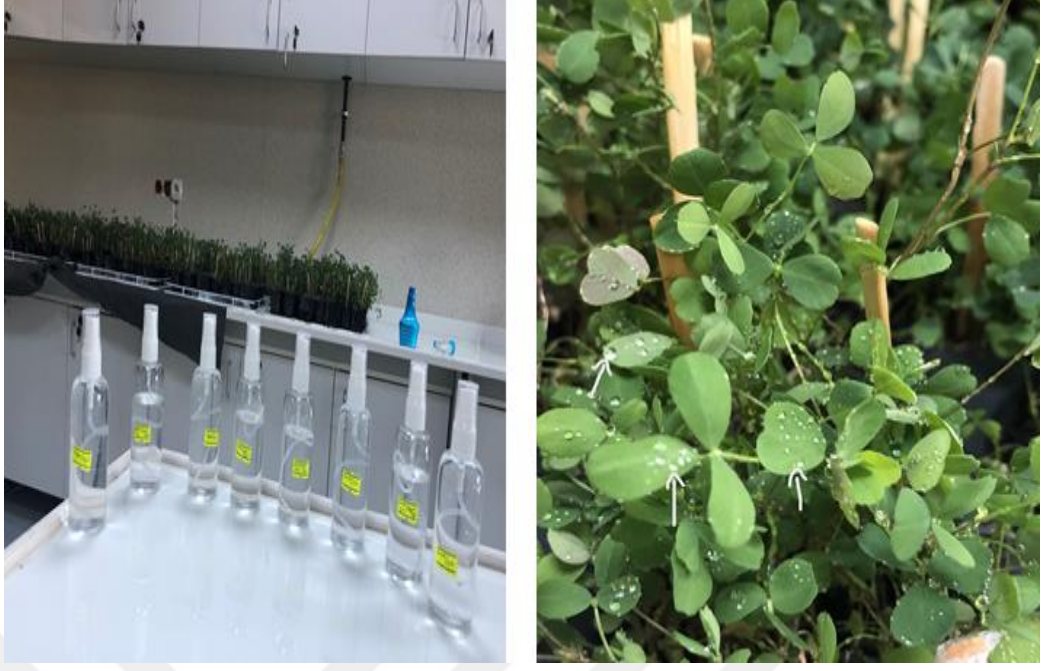
Bitkilerin büyüme süreci tamamlandıktan sonra soğuk stresi, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül uygulamalarına geçilmeden önce 25 °C kontrol için bitki yaprak örnekleri alınarak -80 °C'de depolanmıştır. Van ve Denizli yonca çeşitleri ile

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

İlgili yapılacak olan çalışma için deney tasarımı planlanmıştır. Bu deney tasarımında, salisilik asit (SA) ve magnezyum oksit nanopartikülleri (MgO) konsantrasyon çözeltileri hazırlanmış ve spray şişeleri aracılığı ile Van ve Denizli yonca çeşitlerinin yapraklarına eksojen olarak uygulanmıştır. Salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikülleri konsantrasyonlarını gösteren deney tasarımı aşağıdaki Çizelge 3.3.'te, bitki çeşitlerine uygulanan salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül çözelti spray şişeleri ve eksojen uygulaması ise Şekil 3.5.'te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** SA ve MgO nanopartikül uygulama konsantrasyonları deney tasarımı

(Van / Denizli)	Salisilik Asit	+	Nanopartikül (MgO)
1.	Kontrol		Kontrol
2.	1 mM		-
3.	2 mM		-
4.	-		5 ppm
5.	-		20 ppm
6.	1 mM		5 ppm
7.	1 mM		20 ppm
8.	2 mM		5 ppm
9.	2 mM		20 ppm



Şekil 3.5. SA ve MgO nanopartikül çözeltilerinin eksojen uygulaması

#### 3.2.6. Soğuk stresi, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül uygulaması

İki farklı soğuk stresi (10 °C ve 4 °C) her iki çeşide de (Van ve Denizli) uygulanmıştır. 10 °C ve 4 °C soğuk stresi uygulamaları öncesi bitki çeşitlerinin yapraklarına salisilik asit, magnezyum oksit nanopartikülü ve birleşim uygulamaları eksojen olarak uygulanmıştır.

##### 3.2.6.1. 10 °C soğuk stresi uygulaması

Salisilik asit ve MgO nanopartikül çözeltileri deney tasarımında belirtildiği şekilde eksojen olarak sprey yardımı ile her iki çeşidin yapraklarına uygulandıktan sonra yapraklardan emiliminin gerçekleşmesi adına bitki çeşitleri oda sıcaklığında bir gün bekletilmiştir. Daha sonra bitkiler sıcaklığı 10 °C, nem oranı %60 ve aydınlatma periyodu 16/8 (gündüz/gece) 15.000 lüks olarak ayarlanmış olan iklimlendirme kabini içerisine yerleştirilmişlerdir. 10 °C'de 14 gün boyunca bitkiler soğuk stresine maruz bırakılmışlardır. Bu süre boyunca gün aşırı şeklinde lokal olarak bitkilerin su ihtiyacı karşılanmıştır. Onuncu gün sonunda Van ve Denizli çeşitlerinden yaprak örnekleri alınarak -80 °C de depolanmıştır.

#### 3.2.6.2. 4 °C soğuk stresi uygulaması

Van ve Denizli çeşitlerine ait yonca bitkilerini 10 °C soğuk stresine 14 gün boyunca maruz bırakıp, yaprak örneklerini aldıktan sonra ikinci aşama olan 4 °C soğuk stresine geçilmiştir. Geriye kalan yonca çeşitlerine salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül çözeltileri deney tasarımında belirtildiği gibi eksojen olarak tekrardan sprey yardımı ile uygulanmıştır. Yapraklardan emilimin gerçekleşmesi için bitki çeşitleri 10 °C'de bir gün bekletildikten sonra bitkiler daha önceden sıcaklığı 4 °C nem oranı %60 ve aydınlatma periyodu 16/8 (gündüz/gece) 15.000 lüks olarak ayarlanmış olan iklimlendirme kabini içerisine yerleştirilmişlerdir. 14 gün boyunca 4 °C soğuk stresine maruz bırakılan bitki çeşitlerinin sulama ihtiyacı bölgesel olup sıklıkla olmamıştır. 14. günün sonunda Van ve Denizli çeşitlerinden yaprak örnekleri alınarak -80 °C'de saklanmıştır. Bitki yapraklarından alınan örnekler aşağıdaki Şekil 3.6.'da verilmiştir.

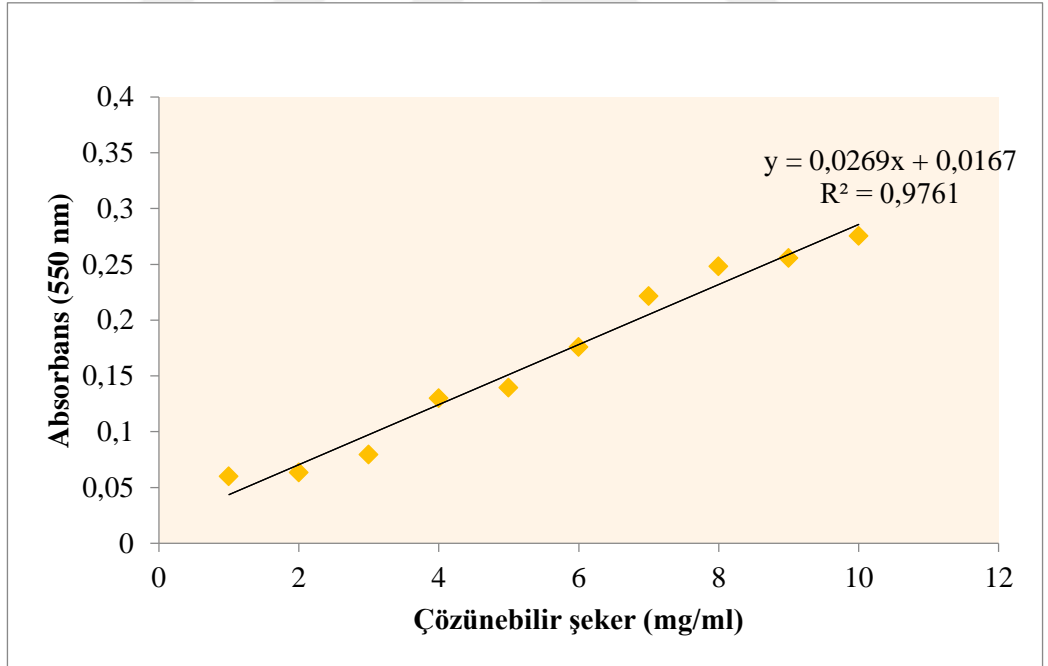


Şekil 3.6. Bitki yaprak örnekleri alımı

#### 3.2.7. Biyokimyasal Analizler

##### 3.2.7.1. Toplam çözünebilir şeker içeriğinin belirlenmesi

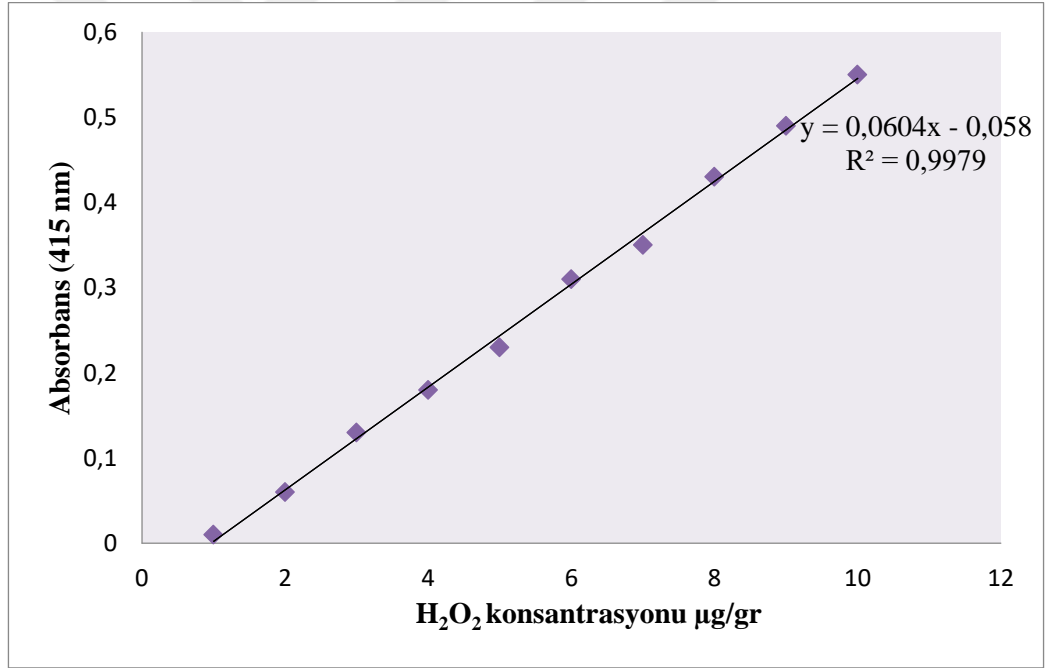
Toplam çözünebilir şeker içeriği DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) yöntemi ile yapılmıştır. Çözünebilir şeker içeriği tayini için öncelikle standart bir grafik hazırlanmıştır. Diğer taraftan bitki örnekleri (0,1 g) bir havan içerisinde sıvı nitrojen (azot) kullanılarak homojenize edilmiştir. Ardından üzerine 2,5 N HCl'den 5 ml ilave edilmiş ve homojenizasyon tamamlanmıştır. Örnekler 15.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantın 2 ml'si bir cam tüpe alınmıştır. Cam tüplere DNSA'dan 2 ml ilave edildikten sonra tüpler 90 °C'lik bir su küvetinde 20 dk inkübe edilmiş ve süre sonunda reaksiyonu durdurmak için bir buz küvetinde soğutulmuştur. Kör örnek dâhil her bir örnekten 100'er µl alınıp 96 well plate kullanarak bir spektrofotometrede 550 nmde absorbans ölçümü yapılmıştır (Miller 1959).



Şekil 3.7. Çözünebilir şeker içeriğini belirlemede kullanılan standart grafiği

#### 3.2.7.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin belirlenmesi

Bunun için 0,2 g bitki örneği tartılmış ve bir havan içerisinde sıvı nitrojen (azot) ile ezilme işlemi yapılarak homojenize edilmiştir. %0,1 TCA'dan (Trikloroasetik asit) 2 ml ilave edilmiştir. 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı 2 ml'lik eppendorf içerisine alınmıştır. 500 µl alınarak üzerine 800 µL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 1.600 µl KI ilave edilmiştir. 390 nm'de absorbans değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinin hesaplanması için eppendorf tüplere sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 µg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren seri çözeltiler hazırlanarak konulmuştur. Hazırlanan bu seri çözeltiler kullanılarak elde edilen standart grafik örneklerdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini hesaplamak için kullanılmıştır. Sonuçlar gr doku başına düşen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı (µg/gr doku) olarak ifade edilmiştir (Hao et al. 2014).



Şekil 3.8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını belirlemede kullanılan standart grafiği

#### 3.2.7.3. Lipid peroksidasyonu içeriğinin belirlenmesi

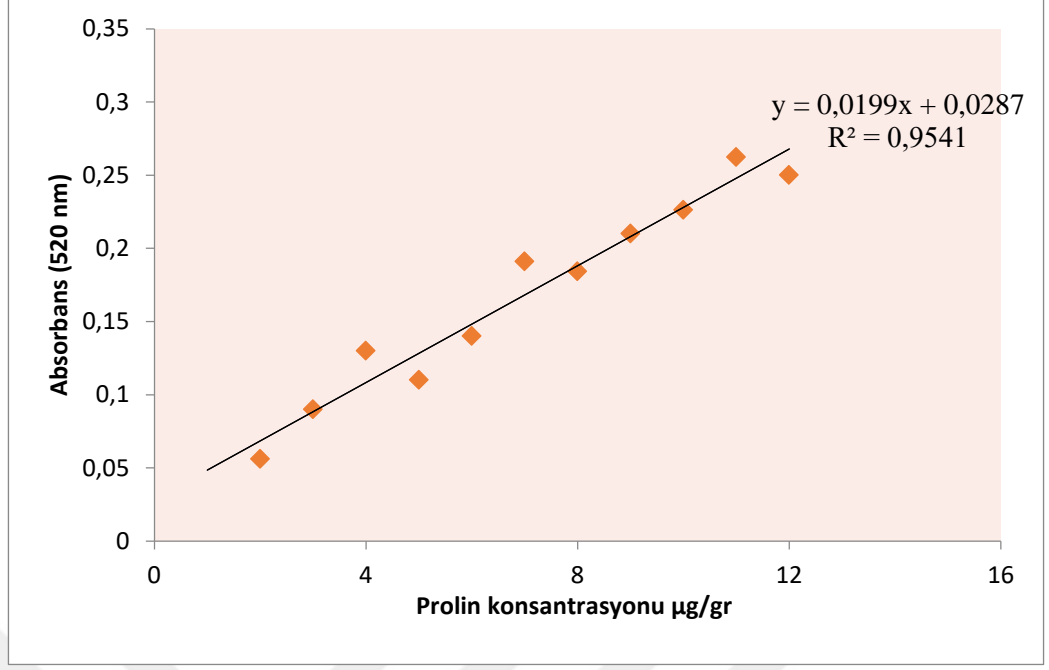
Lipid peroksidasyonu, doku ve hücre hasarlarında oksidatif hasarın bir göstergesidir. Malondialdehit (MDA) ise lipid peroksidasyonu sonucu oluşan yan ürün olup çok kullanılan bir belirteçdir. Malondialdehit içeriğini (lipid peroksidasyonu ölçümü) belirlemek için öncelikle 0,2 g Van ve Denizli çeşitlerine ait bitki örnekleri

tartılmış daha sonra sıvı nitrojen (azot) kullanılarak havanda ezilmiştir. %0,1'lik TCA 2 ml ilave edilerek homojenizasyonu sağlandıktan sonra eppendorf tüplerin içerisine 2 ml alınarak 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmından 2 ml alınarak üzerine 1 ml %20 TCA + 1 ml %0,5 TBA çözeltisinden ilave edilmiştir. Tüpler 100 °C'de 40 dk inkübe edildikten sonra hızlıca buz küvetine alınmış ve reaksiyon tamamlanmıştır. Blank ise 1 ml %20 TCA, 1 mL %0,5 TBA ve 1 mL %0,1 TCA ilaveleriyle hazırlanmıştır. Son olarak 96 well plate kullanarak spektrofotometre de 562 nm ve 600 nm dalga boylarında 3'lü biyolojik tekrarlı olacak şekilde absorbans ölçümü yapılmıştır. Her bir konsantrasyonun absorbans değerinden blank absorbans değeri çıkarılmış ve MDA içeriğinin hesaplanması aşağıdaki şekilde (3.2) yapılmıştır (Hodges et al. 1999).

$$MDA (nmol/ml) = (A562 - A600) * 6,45 \quad (3.2)$$

#### 3.2.7.4. Prolin miktarının belirlenmesi

Prolin miktarı tayini için bitki yapraklarından 0,4 gr alınmış ve bir porselen havanda sıvı azot içerisinde iyice öğütülmüştür. Ardından, örnekler üzerine %3'lük sülfosalisilik asitten 7,5 ml pipetlenmiş ve tekrar iyice homojenize edilmiştir. Homojenat, 6.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmından 2 ml alınarak temiz cam tüplere aktarılmıştır. Cam tüplerin üzerine sırasıyla 1 ml asetik asit ve 1 ml asit ninhidrin ilave edilmiş ve hazırlanan örnekler, 100 °C'lik bir su banyosunda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, cam tüpler hızla buz banyosuna alınarak soğutulmuştur. Soğutulmuş cam tüplerin üzerine 4 ml toluen eklenmiş ve tüpler iyice karıştırılmışlardır. Tüplerdeki toluen fazının absorbası bir spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her bir konsantrasyonun absorbans değerinden Kör absorbans değeri çıkarılarak prolin konsantrasyonu, bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir (Ahmad et al. 2012).



Şekil 3.9. Prolin miktarını belirlemede kullanılan standart grafiği

#### 3.2.8. SEM analizi (Taramalı elektron mikroskobu ile görüntü alınması)

Bitki örnekleri oda sıcaklığında 0,025 M tampon içerisinde 1 saat bekletilmiştir. Ardından fiksatif tamponda oda sıcaklığında (25 °C) 2 saat süreyle bekletildikten sonra 0.025 M tampon buz üzerinde 1 saat bekletilmiştir. 3 kere dH<sub>2</sub>O ile yıkandıktan sonra 30 dk saf su içerisinde bekletilmiştir. %10'luk etil alkol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) ile başlayarak sırası ile %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 ve %100'lük etil alkol konsantrasyonları içerisinde oda sıcaklığında 15'er dk bekletilmiştir (Fowke 1995). Görüntüleme işlemi Quante FEG 250 taramalı elektron mikroskobu aracılığı ile yapılmıştır.

#### 3.2.9. Moleküler analizler ile mtr-miR156a ve ath-miR173-5p gen anlatım seviyelerinin belirlenmesi

Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarına maruz bırakılan Van ve Denizli yonca çeşitlerindeki mtr-miR156a ve ath-miR173-5p gen anlatım seviyelerindeki değişikliği belirlemek amacıyla ilk olarak total RNA izolasyonu ardından cDNA sentezi ve son olarak RT-qPCR yapılmıştır.

#### 3.2.9.1. Total RNA izolasyonu

RNA izolasyonu aşağıda verilen basamaklara göre yapılmıştır.

1. RNA izolasyon işlemi öncesi izolasyon yapılacak ortam ve kabin ile kullanılacak otomatik pipetler, pipet uçları ve eppendorf tüpler sterilize edilmiştir. Çalışılacak santrifüj 4 °C ayarlanmıştır.
2. Soğuk stresi, salisilik asit, MgO nanopartikülü ve birleşim uygulamalarına maruz bırakılan Van ve Denizli çeşitlerine ait yaprak örnekleri hassas terazide 0,2 gram tartılmıştır. Tartım işlemi sonrası yaprak örnekleri sıvı azotta ezilmiş ve üzerlerine 1ml trizol ilave edilerek homojenizasyonu sağlanmıştır.
3. Homojenizasyon sonrası 5 dk boyunca oda koşullarında bekletilmiştir. Üzerine kloroformdan 200 µl ilave edilerek çalkalama işlemi yapılmış ve 3 dk oda koşullarında bekletilmiştir.
4. 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı alınmış farklı bir eppendorf tüplerin içerisine ilave edilmiştir.
5. Eppendorf tüplerin içerisine izopropanol alkolden 250 µl eklenerek spin santrifüj yapılmıştır.
6. Spin santrifüj sonrası oda koşullarında 10 dk bekletildikten sonra 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmış süpernatant kısmı atılmıştır.
7. Pellet kısmına -20 °C sıcaklığa sahip %70'lik etil alkolden 1 ml ilave edilmiş ve spin santrifüj sonrası 7.500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj yapılmıştır.
8. Süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve içerisinde bulunan alkolünde uzaklaşması amacıyla bir süre beklenilmiştir.
9. Son olarak pelletler üzerine 40 µl ultra saf su ilave edilerek pelletler çözülmüştür.

cDNA sentezine geçilmeden önce izole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayini Thermo Scientific Multiscan SkyHigh/A51119700 cihazında ölçülmüştür. RNA konsantrasyonları 1.000 ng olarak hesaplanmıştır (Ma et al. 2015).

#### 3.2.9.2. cDNA sentezi

RNA izolasyonu ile elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi için, "Thermoscientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" ve stem loop primerler kullanılmıştır. miRNA cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri aşağıdaki Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** cDNA sentezi için kullanılan mix bileşenleri

cDNA Mix Bileşenleri	Hacim
5 X Buffer	4 µl
Stem-loop primer	miR156: 2 µl miR173: 2 µl
RNase inhibitör	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid (RT)	1 µl
RNase free water	2 µl
miRNA örneği	6 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

Yukarıda verilen mix bileşenleri her bir örnek için hazırlanmış ve cDNA sentezi için gerekli reaksiyon koşullarına geçilmiştir. Reaksiyon için gerekli koşullar aşağıdaki Çizelge 3.5.'te verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** cDNA sentezi için gerekli reaksiyon koşulları

	1. Adım	2. Adım	3. Adım
<b>Sıcaklık (°C)</b>	65	45	70
<b>Süre (dk)</b>	5	60	5

Reaksiyon tamamlandıktan sonra miRNA-cDNA örneklerine 50 µl dH<sub>2</sub>O ilave edilerek Real –Time PCR aşamasına geçilmiştir.

#### 3.2.9.3. Real-Time PCR (RT-qPCR)

Tez çalışması kapsamında miRNA'lar arasından stres ile ilgili 2 farklı RNA (mtr-miR156a ve ath-miR173-5p seçilmiş ve gen anlatım seviyelerindeki değişiklik RT-qPCR ile tespit edilmiştir. Bu çalışma Applied Biosystems, StepOne Plus™ S/N: 720012158 cihazında, Solis Biodyne Hot Firepol Evagreen Real-Time qPCR Supermix, 5X kitinin protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon protokolünde kullanılan reference U6, mtr-miR156a ve ath-miR173-5p forward ve reverse primer setleri NCBI veri tabanı kullanılarak tasarlanmış ve kullanılan primerler aşağıdaki Çizelge 3.6.'da, RT-qPCR için kullanılan reaksiyon bileşenleri ise (master mix) Çizelge 3.7.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Kullanılan primerlerin sekans bilgileri

##### Reference U6

<b>F-5'</b>	ATTTGAACATACAGGA-3'
<b>R-5'</b>	CGATAAAATTGGACCATTCTG-3'

##### mtr-miR156a

<b>F-5'</b>	ACCGGGGTGACAGAAGAGAGAG-3'
<b>R-5'</b>	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
<b>STEM LOOP</b>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT ACGACTGTGCT

##### ath-miR173-5p

<b>F-5'</b>	ACCGGTTTCGCTTGCAGAGAGA-3'
<b>R-5'</b>	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
<b>STEM LOOP</b>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACGTGATT

**Çizelge 3.7.** Real-Time qPCR için kullanılan reaksiyon bileşenleri

Master Mix Bileşenleri	Hacim
Solis Bıodyne Evagreen Supermix	2 µl
Forwad primer	0,2 µl
Universal primer	0,2 µl
cDNA örneği	2 µl
Nükleaz Free Water (Distile su)	5,6 µl
<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>

Referans gen olarak ise U6 kullanılmıştır. U6 için reaksiyon bileşenleri (master mix) ise Supermix 2 µl, Forwad primer 0,2 µl, Reverse primer 0,2 µl, Universal primer 2 µl, cDNA 2 µl ve dH<sub>2</sub>O'dan 5,4 µl olmak üzere 10 µl toplam hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. Master mix hazırlandıktan sonra RT-qPCR için gerekli reaksiyon koşullarına geçilmiştir. Reaksiyon için gerekli koşullar aşağıdaki Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.8.** Real-Time qPCR için gerekli reaksiyon koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre (sn / dk)	Döngü sayısı
<b>Ön denatürasyon</b>	95	12 dk	1
<b>Denatürasyon</b>	95	15 sn	40
<b>Bağlanma</b>	58	20-30 sn	40
<b>Uzama</b>	72	20-30n	40

#### 3.2.9.4. Real-Time PCR (RT-qPCR) analiz metodu

Gen ifadesi çalışmalarında Real-Time PCR gen anlatım seviyelerinin karşılaştırılması amacıyla kullanılan bir tekniktir. Genlerin normalizasyonu için U6 primeri kullanılmıştır. Real-Time PCR reaksiyon sonucunda elde edilen Ct değerleri ile katlanma değerleri ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) yöntemi ile hesaplanmıştır.

#### 3.2.10. İstatistiksel Analiz

Reaksiyon sonrası ile elde edilen verilerin analizi SPSS 26.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi aracılığıyla belirlenmiştir. Varyans analizi, çift yönlü Anova testi ile yapılmış,  $P < 0.05$  güven derecesinde Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir.



### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

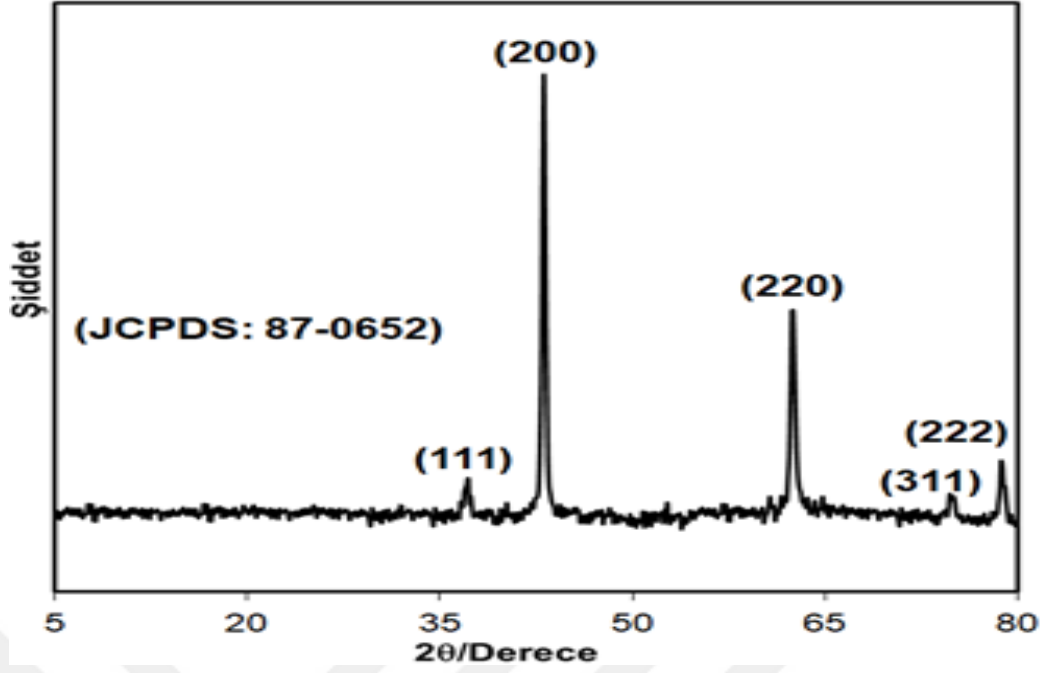
#### 4.1. MgO Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

##### 4.1.1. X-ışını kırınım analizi (XRD)

X-ışını kırınım spektrumu ile MgO nanoparçacıklarının yapısal analizi belirlenmiştir. Yeşil sentez olarak elde edilen MgO nanopartiküllerinin XRD spektrumu Şekil 4.1.'de, MgO nanoparçacıklarının XRD kırınımından elde edilen kristal boyutu ise Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Çizelgede ifade edilen  $2\theta = 36.631, 42.451, 61.841, 74.111$  ve  $78.041$  kırınım pikleri ile literatür uyumlu sonuç vermiş ve [111], [200], [220], [311] ve [222] düzlemleri ile ilişkilidir (Ashok et al. 2016). Piklerin d-aralığı değerlerinin (JCPDS verilerinden), ölçülen d-aralığı değerlerine (Bragg denkleminde) neredeyse eşit olduğu belirlenmiştir. Kristal yapının kafes parametreleri  $a=b=c= 0,4211$  nm'dir. Bunun yanında diğer safsızlıklara ait pik gözlenmemesi de sentezlenen MgO nanoparçacıklarının yüksek bir saflığa sahip olduğuna işaret etmektedir. Kırınım piklerinin keskin ve şiddetli olması MgO nanoparçacıklarının iyi kristalleştiğini göstermektedir. [111], [200], [220], [311] ve [222] örgü düzlemlerine karşılık gelen MgO nanoparçacıklarının tane boyutları Debye-Scherrer (4.1) formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (4.1)$$

Bu (4.1) eşitlikte K, 0.89'a eşit bir sabittir,  $\beta$ ,  $\theta$  açısındaki kırınım pikinin tam genişlikteki yarı maksimum yüksekliğidir ve  $\lambda$ , kullanılan X-ışınlarının dalga boyudur ( $1,54056 \text{ \AA}$ ). Kırınım piklerinden hesaplanan ortalama kristal boyutu 'D' 22,10 nm olarak hesaplanmıştır. XRD tekniği ile yapılan analiz sonucunda yeşil yöntemle sentezlenen magnezyum oksit nanoparçacıklara ait tüm kırınım standart verilerle (JCPDS pdf no: 87-0652) çok iyi bir uyumluluğa sahip olup, kübik bir kristal yapısındadır.



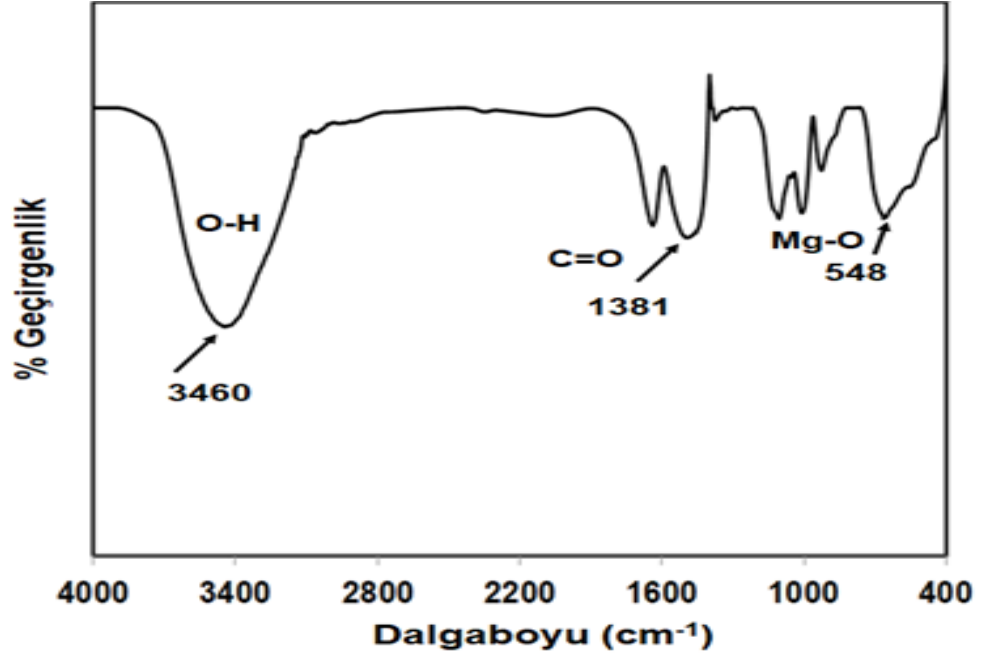
Şekil 4.1. Yeşil sentez MgO nanoparçacıklarının XRD spektrumu

Çizelge 4.1. MgO nanopartikülü XRD kırınımından elde edilen kristal boyut

	2θ (derece)	FWHM	Miller indeksi (hkl)	Tanecik boyutu (nm)
1	37,093	0,504	111	16,63
2	43,092	0,343	200	24,87
3	62,483	0,461	220	20,16
4	74,862	0,433	311	23,09
5	78,774	0,399	222	25,76

#### 4.1.2. FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) analizi

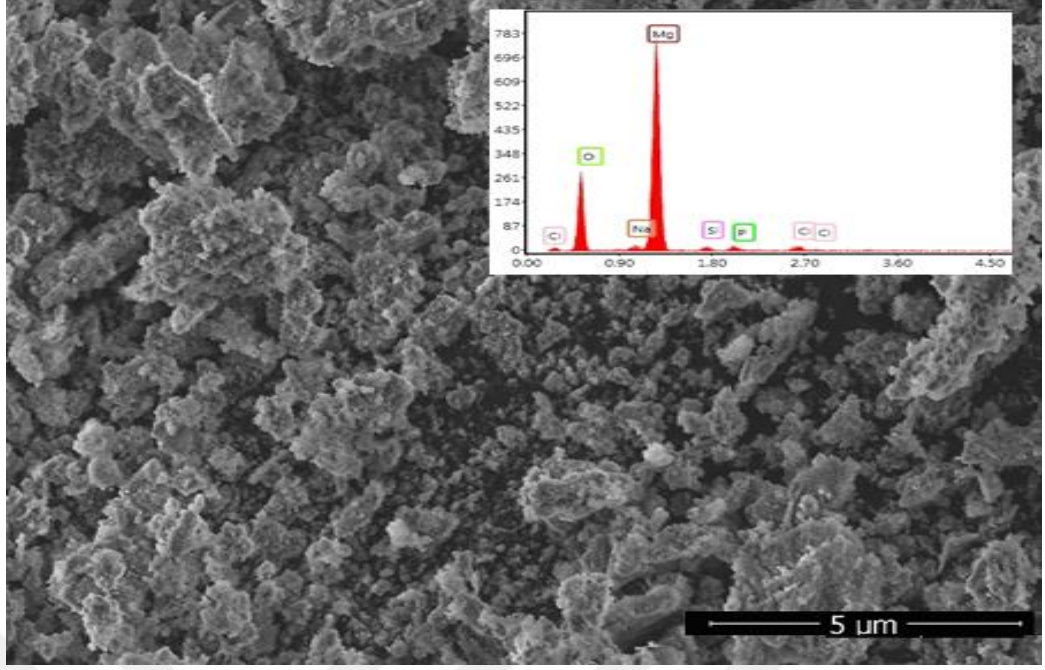
Yeşil sentez olarak elde edilen MgO nanoparçacıklarının FTIR spektrumu (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) Şekil 4.2’de verilmiştir. Spektruma bakıldığında 652 ve 836  $\text{cm}^{-1}$  frekanslardaki pikler MgO nanoparçacıklarının metal-oksijen bağı titreşim moduyla ilişkilidir (Ansari et al. 2018). İlgili bant 1.409  $\text{cm}^{-1}$  gözlenmiştir. 2.902 ile 2.977  $\text{cm}^{-1}$  bantlar C-H germe modları, 3.676  $\text{cm}^{-1}$  bant OH gruplarından ya da kusurlardan kaynaklanmaktadır.  $\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CO}_2$  bantlarının gözlemlenmesi ise magnezyum oksit in atmosferde  $\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{CO}_2$  moleküllerini absorbe etmesine atfedilir.



Şekil 4.2. Yeşil sentez MgO nanoparçacıklarının FTIR spektrumu

#### 4.1.3. SEM ve EDX analizi

Yeşil sentez MgO nanoparçacıklarının morfolojik görüntüsünü belirlemek adına 5 µm büyütme oranına sahip olan SEM görüntüsü Şekil 4.3.'te verilmiştir. Literatüre bakıldığında FESEM aracılığı ile MgO nanoparçacıklarının yüzey morfolojisinin görüntülediği bildirilmektedir. FESEM görüntüsüne bakıldığında nanopartikülün ortalama boyutunun 100 ile 120 nm aralığında olduğu görülmektedir. FESEM görüntüsü içerisinde EDX spektrumunda yer almaktadır. EDX grafiğine bakıldığında da Mg'nin O'ya stokiometrik oranının yaklaşık olarak 1 olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. Yeşil sentez MgO NPs'nin SEM görüntüsü ve EDX spektrumu

## 4.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

### 4.2.1. Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarının toplam çözünebilir şeker içeriği üzerine etkisi

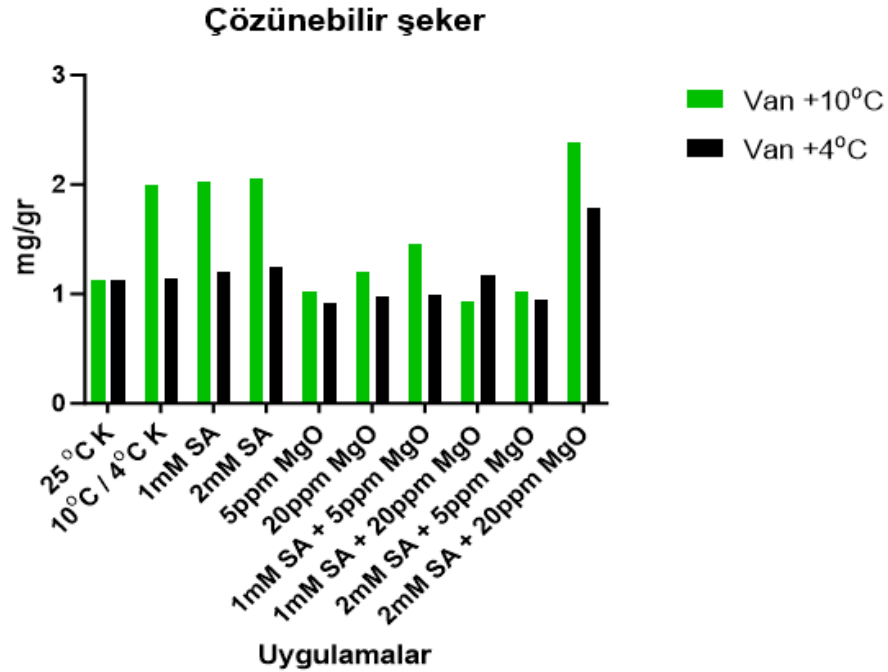
Van çeşidi için 10 °C ve 4 °C 14 günlük bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında çözünebilir şeker içeriği, 10 °C'de 0,891 ile 2,386 mg/gr arasında değişiklik gösterirken 4 °C'de 0,921 ile 1,781 mg/gr arasında değişiklik göstermiştir. 10 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması, 25 °C kontrole göre (%16), 4 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması 25 °C kontrole göre ise (%49) artış göstermiştir. Soğuk kontrollerle karşılaştırıldıklarında yüksek konsantrasyonlu 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması 10 °C'de (%168) (2,3867 mg/gr), 4 °C'de ise (%56) (1,7813 mg/gr) çözünebilir şeker içeriğini artırarak en olumlu sonucu vermiştir. Aynı şekilde 1 ve 2 mM SA uygulamaları 10 °C tek başına soğuk kontrolü ile karşılaştırıldığında sırasıyla (%127-%130) (2,0217-2,0533 mg/gr) artış gösterirken, 4 °C tek başına soğuk kontroller ile karşılaştırıldıklarında sırasıyla (%5-%8) (1,1973-1,2493 mg/gr) artış göstererek çözünebilir şeker içeriğini artırmışlardır. 4 °C'deki uygulamaların tek başına soğuk kontrole göre çözünebilir şeker içerikleri değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.4.).

**Çizelge 4.2.** Van çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin çözünebilir şeker içeriği üzerine etkisi.

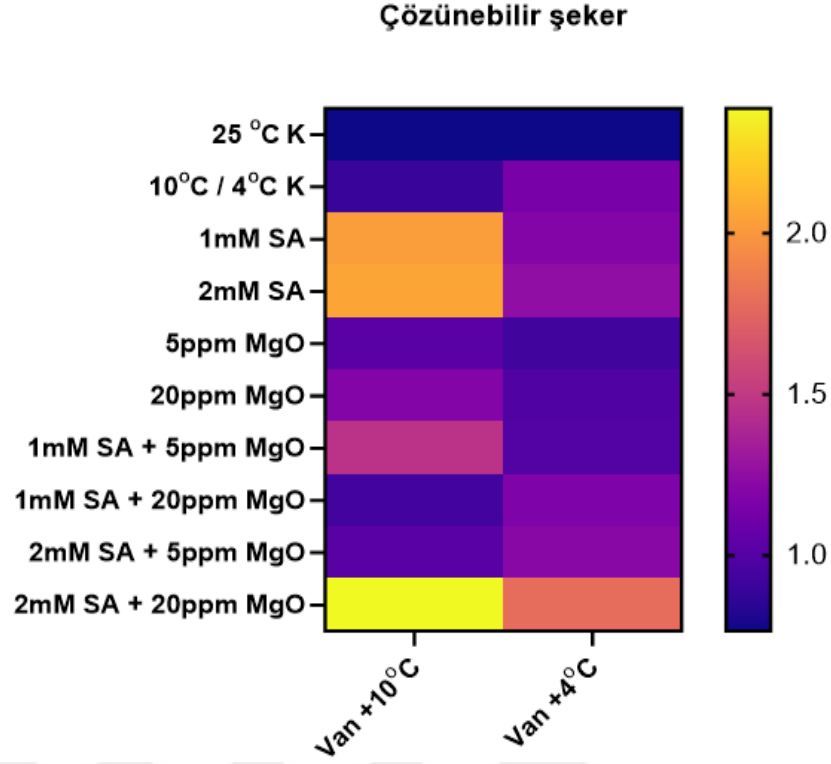
Van	Çözünebilir şeker içeriği (mg/gr)		
	25 °C	10 °C	4 °C
<i>Kontrol</i>	0,7657±0,07401 <sup>e</sup>	0,8913±0,10104 <sup>de</sup>	1,1420±0,10905 <sup>bed</sup>
<i>1 mM SA</i>		2,0217±0,2965 <sup>b</sup>	1,1973±0,22251 <sup>b</sup>
<i>2 mM SA</i>		2,0533±0,1041 <sup>ab</sup>	1,2493±0,18480 <sup>b</sup>
<i>5 ppm MgO</i>		1,0177±0,27674 <sup>de</sup>	0,9217±0,10232 <sup>d</sup>
<i>20 ppm MgO</i>		1,1963±0,28914 <sup>cd</sup>	0,9820±0,06657 <sup>d</sup>
<i>1 mM SA + 5 ppm MgO</i>		1,4620±0,19991 <sup>c</sup>	0,9923±0,03213 <sup>cd</sup>
<i>1 mM SA + 20 ppm MgO</i>		0,9277±0,24244 <sup>de</sup>	1,1667±0,07759 <sup>bc</sup>
<i>2 mM SA + 5 ppm MgO</i>		1,0190±0,09305 <sup>de</sup>	1,2163±0,03436 <sup>b</sup>
<i>2 mM SA + 20 ppm MgO</i>		2,3867±0,16563 <sup>a</sup>	1,7813±0,03493 <sup>a</sup>

\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü



**Şekil 4.4.** Van (*Medicago sativa* L.) çeşidi toplam çözünebilir şeker içeriği



**Şekil 4.5.** Van (*Medicago sativa* L.) çeşidi çözünebilir şeker içeriği ısı haritası

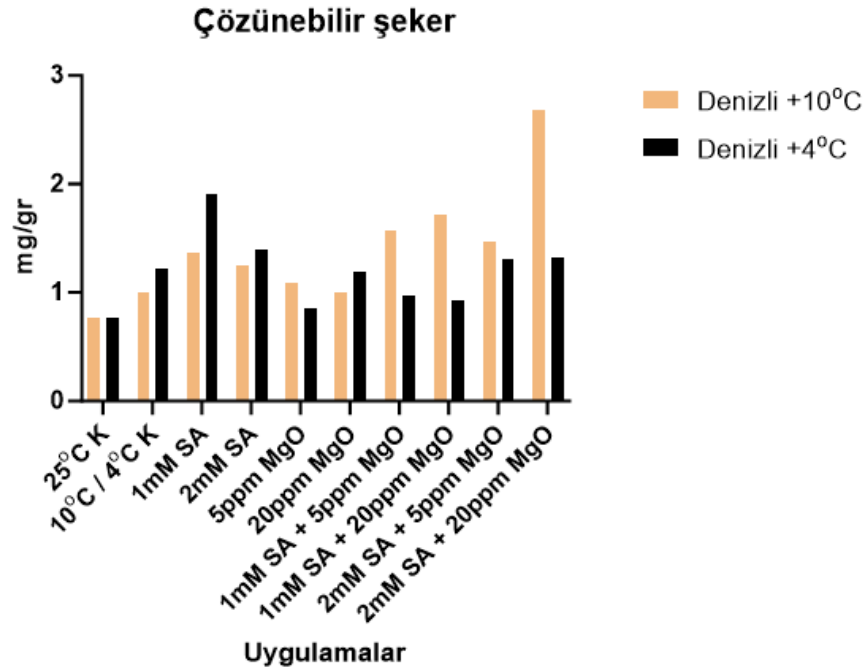
Denizli çeşidi için 10 °C ve 4 °C 14 günlük bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında çözünebilir şeker içeriği, 10 °C’de 0,995 ile 2,680 mg/gr arasında değişiklik gösterirken 4 °C’de 0,855 ile 1,901 mg/gr arasında değişiklik göstermiştir. 10 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması, 25 °C kontrole göre (%31), 4 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması 25 °C kontrole göre ise (%59) artış göstermiştir. 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması 10 °C soğuk kontrol ile karşılaştırıldığında (%169) ile en yüksek artış göstermiştir (2,6803mg/gr). 1 ve 2 mM SA uygulamaları soğuk kontroller (10 °C ve 4 °C) ile karşılaştırıldıklarında 10 °C’de sırasıyla (%36-%26) (1,3580-1,2550 mg/gr) artış 4 °C’de 2 mM SA uygulaması tek başına soğuk kontrole göre (%14), (1,3880 mg/gr) ve 1 mM SA uygulaması ise (%57) ile en yüksek artış değeri göstererek çözünebilir şeker içeriğini artırmıştır. 4 °C’deki uygulamaların tek başına soğuk kontrole göre çözünebilir şeker içerikleri değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.6.).

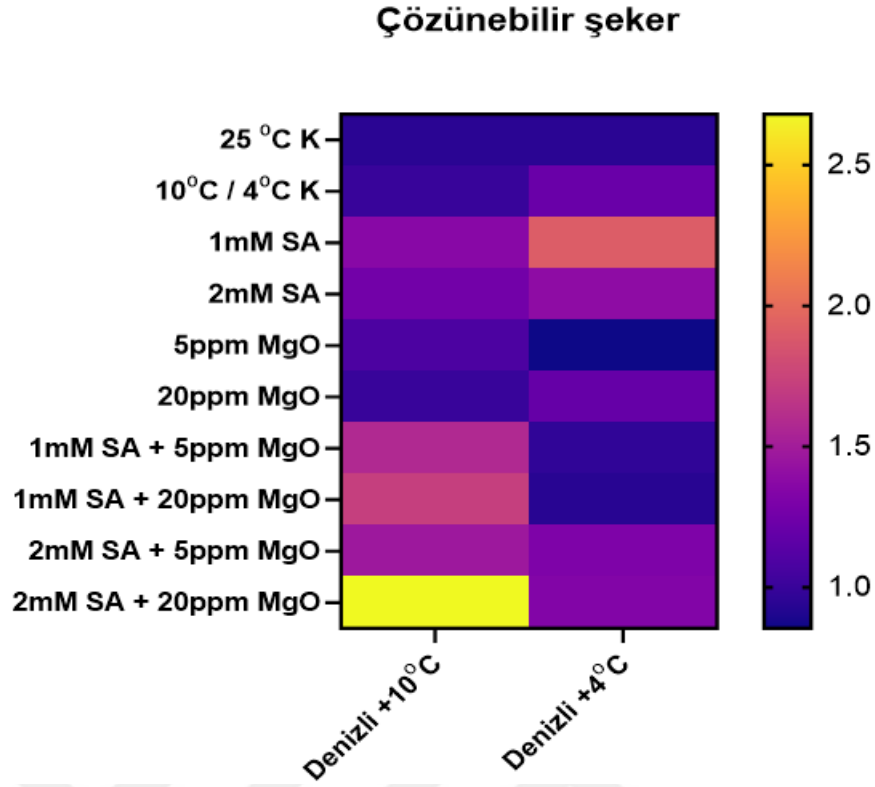
**Çizelge 4.3.** Denizli çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin çözünebilir şeker içeriği üzerine etkisi.

Denizli	Çözünebilir şeker içeriği (mg/gr)		
	25 °C	10 °C	4 °C
Kontrol	0,7617±0,10494 <sup>ed</sup>	0,9950±0,29762 <sup>de</sup>	1,2127±0,01501 <sup>bc</sup>
1 mM SA		1,3580±0,11107 <sup>bcd</sup>	1,9013±0,01450 <sup>a</sup>
2 mM SA		1,2550±0,15099 <sup>cde</sup>	1,3880±0,21670 <sup>b</sup>
5 ppm MgO		1,0837±0,07617 <sup>de</sup>	0,8550±0,16001 <sup>d</sup>
20 ppm MgO		0,9963±0,14492 <sup>de</sup>	1,1930±0,09881 <sup>bc</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO		1,5753±0,27693 <sup>bc</sup>	0,9647±0,10659 <sup>cd</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO		1,7157±0,09609 <sup>b</sup>	0,9330±0,01709 <sup>cd</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO		1,4700±0,13359 <sup>bc</sup>	1,3077±0,31755 <sup>b</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO		2,6803±0,10825 <sup>a</sup>	1,3293±0,02043 <sup>b</sup>

\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü

**Şekil 4.6.** Denizli (*Medicago sativa* L.) çeşidi toplam çözünebilir şeker içeriği



**Şekil 4.7.** Denizli (*Medicago sativa* L.) çeşidi çözünebilir şeker içeriği ısı haritası

#### 4.2.2. Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi

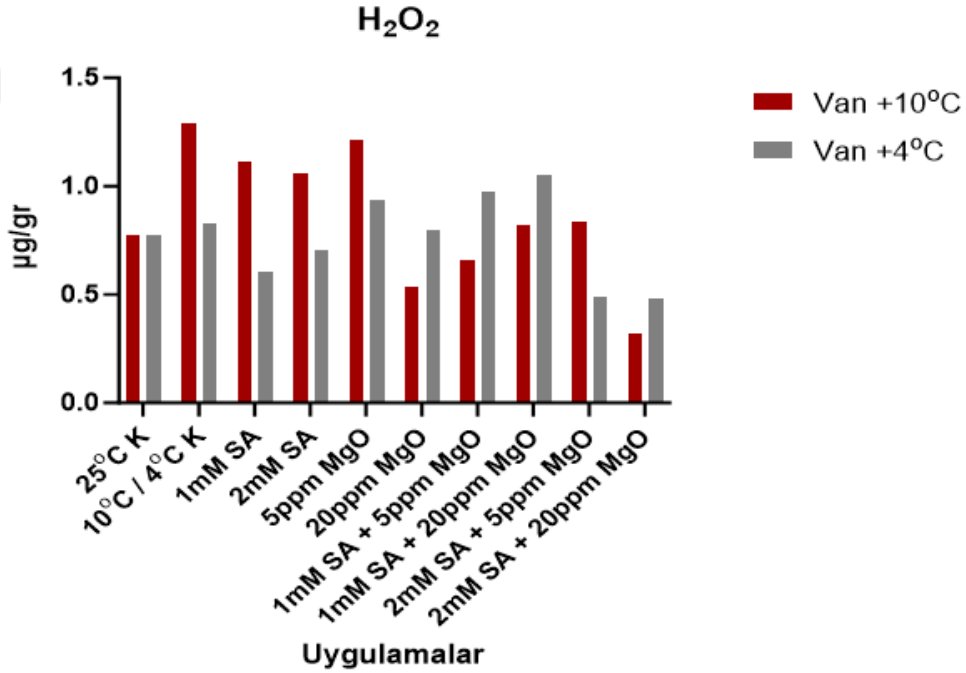
Van çeşidi için 10 °C ve 4 °C 14 günlük bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği, 10 °C'de 0,319 ile 1,291 µg/gr arasında değişiklik gösterirken 4 °C'de 0,482 ile 1,054 µg/g arasında değişiklik göstermiştir. Her iki sıcaklıktaki uygulamalar tek başına soğuk kontrol uygulamaları ile karşılaştırıldıklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği 4 °C için 1 mM SA+5 ppm MgO ile 1 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamaları dışında genel olarak azalmıştır (0,9737-1,0547 µg/gr). 10 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması, 25 °C kontrole göre (%66), 4 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması 25 °C kontrole göre ise (%7) artış göstermiştir. Soğuk kontrollerle karşılaştırıldıklarında 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması 10 °C'de (%75), 4 °C'de ise (%42) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini azaltarak en iyi sonucu vermiştir (0,319-0,482 µg/gr) (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.8.).

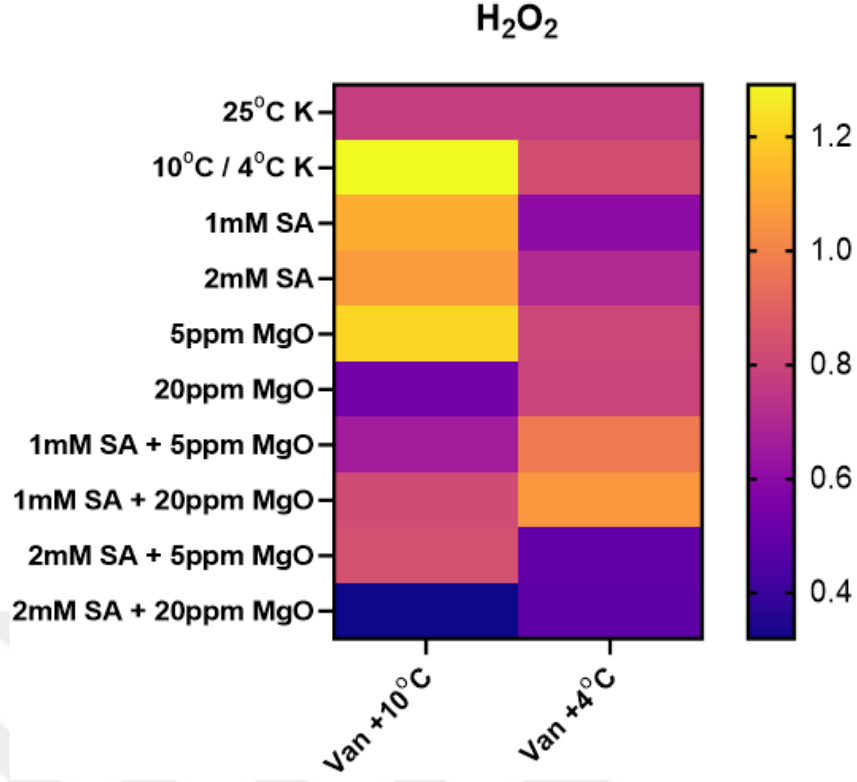
**Çizelge 4.4.** Van çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi.

Van	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> analizi (µg/gr)		
	25 °C	10 °C	4 °C
Kontrol	0,7757±0,09587 <sup>c</sup>	1,2913±0,4020 <sup>a</sup>	0,8317±0,14000 <sup>bc</sup>
1 mM SA		1,1153±0,10584 <sup>ab</sup>	0,6040±0,06894 <sup>de</sup>
2 mM SA		1,0633±0,6113 <sup>b</sup>	0,7057±0,16122 <sup>cd</sup>
5 ppm MgO		1,2113±0,09128 <sup>ab</sup>	0,8020±0,06400 <sup>c</sup>
20 ppm MgO		0,5343±0,02574 <sup>e</sup>	0,7987±0,08985 <sup>cd</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO		0,6553±0,03931 <sup>d</sup>	0,9737±0,02108 <sup>ab</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO		0,8203±0,02470 <sup>c</sup>	1,0547±0,07267 <sup>a</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO		0,8377±0,05729 <sup>c</sup>	0,4887±0,10887 <sup>e</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO		0,3193±0,01986 <sup>f</sup>	0,4827±0,16170 <sup>e</sup>

\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü

**Şekil 4.8.** Van (*Medicago sativa* L.) çeşidi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği



**Şekil 4.9.** Van (*Medicago sativa* L.) çeşidi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği ısı haritası

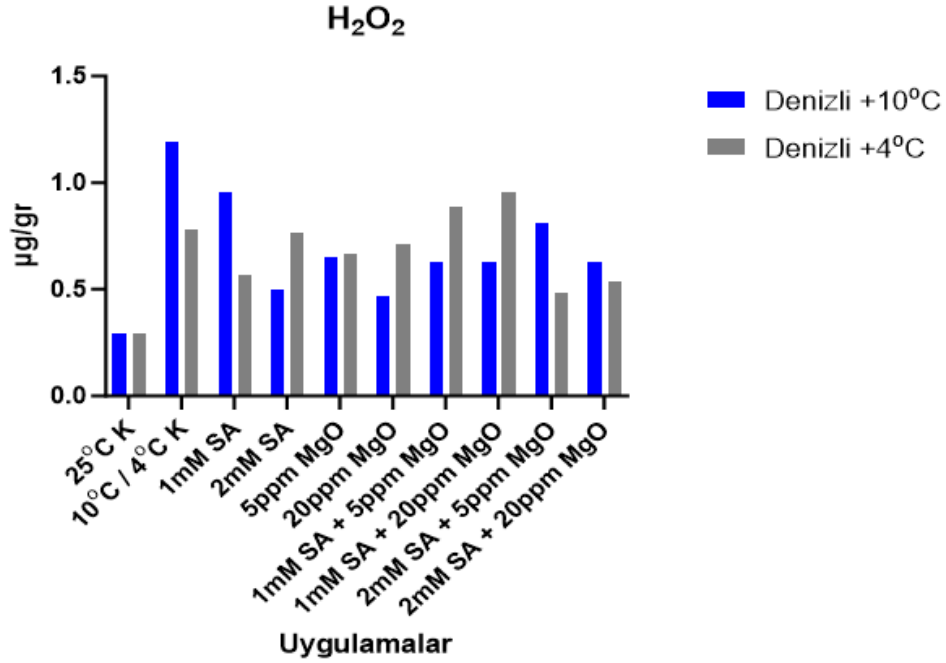
Denizli çeşidi için 10 °C ve 4 °C 14 günlük bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği, 10 °C'de 0,469 ile 1,191 µg/gr arasında değişiklik gösterirken 4 °C'de 0,486 ile 0,955 µg/g arasında değişiklik göstermiştir. Her iki sıcaklıktaki uygulamalar tek başına soğuk kontrol uygulamaları ile karşılaştırıldıklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği 4 °C için 1 mM SA+5 ppm MgO ile 1 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamaları dışında genel olarak azalmıştır. (0,8850-0,9550 µg/gr) 10 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması, 25 °C kontrole göre (%308), 4 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması 25 °C kontrole göre ise (%168) artış göstermiştir. Soğuk kontrollerle karşılaştırıldıklarında 20 ppm MgO nanopartikül uygulaması 10 °C'de (%61) (0,4690 µg/gr) ve 4 °C'de 2 mM SA+5 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması ise (%38)(0,4867 µg/gr) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini azaltarak en iyi sonucu vermiştir (Çizelge 4.5. ve Şekil 4.10.).

**Çizelge 4.5.** Denizli çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği üzerine etkisi.

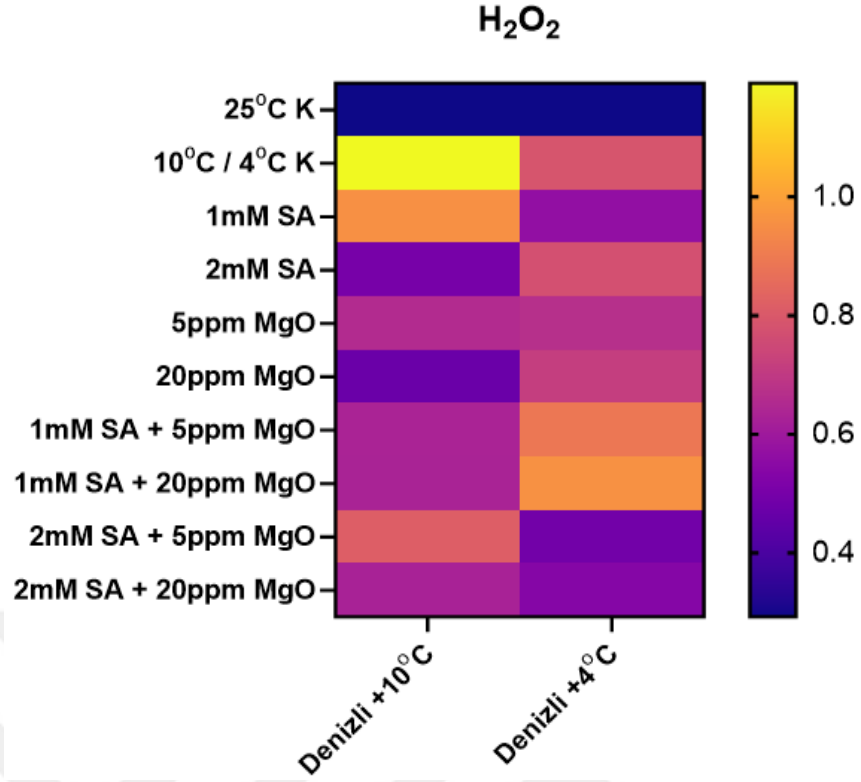
Denizli	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> analizi (µg/gr)		
	25 °C	10 °C	4 °C
Kontrol	0,2920 ±0,01778 <sup>gf</sup>	1,1910±0,03812 <sup>a</sup>	0,7830±0,03764 <sup>bc</sup>
1 mM SA		0,9547±0,08759 <sup>b</sup>	0,5640±0,06636 <sup>de</sup>
2 mM SA		0,4993±0,15000 <sup>ef</sup>	0,7687±0,09610 <sup>bc</sup>
5 ppm MgO		0,6547±0,04008 <sup>d</sup>	0,6687±0,38420 <sup>cd</sup>
20 ppm MgO		0,4690±0,09418 <sup>f</sup>	0,7140±0,78080 <sup>c</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO		0,6293±0,07666 <sup>de</sup>	0,8850±0,00700 <sup>ab</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO		0,6280±0,03005 <sup>de</sup>	0,9550±0,06465 <sup>a</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO		0,8120±0,05709 <sup>c</sup>	0,4867±0,13055 <sup>e</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO		0,6267±0,05840 <sup>de</sup>	0,5330±0,08728 <sup>e</sup>

\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü



**Şekil 4.10.** Denizli (*Medicago sativa* L.) çeşidi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği



**Şekil 4.11.** Denizli (*Medicago sativa* L.) çeşidi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği ısı haritası

#### 4.2.3. Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarının MDA içeriği üzerine etkisi

Van çeşidi için 10 °C ve 4 °C 14 günlük bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında MDA içeriği, 10 °C’de 0,408 ile 1,126 nmol/ml arasında değişiklik gösterirken 4 °C’de 0,552 ile 0,903 nmol/ml arasında değişiklik göstermiştir. Her iki sıcaklıktaki uygulamalar tek başına soğuk kontrol uygulamaları ile karşılaştırıldıklarında MDA konsantrasyonu 10 °C için 1 mM SA+5 ppm MgO, 1 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül (1,1266-0,9589 nmol/ml) birleşim uygulamaları ile 4 °C 1 mM SA+5 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması dışında genel olarak azalmıştır. (0,9030 nmol/ml) 10 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması, 25 °C kontrole göre (%48), 4 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması 25 °C kontrole göre ise (%32) artış göstermiştir. Soğuk kontroller ile karşılaştırıldıklarında 2 mM SA+5 ppm MgO ve 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamaları 10 °C’de sırasıyla (%53-%50) (0,4085-0,4367 nmol/ml), 4 °C’de ise 1 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül uygulaması (%29) (0,5526 nmol/ml) MDA içeriğini azaltarak en iyi sonucu vermiştir (Çizelge 4.6. ve Şekil 4.12.).

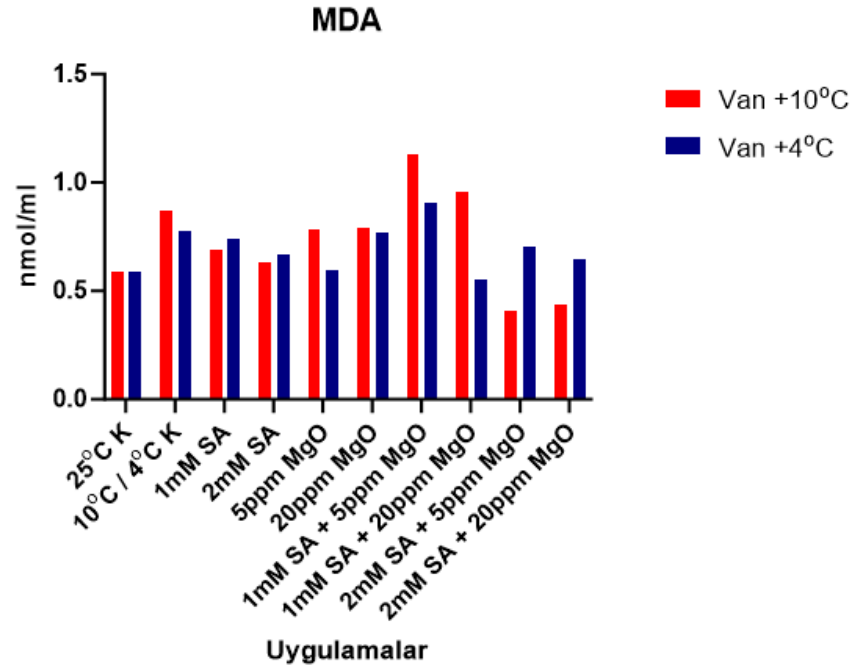
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

**Çizelge 4.6.** Van çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin malondialdehit (MDA) analizi.

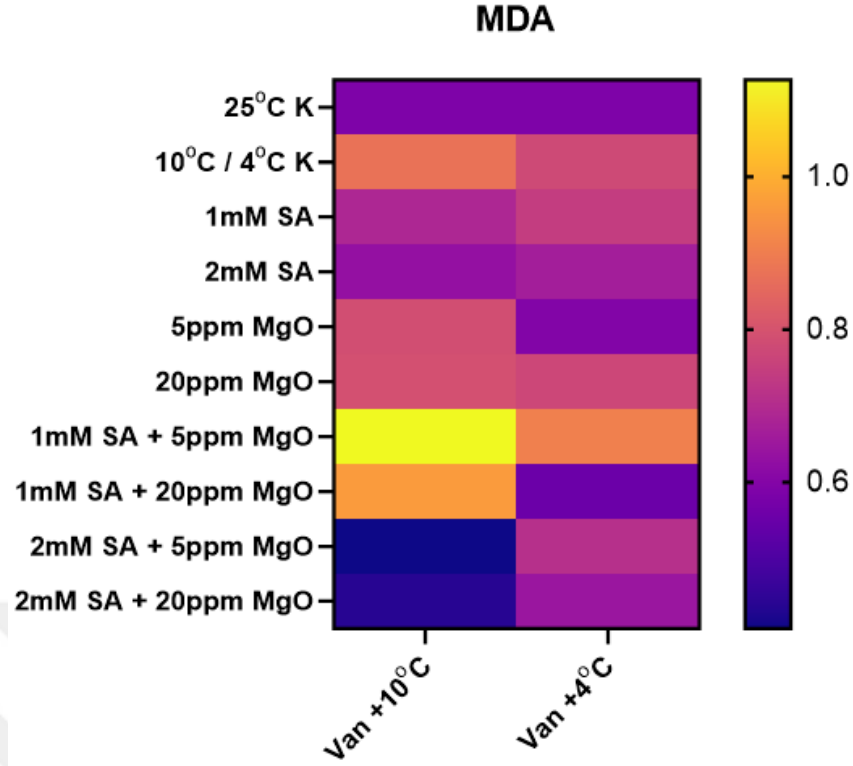
Van	MDA analizi (nmol/ml)		
	25 °C	10 °C	4 °C
Kontrol	0,5867±0,03297 <sup>cd</sup>	0,8709±0,17881 <sup>abc</sup>	0,7740±0,01117 <sup>b</sup>
1 mM SA		0,6867±0,17616 <sup>bcd</sup>	0,7433±0,0572 <sup>bed</sup>
2 mM SA		0,6309±0,33198 <sup>cd</sup>	0,6644±0,02234 <sup>cde</sup>
5 ppm MgO		0,7858±0,17731 <sup>bc</sup>	0,5956±0,00372 <sup>ef</sup>
20 ppm MgO		0,7900±0,13000 <sup>bc</sup>	0,7676±0,03923 <sup>bc</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO		1,1266±0,01343 <sup>a</sup>	0,9030±0,02811 <sup>a</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO		0,9589±0,00745 <sup>ab</sup>	0,5526±0,00372 <sup>f</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO		0,4085±0,01343 <sup>d</sup>	0,7073±0,13427 <sup>bed</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO		0,4367±0,20526 <sup>d</sup>	0,6429±0,07448 <sup>def</sup>

\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü



**Şekil 4.12.** Van (*Medicago sativa* L.) çeşidi MDA içeriği



**Şekil 4.13.** Van (*Medicago sativa* L.) çeşidi MDA içeriği ısı haritası

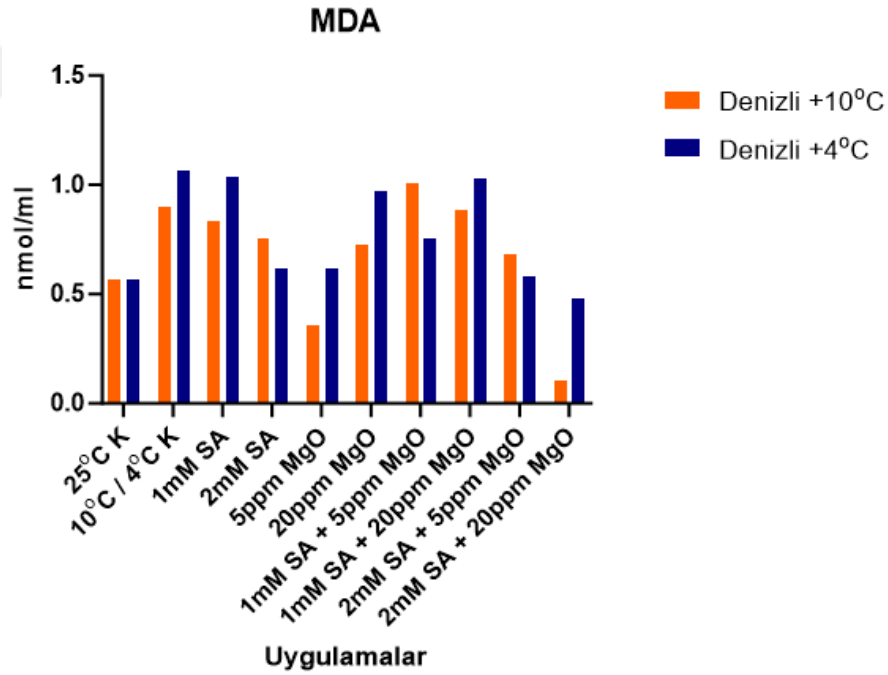
Denizli çeşidi için 10 °C ve 4 °C 14 günlük bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında MDA içeriği, 10 °C’de 0,106 ile 1,010 nmol/ml arasında değişiklik gösterirken 4 °C’de 0,483 ile 1,063 nmol/ml arasında değişiklik göstermiştir. Her iki sıcaklıktaki uygulamalar tek başına soğuk kontrol uygulamaları ile karşılaştırıldıklarında MDA konsantrasyonu 10 °C için 1 mM SA+5 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması dışında genel olarak azalış göstermiştir. 10 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması, 25 °C kontrole göre (%59), 4 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması 25 °C kontrole göre ise (%87) artış göstermiştir. Soğuk kontrollerle karşılaştırıldıklarında 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması 10 °C’de sırasıyla (%88) (0,106 nmol/ml) 4 °C’de ise 2 mM SA+5 ppm MgO uygulaması (%55) (0,4837 nmol/ml) MDA içeriğini azaltarak en iyi sonucu vermiştir (Çizelge 4.7. ve Şekil 4.14.).

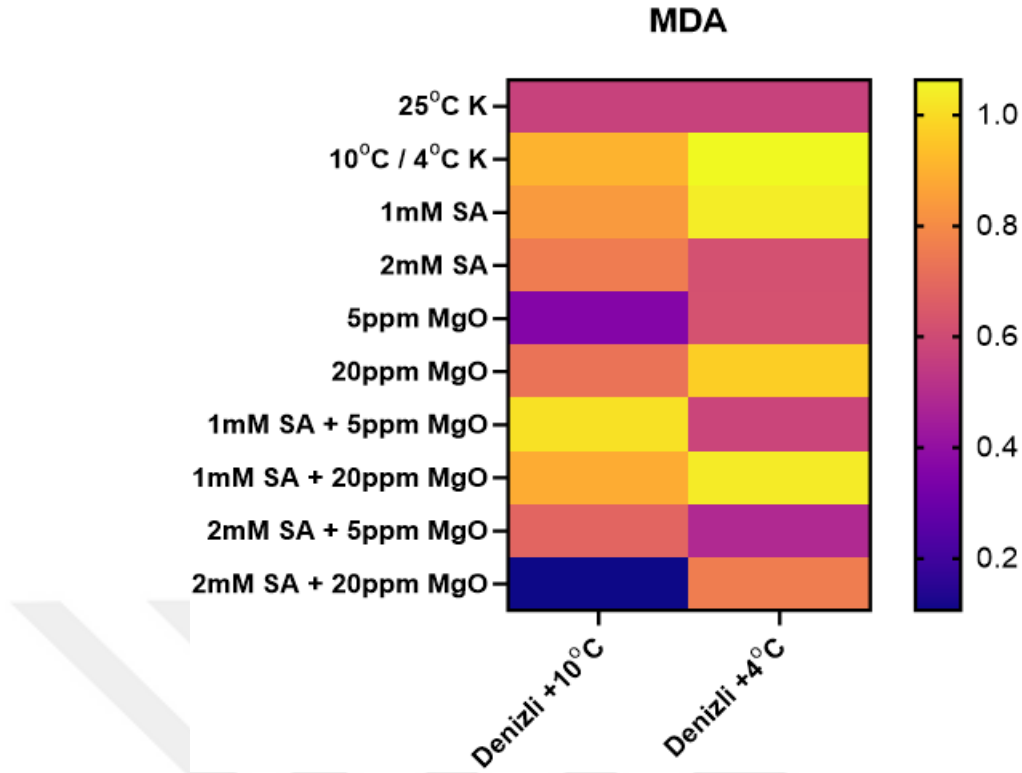
**Çizelge 4.7.** Denizli çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin malondialdehit (MDA) analizi.

Denizli	MDA analizi (nmol/ml)		
	25 °C	10 °C	4 °C
Kontrol	0,5677 ±0,01739 <sup>ec</sup>	0,9020±0,01311 <sup>b</sup>	1,0633±0,10786 <sup>a</sup>
1 mM SA		0,8367±0,03556 <sup>b</sup>	1,0357±0,18827 <sup>a</sup>
2 mM SA		0,7550±0,01300 <sup>c</sup>	0,6160±0,27913 <sup>c</sup>
5 ppm MgO		0,3580±0,01000 <sup>f</sup>	0,6170±0,07351 <sup>c</sup>
20 ppm MgO		0,7267±0,05814 <sup>cd</sup>	0,9678±0,12312 <sup>ab</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO		1,0107±0,05372 <sup>a</sup>	0,7567±0,01986 <sup>bc</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO		0,8857±0,06461 <sup>b</sup>	1,0320±0,27520 <sup>a</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO		0,6837±0,04835 <sup>d</sup>	0,5784±0,45710 <sup>c</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO		0,1063±0,00351 <sup>g</sup>	0,4837±0,00065 <sup>c</sup>

\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü

**Şekil 4.14.** Denizli (*Medicago sativa* L.) çeşidi MDA içeriği



**Şekil 4.15.** Denizli (*Medicago sativa* L.) çeşidi MDA içeriği ısı haritası

#### 4.2.4. Soğuk, SA ve MgO NPs uygulamalarının prolin içeriği üzerine etkisi

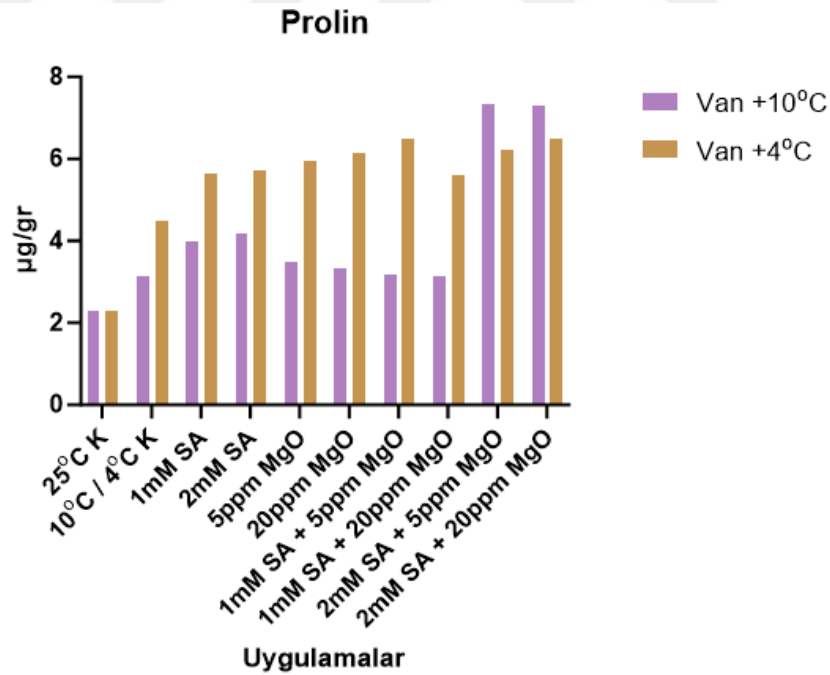
Van çeşidi için 10 °C ve 4 °C 14 günlük bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında prolin içeriği, 10 °C'de 3,131 ile 7,333 µg/gr arasında değişiklik gösterirken 4 °C'de 4,471 ile 6,500 µg/gr arasında değişiklik göstermiştir. Her iki sıcaklıktaki uygulamalar tek başına soğuk kontrol uygulamaları ile karşılaştırıldıklarında prolin konsantrasyonu genel olarak artış göstermiştir. 10 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması, 25 °C kontrole göre (%37), 4 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması 25 °C kontrole göre ise (%94) artış göstermiştir. Soğuk kontrollerle karşılaştırıldıklarında 2 mM SA+5 ppm MgO ile 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması 10 °C'de sırasıyla (%133-%132) (7,333-7,300 µg/gr), 4 °C'de ise 1 mM SA+5 ppm MgO ve 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamaları (%45) (6,500 µg/gr) prolin konsantrasyonunu artırarak en iyi sonucu vermiştir (Çizelge 4.8. ve Şekil 4.16.).

**Çizelge 4.8.** Van çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin prolin miktar analizi.

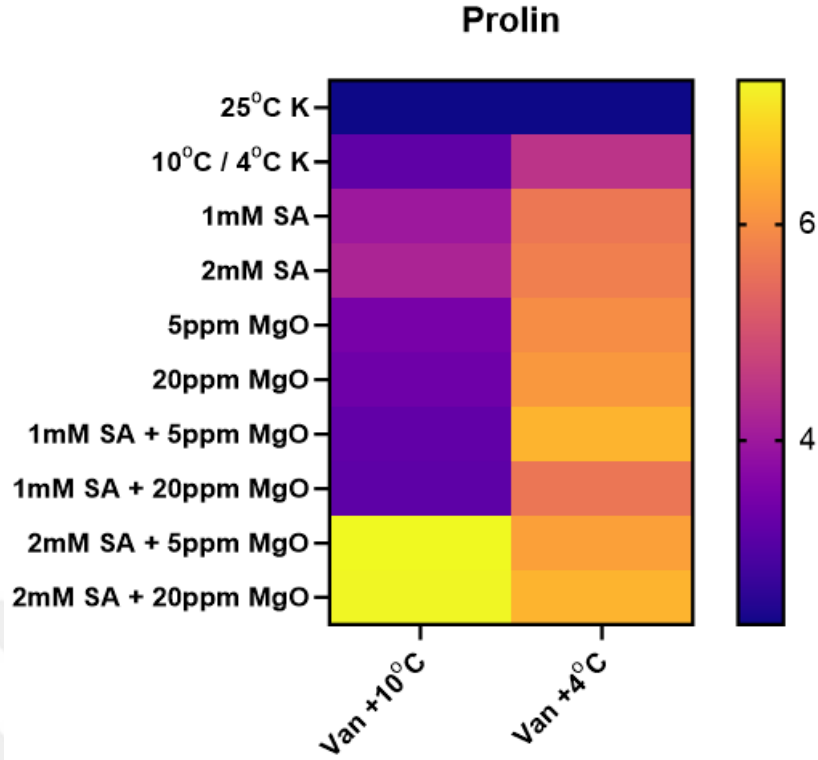
Van	Prolin miktar analizi (µg/gr)		
	25 °C	10 °C	4 °C
Kontrol	2,2942±0,09144 <sup>ed</sup>	3,1466±0,21494 <sup>d</sup>	4,4713±0,25272 <sup>c</sup>
1 mM SA		3,9863±0,13132 <sup>bc</sup>	5,6333±0,25166 <sup>b</sup>
2 mM SA		4,1939±0,23198 <sup>b</sup>	5,7333±0,15275 <sup>b</sup>
5 ppm MgO		3,4671±0,34959 <sup>cd</sup>	5,9533±0,11547 <sup>ab</sup>
20 ppm MgO		3,3343±0,67002 <sup>d</sup>	6,1200±0,8718 <sup>ab</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO		3,1728±0,13800 <sup>d</sup>	6,5000±0,60828 <sup>a</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO		3,1313±0,38051 <sup>d</sup>	5,6000±0,62450 <sup>b</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO		7,3333±0,20817 <sup>a</sup>	6,2333±0,35119 <sup>ab</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO		7,3000±0,55678 <sup>a</sup>	6,5000±0,45826 <sup>a</sup>

\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü



**Şekil 4.16.** Van (*Medicago sativa* L.) çeşidi prolin içeriği



**Şekil 4.17.** Van (*Medicago sativa* L.) çeşidi prolin içeriği ısı haritası

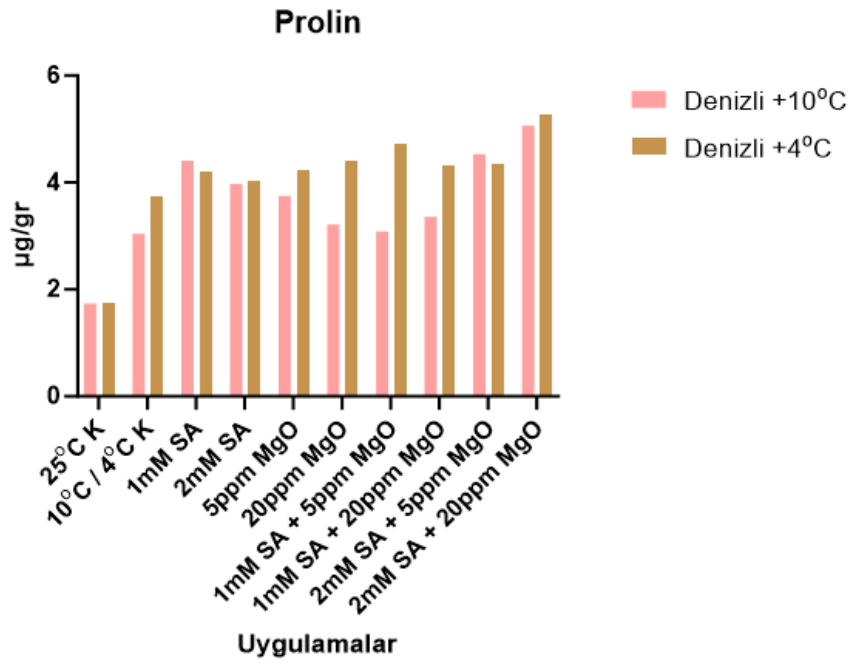
Denizli çeşidi için 10 °C ve 4 °C 14 günlük bitki yapraklarından elde edilen sonuçlara bakıldığında prolin içeriği, 10 °C’de 3,040 ile 5,065 µg/gr arasında değişiklik gösterirken 4 °C’de 3,751 ile 5,260 µg/gr arasında değişiklik göstermiştir. Her iki sıcaklıktaki uygulamalar tek başına soğuk kontrol uygulamaları ile karşılaştırıldıklarında prolin konsantrasyonu genel olarak artış göstermiştir. 10 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması, 25 °C kontrole göre (%75), 4 °C tek başına soğuk kontrol uygulaması 25 °C kontrole göre ise (%116) artış göstermiştir. Soğuk kontrollerle karşılaştırıldıklarında 1 mM SA ve 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması 10 °C’de sırasıyla (%45-%67) (4,407-5,065 µg/gr), 4 °C’de ise 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması (%40) (5,260 µg/gr) prolin konsantrasyonunu artırarak en iyi sonucu vermiştir (Çizelge 4.9. ve Şekil 4.18).

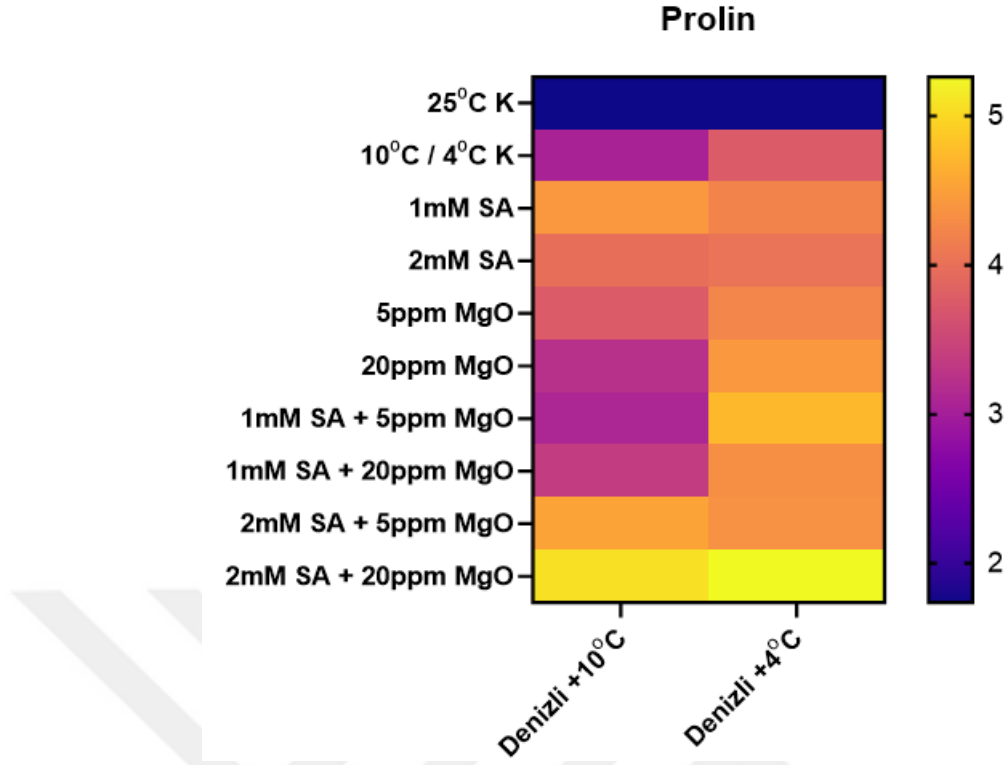
**Çizelge 4.9.** Denizli çeşidine uygulanan soğuk, salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin prolin miktar analizi.

Denizli	Prolin miktar analizi ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ )		
	25 °C	10 °C	4 °C
Kontrol	1,7371 $\pm$ 0,09140 <sup>f</sup>	3,0400 $\pm$ 0,33287 <sup>e</sup>	3,7514 $\pm$ 0,12493 <sup>e</sup>
1 mM SA		4,4078 $\pm$ 0,42549 <sup>b</sup>	4,2097 $\pm$ 0,50000 <sup>cd</sup>
2 mM SA		3,9733 $\pm$ 0,12662 <sup>c</sup>	4,0305 $\pm$ 0,14556 <sup>d</sup>
5 ppm MgO		3,7511 $\pm$ 0,14658 <sup>cd</sup>	4,2295 $\pm$ 0,12117 <sup>cd</sup>
20 ppm MgO		3,2166 $\pm$ 0,12459 <sup>e</sup>	4,4071 $\pm$ 0,10683 <sup>c</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO		3,0862 $\pm$ 0,19567 <sup>e</sup>	4,7142 $\pm$ 0,24757 <sup>b</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO		3,3588 $\pm$ 0,37436 <sup>de</sup>	4,3194 $\pm$ 0,32762 <sup>cd</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO		4,5275 $\pm$ 0,17014 <sup>b</sup>	4,3481 $\pm$ 0,98590 <sup>cd</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO		5,0652 $\pm$ 0,16100 <sup>a</sup>	5,2605 $\pm$ 0,34450 <sup>a</sup>

\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar  $P < 0.05$  önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü

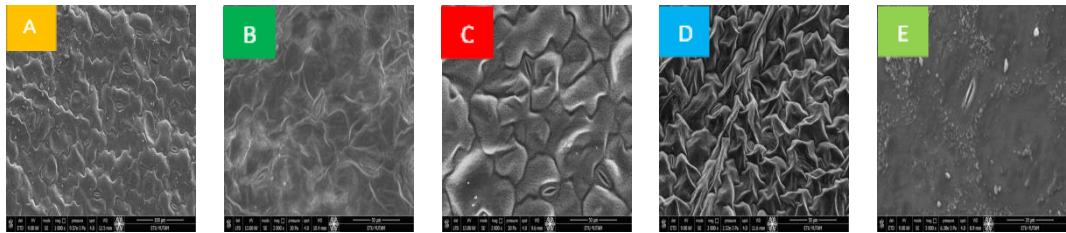
**Şekil 4.18.** Denizli (*Medicago sativa* L.) çeşidi prolin içeriği



**Şekil 4.19.** Denizli (*Medicago sativa* L.) çeşidi prolin içeriği ısı haritası

### 4.3. SEM Analizi

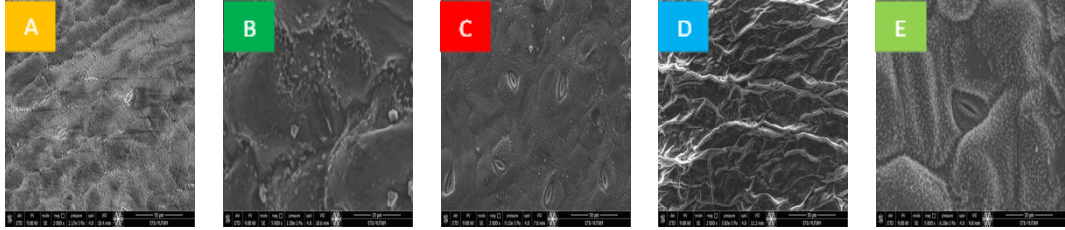
*In vitro* şartlarda soğuk stresi (10 °C ve 4 °C) altında Van/Denizli yonca çeşitlerine salisilik asit, MgO nanopartikül ve birleşim uygulamaları sonucunda yaprak dokularında SEM görüntüleri alınarak analiz değerlendirilmesi yapılmıştır. Van çeşidi SEM görüntülerine bakıldığında, 25 °C ve 10 °C kontrolde fibril yapılar gözlenirken, 2 mM SA uygulamasında küresel yapılar yoğunluk kazanmış ve stoma açıklıkları belirgin hale gelmiştir. 5 ppm MgO nanopartikül uygulamasında membranimsı yapılar gözlenirken 2 mM SA+5 ppm MgO birleşim uygulamasında çok ince lifsi yapılar görülmüştür (Şekil 4.20.).



**Şekil 4.20.** Van çeşidi 10 °C SEM görüntüleri A: 25 °C Kontrol B: 10 °C Kontrol C: 2 mM SA D:5 ppm MgO NPs E: 2 mM SA+5 ppm MgO NPs.

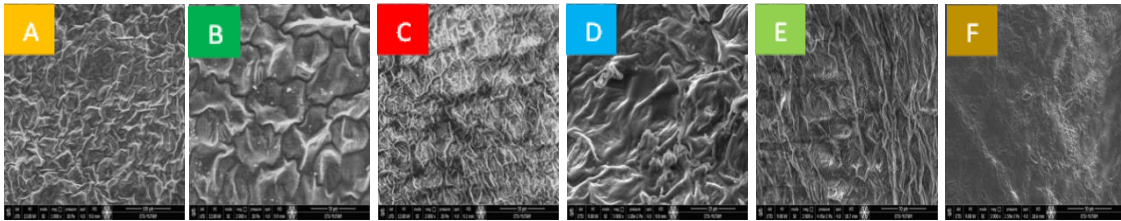
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Denizli çeşidi SEM görüntülerine bakıldığında, 25 °C ve 10 °C kontrolde ipliksi yapılar gözlenirken, 2 mM SA uygulamasında membransı yapılar üzerinde stoma açıklıkları belirgin hale gelmiştir. 5 ppm MgO nanopartikül uygulamasında lifsi yapılar gözlenirken 2 mM SA+5 ppm MgO birleşim uygulamasında ise yoğun küresel yapılar görülmüştür (Şekil 4.21.).



**Şekil 4.21.** Denizli çeşidi 10 °C SEM görüntüleri A: 25 °C Kontrol B: 10 °C Kontrol C: 2 mM SA D: 5 ppm MgO NPs E: 2 mM SA+5 ppm MgO NPs.

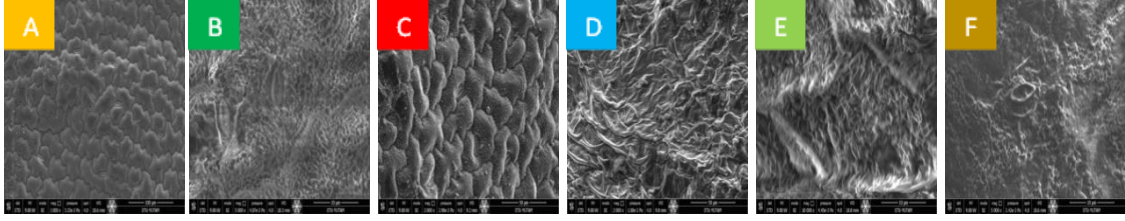
Van çeşidi SEM görüntülerine bakıldığında, 4 °C kontrolde fibril yapılar gözlenirken, 1 mM SA uygulamasında küresel yapılar oluşmuştur. 2 mM SA uygulamasında lifsi yapılar gözlenmiş, 20 ppm MgO nanopartikül uygulamasında yoğun membranimsı yapılar görülmüştür. 1 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamasında yoğun kompakt lifsi yapılar ve 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamasında küçük stoma açıklıkları oluşmuştur (Şekil 4.22.).



**Şekil 4.22.** Van çeşidi 4 °C SEM görüntüleri A: 4 °C Kontrol B: 1mM SA C: 2 mM SA D: 20 ppm MgO NPs E: 1 mM SA+20 ppm MgO NPs F: 2 mM SA+20 ppm MgO NPs.

Denizli çeşidi SEM görüntülerine bakıldığında, 4 °C kontrolde ardışık küresel yapılar gözlenirken, 1 mM SA uygulamasında membranimsı yapılar üzerinde stoma açıklıkları oluşmuştur. 2 mM SA uygulamasında kontrol uygulamasındaki küresel yapılarla benzer fakat daha geniş ardışık küresel yapılar gözlenmiş olup, 20 ppm MgO nanopartikül uygulamasında yoğun membranimsı yapılar oluşmuştur. 1 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamasında membranimsı yapılar daha kompakt

hale dönüşmüştür. 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamasında ise az miktarda stoma açıklıkları oluşmuştur (Şekil 4.23.).



**Şekil 4.23.** Denizli çeşidi 4 °C SEM görüntüleri A: 4 °C Kontrol B: 1mM SA C: 2 mM SA D: 20 ppm MgO NPs E: 1 mM SA+20 ppm MgO NPs F: 2 mM SA+20 ppm MgO NPs.

#### 4.4. Moleküler analizler ile mtr-miR156a ve ath-miR173-5p gen anlatım seviyelerinin değerlendirilmesi

##### 4.4.1. Total RNA izolasyonu sonuçları

Van ve Denizli çeşitlerine ait yaprak örneklerinden RNA izolasyonu işlemi belirli protokole göre yapılmış ve izole edilen RNA'ların konsantrasyonları aşağıdaki Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Van ve Denizli çeşitlerinden izole edilen RNA konsantrasyonları

Van	RNA Konsantrasyonları (ng/µl)		
	25 °C	10 °C	4 °C
Kontrol	1320	1300	1090
1 mM SA		685	1460
2 mM SA		1470	1570
5 ppm MgO		1050	870
20 ppm MgO		1200	1051
1 mM SA + 5 ppm MgO		1180	941
1 mM SA + 20 ppm MgO		1170	1110
2 mM SA + 5 ppm MgO		1120	1420
2 mM SA + 20 ppm MgO		1480	569

<i>Denizli</i>	<i>RNA Konsantrasyonları (ng/μl)</i>		
	<b>25 °C</b>	<b>10 °C</b>	<b>4 °C</b>
<i>Kontrol</i>	1550	1790	1400
<i>1 mM SA</i>		931	1360
<i>2 mM SA</i>		1270	1250
<i>5 ppm MgO</i>		1020	1450
<i>20 ppm MgO</i>		1210	1510
<i>1 mM SA + 5 ppm MgO</i>		1120	329
<i>1 mM SA + 20 ppm MgO</i>		1250	1160
<i>2 mM SA + 5 ppm MgO</i>		1120	2200
<i>2 mM SA + 20 ppm MgO</i>		1840	2540

\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü

#### 4.4.2. Real-Time PCR (qRT-PCR) Gen İfadesi Analiz Sonuçları

Real-time PCR, reaksiyon sırasında PCR siklüsündeki her bir ürünün verdiği yeterli miktarda ki floresans ışığa göre çalışan ve reaksiyon sonunda oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir. Amplifikasyona bağlı DNA artışı, floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Burada çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans ışığa veren ve en fazla tercih edilen boyalardan SYBR kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan 2 farklı miRNA (mtr-miR156a ve ath-miR173-5p) ile kontrol olarak normalizasyon için kullanılan U6'ya ait cDNA ürünleri ters transkriptaz enzimi ve spesifik primerler kullanılarak elde edilmiştir. Gen ifadesindeki değişikliklerin tespitinde verilerin doğru bir şekilde analiz edilebilmesi için denklemler ve varsayımların test edilmesi gerekir. Cycle threshold ( $C_t$ ), kantitatif PCR reaksiyonlarında floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gereken eşik değerini (minimum değeri) geçtiği döngü sayısı olarak ifade edilmektedir. Tez çalışmamızda da  $C_t$  değerleri 3 biyolojik tekrar sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları hesaplanmış ve bu değerler ile hedef genin endojen bir referans gen ile normalizasyonu sonucu kontrole göre gen ifadesindeki kat değişimi ( $F_c$ ) sunulmuştur.

##### 4.4.2.1. Van ve Denizli çeşitlerine ait yaprak örneklerindeki mtr-miR156a gen seviyesindeki kat değişimi

Van ve Denizli çeşitleri her iki soğuk stresi ve uygulamalarında farklı sonuçlar göstermiştir. Van ve Denizli çeşitlerinin 10 °C ve 4 °C tek başına soğuk kontrolleri kendi grupları içerisindeki 25 °C kontrol ile karşılaştırıldıklarında gen anlatım seviyesinde Van 10 °C soğuk kontrolünde (%58) azalma ve 4 °C soğuk kontrolünde (%78) artış olurken, Denizli 10 °C ve 4 °C soğuk kontrollerinde sırasıyla (%76-%92) ile mtr-miR156a gen anlatım seviyesinde azalma gerçekleşmiştir. Kat değişimleri sırasıyla (0,424-1,775-0,245-0,076). Van 10 °C soğuk içerisindeki uygulamalar tek başına soğuk kontrolü ile karşılaştırıldıklarında mtr-miR156a gen anlatım seviyesinin genel olarak artış gösterdiği ve 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamasında (%307) ile en yüksek kat artışının olduğu görülmektedir (1,783). Van 4 °C soğuk içerisindeki uygulamalar tek başına soğuk kontrolü ile karşılaştırıldıklarında 5 ppm MgO NPs ve 1 mM SA+5 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamaları sırasıyla (%14-%58) ve (1,526-0,753) kat değişimleriyle gen anlatım seviyesini azaltmış diğer uygulamalar ise mtr-miR156a gen anlatım seviyesini genel olarak yukarı doğru artırmıştır. En güçlü artışı (5,375) kat değişimi ile 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması (%203) göstermiştir. Denizli 10 °C soğuk içerisindeki uygulamalar tek başına soğuk kontrolü ile karşılaştırıldıklarında genel olarak artış göstermiştir ve 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması (6,330) en güçlü kat artışı ile mtr-miR156a gen anlatım seviyesini artırmıştır. Denizli 4 °C soğuk içerisindeki uygulamalar soğuk kontrolü ile karşılaştırıldıklarında genel olarak yukarı doğru artış gösterdikleri ve 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamasının (3,521) kat değişimi ile en yüksek artışı göstererek mtr-miR156a gen anlatım seviyesini artırmıştır (Çizelge 4.11. ve Şekil 4.24.).

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

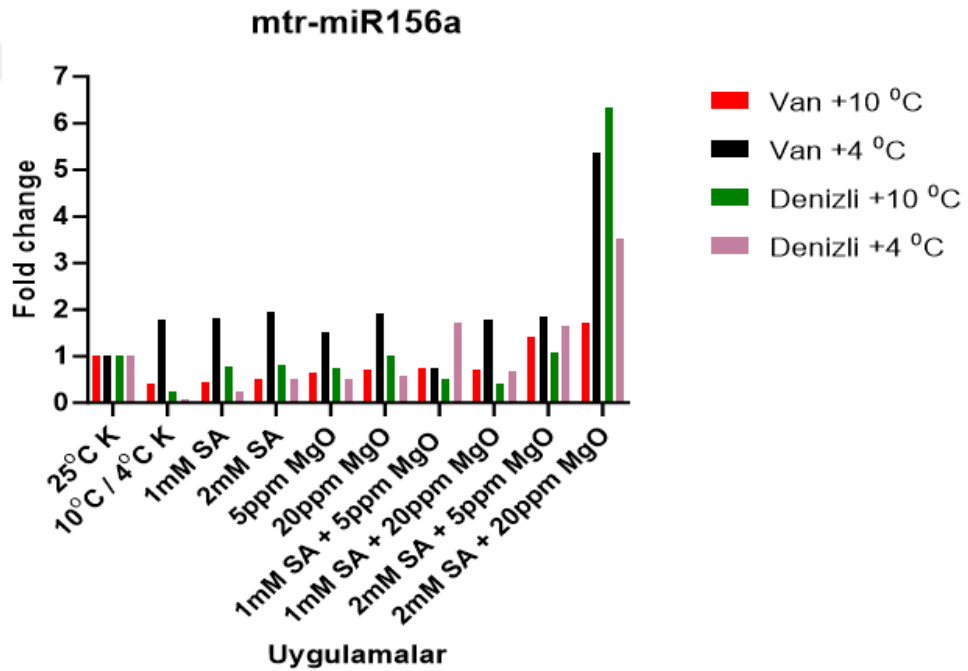
**Çizelge 4.11.**  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile elde edilen mtr-miR156a gen seviyesindeki kat değişimi.

Uygulama	mtr-miR156a			
	Van 10 °C	Van 4 °C	Denizli 10 °C	Denizli 4 °C
Soğuk K	0,424±0,070 <sup>f</sup>	1,775±0,198 <sup>bc</sup>	0,245±0,045 <sup>f</sup>	0,076±0,015 <sup>g</sup>
1 mM SA	0,446±0,066 <sup>f</sup>	1,810±0,202 <sup>bc</sup>	0,776±0,055 <sup>d</sup>	0,230±0,060 <sup>f</sup>
2 mM SA	0,515±0,072 <sup>ef</sup>	1,940±0,081 <sup>b</sup>	0,810±0,043 <sup>d</sup>	0,497±0,060 <sup>e</sup>
5 ppm MgO	0,643±0,041 <sup>de</sup>	1,526±0,100 <sup>c</sup>	0,733±0,020 <sup>d</sup>	0,508±0,020 <sup>e</sup>
20 ppm MgO	0,716±0,040 <sup>d</sup>	1,910±0,113 <sup>b</sup>	1,003±0,110 <sup>c</sup>	0,576±0,110 <sup>de</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO	0,756±0,061 <sup>d</sup>	0,753±0,077 <sup>d</sup>	0,512±0,045 <sup>e</sup>	1,721±0,066 <sup>c</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO	0,723±0,025 <sup>d</sup>	1,790±0,081 <sup>bc</sup>	0,416±0,025 <sup>ef</sup>	0,678±0,045 <sup>d</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO	1,409±0,052 <sup>c</sup>	1,853±0,072 <sup>b</sup>	1,086±0,119 <sup>c</sup>	1,654±0,122 <sup>c</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO	1,723±0,158 <sup>b</sup>	5,375±0,341 <sup>a</sup>	6,330±0,293 <sup>a</sup>	3,521±0,035 <sup>a</sup>

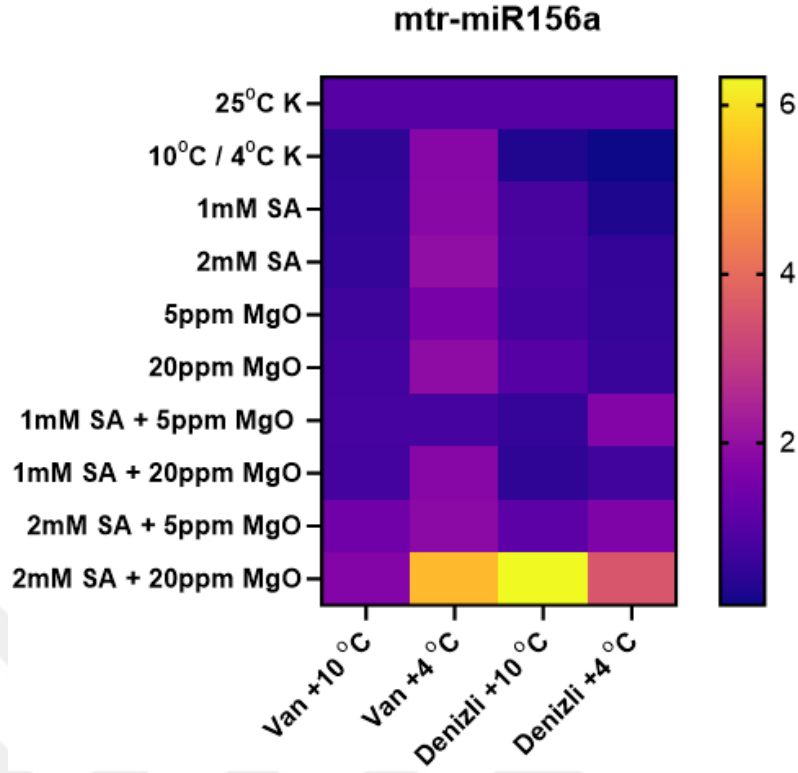
\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar  $P < 0.05$  önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü

\*\*\*25°C kontrol 1 olarak kabul edildiği için tabloda yer almamaktadır.



**Şekil 4.24.** Van/Denizli çeşitlerine ait mtr-miR156a gen seviyesindeki değişiklikler



**Şekil 4.25.** Van/Denizli çeşitlerinin mtr-miR156a gen anlatım seviyelerinin ısı haritası

#### 4.4.2.2. Van ve Denizli çeşitlerine ait yaprak örneklerindeki ath-miR173-5p gen seviyesindeki kat değişimi

Van ve Denizli çeşitleri her iki soğuk stresi ve uygulamalarında farklı sonuçlar göstermiştir. Van ve Denizli çeşitlerinin 10 °C ve 4 °C tek başına soğuk kontrolleri kendi grupları içerisindeki 25 °C kontrol ile karşılaştırıldıklarında gen anlatım seviyesinde Van 10 °C soğuk kontrolünde (%51) artış, 4 °C soğuk kontrolünde (%18) azalma olurken, Denizli 10 °C ve 4 °C soğuk kontrollerinde sırasıyla (%251-%313) ile ath-miR173-5p gen anlatım seviyesinde artış gerçekleşmiştir. Kat değişimleri sırasıyla (1,506-0,821-3,508-4,130). Van 10 °C soğuk içerisindeki uygulamalar tek başına soğuk kontrolü ile karşılaştırıldıklarında genel olarak uygulamaların gen anlatım seviyelerinde aşağı doğru azalma olmuştur. En düşük azalma (%82) ve (0,273) kat değişimi ile 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamasında gerçekleşmiştir. Van 4 °C soğuk içerisindeki uygulamalar tek başına soğuk kontrolü ile karşılaştırıldıklarında 1 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulaması (%186) ve (2,345) kat artışı dışında genel olarak uygulamaların ath-miR173-5p gen anlatım seviyeleri azalmıştır. En düşük anlatım seviyesindeki azalma (%25) ve (0,616) kat değişimi ile 1 mM SA+5 ppm

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

MgO nanopartikül birleşim uygulamasında olmuştur. Denizli 10 °C soğuk içerisindeki uygulamalar tek başına soğuk kontrolü ile karşılaştırıldıklarında ath-miR173-5p gen seviyesinde genel olarak azalma olmuştur. En düşük ekspresyon seviyesindeki azalma 2 mM SA+20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamasında (%91) ve (0,316) kat değişimi ile gerçekleşmiştir. Denizli 4 °C soğuk içerisindeki uygulamalar tek başına soğuk kontrolü ile karşılaştırıldıklarında ath-miR173-5p gen anlatım seviyesinde genel olarak azalma olmuştur. En düşük gen anlatım seviyesindeki azalma 1 mM SA uygulamasında (%85) ve (0,601) kat değişimi ile gerçekleşmiştir (Çizelge 4.12. ve Şekil 4.26.).

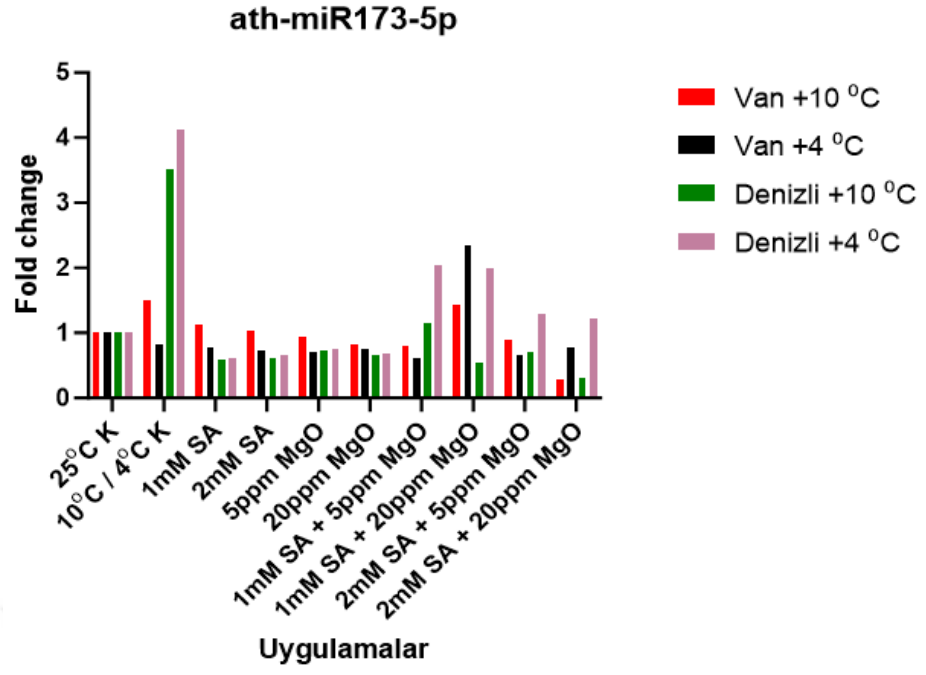
**Çizelge 4.12.**  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile elde edilen ath-miR173-5p gen seviyesindeki kat değişimi.

Uygulama	ath-miR173-5p			
	Van 10 °C	Van 4 °C	Denizli 10 °C	Denizli 4 °C
Soğuk K	1,506±0,038 <sup>a</sup>	0,821±0,0175 <sup>b</sup>	3,508±0,103 <sup>a</sup>	4,130±0,055 <sup>a</sup>
1 mM SA	1,116±0,087 <sup>b</sup>	0,782±0,015 <sup>bc</sup>	0,590±0,020 <sup>de</sup>	0,601±0,085 <sup>e</sup>
2 mM SA	1,023±0,035 <sup>c</sup>	0,726±0,030 <sup>de</sup>	0,616±0,032 <sup>de</sup>	0,648±0,017 <sup>de</sup>
5 ppm MgO	0,933±0,030 <sup>cd</sup>	0,703±0,015 <sup>ef</sup>	0,723±0,020 <sup>c</sup>	0,746±0,040 <sup>d</sup>
20 ppm MgO	0,826±0,032 <sup>e</sup>	0,744±0,037 <sup>cde</sup>	0,663±0,015 <sup>cd</sup>	0,688±0,028 <sup>de</sup>
1 mM SA + 5 ppm MgO	0,803±0,025 <sup>e</sup>	0,616±0,035 <sup>f</sup>	1,156±0,061 <sup>b</sup>	2,043±0,145 <sup>b</sup>
1 mM SA + 20 ppm MgO	1,440±0,098 <sup>a</sup>	2,345±0,404 <sup>a</sup>	0,548±0,023 <sup>e</sup>	1,981±0,020 <sup>b</sup>
2 mM SA + 5 ppm MgO	0,893±0,040 <sup>de</sup>	0,659±0,009 <sup>f</sup>	0,696±0,020 <sup>c</sup>	1,293±0,085 <sup>c</sup>
2 mM SA + 20 ppm MgO	0,273±0,045 <sup>f</sup>	0,778±0,005 <sup>cd</sup>	0,316±0,035 <sup>f</sup>	1,226±0,040 <sup>c</sup>

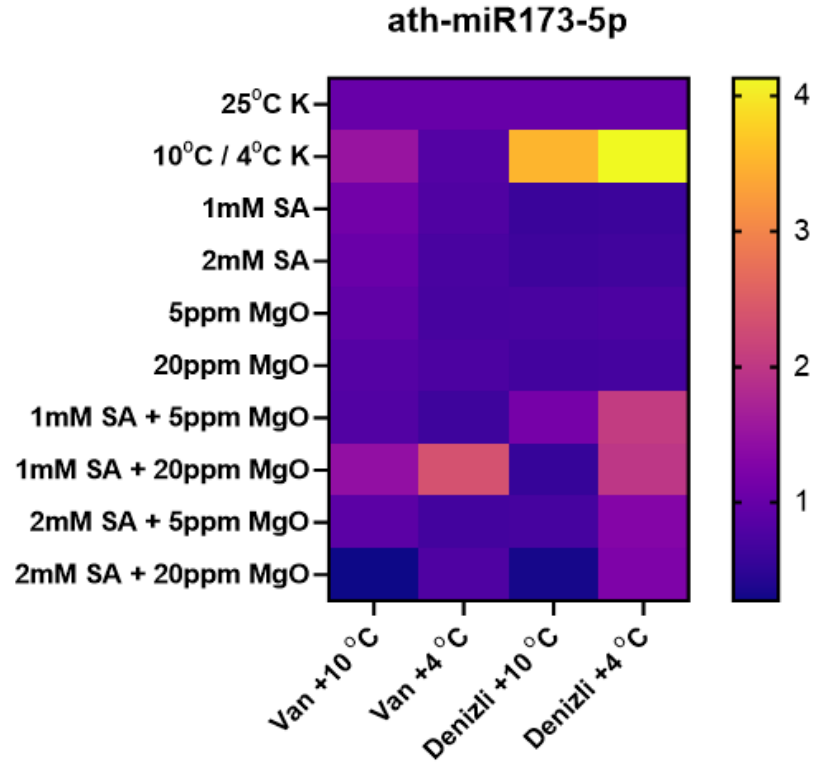
\*Bir sütun içinde farklı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamlıdır.

\*\*SA: Salisilik asit, MgO NPs: Magnezyum oksit nanopartikülü

\*\*\*25°C kontrol 1 olarak kabul edildiği için tabloda yer almamaktadır.



Şekil 4.26. Van/Denizli çeşitlerine ait ath-miR173-5p gen seviyesindeki değişiklikler



Şekil 4.27. Van/Denizli çeşitlerinin ath-miR173-5p gen anlatım seviyelerinin ısı haritası

Bitkiler, abiyotik faktörler içerisinde yer alan soğuk stresinin neden olduğu zararlı etkilere karşı koymak ve soğuk iklimasyonunu sağlamak için bünyelerinde çeşitli osmoprotektanlar biriktirirler. Bunlar; betain, prolin ve çözünebilir karbonhidratlar olup birbirlerinin yerine geçebilen osmolitlerdir. Konsantrasyonları yüksek olsada osmolitler bitkiye zarar vermez ve toksik etki göstermezler. Bitkilerdeki dış görünüşteki değişimler genellikle karbonhidrat ve protein değişimleri ile yorumlanmaktadır. Bu yüzden şeker içerikleri bitkilerin büyüme ve gelişmesinde önemli bir indikatör olarak düşünülmektedir. Uzun süreli soğuk stresine maruz kalan bitkiler soğuk stresine karşı tolerans oluşturabilmek için suda çözünebilir karbonhidratların içeriğini artırmaktadır. Bu karbonhidratlar; glukoz, fruktoz, sükroz, trehaloz ve rafinozdur. Nişasta içeriği ise azalmaktadır. Karbonhidrat miktarının artması hücre içi donma noktasının daha düşük seviyelere inmesini böylelikle soğuğa toleransın artmasını sağlayabilir. Karbonhidratlar osmoprotektan özellik göstermelerinin yanı sıra proteinlerin etrafında bulunan suyu koruma, enerji kaynağı olma, hücreler arasında buz oluşumunu engelleme gibi etkileri ile bitkilerin soğuğa tolerans kazanmasına yardımcı olmaktadır (Smirnoff 1995). Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde çözünebilir karbonhidrat içeriğinin arttığını gösteren çok sayıda çalışma söz konusudur. Javadien et al. (2009) buğday bitkisini (*Triticum aestivum* L.) 4 °C soğuk stresine maruz bırakmış ve karbonhidrat birikiminde önemli derecede artış olduğunu bildirmişlerdir. Vágújfalvi et al. (1999) soğuk stresi altında buğday yapraklarında toplam karbonhidrat, glikoz, fruktoz, sakkaroz ve frukton içeriğini araştırmış ve toplam suda çözünen karbonhidrat ve toplam fruktan içeriğinin, soğuk uygulama sırasında tüm genotiplerde sürekli olarak arttığını bildirmişlerdir. Sharma et al. (2022) MgO nanopartikülünün siyah nohut üzerindeki etkisini araştırmışlar ve MgO nanopartikülünün siyah nohut bitkisinin kök ve sürgünlerinde karbonhidrat içeriğini artırdığını bildirmişlerdir. Hajihashemi et al. (2018) şifalı bitkinin (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 9 çeşidiyle soğuk stresinde yapmış oldukları çalışmada tüm çeşitlerin suda çözünebilir karbonhidrat içeriklerinin düşük sıcaklıklarda arttığını bildirmişlerdir. Mevcut tez çalışmasındaki sonuçlar literatür çalışmalarını destekler niteliktedir.

Bu tez çalışmasında, toplam çözünebilir şeker içeriği her iki çeşidin 10 ve 4 °C tek başına soğuk stresi kontrolleri, 25 °C kontrolüne göre artış göstermiştir. Çözünebilir şeker içeriğindeki bu artış bitkinin soğuğa karşı adapte olabilmesi ile ilgili yakından

ilişkili olup, bozulan hücre içi osmotik dengenin düzenlemesine atfedilebilir. Aynı şekilde hem Van hem de Denizli çeşidi için 10 ve 4 °C'deki sıcaklık ve uygulamaları dikkate alındığında toplam çözünebilir şeker içeriğinin salisilik asit (SA) ve Magnezyum oksit nanopartikül (MgO) birleşimi olan yüksek konsantrasyonlu uygulamalarında daha fazla arttığı ve daha anlamlı hale geldiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2, 4.3. ve Şekil 4.4, 4.6.).

Abiyotik faktörler, bitkilerin yaşamsal faaliyetlerini yavaşlatarak su alımını azaltmaktadır. Bu durum stomaların kapanmasına neden olur ve bitkinin karbondioksit (CO<sub>2</sub>) alımını azalır. Fotosentetik elektronlar yeterli miktarda CO<sub>2</sub> bulamadıklarında O<sub>2</sub> molekülüne aktarılır ve sonuç olarak toksik etki gösteren ve aktive olan süper oksit radikalleri (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) oluşur. Süper oksit radikallerinin aşırı birikmesi hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile birlikte singlet oksijenide içine alan reaktif oksijen türlerini (ROS) üreterek oksidatif strese yani hasara sebep olmaktadır (Mittler et al. 2004). Bitkiler olumsuz koşullardan kaçma hareketinde bulunamazlar ve stres faktörlerine karşı koyabilmek için güçlü savunma mekanizmalarını çalıştırırlar. Antioksidan savunma mekanizmaları enzimatik ve enzimatik olmayan şekilde ifade edilmektedir. Enzimatik olan mekanizmalar süper oksit (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), hidroperoksil (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>), hidroksil (OH<sup>·</sup>), alkoksil (RO<sup>·</sup>) ve peroksil (ROO<sup>·</sup>) serbest radikalleri ile tekli oksijen (O<sub>2</sub>), ozon (O<sub>3</sub>), hipokloröz (HOCl) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) radikal olmayanlar şeklinde tanımlanmaktadır. Bitkilerde hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mitokondri, kloroplast ve peroksisomlardaki metabolik etkinlikler sonucunda üretilen bir oksidan üründür (Tanou et al. 2009). Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal olmayanlar sınıfında yer almaktadır. Hidrojen peroksit, bakır ve demir gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil (OH<sup>·</sup>) radikalinin öncüsü olarak davranır ve bu nedenle de oksitleyici bir tür olarak bilinmektedir. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bakır ve demir gibi metal iyonlarının varlığında süper oksit ile tepkimeye girerek, biyolojik sistemler içerisinde en tehlikeli serbest radikal olarak bilinen hidroksilin (OH<sup>·</sup>) oluşmasına neden olmaktadır. Biyolojik sistemlerden hidrojen peroksit'in (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oksitleyici özelliğinden dolayı uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu görevi peroksidaz ve oksidaz gibi antioksidan enzimler O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O ürünlere dönüştürerek yerine getirmektedir (Liochev and Fridovich 2007). Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı ile ilgili çok sayıda çalışma söz konusudur. Esim et al.

(2014) Buğday (*Triticum aestivum*) yaprakları ile soğuk (5/2 °C) stresi altında yapmış oldukları çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının soğuk stresinde arttığını, eksojen sodyum nitro purissid (SNP) uygulamasının da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını azalttığını bildirmişlerdir. Ahmed et al. (2021) Pirinç (*Oryza sativa* L.) bitkilerinde As stresi altında MgO nanopartikül uygulaması yapmışlar ve kontrole göre As stresinin arttığını buna karşılık MgO nanopartikül tedavisi olan gruplarda kök ve sürgünlerdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında kademeli düşüş olduğunu ve bildirmişlerdir. Öktem et al. (2008) soğuk stresine (4 °C) maruz bırakılan mercimek (*Lens culinaris* M cv) bitkisinin gövde dokularında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının ve MDA seviyesinin yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Ignatenko et al. (2019) kışlık buğdayda 4 °C soğuk stresi altında eksojen salisilik asit uygulamasının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini azalttığını ve salisilik asitin buğdayda soğuğa toleransını iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Literatürdeki çalışmalar, bu tez çalışmasındaki sonuçlar ile paralellik göstermekte ve desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının her iki çeşidin 10 ve 4 °C'de tek başına soğuk stresi kontrollerinin 25 °C kontrolüne göre arttığı görülmektedir. Hem Van hem de Denizli çeşitlerindeki soğuk stresi ile birlikte yapılan tüm uygulamaların 10 °C'de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını azalttığı, 4 °C'de SA'nın düşük dozu ile MgO nanopartikülünün düşük ve yüksek dozu ile olan birleşim uygulamalarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını artırdığı buna karşılık salisilik asit, magnezyum oksit nanopartikülü ve yüksek konsantrasyonlu salisilik asit ile magnezyum oksit nanopartikül birleşim uygulamalarının da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını önemli derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4, 4.5. ve Şekil 4.8, 4.10.).

Lipid peroksidasyon aktivitesi, serbest radikaller (singlet oksijen, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) ile hücre zarı lipidlerinin etkileşmesi sonucu ortaya çıkan, zar lipid yapısını değiştiren ve hücresel yapıların fonksiyonlarının bozulmasına neden olan dolayısıyla hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem derecesi hemde yansıması olarak kabul görülen bir olaydır. Malondialdehit (MDA) ise lipid peroksidasyonun son ürünü olarak oluşur ve stres koşullarında MDA seviyesinin ölçülmesi zarlardaki dönüşümsüz hasarların tespitinde kullanılan bir belirteçdir. MDA birikimi hücre zarlarının bütünlüğünün bozulduğunun işaretidir (Balestrasse et al. 2010). MDA birikimi, elektrolitlerin hücre dışına sızmasına böylelikle de iletkenliğin artmasına sebebiyet vermektedir. Elektrik iletkenliğinin

artması bitkilerde hücre zarı hasarının ve soğuk stresinin bir indikatörü olarak kullanılmaktadır. Çalışmaların birçoğunda soğuk stresinin oluşturduğu ilk hasarın hücre zarının bütünlüğünü kaybettiği yönündedir (Tambussi et al. 2004; Turan and Ekmekçi 2011). Dolayısıyla bitkilerin maruz kaldığı soğuk stresinin yol açtığı hasarları belirlemek için MDA miktarının ölçülmesi elzem ve önemlidir. Stres şartlarında MDA'nın düşük olması bitkide hasarın da düşük olduğu anlamına gelmektedir (Pirasteh-Anosheh and Emam 2018). Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde MDA miktarının seviyesini gösteren çok sayıda çalışma söz konusudur. Esim et al. (2012) buğday bitkilerine uygulanan soğuk stresinin MDA miktarını önemli derecede artırdığını bildirmişlerdir. Mutlu et al. (2016) hassas ve dayanıklı arpa çeşitlerinin soğuk stresinde MDA miktarlarının arttığını buna karşılık salisilik asit uygulamasının soğuk uygulamasına göre azaldığını bildirmiştir. Faizan et al. (2022) As varlığında soya fasulyesi bitkilerinin MDA içeriğinin arttığını fakat MgO nanopartikül eksojen uygulamasıyla MDA içeriğinin azaldığını bildirmişlerdir. Öktem et al. (2008) mercimek (*Lens culinaris* M) bitkisine soğuk stresi 4 °C uygulamasının malondialdehit seviyesini artırdığını ifade etmişlerdir. Faiz et al. (2022) Pb varlığında havuç (*Daucus carota*) bitkilerinin MDA içeriklerinin arttığını buna karşılık MgO nanopartikül tedavi uygulamalarında ise MDA seviyelerinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Cheng et al. (2020) buğday fidelerinde kadmiyumun neden olduğu toksisiteyi hafifletmek adına MgO nanopartikülü uygulamışlar ve MgO nanopartikül uygulamasının MDA seviyesini önemli ölçüde azaltarak bitki büyümesini iyileştirdiğini ifade etmişlerdir. Mevcut tez çalışmasındaki sonuçlar literatür çalışmalarını destekler niteliktedir.

Bu tez çalışmasında, MDA içeriğinin her iki çeşidin 10 ve 4 °C'de tek başına soğuk stresi kontrollerinin 25 °C kontrolüne göre arttığı görülmektedir. Hem Van hem de Denizli çeşitlerindeki soğuk stresi ile birlikte uygulanan salisilik asit, magnezyum oksit nanopartikül konsantrasyonlarının genel olarak her iki sıcaklıktada soğuk stresinde artan MDA içeriğini azalttığı, her iki çeşidin 10 °C sıcaklığında düşük SA uygulamasının MgO ile soğuğa karşı yetersiz doz olarak kaldığı ve MDA'yı artırdığı, 4 °C'de ise Van çeşidinde düşük konsantrasyonlu SA'nın düşük konsantrasyonlu MgO birleşim uygulaması ile Denizli çeşidinde düşük konsantrasyonlu SA'nın yüksek konsantrasyonlu MgO nanopartikül birleşimleri ile MDA miktarı artmıştır. Yüksek konsantrasyonlu salisilik asit ile magnezyum oksit nanopartikül birleşim

uygulamalarının da MDA içeriğini önemli şekilde düşürdüğü ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri gözlemlenmiştir (Çizelge 4.6, 4.7. ve Şekil 4.12, 4.14.). Bu durum salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartiküllerinin MDA miktarının artmasına sebep olan serbest radikallerin uzaklaştırılmasını sağlayacak antioksidan enzim sistemlerini uyardığına atfedilebilir.

Soğuğa tolerans oluşturmada yalnızca karbonhidratların değil aminoasitlerinde önemli bir payı vardır. Aminoasitlerden biri olan prolin, yüksek organizasyonlu bitkilerde yaygın şekilde bulunur ve çevresel streslere yanıt olarak bitkilerde sentezlenen osmoprotektanlardan biridir. Prolin aminoasidi, reaktif oksijen türlerini uzaklaştırma, enzim koruyucu, osmotik, zar bütünlüğü, su bağlama kapasitesini artırma, protein sentez işleyişini dengeleme, enzimleri denatürasyondan koruma azot ve karbon kaynağı olarak kullanılabilme, donma toleransını sağlayabilme gibi birçok önemli görevlerde yer almaktadır. Prolin esasında stres durumlarında savunma mekanizması olarak sentezlenmektedir (Ruelland et al. 2009; Kaur et al. 2011). Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde prolin içeriğinin arttığını gösteren çok sayıda çalışma söz konusudur. Atici et al. (2003) düşük sıcaklıkta kışlık buğday ve lahana yapraklarının prolin miktarını araştırmış ve her iki bitki türünün kontrole göre prolin miktarlarında artış olduğunu açıklamışlardır. Soliman ve et al. (2018), fasülye bitkisinde 4 °C sıcaklıkta eksojen salisilik asit uygulamasının prolin birikimini artırdığını bildirmişlerdir. Ignatenko et al. (2019) kışlık buğdayda 4 °C soğuk stresi altında prolin miktarının arttığını, eksojen salisilik asit uygulaması ile prolin içeriğinin daha yüksek artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Saghfi et al. (2014) soğuk stresinde iki nohut çeşidinin prolin miktarlarını araştırmışlar ve her iki çeşidin yapraklarının soğuk stresi altında prolin seviyelerinin arttığını bildirmişlerdir. Kaur et al. (2011) düşük sıcaklıklarda nohut (*Cicer arietinum* L.) bitkisi üzerine yapmış oldukları çalışmada prolin seviyesinin arttığını, dışarıdan uygulanan prolinin de bitkinin soğuğa dayanıklılığını artırdığını ifade etmişlerdir. Mevcut tez çalışmasındaki sonuçlar literatür çalışmalarını destekler niteliktedir.

Bu tez çalışmasında, prolin konsantrasyonu her iki çeşidin tüm uygulamalarının 10 ve 4 °C'de ki tek başına soğuk stresi kontrolü ve 25 °C kontrolüne göre artış göstermiştir. Aynı şekilde hem Van hem de Denizli çeşidi için sıcaklık ve uygulamaları

dikkate alındığında prolin içeriğinin salisilik asit (SA) ve Magnezyum oksit nanopartikül (MgO) birleşimi olan uygulamalarda daha fazla arttığı, daha anlamlı hale geldiği gözlemlenmiştir. Salisilik asit ile magnezyum oksit nanopartikül uygulamaları antioksidan özellik göstermelerinden dolayı reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması ve membranların korunmasına katkı sağlamıştır (Çizelge 4.8, 4.9. ve Şekil 4.16, 4.18.).

miRNA'ların yakın zamanda bitkilerin çevresel streslere karşı adaptasyonunda yeni düzenleyiciler olarak görev yaptıkları bildirilmiştir (Biggar and Storey 2011). miRNA'lar öncelikle pri-miRNA ya da primer transkript olarak yazılırlar. Bu transkriptlerin baş ve poli kuyruğu vardır (Poli-A). Pri-miRNalar ya da primer transkriptler hücre çekirdeğinde işlenir ve 70 ile 80 nt aralığında pre-miRNA'lara daha sonrada fonksiyonel miRNA'lara dönüşürler (Bartel 2004). Pre-miRNA'lar, hücre çekirdeği içerisinde bulunan Dicer benzeri proteinler ile işlenir ve Argonaute proteinleriyle birleşen RNA kaynaklı susturma komplekslerine (RISC'ler) birleştirilmeden önce sitoplazmaya aktarılırlar. RNA kaynaklı susturma kompleksleri (RISC), mRNA'nın kodlama bölgeleri ve 3' UTR ile baz eşleşmesi yaparlar ve hedef gen ekspresyonunu negatif olarak düzenlerler, böylelikle de hedef mRNA'nın bozulmasını veya translasyonun inhibisyonunu indüklerler. Bu nedenle miRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli hayati rol oynarlar (Bartel 2009). Bugüne kadar çeşitli streslere karşı bitki tepkisine odaklanan çalışma ve bu stresler altında strese duyarlılık gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir (Wei et al. 2009). miR156 ailesi, çeşitli bitkiye özgü transkripsiyon faktörlerini kodlayan promotör bağlama benzeri (SPL) genleri hedefler. miR156'nın ifadesi ve hedef genlerinin ifadesi, önemli gelişimsel süreçler ve stres toleransı ile ilişkilidir (Zhou and Tang 2019). Zhou et al. (2019) OsmiR156'nın aşırı ekspresyonu, *Arabidopsis*, çam ve pirinçte hücre canlılığını, hücre büyüme hızını artırır ve soğuk stres toleransı altında iyon sızıntı oranını azaltır. OsmiR156, OsSPL3'ü hedef alarak soğuk stres toleransını artırır. *Solanum lycopersicum*'da miR156, KNOX ve CLAVATA3 genlerini etkileyerek heterokronik gelişimi destekler (Vendemiatti et al. 2017). *Arabidopsis thaliana*'da miR156 ekspresyonunun azalması yetişkin dokularda DNA metilasyonunda artışa neden olur (Massoumi et al. 2017). *Panicum virgatum*'da miR156'nın aşırı ekspresyonunun bitki mimarisi ve çiçeklenme üzerinde dramatik etkileri vardır (Baxter et al. 2018). *Arabidopsis*'te miR156, (AS2) transkript seviyelerini düzenleyerek silika gelişimini ve

bitki verimliliğini modüle eder (Wang et al. 2016). Cui et al. (2015) *OsmiR156k*'nin aşırı ekspresyonunun, soğuk stresi altında pirinçte çok erken fide aşamasında fide büyümesini engeller. Niazi et al. (2023) buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarına eksojen olarak çinko oksit nanopartikülü uygulamasının miR'leri ve gen ifadesini etkileyip etkilemediğini araştırmış ve 10 mg/L<sup>-1</sup> ZnO NPs'lerin miR156'yı transkripsiyonel olarak aşağı regüle ettiğini toksik bir doz 50 mg/L<sup>-1</sup> ise miR156'nın aşırı ekspresyonunu sağladığını, çinko oksit nanopartiküllerinin fitotoksik dozlarında miR156'yı aşırı ekspre etmesinin remobilazasyonla ilgili genleri (*NAM* ve *SUT*) aşağı regüle ederek başak/tane gelişimini baskıladığını gözlemlediklerini açıklamışlardır. Aungbet al. (2015) yoncada (*Medicago sativa* L.) miR156'nın aşırı ekspresyonunun yem verimini artırdığını, çiçeklenmeyi geciktirdiğini, kök uzunluğunun ve trikoma yoğunluğunun artmasını sağladığını bildirmişlerdir. Lee et al. (2010) miR156a'nın *Arabidopsis*'te 16 °C soğuk stresinde yukarı doğru regüle edildiğini bildirmişlerdir. *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir çalışmada fosfat (pi) eksikliğinde miR156a yüksek oranda ekspre edildi fakat sürgünlerdeki besin eksikliğinden etkilenmedi ancak -Pi, -N veya -K tarafından yukarı regüle edildi. miR156a, gençlikten yetişkinliğe bitkisel faz geçişi ve diğer gelişim süreçlerinde yer alan bir grup squamosa promoter bağlayıcı protein gibi (SPL) transkripsiyon faktörünü düzenler (Hsieh et al. 2009). Ananas bitkisinde yapılan bir başka çalışmada MgO nanopartikülünün konsantrasyonu arttıkça ekspresyon seviyesini artırdığı ve miR156'nın yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Owusu Adjei et al. 2021). Arpa (*Hordeum vulgare* L.) genotiplerinde Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve CuO nanopartikül uygulamalarının artan konsantrasyonlarıyla birlikte miR156a ekspresyon seviyelerini artırdığı ve yukarı doğru düzenlendiğini bu artışta muhtemelen patojenlere karşı bitki direncini etkilediğini bildirmişlerdir (Petrova et al. 2021). *Arabidopsis*'te demir (Fe) eksikliğine duyarlı mikroRNA genlerinin tanımlanması ve miRNA'ların Fe eksikliği altında rolü ile ilgili yapılan çalışmada miR173'ün sürgünlerde ekspresyonun başlangıçta yukarı doğru regüle edildiği daha sonra aşağı regüle edildiği sonuç olarak da miRNA173'ün Fe eksikliğine yanıt verdiği bildirilmiştir (Kong and Yang 2010). Barciszewska et al. (2015) *Arabidopsis* bitkilerinin miR173 ekspresyon seviyelerinde S (kükürt) eksikliğinde ve Cd (kadmium) fazlalığında aşağı regüle olduğunu bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında mtr-miR156a gen ifadesi Van çeşidinde 10 °C soğuk kontrolü 25 °C kontrolüne göre aşağı regüle olurken, 4 °C soğuk kontrolü 25 °C kontrolüne göre yukarı regüle olmuştur. mtr-miR156a gen ifadesi Denizli çeşidinde ise 10 °C ve 4 °C soğuk kontrolleri 25 °C kontrolüne göre aşağı regüle olmuştur. mtr-miR156a, çeşitli bitkiye özgü transkripsiyon faktörlerini kodlayan promotör bağlama benzeri (SPL) genlerini hedefler ve SPL gen ailesi üyelerinin ekspresyonunu düzenleyerek bitkinin büyüme, üreme ve gelişmesini sağlar. Van 10 °C ile Denizli 10 °C ve 4 °C soğuk kontrollerinin aşağı regüle olması yani mtr-miR156a'nın ifadesinin azalması SPL hedef genlerinin yukarı doğru düzenlenmesine neden olarak bitkinin büyümesi ve gelişmesini olumsuz etkilemiştir. Van 4 °C soğuk kontrolünün 25 °C kontrolüne göre yukarı regüle olması miRNA gen anlatım seviyesinin arttığı, SPL hedef genlerinin ifadesinin inhibe edildiği anlamına gelir ve bitkinin büyüme ve gelişmesini teşvik etmiştir. Salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül uygulamaları mtr-miR156 gen ifadesini her iki çeşit ve sıcaklıktada aşağı ya da yukarı olarak düzenlemişlerdir. Yüksek konsantrasyonlu 2 SA + 20 ppm MgO nanopartikül birleşim uygulamaları yüksek kat artışı ile Van 4 °C, Denizli 10 °C ve Denizli 4 °C derecelerde mtr-miR156 gen anlatım seviyesini aşırı ekspre ederek hedef genin susturulmasını sağlamış ve bitkinin soğuk stresine tolerans göstermesini, bitkinin yaprak gelişiminin sağlanmasını en güçlü şekilde desteklemiştir (Çizelge 4.11. ve Şekil 4.24). ath-miR173-5p anlatım seviyesi Van çeşidinde 10 °C soğuk kontrolü 25 °C kontrolüne göre yukarı regüle olurken, 4 °C soğuk kontrolü 25 °C kontrolüne göre aşağı regüle olmuştur. ath-miR173-5p anlatım seviyesi Denizli çeşidinde ise 10 °C ve 4 °C soğuk kontrolleri 25 °C kontrolüne göre yukarı regüle olmuştur. miR173 tarafından TAS1a, TAS1b, TAS1c ve TAS2 hedeflenir ve bir grup PPR genini hedef alan ta-siRNA'lar üretir. PPR proteini, kloroplast veya mitokondriyi hedef alır bir veya daha fazla organel transkriptini bağlar ve RNA dizisini, dönüşümünü, işlenmesini veya translasyonunu değiştirerek bunların ekspresyonunu etkiler. Fotosentez ve solunumun bitki gelişimi üzerinde derin etkileri vardır. ath-miR173-5p'nin anlatımı Van 10 °C ile Denizli 10 °C ve 4 °C soğuk kontrollerinde 25 °C kontrolüne göre yukarı regüle olmuş ve hedeflenen PPR'nin gen ifadesinin azalması ile bitki gelişimi yavaşlamıştır. Van 4 °C soğuk kontrolü ise 25 °C kontrolüne göre aşağı regüle olmuş ve hedeflenen PPR gen ifadesi artarak bitkinin gelişimi devam etmiştir. Salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül uygulamalarında miRNA gen ifadesini azaltıp hedef genin ifadesini artırarak bitkinin yaprak gelişimi ve büyümesini desteklemiştir (Çizelge 4.12. ve Şekil 4.26.).

### 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında, yoncanın (*Medicago sativa* L.) iki farklı genotipleri (Van ve Denizli) sırasıyla 10 °C ve 4 °C soğuk stresine maruz bırakılmış ve salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikülü ayrı ayrı ve birleşimleri şeklinde bitki yapraklarına eksojen olarak uygulanmıştır. Bu uygulamaların etkileri yapılan biyokimyasal (çözünabilir karbonhidrat, MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve prolin), miRNA gen seviyesindeki değişiklik (miR156, miR173) ve SEM analizleri ile değerlendirilmiştir.

Salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül birleşim uygulamalarının yüksek konsantrasyonları, iki düşük sıcaklık stresinde (10 °C ve 4 °C) hem Van hem Denizli genotiplerinde çözünabilir şeker miktarını artırmış ve bitkilerin soğuğa uyumunu desteklemiştir.

Bitkiler için zararlı olan stres koşullarında genellikle artış gösteren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidan ürünü her iki çeşidin düşük sıcaklıklarında artış göstermiştir. Yapılan salisilik asit ve magnezyum oksit nanopartikül uygulamaları reaktif oksijen türünün bu artışını azaltarak soğuğa tolerans kazanılmasında etkili olmuştur.

10 °C ve 4 °C iki düşük sıcaklık stresi altında, her iki çeşitte de soğuk ile artış gösteren lipid peroksidasyon miktarının salisilik asit, magnezyum oksit nanopartikül ve sinerjik etki gösteren yüksek konsantrasyonlu salisilik asit ile magnezyum oksit nanopartikül birleşim uygulamaları ile azalması, nanopartikülün ve hormon olan salisilik asidin soğuk stresinin oluşturmuş olduğu yıkıcı etkisini azalttığını göstermektedir.

Prolin düşük sıcaklıklarda (10 °C ve 4 °C) hem Van hem Denizli çeşitlerinde yukarı yönlü artış göstermiştir. Magnezyum oksit nanopartikül ve salisilik asit uygulamaları ile yüksek konsantrasyonlu birleşimleri prolin birikiminin daha fazla artmasını sağlayarak bu uygulamaların donma derecesinin üstündeki sıcaklıklarda yani soğuk stresinde çeşitleri koruyucu yönde etki gösterdikleri, hücre içerisinde oluşacak buz oluşumunu geciktirecek yolları aktive edebilecekleri anlamına gelmektedir.

mtr-miR156a ve ath-miR173-5p gen anlatım seviyeleri soğuk stresine (10 °C ve 4 °C) maruz kalan yonca (Van/Denizli) çeşitlerinde farklı sonuçlar göstermiştir. mtr-miR156a, Van çeşidinde düşük sıcaklık 10 °C'de down regüle olurken 4 °C'de up regüle olmuştur. Denizli çeşidinde ise 10 °C ve 4 °C düşük sıcaklıklarda down regüle olmuştur. ath-miR173-5p, Van çeşidinde düşük sıcaklık 10 °C'de up regüle olurken 4 °C'de down regüle olmuştur. Denizli çeşidinde ise 10 °C ve 4 °C düşük sıcaklıklarda up regüle olmuştur.

Tüm analizler değerlendirildiğinde, Van ve Denizli yonca çeşitlerinin soğuk stresinden etkilendikleri, aynı şekilde soğuk stresinin hücre metabolizmasını olumsuz etkileyebileceği, bununla beraber ROT oluşumuna neden olabileceği ve fotosentez başta olmak üzere reaksiyon dengelerinin bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir. Denizli çeşidinin Van çeşidine göre soğuk stresine daha duyarlı olduğu görülmüştür. Soğuk stresi altında yapılan uygulamalardan hormon salisilik asit (SA) ile nanopartikül magnezyum oksit (MgO) ise soğuk stresinin bitkilerde oluşturduğu hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Düşük doz salisilik asidin (1 mM) magnezyum oksit nanopartikül konsantrasyonları ile olan birleşim uygulamasının soğuğun yol açtığı olumsuz etkileri iyileştirmede muhtemelen yetersiz doz olarak kaldığı, buna karşılık yüksek doz salisilik asidin (2 mM) magnezyum oksit nanopartikül konsantrasyonu yüksek doz (20 ppm) ile sinerjik etki göstererek soğuğa karşı bitki genotiplerinin yapraklarındaki olumsuz etkileri önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır.

Gelecekte diğer bitki genotipleriyle soğuk stresi altında yapılacak olan çalışmalarda MgO nanopartikülü ile salisilik asidin soğuğa karşı tolerans oluşturmada ve tarımda ürün kaybını azaltmada kullanılabilir maddeler olabileceği düşünülmektedir. SA ile MgO nanopartikülün etki mekanizmalarının tam olarak aydınlatılabilmesi için daha kapsamlı genetik çalışmalara ihtiyaç söz konusudur.

## KAYNAKLAR

- Acharya, J. P., Lopez, Y., Gouveia, B. T., Oliveira, B. I., Resende Jr, M. F., Munoz, P. R. and Rios, E. F. 2020. Breeding alfalfa (*Medicago sativa* L.) adapted to subtropical agroecosystems. *Agronomy*, 10(5), 742.
- Açıkgöz, E. 2001. Yem Bitkileri. 3. Baskı. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 182, 584, Bursa.
- Ahamad, L., Azmat, A. L. I., Masudulla, K. H. A. N., Farid, O. and Mahboob, A. L. A. M. 2023. Exploring the nano-fungicidal efficacy of green synthesized magnesium oxide nanoparticles (MgO NPs) on the development, physiology, and infection of carrot (*Daucus carota* L.) with *Alternaria* leaf blight (ALB): Molecular docking. *Journal of Integrative Agriculture*, 22(10), 3069-3080
- 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.
- Ahmed, T., Noman, M., Manzoor, N., Shahid, M., Hussaini, K. M., Rizwan, M., Ali, S., Maqsood, A. and Li, B. 2021. Green magnesium oxide nanoparticles-based modulation of cellular oxidative repair mechanisms to reduce arsenic uptake and translocation in rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Environmental Pollution*, 288, 117785.
- Aitken, R. L., Dickson, T., Hailes, K. J. and Moody, P. W. 1999. Response of field-grown maize to applied magnesium in acidic soils in north-eastern Australia. *Australian Journal Of Agricultural Research*, 50(2), 191-198.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M. and Carrington, J. C. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121(2), 207-221.
- Al Mahmud, J., Bhuyan, M. B., Anee, T. I., Nahar, K., Fujita, M. and 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.
- Allhoff, F. 2007. On the autonomy and justification of nanoethics. *Nanoethics*, 1, 185–210.
- Al-Salim, N., Barraclough, E., Burgess, E., Clothier, B., Deurer, M., Green, S., Malone, L. and Weir, G. 2011. Quantum dot transport in soil, plants, and insects. *Science of the Total Environment*, 409(17), 3237–3248.
- Anilkumar, M. R., Nagaswarupa, H. P., Nagabhushana, H., Sharma, S. C., Vidya, Y. S., Anantharaju, K. S., Prashantha, S. C., Shivakuamra, C. and Gurushantha, K. 2015. Bio-inspired route for the synthesis of spherical shaped MgO: Fe<sup>3+</sup> nanoparticles: Structural, photoluminescence and photocatalytic investigation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 703-713.

- Anower, M. R., Mott, I. W., Peel, M. D. and Wu, Y. 2013. Characterization of physiological responses of two *alfalfa* half-sib families with improved salt tolerance. *Plant Physiology Biochemistry*, 71, 103–111.
- Ansari, A., Ali, A. and Asif, M. 2018. Microwave-assisted MgO NP catalyzed one-pot multicomponent synthesis of polysubstituted steroidal pyridines. *New Journal of Chemistry*, 42(1), 184-197.
- Arinze, E. A., Schoenau, G. J., Sokhansanj, S. and Adapa, P. 2003. Aerodynamic separation and fractional drying of alfalfa leaves and stems- a review and new concept. *Drying Technology*, 21(9), 1669-1698.
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-de March, G. and Savouré, 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. and Hannoufa, A. 2017. MicroRNA156 improves drought stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by silencing SPL13. *Plant Science*, 258, 122-136.
- Arslan, M. ve Erdurmuş, C. 2012. Ülkemizde hayvancılığa ve kaba yem sorununa. *Ziraat Mühendisliği*, 359, 32-37.
- Arteca, R. N. 1996. *Plant Growth substance principles and applications*. Chapman and Hall, 332, New York.
- Asada, K. 2000. The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1419-1431.
- Ashok, C., Rao, K. V., Chakra, C. S. and Rao, K. G. 2016. MgO nanoparticles prepared by microwave-irradiation technique and its seed germination application. *Nano Trends: A Journal of Nanotechnology Applications*, 18, 10-17.
- Atici, Ö., Demir, Y. and Kocaçalışkan, İ. 2003. Effects of low temperature on winter wheat and cabbage leaves. *Biologia Plantarum*, 46, 603-606.
- Aung, B., Gruber, M. Y., Amyot, L., Omari, K., Bertrand, A. and Hannoufa, A. 2015. Micro RNA 156 as a promising tool for *alfalfa* improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), 779-790.
- Axtell, M. J. and Bartel, D. P. 2005. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant Cell*, 17(6), 1658-1673.
- Aydinoglu, F. 2020. Elucidating the regulatory roles of microRNAs in maize (*Zea mays* L.) leaf growth response to chilling stress. *Planta*, 251(2), 38.
- Bagautdinova, Z. Z., Omelyanchuk, N., Tyapkin, A. V., Kovrizhnykh, V. V., Lavrekha, V. V. and Zemlyanskaya, E. V. 2022. Salicylic acid in root growth and development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2228.

- Bakht, J., Bano, A. and Dominy, P. 2006. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function, *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3707-3715.
- Balestrasse, K. B., Tomaro, M. L., Batlle, A. and Noriega, G. O. 2010. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. *Phytochemistry*, 71(17-18), 2038-2045.
- Barciszewska-Pacak, M., Milanowska, K., Knop, K., Bielewicz, D., Nuc, P., Plewka, P. And Szweykowska-Kulinska, Z. 2015. *Arabidopsis* microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 6, 410.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Bartel, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
- Baxter, H. L., Mazarei, M., Dumitrache, A., Natzke, J. M., Rodriguez Jr, M., Gou, J., Fu, C., Sykes, R. W., Turner, G. B., Davis, M. F., Brown, S. D., Davison, B. H., Wang, Z. Y. and Stewart Jr, C. N. 2018. Transgenic miR156 switchgrass in the field: growth, recalcitrance and rust susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 39-49.
- Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K. and Nedunchezian, N. 2007. Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes, *Biologia Plantarum*, 51, 381-385.
- Bertinetti, L., Drouet, C., Combes, C., Rey, C., Tampieri, A., Coluccia, S. and Martra, G. 2009. Surface characteristics of nanocrystalline apatites: effect of Mg surface enrichment on morphology, surface hydration species, and cationic environments. *Langmuir*, 25(10), 5647-5654.
- Beykaya, M. ve Çağlar, A. 2016. Bitkisel özütler kullanılarak gümüş-nanopartikül (agnp) sentezlenmesi ve antimikrobiyal etkinlikleri üzerine bir araştırma. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(3), 631- 641.
- Biggar, K. K. and Storey, K. B. 2011. The emerging roles of microRNAs in the molecular responses of metabolic rate depression. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(3), 167-175.
- Bindhu, M. R., Umadevi, M., Micheal, M. K., Arasu, M.V. and Al-Dhabi, N. A. 2016. Structural, morphological and optical properties of MgO nanoparticles for antibacterial applications. *Materials Letters*, 166, 19-22.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R. and Zhu, J. K. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 123(7), 1279-1291.

- Burklew, C., E. Ashlock, J., Winfrey, W. B. and Zhang, B. 2012. Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). Plos One, 7(5), e34783.
- Burman, U., Saini, M. and Kumar, P. 2013. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. Toxicological Environmental Chemistry, 95(4), 605-612.
- Cai, L., Chen, J., Liu, Z., Wang, H., Yang, H. and Ding, W. 2018. Magnesium oxide nanoparticles: effective agricultural antibacterial agent against *Ralstonia solanacearum*. Frontiers in Microbiology, 9, 790.
- Cai, L., Liu, M., Liu, Z., Yang, H., Sun, X., Chen, J. and Ding, W. 2018. MgONPs can boost plant growth: evidence from increased seedling growth, morpho-physiological activities, and Mg uptake in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Molecules, 23(12), 3375.
- Cakmak, I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. The New Phytologist, 146(2), 185-205.
- Cakmak, I. and Kirkby, E. A. 2008. Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. Physiologia Plantarum, 133(4), 692-704.
- Cakmak, I. and Yazici, A. M. 2010. Magnesium: a forgotten element in crop production. Better Crops, 94(2), 23-25.
- Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D. and Delmer, D. P. 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. Science, 205(4411), 1144-1147.
- Chang, F. P., Kuang, L. Y., Huang, C. A., Jane, W. N., Hung, Y., Yue-ie, C. H. and Mou, C. Y. 2013. A simple plant gene delivery system using mesoporous silica nanoparticles as carriers. Journal of Materials Chemistry, B, 1(39), 5279-5287.
- Chaudhary, A., Shivam, S. N. and Chandra, P. 2020. A Comprehensive Review: *Medicago sativa*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 65(1), 194-200.
- Chen, H., Li, Y., Ma, X., Guo, L., He, Y., Ren, Z., Kuang, Z., Zhang, X. and Zhang, Z. 2019. Analysis of potential strategies for cadmium stress tolerance revealed by transcriptome analysis of upland cotton. Scientific Reports, 9(1), 86.
- Chen, L., Zhao, Y., Xu, S., Zhang, Z., Xu, Y., Zhang, J. and Chong, K. 2018. Os MADS 57 together with Os TB 1 coordinates transcription of its target Os WRKY 94 and D14 to switch its organogenesis to defense for cold adaptation in rice. New Phytologist, 218(1), 219-231.
- Chen, Y. E., Cui, J. M., Yuan, M., Zhang, Z. W., Yuan, S. and Zhang, H. Y. 2016. Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. Biologia Plantarum, 60(1), 139-147.

- Cheng, H. Y. and Song, S. Q. 2006. Species and organ diversity in the effects of hydrogen peroxide on superoxide dismutase activity in vitro. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(6), 672-678.
- Cheng, X., Fang, T., Zhao, E., Zheng, B., Huang, B., An, Y. and Zhou, P. 2020. Protective roles of salicylic acid in maintaining integrity and functions of photosynthetic photosystems for alfalfa (*Medicago sativa* L.) tolerance to aluminum toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 570-578.
- Cheng, Y., Cheng, Y., Zheng, H., Song, Y., Li, R., Wan, F. and Li, J. 2020. Evaluation and comparison of the toxic effects of MgO NPs, ZnO NPs,  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs on the remediation for cadmium-related effects in wheat seedlings. *Water, Air, Soil Pollution*, 231, 1-14.
- Chimenos, J. M., Fernández, A. I., Villalba, G., Segarra, M., Urruticoechea, A., Artaza, B. and Espiell, F. 2003. Removal of ammonium and phosphates from wastewater resulting from the process of cochineal extraction using MgO-containing by-product. *Water Research*, 37(7), 1601-1607.
- Chuck, G., Cigan, A. M., Saeteurn, K. and Hake, S. 2007. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics*, 39(4), 544-549.
- Cowan, J. A. 2002. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals*, 15(3), 225-235.
- Cui, N., Sun, X., Sun, M., Jia, B., Duanmu, H., Lv, D., Duan, X. and Zhu, Y. 2015. Overexpression of OsmiR156k leads to reduced tolerance to cold stress in rice (*Oryza Sativa*). *Molecular Breeding*, 35, 1-11.
- Dağhan, H. 2017. Nano gübreler. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 4(2), 197-203.
- Dahl, J. A., Maddux, B. L. and Hutchison, J. E. 2007. Toward greener nanosynthesis. *Chemical Reviews*, 107(6), 2228-2269.
- Dai, C., Qiu, L., Guo, L., Jing, S., Chen, X., Cui, X. and Yang, Y. 2019. Salicylic acid alleviates aluminum-induced inhibition of biomass by enhancing photosynthesis and carbohydrate metabolism in *Panax notoginseng*. *Plant and Soil*, 445, 183-198.
- Davies, P. J. 1995. Salicylic acid, plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publication, 833, London.
- Davy de Virville, J., Cantrel, C., Bousquet, A. L., Hoffelt, M., Tenreiro, A. M., Vaz Pinto, V. and Zachowski, A. 2002. Homeoviscous and functional adaptations of mitochondrial membranes to growth temperature in soybean seedlings. *Plant, Cell Environment*, 25(10), 1289-1297.
- Demirbilek, E. M. 2015. Tarımda ve gıdada nanoteknoloji. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 15, 46-53.

- Devatha, C. P. and Thalla, A. K. 2018. Green synthesis of nanomaterials. In Synthesis of Inorganic Nanomaterials, Woodhead Publishing, 169-184, India.
- Dhakal, M., West, C. P., Villalobos, C., Sarturi, J. O. and Deb, S. K. 2020. Trade-off between nutritive value improvement and crop water use for an *alfalfa*-grass system. *Crop Science*, 60(3), 1711-1723.
- Ding, Y., Shi, Y. and Yang, S. 2019. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytologist*, 222(4), 1690-1704.
- Ding, Y., Shi, Y. and Yang, S. 2020. Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures. *Molecular Plant*, 13(4), 544-564.
- Dolata, J., Bajczyk, M., Bielewicz, D., Niedojadlo, K., Niedojadlo, J., Pietrykowska, H., Walczak, W., Kulinska, Z. Z. and Jarmolowski, A. 2016. Salt stress reveals a new role for ARGONAUTE1 in miRNA biogenesis at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Plant Physiology*, 172(1), 297-312.
- Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C. and Feijo, J. A. 2015. Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant*, 8(4), 06-520.
- Dong, W., Lv, H., Xia, G. and Wang, M. 2012. Does diacylglycerol serve as a signaling molecule in plants. *Plant Signaling Behavior*, 7(4), 472-475.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U. and 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.
- Elmer, W., De La Torre-Roche, R., Pagano, L., Majumdar, S., Zuverza-Mena, N., Dimkpa, C., Torresdey, J. G. and White, J. C. 2018. Effect of metalloid and metal oxide nanoparticles on Fusarium wilt of watermelon. *Plant Disease*, 102(7), 1394-1401.
- Ensminger, I., Busch, F. and Huner, N. P. 2006. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 28-44.
- Erdal, S. 2010. Memeli cinsiyet hormonlarının arpa ve nohut bitkilerinin büyüme ve gelişmeleri üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 142, Erzurum.
- Eren, B. 2014. Yoncaya (*Medicago sativa* L.) ait yabancı aksesyonların, yerel çeşitlerin ve modern çeşitlerin morfolojik özellikler yönüyle karşılaştırılmaları. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 50, Kars.
- Eruçar, S. 2006. Bazı bitkisel çayların fenolik madde profili ve antioksidan aktivitelerini incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 84, İstanbul.

- Esim, N., Atici, O. and Mutlu, S. 2014. Effects of exogenous nitric oxide in wheat seedlings under chilling stress. *Toxicology and Industrial Health*, 30(3), 268-274.
- Ettxeberria, E., Gonzalez, P., Bhattacharya, P., Sharma, P. and Ke, P. C. 2019. Determining the size exclusion for nanoparticles in citrus leaves. *HortScience*, 51(6), 732–737.
- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S. and Lead, J. R. 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), 517-531.
- Faiz, S., Yasin, N. A., Khan, W. U., Shah, A. A., Akram, W., Ahmad, A., Ali, A., Naveed, N. H. and Riaz, L. 2022. Role of magnesium oxide nanoparticles in the mitigation of lead-induced stress in *Daucus carota*: modulation in polyamines and antioxidant enzymes. *International Journal of Phytoremediation*, 24(4), 364-372.
- Faizan, M., Bhat, J. A., El-Serehy, H. A., Moustakas, M. and Ahmad, P. 2022. Magnesium oxide nanoparticles (MgO-NPs) alleviate arsenic toxicity in soybean by modulating photosynthetic function, nutrient uptake and antioxidant potential. *Metals*, 12(12), 2030.
- Fariduddin, Q., Hayat, S. and Ahmad, A. 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, 41, 281–284.
- Feng, S., Xu, Y., Guo, C., Zheng, J., Zhou, B., Zhang, Y., Ding, Y., Zhang, L., Zhu, Z. and Wu, G. 2016. Modulation of miR156 to identify traits associated with vegetative phase change in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1493-1504.
- Ferber, D. 1999. Risks and Benefits: GM Crops in The Cross Hairs. *Science*, 286(5445), 1662- 1666.
- Fischer, E. S. 1997. Photosynthetic irradiance response curves of *Phaseolus vulgaris* under moderate or severe magnesium deficiency. *Photosynthetica*, 33, 385-390.
- Fowke, L. C. 1995. Transmission and scanning electron microscopy for plant protoplasts, cultured cells and tissues. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*, 229-238, Berlin.
- Fraire-Velazquez, S., Rodriguez-Guerra, R. and Sanchez, Calderon L. 2011. Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. *Abiotic stress response in plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*, 3-26, Mexico.
- Franklin, K. A. 2009. Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Current Opinion In Plant Biology*, 12(1), 63–68.
- Frazier, T. P., Burklew, C. E. and Zhang, B. 2014. Titanium dioxide nanoparticles affect the growth and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Functional Integrative Genomics*, 14, 75-83.

- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S. H., Tada, Y., Zheng, N. and Fu, X. D. 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228–232.
- Gao, R., Austin, R. S., Amyot, L. and Hannoufa, A. 2016. Comparative transcriptome investigation of global gene expression changes caused by miR156 overexpression in *Medicago sativa*. *BMC Genomics*, 17(1), 1-15.
- Gao, R., Wang, Y., Gruber, M. Y. and Hannoufa, A. 2018. miR156/SPL10 modulates lateral root development, branching and leaf morphology in *Arabidopsis* by silencing AGAMOUS-LIKE 79. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2226.
- Garrett, J. L. 1995. Role of alfalfa in animal diets. Extension Dairy Specialist, University of Missouri, Commercial Agriculture Programs, 26-31, Columbia.
- Gautam, T. and Gupta, P. K. 2020. Sequence variation in genes encoding miRNAs/targets and other related approaches for possible use in crop improvement. *Plant Breeding*, 139(1), 28-41.
- Gençkan, S. 1992. Yem Bitkileri Tarımı. T.C. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 467, İzmir.
- Gerendás, J. and Führes, H. 2013. The significance of magnesium for crop quality. *Plant and Soil*, 368, 101-128.
- Ghnaya, T., Mnassri, M., Ghabriche, R., Wali, M., Poschenrieder, C., Lutts, S. and Abdelly, C. 2015. Nodulation by *Sinorhizobium meliloti* originated from a mining soil alleviates Cd toxicity and increases Cd-phytoextraction in *Medicago sativa* L. *Frontiers in Plant Science*, 6, 863.
- Gholami, A., De Geyter, N., Pollier, J., Goormachtig, S. and Goossens, A. 2014. Natural product biosynthesis in *Medicago* species. *Natural Product Reports*, 31(3), 356-380.
- González-Melendi, P., Fernández-Pacheco, R., Coronado, M. J., Corredor, E., Testillano, P. S., Risueño, M. C., Marquina, C., Ibarra, M. R., Rubiales, D. and Perez-de-Luque, A. 2008. Nanoparticles as smart treatment-delivery systems in plants: assessment of different techniques of microscopy for their visualization in plant tissues. *Annals of Botany*, 101(1), 187–195.
- Gorovits, R. and Czosnek, H. 2007. Biotic and abiotic stress responses in tomato breeding lines resistant and susceptible to tomato yellow leaf curl virus. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease. Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*, 223-237, Netherlands.
- Gout, E., Rébeillé, F., Douce, R. and Bligny, R. 2014. Interplay of Mg<sup>2+</sup>, ADP, and ATP in the cytosol and mitochondria: unravelling the role of Mg<sup>2+</sup> in cell respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(43), E4560-E4567.
- Graham, P. H. and Vance, C. P. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3), 872–877.

- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Bateman, A. and Enright, A. J. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(1), 140-144.
- Grzebisz, W. 2011. Magnesium-food and human health. *Journal of Elementology*, 16(2), 299-323.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Liu, X., Rockett, K. S., Kørner, C. J. and Pajerowska-Mukhtar, K. M. 2015. Salicylic acid signalling: new insights and prospects at a quarter-century milestone. *Essays in Biochemistry*, 58, 101-113.
- Guo, X., Liu, D. and Chong, K. 2018. Cold signaling in plants: insights into mechanisms and regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(9), 745–756.
- Hajihashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J. M., Djalovic, I. and Siddique, K. H. 2018. Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1430.
- Hao, W., Guo, H., Zhang, J., Hu, G., Yao, Y. and Dong, J. 2014. Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *The Scientific World Journal*, 2014, 843764–843771.
- Hara, M., Furukawa, J., Sato, A., Mizoguchi, T. and Miura, K. 2012. Abiotic stress and role of salicylic acid in plants, in abiotic stress responses in plants. *Metabolism Productivity and Sustainability*, 235–251.
- Hare, P. D., Cress, W. A. and Van Staden, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell Environment*, 21(6), 535-553.
- Hasanpour, H., Maali-Amir, R. and Zeinali, H. 2015. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on metabolic limitations to photosynthesis under cold in chickpea. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62, 779-787.
- Hassellöv, M., Readman, J. W., Ranville, J. F. and Tiede, K. 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 344-361.
- Hermans, C., Bourgis, F., Faucher, M., Strasser, R. J., Delrot, S. and Verbruggen, N. 2005. Magnesium deficiency in sugar beets alters sugar partitioning and phloem loading in young mature leaves. *Planta*, 220, 541-549.
- Hey, A. 2018. Feynman and computation. CRC Press, 88, England.
- Hikku, G.S., Jeyasubramanian, K. and Kumar, S. V. 2017. Nanoporous MgO as self-cleaning and anti-bacterial pigment for alkyd based coating. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 52, 168-178.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. and Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in

plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.

- Hossain, A., Farooq, M., Sabagh, A. E., Hasanuzzaman, M., Erman, M. and Islam, T. 2020. Morphological, physiobiochemical and molecular adaptability of legumes of fabaceae to drought stress, with special reference to *Medicago Sativa* L. *The Plant Family Fabaceae, Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses*, 289–317, Singapore.
- Hsieh, L. C., Lin, S. I., Shih, A. C. C., Chen, J. W., Lin, W. Y., Tseng, C. Y., Li, W. H. and Chiou, T. J. 2009. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiology*, 151(4), 2120-2132.
- Hulkoti, N. I. and Taranath, T. 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes, a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474-483.
- Huo, C., Zhang, B. and Wang, R. 2022. Research progress on plant noncoding RNAs in response to low-temperature stress. *Plant Signaling Behavior*, 17(1), 2004035.
- Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H. and Singh, S. C. 2016. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters*, 38(4), 545-560.
- Hutchison, J. E. 2008. Greener nanoscience a proactive approach to advancing applications and reducing implications of nanotechnology. *ACS Nano*, 2(3), 395-402.
- Ignatenko, A., Talanova, V., Repkina, N. and Titov, A. 2019. Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and proline accumulation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41, 1-10.
- Ikhajiagbe, B., Ogwu, M. C., Ogochukwu, O. F., Odozi, E. B., Adekunle, I. J. and Omege, Z. E. 2021. The place of neglected and underutilized legumes in human nutrition and protein security in Nigeria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(14), 3930-3938.
- Imada, K., Sakai, S., Kajihara, H., Tanaka, S. and Ito, S. 2016. Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Plant Pathology*, 65(4), 551-560.
- Inaba, M., Suzuki, I., Szalontai, B., Kanesaki, Y., Los, D. A., Hayashi, H. and Murata, N. 2003. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12191-12198.
- Ishikawa, H. A. 1996. Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells. *American Journal of Botany*, 83(7), 825-835.

- Isner, J. C. and Maathuis, F. J. 2018. cGMP signalling in plants: from enigma to main stream. *Functional Plant Biology*, 45(2), 93-101.
- Jamil, M., Rehman, S. and Rha, E. 2007. Salinity effect on plant growth, PSII photochemistry and chlorophyll content in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 39(3), 753–760.
- Janda, T., Gondor, O. K., Yordanova, R., Szalai, G. and Pál, M. 2014. Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(10), 2537-2546.
- Javadian, N., Karimzadeh, G., Mahfoozi, S. and Ghanati, F. 2010. Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, 540-547.
- Jhansi, K., Jayarambabu, N., Reddy, K. P., Reddy, N. M., Suvarna, R. P., Rao, K. V., Kumar, V. R. and Rajendar, V. 2017. Biosynthesis of MgO nanoparticles using mushroom extract: effect on peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed germination. *3 Biotech*, 7, 1-11.
- Jing, L. I., Xiu-Feng, Y. A. N. and Yuan-Gang, Z. U. 2000. Generation of activated oxygen and change of cell defense enzyme activity in leaves of Korean pine seedling under low temperature. *Journal of Integrative Plant Biology*, 42(2), 148.
- Jones-Rhoades, M. W. 2012. Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Molecular Biology*, 80, 3-16.
- Kaçar, O., Göksu, E. ve Azkan, N. 2005. Bursa koşullarında farklı bakteri suşları ile aşılamanın bazı nohut (*Cicer arietinum* L.) çeşit ve hatlarında verim ve verim öğeleri üzerine etkisinin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42(3), 21-32.
- Kanbur, H., 2012. *Teucrium chamaedrys* L. ve *Achillea biebersteinii* afan. bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin mukayesesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 68, Erzincan.
- Kang, G., Wang, C., Sun, G. and Wang, Z. 2003. Salicylic acid changes activities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 50(1), 9-15.
- Kanjana, D. 2020. Foliar application of magnesium oxide nanoparticles on nutrient element concentrations, growth, physiological, and yield parameters of cotton. *Journal of Plant Nutrition*, 43(20), 3035-3049.
- Kaplan, F., Sung, D. Y. and Guy, C. L. 2006. Roles of  $\beta$ -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiology Plantarum*, 126, 120-128.
- Karabudak, T. 2011. Domates bitkisinde glisin betain uygulamasının soğuk toleransı ile ilgili genlerin belirlenimi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, 91, İzmir.

- Karimi, J. and Mohsenzadeh, S. 2016. Effects of silicon oxide nanoparticles on growth and physiology of wheat seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63, 119-123.
- Karley, A. J. and White, P. J. 2009. Moving cationic minerals to edible tissues: potassium magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 291-298.
- Kaur, G., Kumar, S., Thakur, P., Malik, J. A., Bhandhari, K., Sharma, K. D. and Nayyar, H. 2011. Involvement of proline in response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to chilling stress at reproductive stage. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 174-181.
- Khin, M. M., Nair, A. S., Babu, V. J., Murugan, R. and Ramakrishna, S. 2012. A review on nanomaterials for environmental remediation. *Energy Environmental Science*, 5(8), 8075-8109.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N. and Heyer, A. G. 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation—evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell Environment*, 27(11), 1395-1404.
- Koc, I., Vatansever, R., Ozyigit, I. I. and Filiz, E. 2015. Identification of differentially expressed genes in chilling-induced potato (*Solanum tuberosum* L.) a data analysis study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(4), 792-811.
- Kong, W. W. and Yang, Z. M. 2010. Identification of iron-deficiency responsive microRNA genes and cis-elements in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2-3), 153-159.
- Kosová, K., Prášil, I. T., Vítámvás, P., Dobrev, P., Motyka, V., Floková, K. and Trávníčková, A. 2012. Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. *Journal of Plant Physiology*, 169(6), 567–576.
- Kosová, K., Vítámvása, P., Prášila, I. T. and Renaut, J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74(8), 1301-1322.
- Kratsch, H. A. and Wise, R. R. 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment*, 23(4), 337-350.
- Kuk, Y. I., Shin, J. S., Burgos, N. R., Hwang, T. E., Han, O., Cho, B. H., and Guh, J. O. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science*, 43(6), 2109-2117.
- Kumar, D. 2014. Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, 228, 127-134.
- Kurepa, J., Paunesku, T., Vogt, S., Arora, H., Rabatic, B. M., Lu, J., Wanzer, B., Woloschak, G. E. and Smalle, J. A. 2010. Uptake and distribution of ultrasmall

anatase TiO<sub>2</sub> alizarin red s nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. Nano Letters, 10(7), 2296–2302.

- Kuru, H.İ. 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 93, Kütahya.
- Lahmy, S., Barnèche, F., Derancourt, J., Filipowicz, W., Delseny, M. and Echeverria, M. 2000. A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family. FEBS letters, 480(2-3), 255-260.
- Larcher, W. 1987. Stress bei Pflanzen. Naturwissenschaften, 74(4), 158–167.
- Lau, N. C., Seto, A. G., Kim, J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Bartel, D. P. and Kingston, R. E. 2006. Characterization of the piRNA complex from rat testes. Science, 313(5785), 363-367.
- Lee, H., Yoo, S. J., Lee, J. H., Kim, W., Yoo, S. K., Fitzgerald, H., Carrington, J. C. and Ahn, J. H. 2010. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. Nucleic Acids Research, 38(9), 3081-3093.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell, 75(5), 843-854.
- Leonard, R. T. and Hotchkiss, C. W. 1976. Cation-stimulated adenosine triphosphatase activity and cation transport in corn roots. Plant Physiology, 58(3), 331-335.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stress, volume 1: chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press, 497, Cambridge.
- Li, W. X., Oono, Y., Zhu, J., He, X. J., Wu, J. M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X., Jin, H. and Zhu, J. K. 2008. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. The Plant Cell, 20(8), 2238-2251.
- Li, X., Riaz, M., Song, B., Liang, X. and Liu, H. 2022. Exogenous salicylic acid alleviates fomesafen toxicity by improving photosynthetic characteristics and antioxidant defense system in sugar beet. Ecotoxicology and Environmental Safety, 238, 113587.
- Li, X., Schuler M. A, and Berenbaum, M. R. 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. Nature 419(6918), 712–715.
- Li, Z., Ma, Z., Hao, X., Rensing, C. and Wei, G. 2014. Genes conferring copper resistance in sinorhizobium meliloti CCNWSX0020 also promote the growth of *Medicago lupulinain* copper-contaminated soil. Applied Environmental Microbiology, 80(6), 1961–1971.

- Liang, C., Sasaki, T., Shimizu, Y. and Koshizaki, N. 2004. Pulsed-laser ablation of Mg in liquids: surfactant-directing nanoparticle assembly for magnesium hydroxide nanostructures. *Chemical Physics Letters*, 389(1-3), 58-63.
- Lichtenthaler, H. K. 1985. Differences in morphology and chemical composition of leaves grown at different light intensities and qualities. *Control of Leaf Growth*, 201-221.
- Lichtenthaler, H. K. 1996. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*. 148(1-2), 4-14.
- Lichtenthaler, H. K. and Meier, D. 1984. Regulation of chloroplast photomorphogenesis by light intensity and light quality. In *Seminar series-Society for Experimental Biology*, 261-281.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H. J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D. and Rahmsdorf, U. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research*, 2, 115-141.
- Lindström, K. and Mousavi, S. A. 2019. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314-1335.
- Liochev, S. I. and Fridovich, I. 2007. The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(10), 1465-1469.
- Liu, F. K., Lin, Y. Y. and Wu, C. H. 2005. Highly efficient approach for characterizing nanometer-sized gold particles by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 528(2), 249-254.
- Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A. and Zheng, C. C. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna*, 14(5), 836-843.
- Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J. and Fang, X. 2009. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Letters*, 9(3), 1007-1010.
- Liu, S. R., Zhou, J. J., Hu, C. G., Wei, C. L. and Zhang, J. Z. 2017. MicroRNA mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1801.
- Liu, Y., Xu, C., Zhu, Y., Zhang, L., Chen, T., Zhou, F., Chen, H. and Lin, Y. 2018. The calcium-dependent kinase OsCPK24 functions in cold stress responses in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(2), 173-188.
- López-Lorente, A. I., Simonet, B. M. and Valcárcel, M. 2011. Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(1), 58-71.
- Lu, X. Y. and Huang, X. L. 2008. Plant miRNAs and abiotic stress responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(3), 458-462.

- Lukatkin, A. S., Brazaityte, A., Bobinas, C. and Duchovskis, P. 2012. Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review. *Agriculture* 99(2), 111-124.
- Lundqvist, T. and Schneider, G. 1991. Crystal structure of activated ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase complexed with its substrate, ribulose-1,5-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12604-12611.
- Ma, Z., Huang, B., Xu, S., Chen, Y., Li, S. and Lin, S. 2015. Isolation of high-quality total RNA from chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). *PLoS One*, 10(6), e0130234.
- Maguire, M. E. and Cowan, J. A. 2002. Magnesium chemistry and biochemistry. *Biometals*, 15(3), 203.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139-158.
- Mahdavi, S., Jalali, M. and Afkhami, A. 2013. Heavy metals removal from aqueous solutions using TiO<sub>2</sub>, MgO, and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Chemical Engineering Communications*, 200(3), 448-470.
- Marković, J., Štrbanović, R., Cvetković, M., Anđelković, B. and Živković, B. 2009. Effects of growth stage on the mineral concentrations in alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf, stem and the whole plant. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5–6–2) 1225-1231.
- Massoumi, M., Krens, F. A., Visser, R. G. and De Klerk, G. J. M. 2017. Azacytidine and miR156 promote rooting in adult but not in juvenile *Arabidopsis* tissues. *Journal of Plant Physiology*, 208, 52-60.
- Mastinu, A., Bonini, S. A., Premoli, M., Maccarinelli, G., Mac, S. E., Zhang, L. L., Lucini, L. and Memo, M. 2021. Protective effects of *Gynostemma pentaphyllum* (var. *Ginpent*) against Lipopolysaccharide-Induced inflammation and motor alteration in mice. *Molecules*, 26(3), 570.
- Mattioli, R., Falasca, G., Sabatini, S., Altamura, M. M., Costantino, P. and 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.
- Mbarki, S., Skalicky, M., Vachova, P., Hajhashemi, S., Jouini, L., Zivcak, M., Tlustos, P., Brestic, M., Hejnak, V. and Zoghalmi, K.A. 2020. Comparing salt tolerance at seedling and germination stages in local populations of *Medicago ciliaris* L. to *Medicago intertexta* L. and *Medicago scutellata* L. *Plants*, 9(4), 526.
- Mbonyiriyuze, A., Zongo, S., Diallo, A., Bertrand, S., Minani, E., Yadav, L. L., Mwakikunga, B., Dhlamini, S. M. and Maaza, M. 2015. Titanium Dioxide Nanoparticles Biosynthesis for Dye Sensitized Solar Cells application: Review. *Physics and Materials Chemistry*, 3(1), 12-17.
- McKersie, B. D., Leshem, Y. A. Y., McKersie, B. D. and Leshem, Y. A. Y. 1994. Freezing stress. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*, 79-103.

- Mehne-Jakobs, B. 1995. Seasonal development of the photosynthetic performance of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) under magnesium deficiency, *Plant Soil*, 168, 255-261.
- Meier, D. and Lichtenthaler H. K. 1981. Ultrastructural development of chloroplasts in radish seedlings grown at high and low light conditions and in the presence of the herbicide bentazon. *Protoplasma* 107, 195–207.
- Mezni, M., Albouchi, A., Bizid, E. and Hamza, M. 2010. Minerals uptake, organic osmotica contents and water balance in *alfalfa* under salt stress. *Journal of Phytology*, 2(11), 1-12.
- Michaud, R., Lehman, W. F. and Rumbaugh, M. D. 1988. World Distribution and Historical Development. *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, 29, 25-91.
- Mikaili, P. and Shayegh, J. 2011. *Medicago sativa*: A Historical Ethnopharmacology and Etymological Study of the *Alfalfa*, *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 1(9), 614-618.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Misra, A. N., Sahu, S. M., Misra, M., Singh, P., Meera, I., Das, N., Kar, M. and Sahu, P. 1997. Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two rice cultivars. *Biologia Plantarum*, 39, 257–262.
- Mittal, A. K., Chisti, Y. and Banerjee, U. C. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346-356.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Møller, I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1), 561-591.
- Mutlu, S., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B. and Mete, E. 2016. Exogenous salicylic acid alleviates cold damage by regulating antioxidative system in two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 99-109.
- Narjala, A., Nair, A., Tirumalai, V., Hari Sundar, G. V. and Shivaprasad, P. V. 2020. A conserved sequence signature is essential for robust plant miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Research*, 48(6), 3103-3118.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J. P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 129(1), 185-195.
- Nayyar, H., Bains, T. S. and Kumar, S. 2005. Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany*, 54(3), 275-285.

- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S. and Khan, N. A. 2011. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mung bean cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 168(8), 807–815.
- Niazi, A., Iranbakhsh, A., Esmael Zadeh, M., Ebadi, M. and Oraghi Ardebili, Z. 2023. Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) influenced seed development, grain quality, and remobilization by affecting the transcription of microRNA 171 (miR171), miR156, NAM, and SUT genes in wheat (*Triticum aestivum*) a biological advantage and risk assessment study. *Protoplasma*, 260(3), 839-851.
- Nijalingappa, T. B., Veeraiah, M. K., Basavaraj, R. B., Darshan, G. P., Sharma, S. C. and Nagabhushana, H. 2019. Antimicrobial properties of green synthesis of MgO micro architectures via *Limonia acidissima* fruit extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 100991.
- Noman, A. and Aqeel, M. 2017. miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 10068-10082.
- Noman, A., Fahad, S., Aqeel, M., Ali, U., Anwar, S., Baloch, S. K. and Zainab, M. 2017. miRNAs: major modulators for crop growth and development under abiotic stresses. *Biotechnology Letters*, 39, 685-700.
- Norouzi, S. and Khademi, H. 2010. Ability of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to take up potassium from different micaceous minerals and consequent vermiculitization. *Plant and Soil*, 328(1-2), 83-93.
- Orvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F. and Dhindsa, R. S. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal*, 23(6), 785-794.
- Owusu Adjei, M., Zhou, X., Mao, M., Xue, Y., Liu, J., Hu, H., Luo, J., Zhang, H., Yang, W., Feng, L. and Ma, J. 2021. Magnesium Oxide nanoparticle effect on the growth, development, and microRNAs expression of *Ananas comosus* var. *bracteatus*. *Journal of Plant Interactions*, 16(1), 247-257.
- Ozkose, A. 2018. Effect of environment x cultivar interaction on protein and mineral contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in central Anatolia, Turkey. *Sains Malays*, 47(3), 551-562.
- Öktem, H. A., Eyidoğan, F., Demirba, D., Bayraç, A. T., Öz, M. T., Özgür, E. and Yücel, M. 2008. Antioxidant responses of lentil to cold and drought stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17, 15-21.
- Pal, L. S., Jana, U., Manna, K. P., Monahata, P. G. and Manavalan, R. 2011. Nanoparticle: an overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 228-234.
- Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S. and Esquivel, K. 2020. Nanoparticles in agroindustry: Applications, toxicity, challenges, and trends. *Nanomaterials*, 10(9), 1654.

- Park, J. Y., Lee, Y. J., Jun, K. W., Baeg, J. O. and Yim, D. J. 2006. Chemical synthesis and characterization of highly oil dispersed MgO nanoparticles. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 12(6), 882-887.
- Parmar, S., Gharat, S. A., Tagirasa, R., Chandra, T., Behera, L., Dash, S. K. and Shaw, B. P. 2020. Identification and expression analysis of miRNAs and elucidation of their role in salt tolerance in rice varieties susceptible and tolerant to salinity. *PloS One*, 15(4), e0230958.
- Parsons, J. G., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L. 2007. Use of plants in biotechnology: Synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants. *Developments in Environmental Science*, 5, 463-485.
- Patil, S. and Chandrasekaran, R. 2020. Biogenic nanoparticles: a comprehensive perspective in synthesis, characterization, application and its challenges. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18, 1-23.
- Pearce, R.S. 2001. Plant freezing and damage. *Annals of Botany*, 87(4), 417-424.
- Peltekova, V. D. and Broderick, G. A. 1996. In vitro ruminal degradation and synthesis of protein on fractions extracted from *alfalfa* hay and silage. *Journal of Dairy Science*, 79(4), 612-619.
- Penfield, S. 2008. Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist*, 179(3), 615–628.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L. and Poethig, R. S. 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Development*, 18(19), 2368-2379.
- Perezde-Luque, A. 2017. Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 12.
- Petrova, A., Plaksenkova, I., Kokina, I. and Jermaļonoka, M. 2021. Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and CuO Nanoparticles on morphology, genotoxicity, and miRNA expression on different barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. *The Scientific World Journal*, 2021, 1-11.
- Phillips, L. 2006. Food globalization. *Annual Review of Anthropology*, 35, 37-57.
- Pierce, J., Lorimer, G. H. and Reddy, G. S. 1986. Kinetic mechanism of ribulose biphosphate carboxylase: evidence for an ordered, sequential reaction. *Biochemistry*, 25(7), 1636-1644.
- Pirasteh-Anosheh, H. and 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.

- P-Singh, R., K-Shukla, V., S-Yadav, R., K-Sharma, P., K-Singh, P. and C-Pandey, A. 2011. Biological approach of zinc oxide nanoparticles formation and its characterization. *Advanced Materials Letters*, 2(4), 313-317.
- Puhakainen, T., Li, C., Boije-Malm, M., Kangasjarvi, J., Heino, P. and Palva, E. T. 2004. Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a c-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. *Plant Physiology*, 136(4), 4299–4307.
- Putnam, D. H. and Orlof, S. B. 2014. Forage crops, reference module in food science. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 381-405.
- Rab, A. and Saltveit, M. E. 1996. Differential chilling sensitivity in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 96(3), 375-382.
- Radovic, J., Sokolović, D. and Marković, J. 2009. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6-1), 465-475.
- Rajasekharreddy, P., Usha-Rani, P. and Sreedhar, B. 2010. Qualitative assessment of silver and gold nanoparticle synthesis in various plants: a photobiological approach. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1711-1721.
- Raliya, R., Tarafdar, J. C., Singh, S. K., Gautam, R., Choudhary, K., Maurino, V. G. and Saharan, V. 2014. MgO nanoparticles biosynthesis and its effect on chlorophyll contents in the leaves of clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 6(5), 538-545.
- Ramanujam, K. and Sundrarajan, M. 2014. Antibacterial effects of biosynthesized MgO nanoparticles using ethanolic fruit extract of emblica officinalis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 141, 296-300.
- Rao, M. L. and Savithramma, N. 2011. Biological synthesis of silver nanoparticles using *Svensonia Hyderabadensis* leaf extract and evaluation of their antimicrobial efficacy. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(3), 1117.
- Raskin, I. 1992. Role of Salicylic Acid in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), 439-463.
- Rasmusson, A. G., Soole, K. L. and Elthon, T. E. 2004. Alternative NAD (P) H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 23-39.
- Rasool, S., Singh, S., Hasanuzzaman, M., Rehman, M. U., Azooz, M. M., Lone, H. A. and Ahmad, P. 2014. Plant resistance under cold stress: metabolomics, proteomics, and genomic approaches. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. 79–98, Cambridge.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B. and Bartel, D. P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Development*, 16(13), 1616-1626.

- Rihan, H. Z., Al-Issawi, M. and Fuller, M. P. 2017. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 143-157.
- Rissler, H. M., Collakova, E., DellaPenna, D., Whelan, J. and Pogson, B. J. 2002. Chlorophyll biosynthesis. Expression of a second chl I gene of magnesium chelatase in *Arabidopsis* supports only limited chlorophyll synthesis. *Plant Physiology*, 128(2), 770-779.
- Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321–3338.
- Rodas-Junco, B. A., Racagni-Di-Palma, G. E., Canul Chan, M., Usorach, J. and Hernández-Sotomayor, S. M. T. 2021. Link between lipid second messengers and osmotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2658.
- Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K. and Yilmaz, M. D. 2019. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances*, 9(5), 2673-2702.
- Ruelland, E., Vaultier, M. N., Zachowski, A. and Hurry, V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research*, 49, 35–150.
- Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inzé, D. and Beemster, G.T.S. 2007. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiology*, 143(3), 1429-1438.
- Saghfi, S. and Eivazi, A. R. 2014. Effects of cold stress on proline and soluble carbohydrates in two chickpea cultivars. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 591-595.
- Sahu, G. K. and Sabat, S. C. 2011. Changes in growth, pigment content and antioxidants in the root and leaf tissues of wheat plants under the influence of exogenous salicylic acid. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23, 209-218.
- Saltveit, M. E. and Morris, L. L. 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops. *Chilling Injury of Horticultural Crops*, 3-15, Boca Raton.
- Sangwan, V., Örvar, B. L. and Dhindsa, R. S. 2002. Early events during low temperature signaling. In *Plant Cold Hardiness*, 43-53, Boston.
- Santarius, K. A. 1992. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiologia Plantarum*, 84(1), 87-93.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. and Estelle, M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 301–307.

- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Whang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M. and Doudna-Cate, J. E. 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 angstrom resolution. *Science*, 310(5749), 827-834.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Gök, G., Bekat, L. ve Leblebici, E. 2008. Tohumlu bitkiler sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, 116, 286 Basımevi Bornova- İzmir.
- Selye, H. 1936. A syndrome produced by various nucuous agents. *Nature*, 138(3479), 32–32.
- Semerci, A. ve Kurt, C. 2006. Türkiye’de yem bitkileri tarımının önemi, *Hasad Hayvancılık Dergisi*, 21, 42-49.
- Senbayram, M., Gransee, A., Wahle, W. and Thiel, H. 2015. Role of magnesium fertilisers in agriculture: plant-soil continuum. *Crop and Pasture Science*, 66(12), 1219-1229.
- Seo, S., Ishizuka, K. and Ohashi, Y. 1995. Induction of salicylic acid  $\beta$ -Glucosidasein tobacco leaves by exogenous salicylic acid. *Plant of Cell Physiology*, 36(3), 447-453.
- Sfakianaki, M., Sfichi, L. and Kotzabasis, K. 2006. The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(3), 181-188.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Shao, M. A., Jaleel, C. A. and Hong-mei, M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*, 331(6), 433-441.
- Shao, H., Chu, L., Abdul, C. and Zhao, C. X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331(3), 215-225.
- Sharma, A., Bhardwaj, R., Kumar, V., Zheng, V. and Tripathi, D. K. 2022. Managing plant stress using salicylic acid: Physiological and molecular aspects. *John Wiley Sons*, 14, 258-269.
- Sharma, P., Gautam, A., Kumar, V. and Guleria, P. 2022. MgO nanoparticles priming promoted the growth of black chickpea. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100435.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. and Pessaraki, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 217037.
- Shaul, O. 2002. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals*, 15, 307-321.
- Shenvi, C. L., Dong, K. C., Friedman, E. M., Hanson, J. A. and Cate, J. H. D. 2005. Accessibility of 18S rRNA in human 40S subunits and 80S ribosomes at

- physiological magnesium ion concentrations – implications for the study of ribosome dynamics. *RNA*, 11(12), 1898-1908.
- Shin, H., Min, K. and Arora, R. 2018. Exogenous salicylic acid improves freezing tolerance of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Cryobiology*, 81, 192-200.
- Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, R. M., Khare, T. S. and Wani, S. H. 2016. MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 817.
- Shu, Y., Liu, Y., Li, W., Song, L., Zhang, J. and Guo, C. 2016. Genome-wide investigation of microRNAs and their targets in response to freezing stress in *Medicago sativa* L., based on high-throughput sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(3), 755-765.
- Shukla, V. K., Singh, R. P. and Pandey, A. C. 2010. Black pepper assisted biomimetic synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 507(1), L13-L16.
- Shultze, M. and Kondorosi, A. 1998. Regulation of Symbiotic Root Nodule Development. *Annual Review of Genetic*, 32(1), 33-57.
- Singh, S. and Rawat, P. S. 2021. Nutraceuticals: an approach towards safe and effective medications. In *Treating endocrine and metabolic disorders with herbal medicines*. IGI Global, 278–297.
- Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. *Environment and plant metabolism: Flexibility and Acclimation*, 243-317.
- Soliman, M. H., Alayafi, A. A., El Kelish, A. A. and Abu-Elsaoud, A. M. 2018. Acetylsalicylic acid enhance tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. to chilling stress, improving photosynthesis, antioxidants and expression of cold stress responsive genes. *Botanical Studies*, 59(1), 1-17.
- Song, Y., Jiang, M., Zhang, H. and Li, R. 2021. Zinc oxide nanoparticles alleviate chilling stress in rice (*Oryza Sativa* L.) by regulating antioxidative system and chilling response transcription factors. *Molecules*, 26(8), 2196.
- Song, Y., Lv, J., Ma, Z. and Dong, W. 2019. The mechanism of alfalfa (*Medicago sativa* L.) response to abiotic stress. *Plant Growth Regulation*, 29, 239–249.
- Soni, V., Raizada, P., Singh, P., Cuong, H. N. Rangabhashiyam, S., Saini, A., Saini, R. V., Van, Le. Q., Kumar- Nadda. A., Le, T. T. and Nguyen. V. H. 2021. Sustainable and green trends in using plant extracts for the synthesis of biogenic metal nanoparticles toward environmental and pharmaceutical advances: A review. *Environmental Research*, 202, 111622.
- Soto-Alvaredo, J., Montes-Bayón, M. and Bettmer, J. 2013. Speciation of silver nanoparticles and silver (I) by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICPMS. *Analytical Chemistry*, 85(3), 1316-1321.

- Sperrazza, J. M. and Spremulli, L. L. 1983. Quantitation of cation binding to wheat germ ribosomes: Influences on submit association equilibria and ribosome activity. *Nucleic Acids Research*, 11(9), 2665-2679.
- Steinhorst, L. and Kudla, J. 2014. Signaling in cells and organisms - calcium holds the line. *Current Opinion in Plant Biology*, 22, 14-21.
- Štengl, V., Bakardjieva, S., Maříková, M., Bezdička, P. and Šubrt, J. 2003. Magnesium oxide nanoparticles prepared by ultrasound enhanced hydrolysis of Mg-alkoxides. *Materials Letters*, 57(24-25), 3998-4003.
- Strand, Å., Hurry, V., Gustafsson, P. and Gardeström, P. 1997. Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *The Plant Journal*, 12(3), 605-614.
- Sunkar, R. and Zhu, J. K. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2001–2019.
- Suzuki, N and Mittler, R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 45-51.
- Sweetlove, L. J., and Foyer, C. H. 2004. Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. In *Plant Mitochondria: From Genome to Function* 307-320, Netherlands.
- Szabados, L. and Savouré, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Tabande, L., Sepehri, M., Yasrebi, J., Zarei, M., Ghasemi-Fasaee, R. and Khatabi, B. 2022. A comparison between the function of *Serendipita indica* and *Sinorhizobium meliloti* in modulating the toxicity of zinc oxide nanoparticles in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental. Science and Pollution Research*, 29, 8790–8803.
- Tambussi, E. A., Bartoli, C. G., Guiamet, J. J., Beltrano, J. and Araus, J. L. 2004. Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Science*, 167(1), 19-26.
- Tan, M. and Yolcu, H. 2021. Current status of forage crops cultivation and strategies for the future in Turkey: A Review. *Journal of Agricultural Sciences*, 27(2), 114-121.
- Tang, Z. X. and Lv, B. F. 2014. MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31, 591-601.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A. and Job, D. 2009. Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *The Plant Journal*, 60(5), 795-804.

- Taşgın, E., Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu, B. 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, 41, 231-236.
- Taurian, O. E., Springborg, M. and Christensen, N. E. 1985. Self-consistent electronic structures of MgO and SrO. *Solid State Communications*, 55(4), 351-355.
- Tester, M. and Davenport, R. 2003. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503-527.
- Thomashow, M. F. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology*, 118(1), 1-8.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 571-599.
- Turan, Ö. and Ekmekçi, Y. 2011. Activities of photosystem II and antioxidant enzymes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars exposed to chilling temperatures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 67-78.
- Turan, Ö. ve Ekmekçi, Y. 2008. Soğuk stresinin bitkiler üzerine etkileri ve tolerans mekanizmaları. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(2), 177-198.
- Uemura, M. and Steponkus, P. L. 1999. Cold acclimation in plants: relation between lipid composition and cryostability of the plasma membrane, *Journal of Plant Research*, 112(2), 245-254.
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A. and Kawamura, Y. 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures, *Physiologia Plantarum*, 126(1), 81-89.
- Umaralikhhan, L and Jamal Mohamed Jaffar, M. 2018. Green synthesis of MgO nanoparticles and its antibacterial activity. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42, 477-485.
- Uslu, Ö. S. ve Kaya, M. 2021. Yonca (*Medicago sativa* L.) Yem bitkilerinin kraliçesi. İKSAD Publishing House, I. Basım, 128, Ankara.
- Uzunova, A. N. and Popova, L. P. 2000. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica*, 38(2), 243-250.
- Vágújfalvi, A., Kerepesi, I., Galiba, G., Tischner, T. and Sutka, J. 1999. Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. *Plant Science*, 144(2), 85-92.
- Vassey, T. L. and Sharkey, T. D. 1989. Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. *Plant Physiology*, 89(4), 1066-1070.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C. and Crété, P. 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Molecular Cell*, 16(1), 69-79.

- Vendemiatti, E., Zsögön, A., e Silva, G. F. F., de Jesus, F. A., Cutri, L., Figueiredo, C. R. F., Tanaka, F. A. O., Nogueira, F. T. S. and Peres, L. E. P. 2017. Loss of type-IV glandular trichomes is a heterochronic trait in tomato and can be reverted by promoting juvenility. *Plant Science*, 259, 35-47.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. 2013. Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant and Soil*, 368, 87-99.
- Verdier, J., Kakar, K., Gallardo, K., Le Signor, C., Aubert, G., Schlereth, A., Town, CD., Udvardi, MK. and Thompson, R.D. 2008. Gene expression profiling of *M. 100 truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legüme seed filling. *Plant Molecular Biology*, 67(6), 567-580.
- Vernieri, P., Lenzi, A., Figaro, M., Tognoni, F. and Pardossi, A. 2001. How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress. *Journal of Experimental Botany*, 52(364), 2199-2206.
- Véron, O., Blondeau, J. P., Meneses, D. D. S. and Vignolle, C. A. 2013. Characterization of silver or copper nanoparticles embedded in Soda-lime glass after a staining process. *Surface and Coatings Technology*, 227, 48-57.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A. and Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177–206.
- Wan, S. B., Tian, L., Tian, R. R., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Wen, P. F., Chen, J. Y., Zang, P., Wang, W. and Huang, W. D. 2009. Involvement of phospholipase D in the low temperature acclimation-induced thermotolerance in grape berry. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 504-510.
- Wang, A., Li, J., Al-Huqail, A. A., Al-Harbi, M. S., Ali, E. F., Wang, J., Ding, Z., Rekaby, S. A., Ghoneim, A. M. and Eissa, M. A. 2021. Mechanisms of chitosan nanoparticles in the regulation of cold dtress resistance in banana plants. *Nanomaterials*, 11(10), 2670.
- Wang, C. Y. 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *Hortscience*, 17(2), 173-186.
- Wang, F., Wang, E. T., Wu, L. J., Sui, X. H., Jr, Y. L. and Chen, W. X. 2011. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *International Journal of Systematic and Evololutionary Microbiology*, 61(11), 2582–2588.
- Wang, X., Li, W., Li, M. and Welti, R., 2006. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures, *Physiologia Plantarum*, 126(1), 90-96.
- Wang, Z., Wang, Y., Kohalmi, S. E., Amyot, L. and Hannoufa, A. 2016. Squamosa promoter binding protein-like 2 controls floral organ development and plant fertility by activating asymmetric leaves 2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 92, 661-674.

- Wani, S. H., Kumar, V., Khare, T., Tripathi, P., Shah, T., Ramakrishna, C., Aglawe, S. and Mangrauthia, S. K. 2020. miRNA applications for engineering abiotic stress tolerance in plants. *Biologia*, 75, 1063-1081.
- Wassie, M., Zhang, W., Zhang, Q., Ji, K., Cao, L. and Chen, L. 2020. Exogenous salicylic acid ameliorates heat stress-induced damages and improves growth and photosynthetic efficiency in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 110206.
- Wei, L., Zhang, D., Xiang, F. and 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.
- Weiss, R. L. and Morris, D. R. 1973. Cations and ribosome structure. I. Effects on the 30S subunit of substituting polyamines for magnesium ion. *Biochemistry*, 12(3), 435-441.
- Xiao, L., Wang, S., Yang, D., Zou, Z. and Li, J. 2019. Physiological Effects of MgO and ZnO Nanoparticles on the *Citrus maxima*. *Journal of Wuhan University of Technology- Materials Science Education*, 34(1), 243–253.
- Xie, K., Wu, C. and Xiong, L. 2006. Genomic organization, differential expression, and interaction of squamosa promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant Physiology*, 142(1), 280-293.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A. and Carrington, J. C. 2005. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12984-12989.
- Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M. Y., Earley, K. W., Wu, G., Yang, L. and Poethig, R. S. 2016. Developmental functions of miR156-regulated Squamosa promoter binding protein-like (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 12(8), e1006263.
- Xue, X., Liu, A. and Hua, X. 2009. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. *BMB Reports*, 42(1), 28-34.
- Yadav, S. K. 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(3), 515-527.
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. A. and Raskin, I. 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated *tobacco*. *Plant Physiology*, 103(2), 315-321.
- Yang, G. H., Yang, L. T., Jiang, H. X., Li, Y., Wang, P. and Chen, L. S. 2012. Physiological impacts of magnesium-deficiency in Citrus seedlings: photosynthesis, antioxidant system and carbohydrates. *Trees*, 26, 1237-1250.
- Yang, H. M., Zhang, J. H. and Zhang, X. Y. 2005. Regulation mechanisms of stomatal oscillation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(10), 1159-1172.

- Yang, T., Wang, Y., Teotia, S., Wang, Z., Shi, C., Sun, H., Gu, Y., Zhang, Z. and Tang, G. 2019. The interaction between miR160 and miR165/166 in the control of leaf development and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 9(1), 2832.
- Yılmaz, S. ve Ozan, T. S. 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4), 252-256.
- Yokoi, S., Bressan, R. A. and Hasegawa, P. M. 2002. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*, 23(1), 25-33.
- Yolcu, H. ve Tan, M. 2008. Ülkemiz yem bitkileri tarımına genel bir bakış. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 14(3), 303-312.
- Yong, Z., Hao-Ru, T. and Ya, L. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(4), 458-462.
- Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38, 171-186.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y. and Poethig, R. S. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Development*, 19(18), 2164-2175.
- Yu, J. C., Xu, A., Zhang, L., Song, R. and Wu, L. 2004. Synthesis and characterization of porous magnesium hydroxide and oxide nanoplates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(1), 64-70.
- Yun, J. G., Hayashi, T., Yazawa, S., Katoh, T. and Yasuda, Y. 1996. Acute morphological changes of palisade cells of *Saintpaulia* leaves induced by a rapid temperature drop. *Journal of Plant Research*, 109, 339-342.
- Zeng, Q. Y., Yang, C. Y., Ma, Q. B., Li, X. P., Dong, W. W. and Nian, H. 2012. Identification of wild soybean miRNAs and their target genes responsive to aluminum stress. *BMC Plant Biology*, 12(1), 1-16.
- Zhang, F., Jiang, Y., Bai, L., Zhang, L., Chen, L., Li, H., Yin, Y., Yan, W., Yi, Y. and Guo, Z. 2011. The ICE-CBF-COR pathway in cold acclimation and AFPs in Plants. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8(2), 493-498.
- Zhang, F., Liu, M., Li, Y., Che, Y. and Xiao, Y. 2019. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, biochar and cadmium on the yield and element uptake of *Medicago sativa*. *Science Total Environment*, 655, 1150-1158.
- Zhang, J., Zhou, M., Zhou, H., Zhao, D., Gotor, C., Romero, L. C., Shen, J., Ge, Z., Zhang, Z., Shen, W., Yuan, X. and Xie, Y. 2021. Hydrogen sulfide, a signaling molecule in plant stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 146-160.
- Zhang, X., Zou, Z., Zhang, J., Zhang, Y., Han, Q., Hu, T., Xu, X., Liu, H., Li, H. and Ye, Z. 2011. Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple

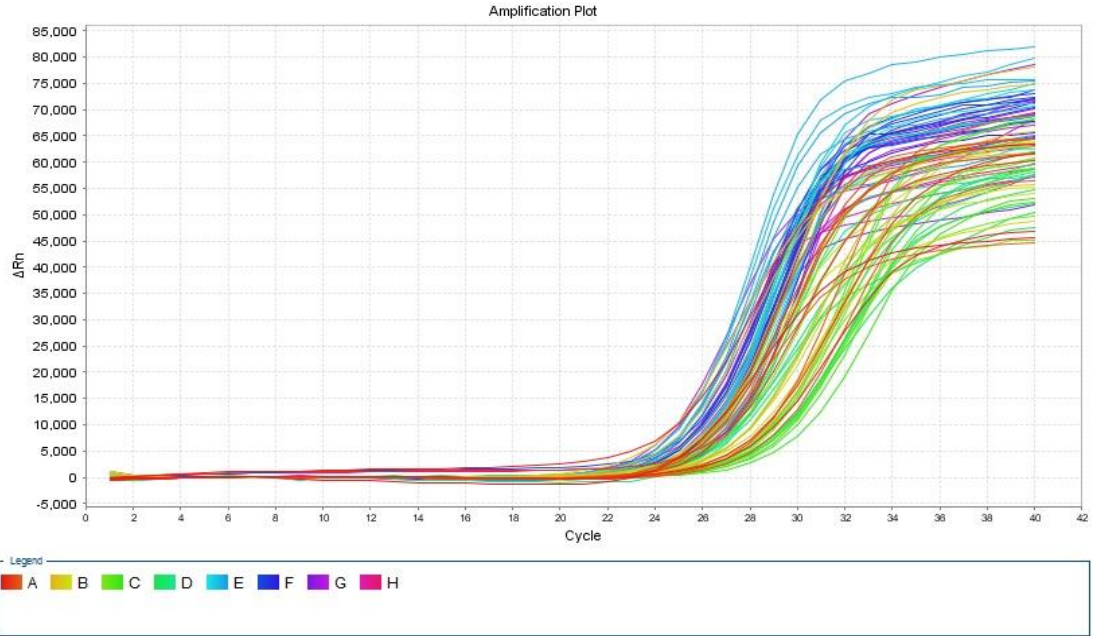
vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. FEBS letters, 585(2),435-439.

- Zhou, M. and Tang, W. 2019. MicroRNA156 amplifies transcription factor-associated cold stress tolerance in plant cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 294, 379-393.
- Zhou, Z. S., Guo, K., Elbaz, A. A. and Yang, Z. M. 2009. Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. *Environmental Experimental Botany*, 65(1), 27-34.
- Zhou, Z. S., Huang, S. Q. and Yang, Z. M. 2008. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(3), 538-542.
- Zhou, Z. S., Song, J. B. and Yang, Z. M. 2012. Genome-wide identification of Brassica napus microRNAs and their targets in response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*, 63(12), 4597-4613.
- Zhu, P. J., Song, Q. Q., Tan, Q. L., Cheng, Q., Li, J. H., Pang, X. H. and Long, S. 2021. Bioinformatics analysis of microRNAs and prediction of target genes associated with cold tolerance in sugarcane. *Guangxi Subtropical Plants Research Institute*, 42(11), 1840-1853.

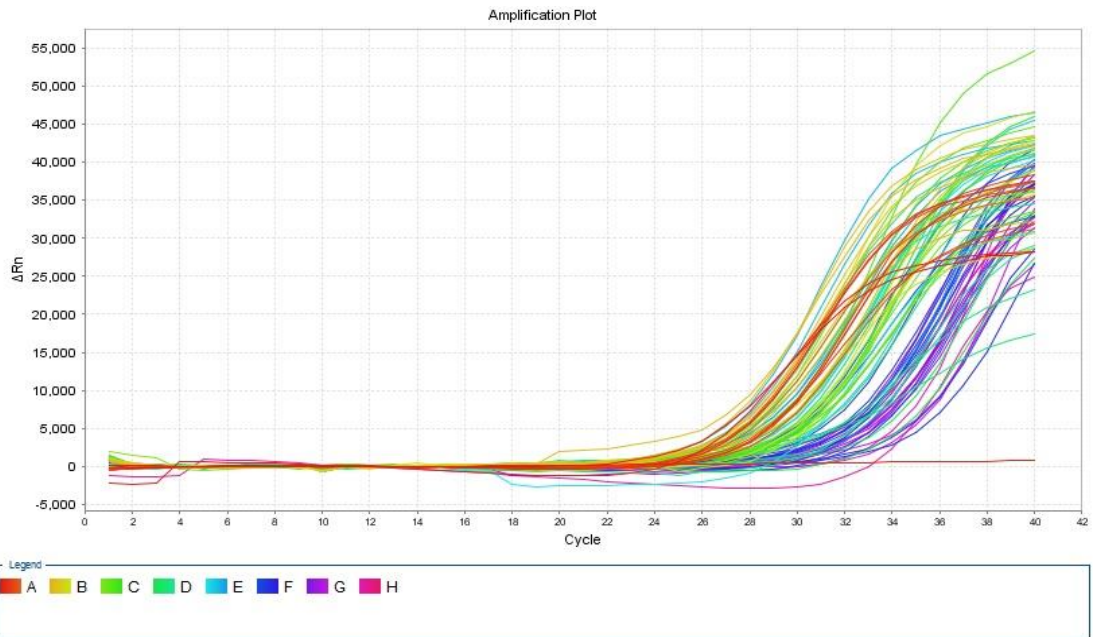
# EKLER

## EK-1 miRNA amplifikasyonu grafikleri

### U6



### mtr-miR156a



# ath-miR173-5p

