



**YONCA (*Medicago sativa* L.) GENOTİPLERİNDE *İN VİTRO*
ŞARTLARDA ÇEŞİTLİ NANOPARTİKÜLLERİN TUZ
STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma BÖKE

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

**2021
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YONCA (*Medicago sativa* L.) GENOTİPLERİNDE
İN VİTRO ŞARTLARDA ÇEŞİTLİ NANOPARTİKÜLLERİN TUZ STRESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma BÖKE

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2021

Her hakkı saklıdır

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

**YONCA (*Medicago sativa* L.) GENOTİPLERİNDE *İN VİTRO* ŞARTLARDA
ÇEŞİTLİ NANOPARTİKÜLLERİN TUZ STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU danışmanlığında, Fatma BÖKE tarafından hazırlanan bu çalışma 07 / 01 / 2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile** kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Özlem BARIŞ *İmza* :

Üye : Dr. Öğr.Üyesi Ayşenur YAZICI *İmza* :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması tarafından nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

07 / 01 / 2021

Fatma BÖKE

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YONCA (*Medicago sativa* L.) GENOTİPLERİNDE *İN VİTRO* ŞARTLARDA ÇEŞİTLİ NANOPARTİKÜLLERİN TUZ STRESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Fatma BÖKE

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Tuz stresi, bitki gelişimi kısıtlayan faktörlerden birisidir. *Medicago sativa* L., besin kalitesi en yüksek baklagillerden olup uzun ve köklü bir tarihe sahiptir. Bu çalışmada yonca kallusları (*Muş* ve *Erzurum*) ve embriyogenik kallusların oluşumunda kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması (0,8 ppm CaO, 0,8 ppm ZnO ve 0,8 ppm CuO) kullanarak ve kallus oluşum sonrası nanopartiküller kullanılarak iki hafta boyunca tuz stresi (50 mM) altında etkileri araştırılmıştır. Analiz sonuçlarına bakıldığı zaman tuz stresi altında hücreye en çok hasar tohumdan itibaren gelmeyen nanopartiküller olduğu sonucuna varılmıştır ayrıca alınan Taramalı Elektron Mikroskopu ve Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop görüntüleri bu sonucu desteklemektedir. Kallusların Malondialdehit, H₂O₂ ve Peroksidaz sonuçlarında hücreye en az hasar veren ve en çok hasar veren nanopartiküllerin farklı olduğu görülmüştür. Genotiplerin protein miktarları karşılaştırıldığı zaman sonuçlar da kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 0,8 ppm CuO 50 mM NaCl konsantrasyonu, hücrede en az protein miktarı kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulanan 0,8 ppm CuO olduğu görülmüştür. Ayrıca Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop görüntülerinde nanopartiküllerin hücrelerde ne kadar biriktiği görülmüştür.

2021, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler: Yonca, Nanopartikül, Tuz stresi, Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop, Taramalı Elektron Mikroskopu

ABSTRACT

MS. Thesis

THE EFFECTS OF VARIOUS NANOPARTICULES ON SALT STRESS IN YONCA (*Medicago sativa* L.) GENOTYPES IN VITRO CONDITIONS

Fatma BÖKE

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ismail BEZIRGANOGLU

Salt stress is one of the factors that restrict plant growth. *Medicago sativa* L. is one of the legumes with the highest nutritional quality and has a long and long history. In this study, in the formation of alfalfa calluses (Muş and Erzurum) and embryogenic calluses, using nanoparticle application (0.8 ppm CaO, 0.8 ppm ZnO and 0.8 ppm CuO) before callus formation and using nanoparticles after callus formation for two weeks (50 mM), its effects have been investigated. When looking at the analysis results, it was concluded that the most damage to the cell under salt stress is the nanoparticles that do not come from the seed, and the Scanning Electron Microscope and Confocal Laser Scanning Microscope images taken support this result. The results of Malondialdehyde, H₂O₂ and Peroxidase of the calluses showed that the nanoparticles that caused the least damage and the most damage to the cell were different. When the protein amounts of the genotypes were compared, the results showed that the concentration of 0.8 ppm CuO 50 mM NaCl applied with nanoparticle before callus formation, and the least amount of protein in the cell was 0.8 ppm CuO applied to the nanoparticle after callus formation. In addition, the accumulation of nanoparticles in the cells was seen in Confocal Laser Scanning Microscope images.

2021, 72 page

Keywords: *Medicago sativa* L., Nanoparticle, Salt stress, Confocal Laser Scanning Microscope, Scanning Electron Microscope

TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisansüstü eğitimim süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Beyza REİSOĞLU, Serap KARAMAN, Büşra YAZICILAR, Merve ŞİMŞEK ve Büşra ALBAYRAK' a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan, maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen başta annem Fisun BÖKE olmak üzere bütün aileme sonsuz teşekkür ederim.

Fatma BÖKE

Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Medicago sativa</i> ssp <i>sativa</i> L.(Adi yonca).....	1
1.2.Stres Faktörleri	2
1.2.1. Tuz Stresi	2
1.2.2. Kuraklık Stresi	3
1.2.3. Sıcaklık Stresi	4
1.2.4. Ağır Metal Stresi	4
1.3. Nanoteknoloji.....	5
1.3.1. Nanopartiküller	7
1.3.1.2. Altın Nanopartikülleri (Au NPs).....	9
1.3.1.3 Bakır Nanopartikülleri (Cu NPs)	10
1.3.1.4 Çinko Tabanlı Nanopartiküller (ZnO,ZnS NPs)	11
1.3.1.5 Gümüş Nanopartikülleri (Ag NPs)	12
1.3.1.6 Kalsiyum Nanopartikülleri (CaCO ₃ NPs)	13
1.3.1.7 Titanyum Nanopartikülleri (TiO ₂ NPs).....	13
1.3.2 Nanopartiküller ile Bitkilerin Etkileşimi.....	14
1.3.3 Nanopartiküllerin Bitkiler Tarafından Alınması.....	14
1.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Yararlanılan Cihazlar	23
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	23
3.3. Bitki Materyali ve Kallus Oluşumu	24

3.4. Oluşan Kalluslara Nanopartikül ve Tuz Stresi Uygulanması	24
3.5. Malondialdehit (MDA)	25
3.6. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	25
3.7. Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi	25
3.8. Mikrotonal ile Kesit Alınması	26
3.9. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Görüntü Alınması (CLSM)	26
3.10. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntü Alınması	26
3.11. İstatistiksel Analiz	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	27
5.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	52
EKLER.....	68
EK 1.....	68
EK 2.....	68
EK 3.....	69
EK 4.....	69
EK 5.....	70
EK 6.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
mL	Mililitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
M	Molar
ppm	Milyonda bir
mM	Milimolar
g	Yerçekimi İvmesi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektrofotometre
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik Asit
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
2,4 D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
LPO	Lipid Peroksidasyon
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NaCl	Sodyum Klorür
TBA	Tiobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

CaO	Kalsiyum Oksit
CuO	Bakır Oksit
ZnO	Çinko Oksit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
CLSM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Doğal ve sentetik nanopartikül boyutları.....	8
Şekil 1.2 Nanopartiküllerin bitkiye giriş yolları.....	15
Şekil 4.1 MDA analiz sonuçları	27
Şekil 4.2 H ₂ O ₂ analiz sonuçları	29
Şekil 4.3 POD analiz sonuçları	31
Şekil 4.4 Protein miktarı analiz sonuçları	33
Şekil 4.5a Birinci hafta <i>Muş</i> genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri.....	35
Şekil 4.5b Birinci hafta <i>Muş</i> genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri.....	36
Şekil 4.6a İkinci hafta <i>Muş</i> genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri.....	37
Şekil 4.6b İkinci hafta <i>Muş</i> genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri	38
Şekil 4.7a Birinci hafta <i>Erzurum</i> genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri.....	39
Şekil 4.7b Birinci hafta <i>Erzurum</i> genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri.....	40
Şekil 4.8a İkinci hafta <i>Erzurum</i> genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri.....	41
Şekil 4.8b İkinci hafta <i>Erzurum</i> genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında yaralanılan cihazlar ve modelleri	23
Çizelge 4.1 12 farklı nanopartikül ve tuz stresi muamelesinin MDA oranındaki değişikliği	28
Çizelge 4.2 12 farklı nanopartikül ve tuz stresi muamelesinin H ₂ O ₂ oranındaki değişikliği	30
Çizelge 4.3 12 farklı nanopartikül ve tuz stresi muamelesinin POD oranındaki değişikliği	32
Çizelge 4.4 12 farklı nanopartikül ve tuz stresi muamelesinin protein oranındaki değişikliği	34

1. GİRİŞ

1.1. *Medicago sativa ssp sativa* L. (Adi Yonca)

Yonca, “*Alfalfa*” kelimesinden türetilmiş Arapça olarak “en iyi at yemi” anlamına gelmektedir. İlk kültüre alınan besin kalitesi en yüksek baklagillerden olan yemlerin kraliçesi yonca (*Medicago sativa ssp sativa* L.), uzun ve köklü bir tarihe sahiptir. Yonca (*Medicago sativa*), *Medicago* cinsine ait *Fabaceae* familyasının *Faboideae* alt familyasına aittir. *M. sativa*, Türkiye, Türkmenistan, İran ve Kafkasya bölgelerinin yakınlarında kültüre alınmıştır (Michaud et al. 1988). Yonca ile ilgili en eski yazılı kaynak Putnam ve ark. (2001) tarafından, Türkiye'de bulunmuştur ve MÖ 1300'lere ait olduğu bildirilmiştir. Yoncanın en eski arkeolojik kanıtları İran'da bulunmuştur ve 6000 yıldan daha eski tarihe dayandığı tahmin edilmektedir. Yoncanın iki farklı orijin merkezi bulunmaktadır (Michaud et al. 1988; Sinskaya 1959). İlk merkezi Küçük Asya, Trans-Kafkasya ve İran'ın bazı bölgeleri, ikinci merkezi Orta Asya'dır. Asya, Trans-Kafkasya ve İran'da bulunan yonca bitkisi, soğuk stres faktörlerine dayanıklı genotiplere sahipken; Orta Asya yoncası, kuraklık ve hastalıklara toleransları düşük genotiplere sahiptir. Yonca orijin merkezlerinden dünyanın diğer bölgelerine dağılmıştır.

Yoncanın dünyadaki üretim alanı 1980'lerde 32 milyon hektara kadar ulaşmıştır (Michaud et al. 1988). Yonca, total protein miktarı %17 ile 21 arasında değişmektedir (Arinze et al. 2003). Yoncada yaygın olarak bulunan vitaminler A, B1, B2, B3, B5, B7, B9, D, E ve K'dır (Norouzi and Khademi 2010). Ayrıca, fosfor, potasyum, kalsiyum, klor, bakır ve magnezyum gibi mineraller bakımından da zengindir (Mezni et al. 2010).

Yüksek verim kapasitesine sahip yem bitkisi olan yonca, adaptasyon uyumu iyi olan topraklarda toprak erozyonunun engellenmesi ve haşere direncini en aza indirmesi açısından sürdürülebilir tarım sisteminde önemli rol oynamaktadır (Huggins et al. 2001). Baklagil grubunda olan yonca, çeşitli bakteri türleri (*Sinorhizobium meliloti*) ile simbiyotik bir yaşam sürdürerek azot fiksasyonunu gerçekleştirmektedir ve böylece toprak verimliliğini arttırmaktadır (Sumberg et al. 1983; Putnam et al. 2001). Ayrıca,

1. GİRİŞ

bal arılarının çiçeklenme esnasında yonca tarlalarını sık sık ziyaret etmesinden dolayı yonca bitkisi bal üretiminde de önemli rol oynamaktadır (Putnam et al. 2001).

Yonca fizyolojik özellikleri açısından ele alındığında 1,5 metre boyuna ve 12 metreye kadar uzanan güçlü, derin kök sistemine sahiptir (Putnam et al. 2001), bu özellikler sayesinde yonca, kurak bölgelerde oldukça dayanıklıdır. Yonca, kendine tozlaşabilme özelliğine sahip yem bitkisidir.

Yoncanın tozlaşmayı sağlayan faktörler; arılar (bal arıları (*Apis mellifera*), yaprak kesici arılar (*Megachile rotundata*), bombus arısı (*Bombus spp.*) ve alkali arılar (*Nomia melander*)), rüzgar ve yağmur gibi doğa olaylarıdır.

1.2 Stres faktörleri

Çevresel koşullardaki farklılıklar bitkilerin büyümesinde ya da gelişmesinde değişikliklere sebep olmaktadır. Çevre koşullarındaki farklılıklar stres olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerde stres faktörleri abiyotik ve biyotik stres faktörleri olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Abiyotik stres faktörleri sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, çeşitli kimyasallar, soğuk (üşüme-donma), radyasyon, su fazlalığı, oksidatif stres, topraktaki besin yetersizliği ve rüzgar gibi çevresel faktörler iken biyotik stres faktörleri ise virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcek ve herbivorlardır (Mahajan and Tuteja 2005).

1.2.1 Tuz stresi

Tuz stresi, gıda ürünlerine olan taleplerdeki azalmaya neden olan önemli bir stres faktörüdür. Dünya genelinde ekili olan alanların %20'sinden fazlası tuz stresinden etkilenmektedir ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır. Bitki türlerinin çoğu aşırı tuza dayanamazlar bu nedenle tuzluluk, dünya genelinde ürün verimliliğini azaltan en ölümcül çevresel faktörlerden birisidir (Flowers et al. 2004; Munns et al. 2008).

Tuz stresi, stresin süresi ve şiddetine bağlı olarak çeşitli fizyolojik ve metabolik süreçlerdeki değişiklikleri içerir ve sonuçta ürün verimliliğini azaltır (James et al. 2011;

1. GİRİŞ

Rozema et al. 2008). Bitkiler tuz stresine maruz kaldığı anda ilk olarak kök sistemlerinin su emebilme kapasitesi azalır ve bitkilerdeki yüksek tuz birikiminin ozmotik stresi sebebiyle yapraklardan su kaybı artar. Daha sonra bitkilerde ROS salınımı, besin dengesizliği, antioksidan enzimlerde farklılıklar ve fotosentetik aktivitede azalma gibi çeşitli fizyolojik değişikliklere sebep olur (Munns et al. 2008; Rahnama et al. 2010).

Tuz stresinin en zararlı etkilerinden birisi yüksek Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının birikimidir. Hem Na⁺ hem de Cl⁻ iyonlarının hücreye girmesiyle hücre içerisinde ciddi iyon dengesizliğine sebep olur ve hücreye fazla alınmaları durumunda önemli fizyolojik bozukluklara sebep olabilir. Yüksek Na⁺ konsantrasyonu, düşük üretkenlik ve hatta ölüme sebep olabilecek büyüme ve gelişme için gerekli bir etmen olan K⁺ iyonlarının alınımını engellemektedir (James et al. 2011). Tuzluluğa bağlı olarak ROS'lerin oluşumu lipid, protein, DNA gibi hücresel bileşenlerde hasara yol açabilmekte ve bitkilerin hayati fonksiyonlarını sekteye uğratabilmektedir. Tuzluluk toleransının şiddeti bitki türüne ve tür içindeki çeşide göre farklılık gösterir. Tuz stresine en dayanıklı bitki çeşitleri Arpa (*Hordeum vulgare*), pirinç (*Oryza sativa*) ve buğday (*Triticum aestivum*)'dır.

1.2.2 Kuraklık stresi

Kuraklık, Dünyada özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde, bitkiler için önemli bir stres faktörüdür (Madhava et al. 2006). Küresel iklim değişiklikleri dünya üzerinde kuraklık stresini tetikleyen en önemli faktördür (Mishra et al. 2011; Rana et al. 2013). Küresel ısınmanın yanı sıra, suyun topraktan buharlaşmasına sebep olan birçok faktörlerde kuraklığa neden olmuştur. Bu faktörler bitkilerden kaynaklanan su kayıplarını arttırmıştır ve daha sonra bitkilerin su stresine maruz kalmasına sebep olmuştur (Shao et al. 2008; Mafakheri et al.2010; Dai 2012; Salehi et al. 2012; Trenberth et al. 2014). Kuraklığın uzunluğu, şiddeti ve toprak yapısı bitkilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, ekolojik ve moleküler değişikliklerine neden olmaktadır (Shao et al. 2008; Farooq et al. 2009; Bhargava et al. 2013). Ayrıca bitkilerin büyümesi, verimi ve kalitesi üzerinde önemli derecede azalışına neden olmaktadır (Jaleel et al. 2009; Zlatev et al. 2012; Nezhadahmadi et al. 2013).

1.2.3 Sıcaklık stresi

Aşırı sıcaklık dünya genelinde verimde önemli düşümlere neden olmaktadır. Sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerin tepkilerini düzenleyen mekanizmaları bulmak için çok kapsamlı araştırmalar yapılmasına rağmen aydınlatıcı bilgiler henüz keşfedilmemiştir. Aşırı sıcaklığın yanında düşük sıcaklığa karşı bitkilerin tepkileri araştırılmıştır. Bitkiler, yüksek sıcaklık stresi altında büyüme ve gelişmesinde geri dönüşü olmayan hasarlarla karşı karşıya oldukları bildirilmiştir (Wahid 2007). Bunun yanı sıra, soğuk stresinde bitki dokularında buz kristalleri oluşmaya başlar ve bitki dokularında hasarlara neden olmaktadır (Hasanuzzaman et al. 2013).

Bilim insanları yüksek sıcaklığa maruz kalan bitkilerde gen ifadesinde, Ca^{+2} iyonlarında, bitki hormon sinyallerinde ve nitrik oksit (NO) dahil olmak üzere çeşitli yolların stresi en az hasarla kurtarmaya çalıştığını gözlemlemişlerdir (Katano et al. 2018). Düşük sıcaklıkla ilgili araştırmalar sonucunda elde edilen bulgular da, soğuk strese karşı NO tarafından tetiklenen ROS'ların görev aldığı görülmüştür (Zhang et al. 2019).

1.2.4 Ağır metal stresi

Ağır metaller, atom kütlesi 20'den büyük ve yoğunluğu $5g/cm^{-3}$ 'den yüksek doğada çözünmeyen, kalıcı inorganik kimyasallar içeren insanlar, bitkiler ve hayvanlar üzerinde sitotoksik, mutajenik ve genotoksik etkilere sahiptir (Flora et al. 2008; Wuana et al. 2011). Sanayileşmenin artışı, yoğun tarım, nüfus artışı, doğal kaynakların tahribi ve kirlilik oranında artış ağır metal stresine neden olmaktadır. (Nagajyoti et al. 2010; Ali et al. 2013).

Temel elementler, enzim ve proteinlerin yapısında önemli rol oynar. Bitkilerin büyümesi ve gelişimi için küçük miktarlarda gereklidir. Bitkiler hem yer yüzeyinden hem de toprak altından ağır metal alabilmektedir (Patra et al. 2004). Bitkiler belirli oranın üzerinde ağır metal aldıklarında normal fonksiyonlarını engeller, protein yapılarının bozulması veya protein yapı taşlarının yer değiştirmesi, fotosentez, solunum aktiviteleri, sitoplazmik zar bütünlülüğünün bozulması gibi metabolik süreçlere neden

olmaktadır (Hall et al. 2002). Ayrıca, serbest radikaller bitki dengesini bozarak oksidatif strese neden olmaktadır. Bu durum sonucunda, iyon kaçağı, oksidatif DNA hasarı, hücre zarının denatüre edilip programlı hücre ölümüne neden olmaktadır (Nagajyoti et al. 2010; Flora et al. 2008; Rascio et al. 2011; Rellan Alvarez et al. 2006; Sharma et al. 2012).

1.3 Nanoteknoloji

Bilim ve teknoloji yaşam koşullarının elde edilmesine öncülük eden önemli faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsanlık tarihine bakıldığı zaman bilginin büyük bir önem arz ettiği ayrıca yeni bilgiler keşfetme, yeni yöntemlerle doğayı daha iyi tanıma ve yaşam standartlarını yükseltme isteği insanların devamlı arayış içerisinde olduğu bir konudur.

Mevcut olan üretim yöntemleri ve ürünler üzerinde insan refahını artırıcı yönde yeni stratejiler, üretim biçimleri, kullanım olanakları ve yöntem teknikleri geliştirme yoluyla teknolojinin ilerlemesi, teknolojik gelişme olarak adlandırılır (Bal 2007). Bu gelişmeler içerisinde 21. Yüzyılın teknoloji devrimi olarak gösterilen nanoteknoloji, insanların refah seviyelerini artırıp ülkelerinde söz sahibi olmasından önemli katkı sunabilecek bir teknoloji dalı olarak görülür.

Nano kelimesinin kökeni Yunancadan gelir ve cüce anlamından kullanılır. Bilimsel olarak kullanıldığında herhangi bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamını taşır (Tegart, 2003). Nanometre ise metrenin milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir (10^{-9} m). Ne kadar küçük olduğunu anlamak için bir nanometre içerisine yan yana sadece 2 ya da 3 atom dizilebilmesi ve insan saçı telinin çapının yaklaşık 100.000 nm olması örnek verilebilir (Turkan 2015). Nanoteknoloji, 1-100 nm arasındaki fiziksel, kimyasal, biyolojik yapıların anlaşılması, kontrol edilmesi ve atom seviyesinde değişiklikler yaparak fonksiyonel hale getirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Singh 2006). Nanoteknoloji kullanılarak sadece çalışabilen değil, iş görebilen, makro dünyada olmayan niteliklere sahip araç gereçlerin üretilmesi ve kullanılması amaçlanmakta olup, 10 yılı aşkın süredir dünyadaki ülkelerin askeri, bilim ve teknoloji stratejilerini belirler duruma gelmiştir (Turkan 2015). Maddeleri nanometre seviyesinde işleyip ortaya

1. GİRİŞ

çıkarılan değişik özellikler kullanılarak, yeni teknolojik nano boyutunda aygıtlar ve malzemeler yapmak mümkün hale gelmiştir. Örneğin, atomik kuvvet mikroskopları kullanılarak yüzey üzerinde atomları iterek birbirlerinden ayırmak ve istediğimiz şekilde dizmek olası hale gelmiştir. Bu şekildeki gelişmeler, 19. yy'da dünyayı yeniden yapılandıran sanayi devrimine eşdeğer bir bilimsel ve teknolojik devrimi başlatmıştır. Bütün bu çalışmalar ve gelişmeler fizik, kimya, biyoloji, malzeme bilimi, eczacılık bilimi, tıp, tarım ve uzay gibi alanları ortak bir paydada buluşturmuştur. Önümüzdeki yıllarda nanoteknoloji kullanılarak, insan vücudunda hastalıklı dokuyu bulabilen ve iyileştiren nanorobotlar bulunabilecek, fabrikalardan çıkan dumanları önleyen nanoparçacıklar sayesinde hava kirliliği azalacak, nanoparçacık kapsüllenmiş gübreleri kullanarak tarımsal verimliliğin artırılması, böcek zararlarına dirençli çeşitler geliştirilmesi için bitkilerde nanoparçacık aracılı gen transferi ve farklı sensörlerin hazırlanması için nanomateryal kullanımı gibi faydalar sağlayacaktır (Demirkıran 2019).

Nanoteknoloji çoğu zaman insanlara fizik bilimini hatırlatmaktadır. Malzemelerin yapışma, sürtünme, hidrofobik, hidrofilik özellikleri nanometre boyutundaki en üst tabakaların kimyasal kompozisyonu ve morfolojisi ile belirlenir. Bundan dolayı yüzey özelliklerinin kontrollü ve akıllı şekilde kullanılması da tahmin edildiği gibi nanoteknolojiden geçmektedir (Tarhan ve ark. 2010).

Nanoteknoloji uygulamaları denilince akla ilk olarak, pahalı ve yüksek teknoloji gerektiren yüksek sıcaklık, vakum ihtiyaç duyulan aletler, nano boyutta litografi yapan cihazlar gelmektedir. Oysa ki doğada örneklerine bakıldığı zaman birçok tepkime ve malzeme üretimi oda sıcaklığında, normal şartlarda ya da sulu ortamda gerçekleşmektedir. Lotus yaprağı ya da balina derisi örneklerinde gördüğümüz gibi doğadaki canlıların yüzey özelliklerini uygun şartlarda kolay ve hızlı şekilde kontrol edebilmektedirler. Örneğin; lotus yaprağının yüzeyinde bulunan mikron ve nano boyuttaki çukur ve tepecikli yapılar sayesinde yapraklar ıslanmaz hale gelir ve kendi kendini temizleyebilmektedir (Turkay 2015). Nano bilimle uğraşan insanlar lotus bitkisinin bu özelliğini taklit ederek kumaş, boyaların ve pek çok yüzeyin hem kuru hem de kendi kendini temizleme özelliği kazanabilmesi için yeni yöntemler geliştirmektedirler.

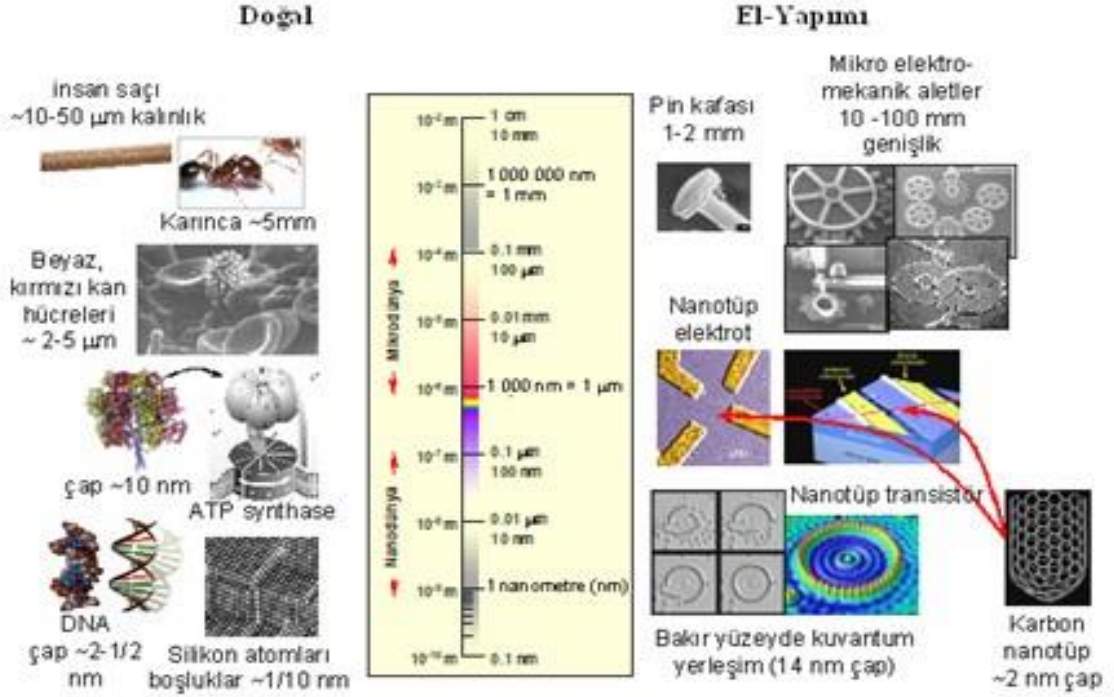
Nanoteknolojinin gelişmesiyle nanopartiküllerin de birçok alanda kullanılabilmesi düşüncesi ortaya çıkmıştır. Tarımsal nanoteknolojide kullanılabilmesi de araştırma konularından biri olmuştur. Tarımsal nanoteknolojideki çalışma odakları genellikle verim arttırma, az ilaç kullanımı, kontrollü salınım ve strese dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi alanlarındadır. Bu alanda yapılan çalışmalardan bazıları olumlu sonuç vermiş fakat nanoteknolojinin tarımda kullanılmaya başlanması için çok daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Hangi nanopartikülün kullanılması gerektiğine karar verilmesi uzun süreçler alan bir konudur. Günümüzdeki nanopartiküller, biyosensörler, optik, enerji depolama ve ilaç sanayisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Haverkamp et al. 2009; Rai et al. 2012a; Rai et al. 2012b; Yu et al. 2015).

Nanopartiküller doğa olayları ile oluşabildiklerinden dolayı doğada her zaman bulunabilmektedirler. Bundan dolayı canlılar her zaman nanopartiküllere maruz kalmaktadır. Normal şartlar altında canlıların maruz kaldıkları konsantrasyon miktarı düşüktür, fakat sanayinin gelişmesi ve nanopartiküllerin birçok alanda kullanılmaya başlanmasıyla birlikte doğaya salınan nanopartikül miktarlarında önemli ölçüde artışlar meydana gelmiştir. Bu yüzden nanopartiküllerin canlılar üzerindeki etkilerini araştıran çalışmaların her geçen gün değeri artmaktadır. Son zamanlarda nanopartiküllerin canlılar üzerindeki etkisini araştıran çalışmacılar bu etkilerin yararlı ve zararlı yönlerini bulmayı hedeflemişlerdir (Haverkamp et al. 2009; Khan et al. 2019).

1.3.1 Nanopartiküller

Nanobilim, nanoteknoloji, nanopartikül ve nanoyapı sadece araştırmalarda değil de günlük hayatta da sıklıkla kullanılan kelimeler haline gelmiştir. 10 yıl öncesine kadar, boyuta bağlı kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı nanopartiküller ile çalışılmaktaydı. Günümüzde ise, nanopartiküller ticari uygulama alanlarında da kullanılmaya başlanmıştır (Sharmaa 2001).

Nanopartiküller, boyutları 10-100 nm arasında değişebilen, çözünmüş, hapsedilmiş ya da absorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salabilen katı veya kolloidal partiküllerdir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Doğal ve Sentetik Nanopartikül Boyutları (Mamalis, 2007)

Nanoteknolojinin temelini 100 nm ve altında kalan boyutlar olarak isimlendirilen nanopartiküller oluşturmaktadır (Miller et al. 2004; Rao et al. 2005). Nanopartiküllerin ilgi görmesinin sebepleri; yüzey atomlarının eşsiz karakterleri, yüksek yüzey/hacim oranı, kuantum boyut etkileri şeklinde sıralanabilmektedir (Liveri, 2006).

Nanopartiküllerin sentezi için birçok yöntem olmakla birlikte genel olarak çevre dostu yollar tercih edilmektedir. Araştırmacılar nanopartikül sentezi için bakteri, maya, yüksek bitkiler, aktinomisetler ve virüsler gibi çeşitli biyolojik canlıları çok fazla kullanmaktadırlar, çünkü nanopartikül sentezi için tuzları karşılık gelen nanoparçacıkları indirgeyebilme özelliğine sahiptir. Nanopartikül sentezi için çeşitli biyolojik kaynaklar kullanılmış ve aynı zamanda da hassas tarım için de kullanılmıştır (Bansal et al. 2014). Kullanılan nanopartiküllerden bazıları şöyledir: Gümüş nanopartikülleri, titanyum nanopartikülleri, çinko nanopartikülleri (Landa et al. 2012; Beykaya ve ark. 2016).

1.3.1.2 Altın Nanopartikülleri (Au NPs)

Kolloidal yapıya sahip nanopartiküller kırmızı (küresel partiküller) ya da mor/mavi (daha büyük küresel partiküller) renktedirler. Kolloidal özellik bütünüyle şekil ve boyuta bağlıdır. Örneğin, çubuk benzeri nanoparçacıklar hem enine hem boyuna, küresel nanoparçacıklar enine emme pikine sahiptirler. Altın nanopartiküller ilaç salınımı, tümörlerin tespit edilmesi, gen terapisi, fototermal terapi ve hidrojen sülfür gibi toksik gazların tespiti gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Altın nanopartiküllerinin fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak sentezlenmesi çok fazla toksisiteye neden olduğu için bilim insanlarının dikkatini daha yeşil sentetik yöntemlere yönelmeleri gerektiğini düşündürmüştür (Kumari et al. 2009; Chee et al. 2015).

Bitkiler, altın iyonlarından oluşan altın nanopartikülleri azaltmak için önemli rol oynayan polifenoller, terpenoidler, flavonoidler, alkaloidler, askorbik asit, kinonlar, sitrik asit gibi birçok biyoaktif bileşiklere sahiptir. Bu bileşikler bir kavrama ajanı olarak işlev görürler ve böylece çözeltiler içinde partikülleri çok fazla toplanmadan dengede tutmaktadırlar.

Olea europea (zeytin) yaprak ekstraktları, sarı renkli altının koyu pembeye dönüşümü ile işaretli altın nanopartikül sentezi için kullanılmıştır. FTIR bandı, etkin stabilizasyon için nanopartiküllerin yüzeyinde –OH grubu, bir amino ve ketonik grup varlığında doğrulanmıştır (Khalil et al. 2012). Ayrıca, altın nanopartikülleri de *Mangifera indica* (mango) yapraklarından da sentezlenmiştir. FTIR sonuçları, nanopartikül yüzeyinin azaltılması ve kaplatılması için flavonoidler, terpenler ve tiamin gibi suda çözünür bileşiklerin rol oynadığını doğrulamıştır (Philip 2010). *Citrus maxima* (pomela) meyve ekstraktları da altın nanopartikül sentezi için kullanılmıştır. Ayrıca 535 nm'de SPR pikine sahip olduğu analiz edilmiştir. Ekstrakta bulunan flavonoidler, terpenler ve vitaminler hem azaltıcı hem de kaplayıcı madde olarak işlev gördüğü sonucuna varmışlardır (Yu et al. 2016).

1.3.1.3 Bakır Nanopartikülleri (Cu NPs)

Bakır nanopartikülleri katalitik, optik, elektronik ve antifungal/ antibakteriyel kapasite gibi çoklu özellikleri sebebiyle diğer metal parçacıklara göre araştırmacılar için ilgi odağı olmuştur. Antibakteriyel özelliklere odaklanan nanopartiküller tıp, cihazlar, su arıtma, gıda işleme gibi alanlarda uygulanabilmektedir. Bakır nanopartiküllerin antibakteriyel aktivitesi, metal iyonlarının salınmasından ziyade mikrobiyal membranlarla yakın etkileşime girebildiklerinden dolayı yüksek yüzey/hacim oranlarına ve küçük boyutlarına dayandırılabilir (Ramyadevi et al. 2012).

Bakır nanopartikül sentezinde kimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır fakat bazı sentez protokolleri sırasında toksik reaktiflerin kullanımı kaçınılmazdır ve büyük bir dezavantaj sağlamaktadır. Çünkü metal nanopartikülleri insanların temas alanlarına yoğun olarak uygulanmaktadır. Bu durum çevre dostu sentez protokollerinin gelişmesini arttırmaktadır. Mikroorganizmalar, enzimler, bitkiler ve özütleri kullanılarak biyolojik nanopartikül sentez yöntemleri çevre dostu alternatifler olarak kullanılabilir (Lee et al. 2011). Bitkilerin ve ekstraktlarının kullanımı hızlı, çevre dostu, ekonomik ve ayrıca üretilen nanopartiküllerin daha kararlı ve çeşitli boyutlarda olması araştırmacıları adeta büyülemiştir. Araştırmacılar bakır nanopartikül sentezi için bitki dokusunu ve bitki özütlerini yoğun olarak kullanmaktadır (Shobha et al. 2014).

Bakır nanopartikülleri biyolojik yöntemlerle sentezlenmiş ve karakterize edilmesi için farklı analizler yapılmıştır. Lee ve arkadaşları, *Magnolia kobus* (Kobuşu manolyası) bitkisinden bakır nanopartiküllerinin sentezi için bitkinin sulu ekstraktını kullanmıştır ve nanopartikül yapılarını HR-TEM ve SEM ile analiz etmiştir (Lee et al. 2011). Ortamda bulunan bakır nanopartikülleri steril lateks köpük ile kaplanıp antibakteriyel aktivite için analiz yapılmıştır.

Ocimum sanctum (Kutsal fesleğen) Hindistan'da tıbbi bir bitki olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bitkinin alkaloidler, tanenler, glikozitler, saponinler ve aromatik bileşikler gibi yüksek miktarda biyomolekül nedeniyle bakır nanopartikülü

sentezi için uygun bir biyo-indirgeme bileşikleri ve stabilizatör kaynağı olduğu kanıtlanmıştır (Shobha et al. 2014).

1.3.1.4 Çinko Tabanlı Nanopartiküller (ZnO, ZnS NPs)

Çinko eksikliği en sık görülen mikro besin problemidir (Takkar et al. 1993). Kalsiyum karbonatlı topraklarda bitkilerin çinko kullanımını sınırlayan parametreler çinko çözünürlüğünü azaltan alkalın pH ve çinko emebilen/çöktürebilen yüksek kalsiyum karbonat içeriğidir (Alloway 2009; Rashid et al. 2004). Çinko oksitler, çinko sülfatlar topraklarda çinko eksikliğini düzeltmek için yaygın olarak çinko gübrelere kullanılmaktadır (Mortvedt 1992). Bununla birlikte, çinkonun bitkilerde bulunmaması sebebiyle gübre olarak uygulamaları sınırlı kalmaktadır. Çinko oksit nanopartikülleri, dökme olarak mevcut mikron veya mililitre boyutunda çinko parçacıklarına göre daha yüksek reaktiviteleri nedeniyle bitkilere daha çözünür ve mevcut çinko formu sağlayarak bu sorunun üstesinden gelebilmektedir.

Çinko oksit nanopartikülleri kimyasal ve biyolojik yöntemlerle sentezlenebilmektedirler. Kimyasal yöntemler toksik kimyasallar gerektirdiğinden, biyolojik yöntemler popüler hale gelmektedir. Çinko oksit nanopartikül sentezi bitkilerden elde edildiği zaman uygun maliyetli ve çevre dostu olmaktadır (Li et al 2011).

Çinko oksit nanopartiküllerin çinko gübrelere olarak kullanılması, kalsiyum karbonatlı topraklarda çinko çözünmesini ve biyoyararlanımını artırabilmektedir. Çözünmüş çinkonun difüzyonu, çinkonun çözünme sürecini takiben gübreyle bitki köklerine hareketinin ana mekanizmasıdır (Gangloff et al. 2006). Çinko oksit nanopartikülleri, büyük çinko partiküllerine göre çok daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterir, çünkü 100 nm'den daha küçük boyutlar ve nanopartiküllerin yüksek yüzey/hacim oranı bakterilerle daha iyi etkileşime izin vermektedir (Xie et al. 2011). Çinko oksit nanopartikülleri, hücrenin antioksidatif kapasitesi aşıldığında hücre ölümüne yol açabilen ROS oluşumunu indüklemeye yeteneğine sahiptir. Çinko sülfat nanopartikülleri buğdayda serbest ROS oluşumunu indüklediği, artan malondialdehit ve

düşük seviyelerde azaltılmış glutasyon ve azalmış klorofil içeriği ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Panda et al. 2003; Aarti et al. 2006).

1.3.1.5 Gümüş Nanopartikülleri (Ag NPs)

Gümüş nanopartiküller yüksek bir yüzey alanına ve yüzey atomlarının bir kısmına sahiptir. Bu da sonuç olarak dökme gümüş ile karşılaştırıldığında yüksek antimikrobiyal özelliğe sahip olmasını sağlamaktadır (Cho et al. 2005). Gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal özelliği, geniş bir yelpazedeki insan patojenlerine karşı kullanılmıştır (Morones et al. 2005; Oves et al. 2013). Bununla birlikte, mahsullerin korunması için tam potansiyel halen araştırılmaktadır. Bu nedenle, gümüş nanopartiküllerin bitki hastalıklarının yönetimi için antimikrobiyal özelliklerden yararlanma konusunda araştırmacılar tarafından sürekli artan bir ilgiyi doğurmaktadır (Mishra et al. 2014).

Gümüş nanopartikülleri bitkilerin fizyokimyasal özelliklerini ve metabolik yollarını değiştirse de altta yatan mekanizmalar ve spesifik yollar belirsizliğini korumaktadır. Gümüş nanopartiküllerin bitki hücrelerinde genotoksik olduğu gösterilmiştir (Kumari et al. 2009). Çünkü gümüş nanopartiküllere maruz kalma kromozomal anomalilerine ve soğandaki hücre bölünmesinin bozulmasına neden olmuştur (Kumari et al. 2009). Gümüş nanopartikülleri bitkilerde DNA hasarını indükleyerek kromatin köprüleri, çoklu kromozomal kırılmalar ve metafaz bozulmalarına neden olabilmektedir (Panda et al.2011).

qRT-PCR ile *Arabidopsis* model bitkisinin gen ekspresyon analizleri gümüş nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki tepkilerinin moleküler mekanizmalarına yeni bakış açıları sağlamıştır. Gümüş nanopartiküllerine maruz bırakılan *Arabidopsis* bitkilerinin transkripsiyonel yanıtı, bütün genom cDNA ekspresyon mikrodizileri kullanılarak analiz edilmiştir (Kaveh et al. 2013).

1.3.1.6 Kalsiyum Nanopartikülleri (CaCO₃ NPs)

Kalsiyum (Ca) elementi, yapısal ve sinyal görevleri olan önemli bir makrobesindir. Kalsiyum birçok biyotik aktivitede ikincil bir mesajcı olarak işlev görür. Sinyaller kalsiyum iyon kanallarından iletilir, bitkiler içsel ve çevresel uyarıları algılayıp bunlara tepki verirler (Jammes et al. 2011). Hücre içerisindeki kalsiyum iyonları, gen ekspresyonu ve hücre döngüsü kontrolünde önemlidir.

Kalsiyum karbonat (CaCO₃) kozmetik, seramik ve katalizör gibi birçok yerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, mikroorganizmaların kontrolü için inorganik antimikrobiyal malzeme olarakta uygulanabilmektedir. CaO kimyasal yapılarına dayanarak, periyodik cetveldeki alkalın toprak grubunda yer almaktadır (Ngamcharussrivichai et al. 2011; Roy et al. 2011). Diğer taraftan, Endonezya'da yetişen tropik bitkilerin zengin biyolojik çeşitliliği ile ilgili olarak, CaO biyosentezi için ekstraktların kullanımı veya tropikal biyokütle kullanımı, CaO biyosentezi için çevre dostu ve daha verimli bir yöntem sebebiyle bilimsel bir zorluk doğuracaktır (Ramli et al. 2019).

1.3.1.7 Titanyum Nanopartikülleri (TiO₂)

Titanyum sert, korozyona dayanıklı bir metaldir. Bileşiği titanyum dioksit, pigmentlerin üretiminde bir fotokatalizör olarak kullanılmaktadır (Sang et al. 2014). Titanyum dioksit nanopartikülleri beyaz renklidir ve UV absorpsiyon özellikleri kristal yapısına ve boyutuna bağlıdır. Titanyum, bitkilerde büyümeyi ve fotosentez oranını teşvik ederek daha fazla karbonhidrat üretimini uyarmaktadır (Owolade et al. 2008; Chen et al. 2014). Yapılan araştırmalar sonucunda titanyum oksit pestisitlerin parçalanması için fotokatalitik aktivite göstermiştir (Peleaz et al. 2012). Titanyum dioksitin fotokatalitik özelliği toksik ve tehlikeli bileşikler oluşturmadığı için büyük patojen dezenfeksiyon verimliliğine sahip olması sebebiyle bitki koruma uygulamalarında kullanılabilir. Bilim insanları, titanyum dioksit ince filmlerin fitopatojenik dezenfeksiyon verimliliğini boya katkısı ve diğer uygun yöntemlerle geliştirmeyi amaçlamışlardır (Yao et al. 2009).

Titanyum dioksit nanopartikülleri dünyada en çok kullanılan 10 nanopartikül çeşidinden bir tanesidir. Kozmetik, boya sanayisi, güneş pilleri, inşaat alanı gibi yerlerde yılda yaklaşık 10.000 ton titanyum dioksit nanopartikülleri kullanılmaktadır (Liu et al. 2014).

1.3.2 Nanopartiküller ile Bitkilerin Etkileşimleri

Nanopartiküllerin toksik etkilerinin ana bitki fizyolojik indeksleri çimlenme yüzdesi, yaprak sayısı, biyokütle ve kök uzamasıdır (Lee et al. 2010). Nanopartiküllerin yüksek dozu, tohum çimlenmesinde azalma ve bitki uzamasının baskılanması gibi önemli olumsuz etkilere sebep olabilmekte ve hatta bitki ölümlerine yol açabilmektedir. Önceden yapılan birçok bitki nanotoksosite çalışması, soya fasulyesi, mısır, çavdar, arpa gibi bitkilerin nanopartiküllere maruz bırakılarak inhibisyonu belirlenmiştir; tohum çimlenmesi, sürgün uzunluğu ve gen ekspresyonu gibi bitki büyümesinin çeşitli yönleri etkilenmiştir (Dimkpa et al. 2012; El-Temseh and Joner 2012; Riahi Madvar et al. 2012; Yan et al. 2013; Ghosh et al. 2015).

Buğday bitkileri bir kum matrisinde yetiştirildiğinde, bakır oksit nanopartiküller büyümelerini inhibe etmiştir ve köklerin yapısını değiştirmiştir (Dimkpa et al. 2012; Tang et al. 2016). Shaw ve Hossain (2013) bakır oksit nanopartiküllerinin *Arabidopsis* fidelerinin taze ağırlıklarını ve kök uzunluğunu, pirinç tohumlarının çimlenme oranını ve biyokütlesini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Yapılan araştırmalarda, titanyum dioksit nanopartikülleri toplam klorofil miktarını ve katalaz aktivitesini arttırdığı ve yapraklarda askorbat peroksidaz aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak nanopartikül çeşitleri bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerine hem arttırıcı hem de engelleyici etkileri olduğu belirlenmiştir (Yang et al. 2017).

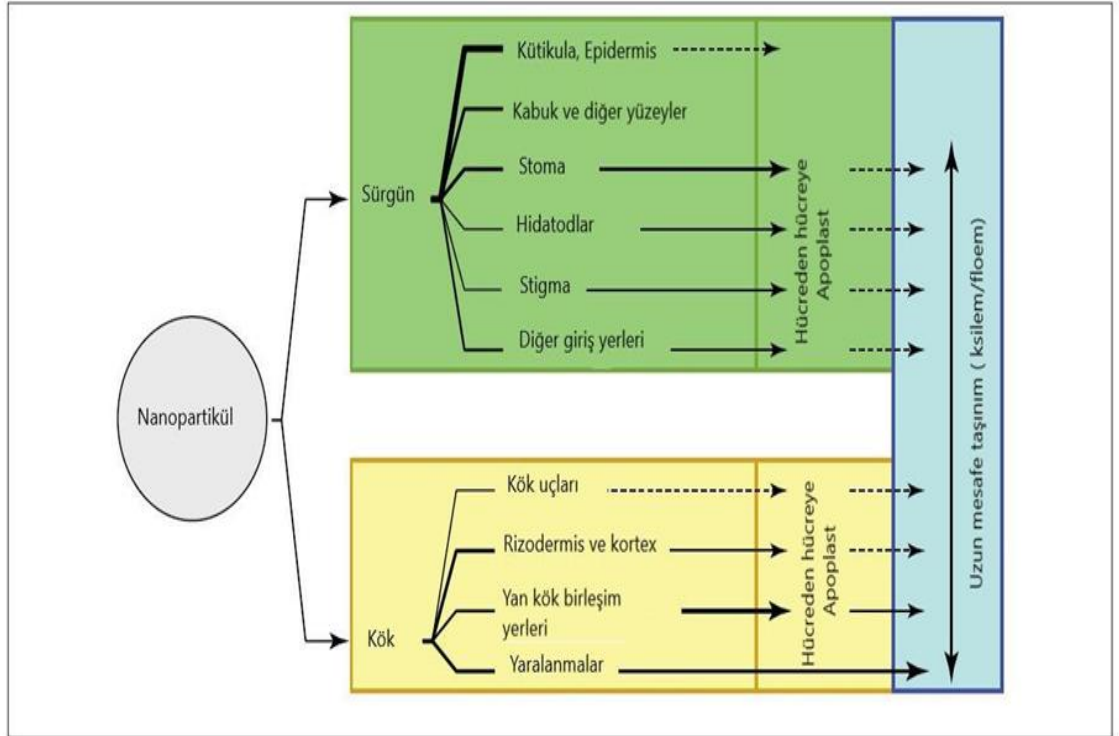
1.3.3 Nanopartiküllerin Bitkiler Tarafından Alınması

Bitkisel nanoteknoloji alanı, nanopartikül maruziyetine cevap olarak bitkinin fonksiyonel biyolojisini çok daha iyi anlaşılması bakımından karmaşık süreçleri ve mekanizmaları incelemek için yeni bir keşif çağına girmiştir. Yapılan deney sonuçları,

1. GİRİŞ

nanopartikül ile muamele edilmiş bitkilerde, nanopartikülleri taşımak için simplastik yolun baskın ve yüksek düzeyde bir yol olduğunu göstermektedir. Çok sayıda taşıyıcı protein, aquaporinler, endositoz yolu, birbirine bağlı iyon kanalları ya da gözenekler nanopartiküllerin bitki içerisine girişini kolaylaştırdığı gösterilmiştir. (Shukla and Kole 2016).

Bitki yüzeylerinde mikro ve nano boyutlu yüzeylerce açıklık vardır ve nanopartiküller bitkilerin yüzeylerinde birikerek bu açıklıktan içeriye girmektedirler. (Şekil 1.2) Genel olarak bitkilerin sürgün yüzeyleri geniş olduğu için daha fazla nanopartiküllerle etkileşime girmekte ve absorbe etmektedirler. Bunun yanı sıra yüzeylerdeki trikoma yapıları nanopartiküllerin birikmesini arttırabilmektedir (Dietz and Herth 2011). Nanopartiküller genel olarak bitkilerin hücre duvarı, hücre zarı ve sitoplazmada birikmelerine rağmen nadir de olsa plastidler, çekirdek ve küçük veziküllerde de birikebilmektedirler (Shukla and Kole 2016). Nanopartiküllerin bitkilerde hücre içerisine girmesi için bitki hücre duvarını geçmesi gerekmektedir. Hücre duvarındaki por açıklıkları genellikle 3 ila 5 nm arasında olduğundan dolayı 5 nm'den daha küçük olan nanopartiküller porlardan geçebilmektedir (Shukla and Kole 2016).



Şekil 1.2. Nanopartiküllerin bitkiye giriş yolları (Dietz and Herth 2011)

Nanopartiküllerin bitkiye girişini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bitkinin yüzey alanı, nanopartiküllerin boyutu ve kimyasal özellikleri bunlardan sadece birkaç tanesidir. Meyveler, yapraklar, epiderma hücrelerinin dış yüzeyi genellikle kütikula ile kaplıdır. Küçük ve lipofilik nanopartiküller kütikula tabakasının sıvı kısımlarından absorbe edilebilmektedirler (Schreiber 2010). Daha büyük olan nanopartiküller ise hidatod, stoma ve stigma gibi kütikula tabakası olmayan bölgelerden girebilmektedirler.

Bitki ksilemi nanopartiküllerin emilmesi ve taşınması için floem ve stoma açıklığıyla birlikte en çok tercih edilen dokudur (Shukla and Kole 2016).

1.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Elektron mikroskobu görüntü oluşturmak için elektronları kullanan bir mikroskop çeşididir. Elektron mikroskobu yüksek büyütme özelliğine sahip, görüntü kalitesi 2-23 angstrom arasındadır (Benjamin and Raymond 1978; Bozzola and Russell 1998; Wagner 2000). İlk elektron mikroskobu Knoll ve Ruska tarafından Almanya'da geliştirilmiştir (Bozzola et al. 1998; Marton 1968; Peven et al. 1985). Elektron mikroskobunun Taramalı (SEM) ve Geçirimli (TEM) olmak üzere iki çeşidi vardır.

TEM, bitki hücresi organellerinin yapısı, işlevi, protoplastların polietilen glikol kaynaklı füzyonunun incelenmesi gibi temel çalışmalar için önemlidir. SEM'de elektron ışını, hazırlanmış olan örneklerin yüzeyini tarar. Elektronlar, yüzeydeki atomlar ile etkileşime girer ve bir dedektör yardımıyla ışının yüzeyle etkileşimi sırasında üretilen sinyali alır. Bundan dolayı SEM, sağlam olan hücre, doku ve organların dış morfolojisini incelemek için önemlidir. Maksimum olarak büyütme yaklaşık 100.000'dir (Everhart and Hayes 1972).

SEM biyolojik botanik, sitoloji, tıp, madde bilimi ve yeryüzü bilimlerinden elde edilen örneklerin yüzey yapılarını görüntüler ve yüzeyde meydana gelen değişiklikleri değerlendirir (Benjamin and Raymond 1978; Bozzola and Russell 1998; Hayat 1978; Joel 1999; Wagner 2000). Sonuçta üç boyutlu bir görüntü elde edilir. Gün geçtikçe geliştirilen özelliklerle SEM, ışık mikroskobuna göre 300 kat daha çok odaklama

1. GİRİŞ

derinliği ve 20 ile 100.000 arasında net gösterebilme oranına sahiptir (Bozzola and Russell 1998; Hayat 1978; Joel 1999).

Bu çalışmanın amacı iki farklı yonca genotipi(*Erzurum* ve *Muş*) kullanılarak *in vitro* şartlarda 50 mM tuz stresi seviyesinde 0.8 ppm CaO, CuO ve ZnO nanopartikül uygulamalarının embriyogenik kallus gelişimleri üzerine etkilerini ve enzim aktivite değişimlerini ile ilgili parametreleri belirlemektir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nanfei Xu et al. (1992), Yonca somatik embriyolarının gelişimi sırasında meydana gelen morfolojik değişiklikleri araştırmak için taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Embriyolar kallustan başlatılmış, süspansiyon kültürüne aktarılmış ve katı agar ortamında olgunlaştırılmıştır. Bu gelişimsel model, ovuloda gelişen zigotik embriyolarla karşılaştırılmıştır. Somatik embriyolar, süspansiyon kültürüne yerleştirilen kallus doku parçaları içinde farklı ön embriyolar olarak başlamıştır. Katı agar ortamında küresel ve kalp şekli haline gelmiş ve daha sonra kotiledon uzamış ve olgunlaşmıştır. Somatik embriyolar, gelişimin erken aşamalarında nispeten daha yavaş ve sonraki aşamalarda zigotik embriyolara göre daha hızlı gelişmiştir. İyi tanımlanmış bir askıdan yoksundurlar ve çok kaba, kötü diferansiye epidermise sahiptirler, bu epidermin ilk tabakası embriyo öncesi oluşumdan sonra kaybolurlar. Somatik embriyoların kotiledonları çok sayıdadır ve yeterince gelişmemiştir; gelişmekte olan embriyonun yüzey pürüzlülüğünün miktarı ile polikotiledonunun oluşma derecesi arasında bir korelasyon olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarında, daha önce bu tür için kullanılmayan bir yaklaşım olan taramalı elektron mikroskobu kullanarak zigotik ve somatik embriyoların gelişimini karşılaştırmışlardır. Bu iki embriyo tipinin gelişim modelinde, özellikle somatik embriyodaki zayıf şekillendirilmiş süspansiyon ve çoklu kotiledon oluşturma eğilimi açısından çarpıcı farklılıklar ortaya çıkarmışlardır.

Etienne et al. (1997), Kauçuk ağacı kalluslarının kalsiyum içeriği hakkında yaptıkları çalışmada kalsiyum içeriğini 3 mM'den 9 mM'ye çıkararak embriyogenez yoluyla rejenerasyon potansiyelini araştırmışlardır. İlave kalsiyum içeren ortamda kültürlenmiş kallusların rejenerasyon kapasitesinde artış gözlemlenmiştir. İki ay boyunca embriyogenez indüksiyon ortamında yüksek CaCl_2 konsantrasyonunda (9 mM CaCl_2) tutulan kalluslarda somatik embriyo gelişimi görüntülenmiştir. Bu şartlarda, ortama benzilaminopurin (BAP) ve 3,4-diklorofenoksiasetik asit (3,4-D) eklenmesi, üretilen embriyo sayısı ve çimlenme kapasitesinde artışa neden olmuştur. Bu kültür koşulları optimum bir embriyogenez indüksiyon süresi belirlemek için kullanılmıştır. Sonuç olarak, süre uzunluğu hem embriyogenezin yoğunluğu hem de somatik embriyo kalitesini etkilemiştir.

Sheykh et al. (2009), su stresi koşullarında çinko yaprak uygulamasının verim ve bileşenleri tek çapraz 704 üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla 2007-2008 yılları arasında Tahran'ın Güneydoğusu'ndaki Varamin Tarımsal Araştırma Merkezi'nde deney yapılmıştır. Saha deneyi, üç tekerrürlü tesadüf bloklarına dayalı olarak bölünmüş parsel tasarımıyla gerçekleştirilmiştir. Ana parseller, üç sulama seviyesinde su stresi, çinko sülfat, çinko şelat, su ile yapraktan uygulama ve yapraksız uygulama yaklaşık %50 tarla kapasitesi (stressiz), %60 tarla kapasitesine dayalı sulama stresi ve %70 tarla kapasitesine dayalı sulama stresi ve alt parseller, dört seviyede yapraktan uygulama işlemidir. Sonuçlar, maksimum miktarları %50 tarla kapasitesine ilgili sulamada, tohum verimi, 1000 tane ağırlığı, sap çapı, tohum proteininin yüzdesi, kulak çapının, kulak sayısı yaprak, tohum ağırlığı oranı olarak özelliklere (gerilme olmadan), ve minimum miktarları %70 tarla kapasitesi esas alınarak kulak ağırlığı sulama stresi içinde olduğunu göstermiştir. Yapraktan uygulamada maksimum miktarlar 1000 tane ağırlığı, sıra başına tohumlar, kulakta toplam tohum sayısı, tohum proteini yüzdesi, tohum yağı yüzdesi, yapraktan uygulama çinko sülfat ve maksimum miktarlarda yapraktan uygulama şelatı özellikleri tohum verimi, sap çapı, tohum nem yüzdesi içindir. Bu nedenle etkileşim, yapraktan uygulama çinko sülfat ve yaklaşık %50 tarla kapasitesi (stressiz) sulama diğerlerine göre daha iyidir. Bu testte yaprak uygulamasının ortalama karşılaştırma etkisi, yapraktan uygulama $ZnSO_4$ ve çinko şelatın sırasıyla daha iyi olduğunu göstermiştir.

Tavallali et al. (2009), Zn'nin NaCl stresini azalttığı mekanizma (lar) *Pistacia vera* L. "Badami" de araştırmışlardır. Antep fıstığı fidanları 0, 800, 1600, 2400 ve 3200 mg NaCl kg^{-1} toprakla birlikte Zn (0, 5, 10 ve 20 mg kg^{-1} toprak) ile muamele etmişlerdir. NaCl stresi, yüksek oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, elektrolit sızıntısı ve lipoksijenaz (LOX, E.C. 1.13.11.12) aktivitesini yüksek seviyelere çıkarmıştır. Zn takviyesi, tuz stresinin tüm bu olumsuz etkilerini etkili bir şekilde azaltmıştır. Bununla birlikte, sadece Zn ile muamele edilen bitkilerde yukarıdaki parametreler arasında önemli bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir. NaCl stresi, antioksidan enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz [SOD, E.C. 1.15.1.1], katalaz [CAT, E.C. 1.11.1.6] ve askorbat peroksidaz [APX, E.C. 1.11.1.11]) aktivitesi, NaCl + Zn ile muamele edilmiş bitkilerde, tek başına NaCl veya Zn ile muamele edilenler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu sonuçlar, Zn'nin tuz stresine yanıt olarak üretilen reaktif oksijen türlerini temizleyen antioksidan enzim aktivitesi üzerindeki olumlu etkilerini desteklemektedir. Çinko muamelesi, tek başına tuz muamelesi ile karşılaştırıldığında, fenoliklerin miktarında ve askorbik asit içeriğinde önemli bir artışa neden olmuştur. Tek başına çinko muamelesi, stres uygulanmayan bitkilerde çok yüksek antioksidan enzim aktivitesi ile sonuçlanmadığı bildirilmiştir.

Weisany et al. (2012), Soya fasulyesinin (*Glycine max L, var. Williams*) bazı morfolojik ve fizyolojik parametreleri üzerindeki çinko uygulaması ve tuzluluk stresinin (0, 33, 66 ve 99 mM NaCl) etkilerini araştırmak için bir deney yapılmıştır. Sonuçlar, çinko uygulamasının sürgün uzunluğunu, köklerin taze ve kuru ağırlığını ve tüm tuzluluk muamelelerinde taze ve kuru ağırlığı arttırdığını göstermiştir. En yüksek tuzluluk altındaki lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit konsantrasyonu, diğer muameleler altında olanlardan önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, tuzluluk muameleleri altında lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit konsantrasyonu, çinko uygulamasının sonucunda önemli ölçüde azalmıştır. Çinko, tuz stresi altında biyomembranlar üzerindeki hasarı hafifletmek için bir ROS temizleyicisi olarak davrandığını düşündürmüştür. Yeterli çinko ayrıca kök hücrelerinin zar bütünlüğünü artırarak sürgündeki Na alımını ve birikmesini önlediğini bildirmişlerdir.

Alharby et al. (2016), Beş domates çeşidinin dokularında ZnO nanopartikülü ve yüksek tuz konsantrasyonu varlığında bazı kallus büyüme özellikleri, mineral element içeriği, bitki rejenerasyonu hızı süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPX) aktivitesindeki değişiklikler araştırılmıştır. Tuzluluğa artan maruziyet yüksek sodyum içeriği, SOD ve GPX ile alakalı olduğu görülmüştür. Düşük konsantrasyonda ZnO nanopatiküllerinin tuzun etkisini azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında ZnO nanopartiküllerinin ekin üretiminde potansiyel bir anti-stres maddesi olabileceği için daha çok araştırma gerektiği düşünülmüştür.

Ajen et al. (2017), Bakır oksit nanopartiküllerini, bakır asetat monohidrat öncü kullanılarak ıslak çökeltme yöntemiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin boyutları için X-ışını kırınımı, parçacık boyutu analizi, transmisyon elektron mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu analizleri ile belirlenmiştir. Sentezlenmiş

2. KAYNAK ÖZETLERİ

olan nanopartiküller maş fasulyesinin çimlenme süresi ve fide büyümesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Sonuçta, düşük nanopartikül konsantrasyonunda çimlenme ve fide büyümesinde etkili bir değişim görülmemiştir. Farklı CuO nanopartikül konsantrasyonlarında protein ve şeker miktarı içeriğini belirlemek için biyokimyasal parametreler kullanılmıştır. Şeker ve protein miktarı düşük nanopartikül konsantrasyonlarında daha yüksek, yüksek nanopartikül konsantrasyonlarından daha düşük değer kaydedilmiştir.

Ali et al. (2018), Çilek eksplantları, tuzluluğa yanıt olarak salisilik asit (SA) ve demir nanopartiküllerinin (INs) *in vitro* koşullar altında da değişiklikleri gözlemlemek için kültüre almışlardır. Üç farklı tuz konsantrasyonu (0, 50 ve 100 mM NaCl), üç farklı demir nanopartikül konsantrasyonu (0,0, 0,08 ve 0,8 ppm) ve üç SA konsantrasyonu (0,0, 0,01, 0,05 mM) uygulamışlardır. Tuzluluk büyüme parametreleri, pigment içeriği, bağıl su içeriği (RWC) ve membran stabilite indeksi (MSI) üzerinde olumsuz etkiler göstermiştir ve olgun bitkilerdeki iyonik değişimi bozmuştur. En yüksek INs konsantrasyonu (0,8 ppm), tüm ölçülen parametreler için en yüksek pozitif etkiyi göstermiştir. Tuzluluk koşulları altında yüksek (0,05 mM) ve orta (0,01 mM) SA seviyeleri arasında istatistiksel fark saptanamamasına rağmen, stres dışı koşullar altında fark büyümeyle ilişkili parametreler için anlamlı olduğunu rapor edilmiştir.

Sridhar et al. (2018), Islak kimyasal yöntem kullanılarak ZnO nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenmiş olan ZnO nano parçacıklarının özellikleri, SEM, X-Işını Kırınımı ve parçacık boyutu dağılımı ile morfolojik, yapısal açıdan bakılmıştır. Sentezi gerçekleştirilen ZnO nanopartikülleri, fenol bileşiğinin sentetik ve endüstriyel atık suyundan uzaklaştırılması için kullanılmıştır.

Muliadi et al. (2019), Kırmızı ejderha meyvesi kabukları ekstraktı kullanarak CaO biyosentezi ve sulu koşullarda biyosentezlenmiş CaO'nun *Candida albicans* üzerindeki katalitik aktivitesi araştırılmıştır. İlk olarak, kalsiyum metalinin öncüsü olan $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ile tepkimeye giren ejderha meyve kabuklarının ekstraktlarının koşullandırılmasıyla biyosentez gerçekleştirilmiştir. SEM kullanılarak yapılan analiz sonucunda biyosentezi gerçekleştirilen örneğin CaO olduğu kanıtlanmıştır. Biyosentezi gerçekleşen CaO'nun antimikrobiyal aktivitesi için türbidimetri yöntemi kullanılarak

2. KAYNAK ÖZETLERİ

çeşitli konsantrasyonlarda *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, kırmızı ejderha meyve kabuklarının sulu ekstraktlarının CaO biyosentezinde başarılı bir şekilde kullanıldığı ve biyosentezi gerçekleştiren CaO'nun *C. albicans*'a karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Yararlanılan Cihazlar

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında yararlanılan cihazlar ve modelleri.

Cihaz Adı	Model
Hassas Terazi	Shimadzu ATX224
İklimlendirme Kabini	Wisd Thermostable GC-450
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop	Nikon Eclips TE2000
Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Mikrotom Cihazı	Leica RM 2125 RT
Otoklav	JSR, JSAC-60
pH Metre	OHAUS ST3100F
Spektrofotometre	Thermo Scientific™ Multiskan GO
Steril Kabin	ESCO Nordicsafe™
Taramalı Elektron Mikroskobu	Quante FEG 250
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W

3.2 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin nerelerde kullanıldığı ve hazırlanış biçimleri aşağıda belirtilmiştir.

1. Tez çalışmasında kullanılan CaO (20-160 nm), CuO (25-80 nm) ve ZnO (5-20 nm) nanopartikülleri Atatürk Üniversitesi Temel Bilimler Meslek Yüksekokulu Gıda Teknolojisi Programı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'ndan yeşil sentez ile üretilmiş ve temin edilmiştir.
2. **%1 Rodamin** (Lazer Taramalı Mikroskopta görüntü almak için gerekli boya): 100 mL saf su içerisine 1 gram rodamin eklenmiş ve rodamin tam çözülene kadar çalkalanmıştır.
3. **%1'lik TCA** (Trikloroasetik asit) (Malondialdehit aktivitesi homojenat çözeltisi): 100 mL saf su içerisine 0,1 gram TCA eklenmiştir ve TCA tam olarak çözülene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.

4. **%0,5 TBA** (Tioborbütirik asit) (Malondialdehit aktivitesi için reaksiyon çözeltisi): 100 mL saf su içerisine 20 gram TCA çözülmüştür ve içerisine 0,5 gram TBA eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.
5. **0,1 M NaH₂PO₄ (pH: 5,5)** (Peroxidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3 gram NaH₂PO₄ tartılarak 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250mL'ye tamamlanmıştır.
6. **Peroxidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi:** 30 µL guaikol ve 21 µL H₂O₂, 50 mL 0,1 M fosfat tamponu (NaH₂PO₄) pH: 5,5 içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
7. **Fiksativ tampon** (SEM'de görüntü almak için gerekli çözelti): 1 mL %3'lük gluteraldehit ve pH: 6,8 olan 49 mL fosfat tamponu (NaH₂PO₄) birlikte çözümlenerek hazırlanmıştır.

3.3 Bitki Materyali ve Kallus Oluşumu

Çalışmamızda CaO, CuO, ZnO NP'lerine yanıt olarak iki yonca genotipi (*Erzurum* ve *Muş*) materyal olarak kullanılmıştır. Tohumlar, 20 dakika boyunca %1 NaOCl ile dezenfekte edilmiştir, birkaç kez steril damıtılmış su ile yıkanmıştır. Tohumlar, MS ortamı (Murashige and Skoog 1962) içeren petri kaplarında 15 gün boyunca 25 ± 1 °C'de ve 16 saat ışık / 8 saat karanlık foto-periyodunda 1500 lux aydınlatma yoğunluğunda yetiştirilmiş ve yaprak oluşumu gerçekleştirilmiştir. Oluşan yapraklar, forseps kullanılarak aseptik olarak 0,125 kinetin 1 mg/mL 2,4 D ve 1 mg/mL kinetin / 2,4 D içeren MS ortamına (Murashige and Skoog 1962) yerleştirilmiştir. 0,8 ppm CaO, ZnO ve CuO besiyerlerine otoklav sonrası eklenmiştir. Vitamin ve hormonların sterilizasyonunda 0,22 µm gözenekli selüloz nitrat filtreler kullanılmıştır. Yaprak eksplantları tam karanlıkta 25 ± 1 °C sıcaklıkta bir ay süreyle inkübe edilmiştir.

3.4 Oluşan Kalluslara Nanopartikül ve Tuz Stresi Uygulanması

Oluşan kalluslara 2 hafta süreyle üç çeşit nanopartikül ve tuz uygulanmıştır. Bir ve iki haftalık sürelerde kalluslar 50 mM NaCl ve 0,8 ppm CaO, ZnO, CuO içeren MS ortamında bekletilmiştir. Kallus oluşumu nanopartiküllü MS ortamında gerçekleştirilmiştir. İyi durumda olan kalluslar daha sonra hem NaCl hem de

nanopartikül içeren 0,125 kinetin 1 mg/mL 2,4 D ve 1 kinetin 1 mg/mL 2,4 D ortamında yaklaşık 15 gün bekletilmiştir. Toplam kültür süresi tohumdan yaprak oluşumu 15 gün yapraktan kallus oluşumu 30 gün ve kallusların tuz stresine maruz bırakılması 15 günü içermektedir.

3.5 Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit aktivitesi ölçümü için öncelikle sıvı nitrojen kullanılarak örnekler ezilmiştir. Heath ve Packer'ın (1968) 133 yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0,4 gram homojen hale getirilmiş kalluslar %20 TCA içeren %0,5 TBA solüsyonuyla muamele edilmiştir. Örnekler yaklaşık 30 dakika 98°C'de kaynatılmıştır ve ardından hızla bir buz banyosuna alınmıştır. Numune içeriği 3000 x g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir ve süpernatantın 532 ve 600 nm'de ölçümü alınmıştır (Heath and Packer 1968; Jaleel et al. 2007; Erdal 2012).

3.6 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarının Belirlenmesi

H₂O₂ (Hidrojen peroksit) içeriği Sergiev et al. (1997) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. 0,4 gram kallus materyali, 4 mL TCA içinde homojenize edilmiştir ve 4°C'de 15 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. 2 mL özüt, test tüplerinde 0,8 mL KH₂PO₄ ve 1,6 mL KI ile karıştırılmıştır. Kallus numunesi ürününün absorbansı, H₂O₂ solüsyonları ile standart bir eğri kullanılarak 390 nm'de ölçülmüştür (Velikova et al. 2000).

3.7 Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi

POD aktivitesi, Chance ve Maehly (1955) tarafından oluşturulan yöntemi izleyerek, 13 mM guaiakol, 5mM H₂O₂ ve 50mM fosfat tamponu içeren 3 mL tahlil solüsyonuna 100 µL kallus ekstraktı eklenerek ölçülmüştür (pH: 6,5). POD aktivitesi, 470 nm'de absorbans ölçülerek belirlenmiştir. Toplam çözünebilir protein içerikleri BCA (Bişinkoninik asit) protokolü ile belirlenmiştir (Yee et al. 2003; Erdal 2012).

3.8 Mikroton İle Kesit Alma

Kalluslar %10 formaldehit içinde 3 gün tutulduktan sonra kasetlere alınmıştır ve gece boyunca yıkanmaya bırakılmıştır. Daha sonra sırasıyla bir saat arayla %70, %80 ve %96 etil alkol içerisinde tutulmuştur. Absol-I, Absol-II, Xylol-I ve Xylol-II sırasıyla 1 saat süreyle tutulmuştur. Seri olarak solüsyonlara maruz bırakılan kalluslar parafilm içine gömülmüştür ve 6 µm'lik bir kesit alınmıştır (Rolls et al. 2012).

3.9 Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Görüntü Alınması (CLSM)

Mikroton ile kesitlere ayrılan kalluslar, %1 rodamin içinde yaklaşık 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 3 defa distile sudan geçirilmiştir. Floresans görüntüleri, Nikon Eclipse TE2000 Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu C1 ile elde edilmiştir. Numuneler, bir argon lazerin 488 nm hattı ile uyarılmıştır ve 520 ve 610 nm'de boya emisyonu toplanmıştır. DCF floresansı, kallusun tek bir optik bölümünde görselleştirilmiştir. Tüm görüntüler aynı derinlikte elde edilmiştir (Minta et al. 1989).

3.10 Taramalı Elektron Mikroskobu ile Görüntü Alınması (SEM)

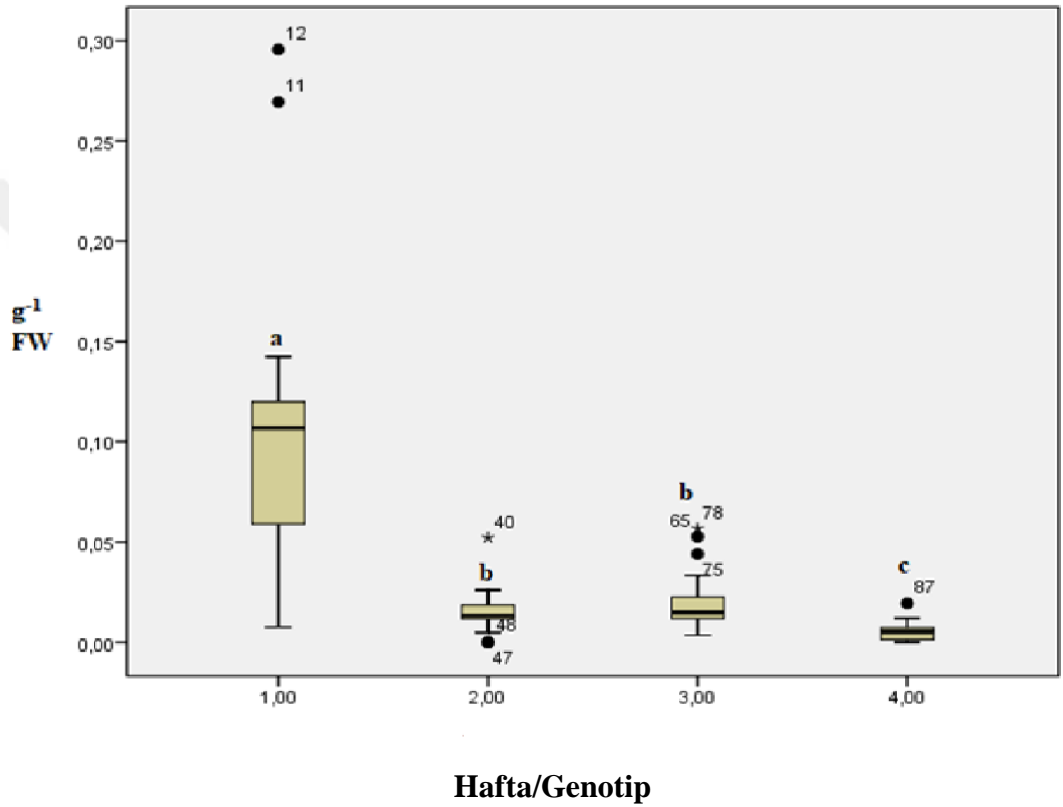
Kalluslar 0,025 M tamponda oda sıcaklığında 1 saat, 0,025 M tampon ve gluteraldehit içeren fiksatif tamponunda 2 saat bekletilmiştir. 0,025 M tampon üzerinde buz üzerinde 1-12 saat arası bekletilmiştir daha sonra steril saf su ile yıkanıp 30 dakika bekletilmiştir. Sırasıyla verilen %10, %20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, %90 ve %100 alkol konsantrasyonlarında oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Quante FEG 250 ile görüntü alınmış olup EDAX ile hesaplama yapılmıştır (LC Fowke - 1995).

3.11 İstatistiksel Analiz

Deney, her bir petri kabında 25 eksplant olacak şekilde rastgele olarak 3 tekrarlı yapılmıştır. Her bir petri kabı bir deney birimi olarak kabul edilmiştir. Varyans analizi ve Univariate testi, anlamlı farklılıkları belirlemek için kullanılmıştır. İstatistiksel analiz, SPSS 20.0 (IBM Crop., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada *Muş* ve *Erzurum* genotiplerinin kallus oluşum öncesi ve kallus oluşum sonrası 0,8 ppm CaO, 0,8 ppm CuO ve 0,8 ppm ZnO nanopartiküllerinin 50 mM tuz stresine karşı iyileştirici özelliği araştırılmış olup bu iyileştirme sonuçları bazı enzim aktiviteleri, protein içeriklerine bakılarak, CLSM, SEM görüntüleri alınarak her bir analiz sonucu çizelge, tablo ve grafiklerle gösterilmiştir.



Şekil 4.1 MDA analiz sonuçları. (a: Birinci hafta *Muş*, b: Birinci hafta *Erzurum*, c: İkinci hafta *Muş*, d: İkinci hafta *Erzurum* ($p < 0.005$))

Şekil 4.1’de Birinci hafta *Muş* ($0,1020 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) ve birinci hafta *Erzurum* ($0,0051 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) diğer haftalar arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. İkinci hafta *Erzurum* ($0,0153 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) ve ikinci hafta *Muş* ($0,0195 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.1 12 farklı nanopartikül ve tuz stresi muamelesinin MDA oranındaki değişikliği

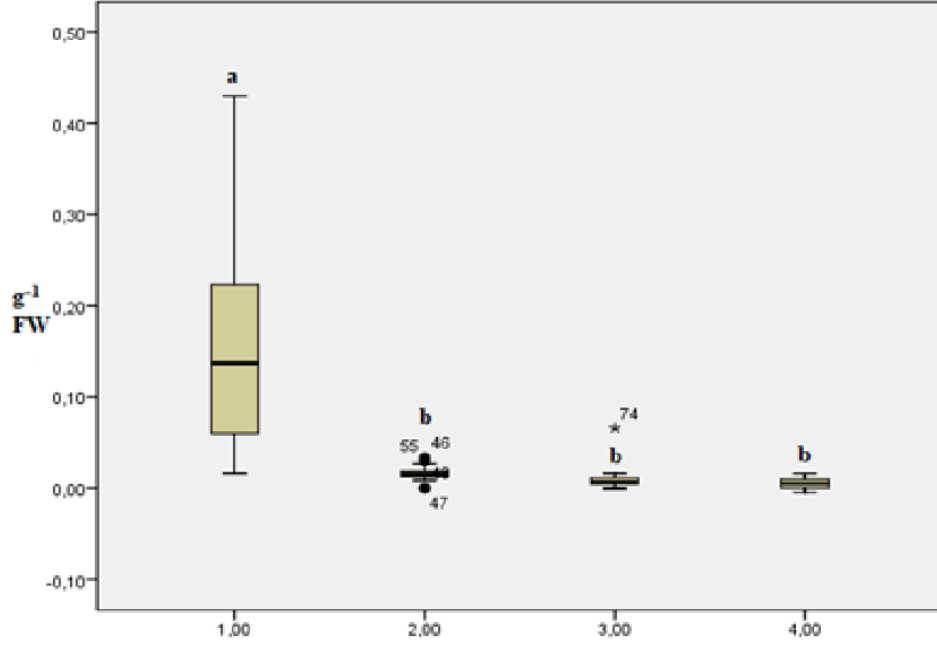
Muamele (ppm and mM)	MDA Oranı (%)
0.8 ppm ZnO (+)	0,0210±0,005 ^e
0.8 ppm CuO (+)	0,0411±0,005 ^{bc}
0.8 ppm CaO (+)	0,0194±0,005 ^e
0.8 ppm ZnO 50 mM NaCl (+)	0,0329±0,005 ^{bcd}
0.8 ppm CuO 50 mM NaCl (+)	0,0466±0,005 ^b
0.8 ppm CaO 50 mM NaCl (+)	0,0831±0,005 ^a
Kontrol	0,0410±0,005 ^{bc}
50 mM NaCl	0,0250±0,005 ^{cde}
0.8 ppm ZnO (-)	0,0236±0,005 ^{de}
0.8 ppm CuO (-)	0,0323±0,005 ^{bcd}
0.8 ppm CaO (-)	0,0445±0,005 ^b
0.8 ppm ZnO 50 mM NaCl (-)	0,0312±0,005 ^{bcd}
0.8 ppm CuO 50 mM NaCl (-)	0,0384±0,005 ^{bcd}
0.8 ppm CaO 50 mM NaCl (-)	0,0168±0,005 ^d

(+): Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması

(-): Kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulaması

(p < 0.005).

Çizelge 4.1'e göre MDA oranı 0,0168 g⁻¹ FW ile 0,0831 g⁻¹ FW arasında değişiklik göstermiştir. Hücreye en az hasar veren muamele kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulanan 0.8 ppm CaO 50 mM NaCl konsantrasyonundaki MDA oranı 0,0168 g⁻¹ FW'dir. Hücreye en çok hasar veren ise kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulanan 0.8 ppm CaO 50 mM NaCl konsantrasyonundaki MDA oranı 0,0831 g⁻¹ FW'dir. Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulanan Zn, Cu ve Ca oksit NP'ler karşılaştırıldığında en iyi sonucu veren Ca NP (0,0194 g⁻¹ FW) iken kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulanan Zn, Cu ve Ca oksit NP'ler karşılaştırıldığında en iyi sonuç Zn oksit NPs (0,0236 g⁻¹ FW) 'dir.



Hafta/Genotip

Şekil 4.2 H₂O₂ analiz sonuçları. (a: Birinci hafta *Muş*, b: Birinci hafta *Erzurum*, c: İkinci hafta *Muş*, d: İkinci hafta *Erzurum* (p < 0.005))

Şekil 4.2 H₂O₂ analizine göre Birinci hafta *Muş* (0,1447 g⁻¹ FW) diğer haftalar arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Birinci hafta *Erzurum* (0,0159 g⁻¹ FW), ikinci hafta *Muş* (0,0096 g⁻¹ FW) ve ikinci hafta *Erzurum* (0,0047 g⁻¹ FW) arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.2. 12 farklı nanopartikül ve tuz stresi muamelesinin H₂O₂ oranındaki değişikliği

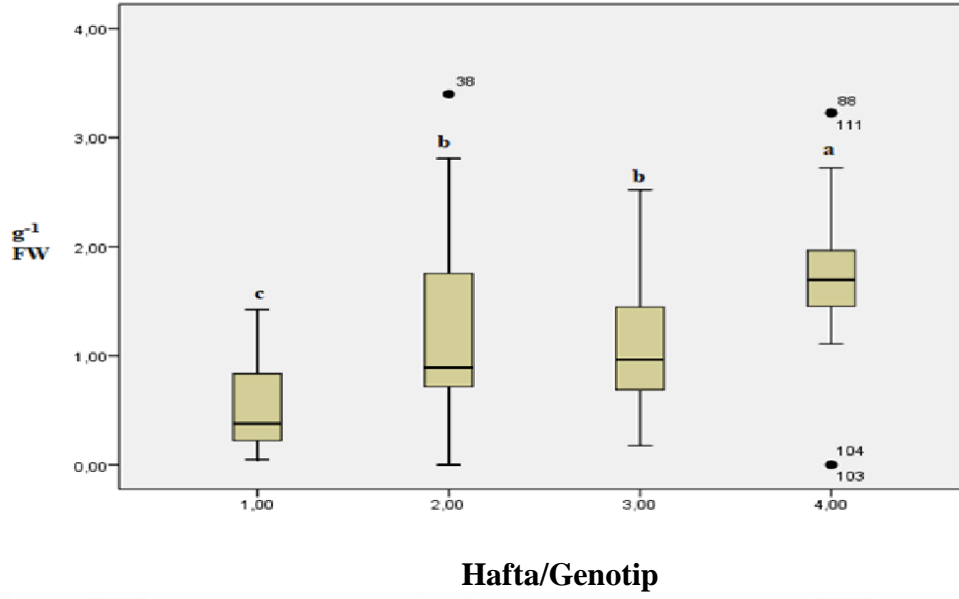
Muamele (ppm and mM)	H₂O₂ Oranı (%)
0.8 ppm ZnO (+)	0,0386±0,014 ^{bc}
0.8 ppm CuO (+)	0,0979±0,014 ^a
0.8 ppm CaO (+)	0,0319±0,014 ^{bc}
0.8 ppm ZnO 50 mM NaCl (+)	0,0481±0,014 ^{bc}
0.8 ppm CuO 50 mM NaCl (+)	0,0377±0,014 ^{bc}
0.8 ppm CaO 50 mM NaCl (+)	0,0645±0,014 ^{ab}
Kontrol	0,0545±0,014 ^{bc}
50 mM NaCl	0,0388±0,014 ^{bc}
0.8 ppm ZnO (-)	0,0293±0,014 ^{bc}
0.8 ppm CuO (-)	0,0134±0,014 ^c
0.8 ppm CaO (-)	0,0389±0,014 ^{bc}
0.8 ppm ZnO 50 mM NaCl (-)	0,0289±0,014 ^{bc}
0.8 ppm CuO 50 mM NaCl (-)	0,0450±0,014 ^{bc}
0.8 ppm CaO 50 mM NaCl (-)	0,0445±0,014 ^{bc}

(+): Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması

(-): Kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulaması

(p < 0.005)

Çizelge 4.2'ye göre H₂O₂ oranı 0,0134 g⁻¹ FW ile 0,0979 g⁻¹ FW arasında değişiklik göstermiştir. Hücreye en az hasar veren muamele kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulaması yapılan 0.8 ppm CuO konsantrasyonu H₂O₂ oranı 0,0134 g⁻¹ FW'dir. Hücreye en fazla hasar veren muamele kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 0.8 ppm CuO konsantrasyonundaki H₂O₂ oranı 0,0979 g⁻¹ FW'dir. Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulanan Zn, Cu ve Ca oksit NP'ler karşılaştırıldığında en iyi sonucu veren Ca NPs (0,0319 g⁻¹ FW) iken kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulanan Zn, Cu ve Ca oksit NP'ler karşılaştırıldığında en iyi sonucu veren Cu oksit NPs (0,0134 g⁻¹ FW) 'dir.



Şekil 4.3 POD analiz sonuçları. (a: Birinci hafta *Muş*, b: Birinci hafta *Erzurum*, c: İkinci hafta *Muş*, d: İkinci hafta *Erzurum* ($p < 0.005$))

Şekil 4.3’de POD analizine göre Birinci hafta *Muş* ($0,4983 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) ve ikinci hafta *Erzurum* ($1,7257 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) diğer haftalar arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Birinci hafta *Erzurum* ($1,2382 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) ve ikinci hafta *Muş* ($1,0699 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.3 12 farklı nanopartikül ve tuz stresi muamelesinin POD oranındaki değişikliği

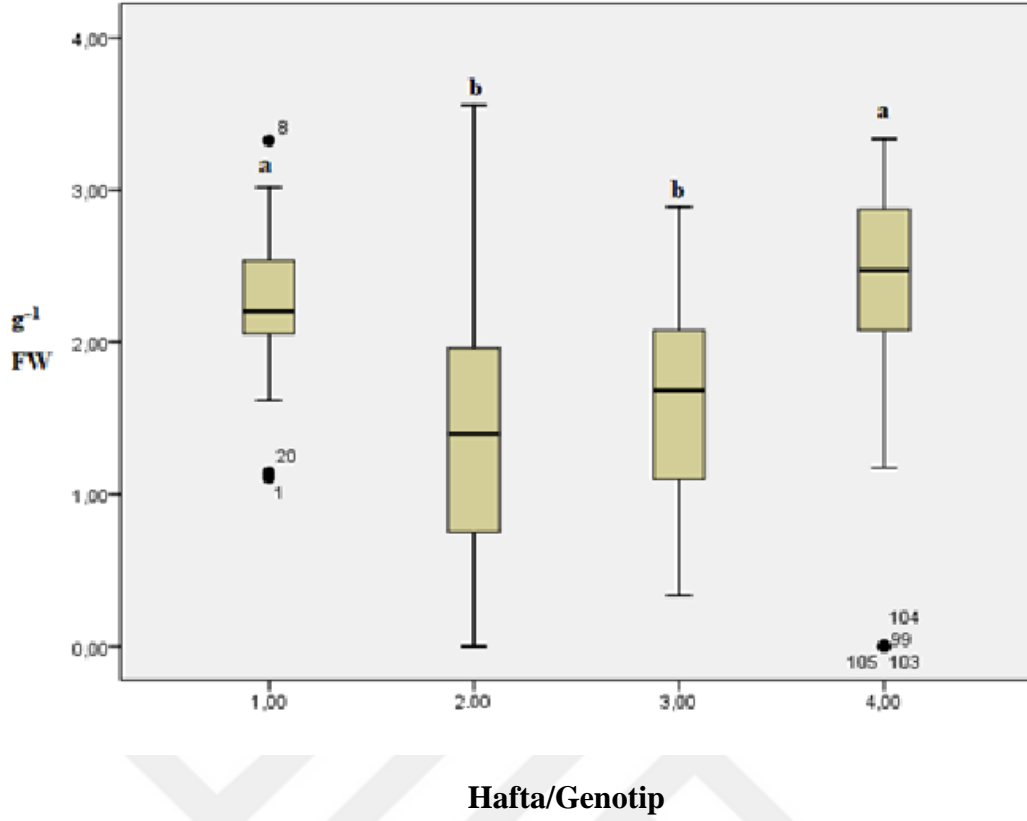
Muamele (ppm and mM)	POD Oranı (%)
0.8 ppm ZnO (+)	1,4727±0,186 ^{ab}
0.8 ppm CuO (+)	1,2792±0,186 ^{ab}
0.8 ppm CaO (+)	0,9267±0,186 ^b
0.8 ppm ZnO 50 mM NaCl (+)	1,1658±0,186 ^{ab}
0.8 ppm CuO 50 mM NaCl (+)	1,5335±0,186 ^{ab}
0.8 ppm CaO 50 mM NaCl (+)	1,2862±0,186 ^{ab}
Kontrol	0,9985±0,186 ^b
50 mM NaCl	1,6668±0,186 ^a
0.8 ppm ZnO (-)	0,9699±0,186 ^b
0.8 ppm CuO (-)	0,1035±0,186 ^c
0.8 ppm CaO (-)	1,0015±0,186 ^b
0.8 ppm ZnO 50 mM NaCl (-)	0,9742±0,186 ^b
0.8 ppm CuO 50 mM NaCl (-)	1,0663±0,186 ^{ab}
0.8 ppm CaO 50 mM NaCl (-)	1,4176±0,186 ^{ab}

(+): Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması

(-): Kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulaması

(p < 0.005)

Çizelge 4.3'e göre POD oranı 0,9267 g⁻¹ FW ile 1,6668 g⁻¹ FW arasında değişiklik göstermiştir. Hücreye en az hasar veren muamele kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 0.8 ppm CaO konsantrasyonundaki POD oranı 0,9267 g⁻¹ FW'dir. Hücreye en çok hasar veren ise 50 mM NaCl konsantrasyonundaki POD oranı 1,6668 g⁻¹ FW'dir. Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulanan Zn, Cu ve Ca oksit NP'ler karşılaştırıldığında en iyi sonucu veren Ca NPs (0,9267 g⁻¹ FW) iken kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulanan Zn, Cu ve Ca oksit NP'ler karşılaştırıldığında en iyi sonuç Cu oksit NPs (0,1035 g⁻¹ FW) 'dir.



Şekil 4.4 Protein miktarı analiz sonuçları. (a: Birinci hafta *Muş*, b: Birinci hafta *Erzurum*, c: İkinci hafta *Muş*, d: İkinci hafta *Erzurum* ($p < 0.005$))

Şekil 4.4'te Protein miktarı analizine göre Birinci hafta *Muş* ($2,2251 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) ve ikinci hafta *Erzurum* ($2,2161 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) diğer haftalar arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Birinci hafta *Erzurum* ($1,4497 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) ve ikinci hafta *Muş* ($1,6237 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.4 12 farklı nanopartikül ve tuz stresi muamelesinin Protein oranındaki değişikliği

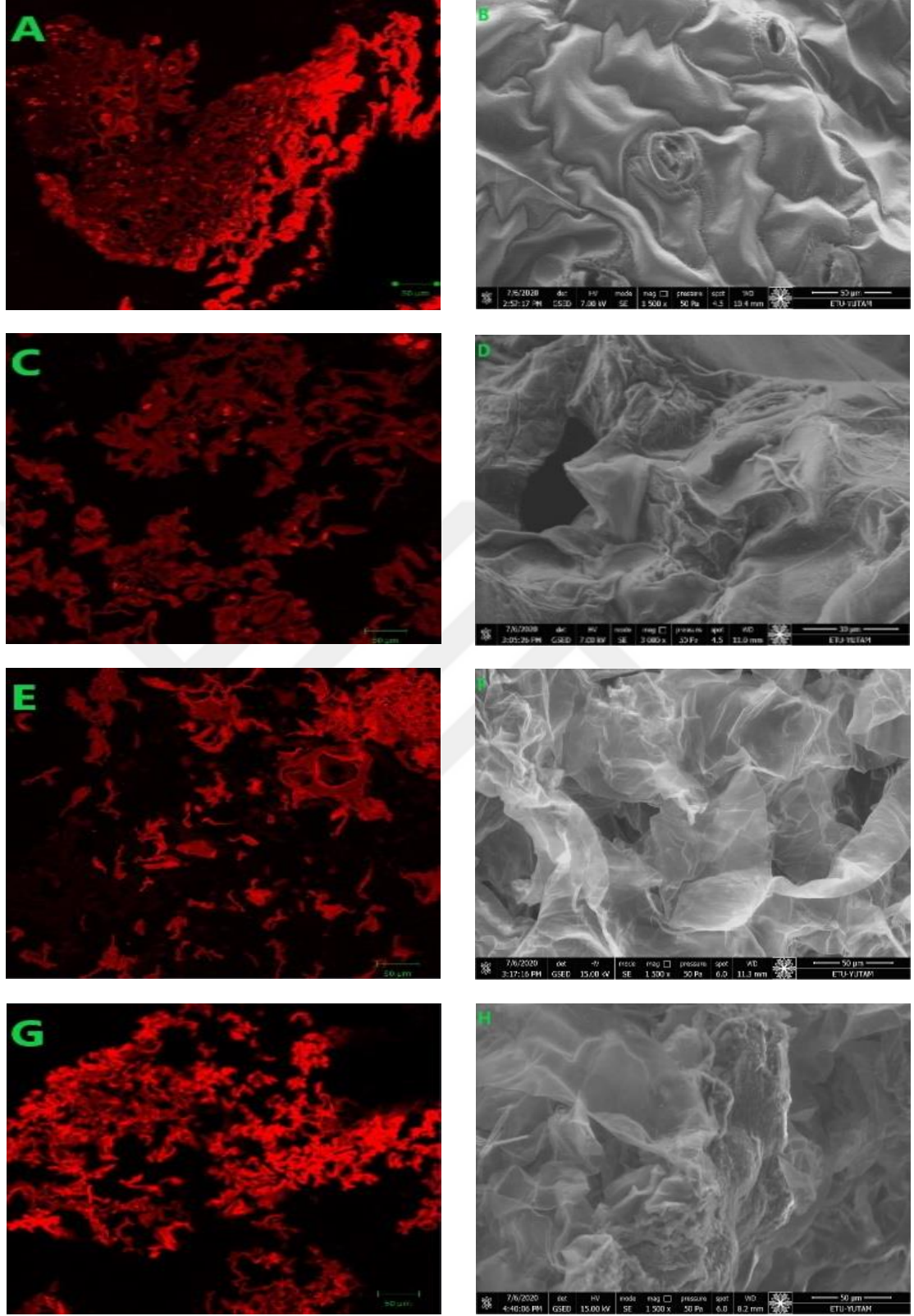
Muamele (ppm and mM)	Protein Oranı (%)
0.8 ppm ZnO (+)	2,0439±0,260 ^a
0.8 ppm CuO (+)	1,5331±0,260 ^a
0.8 ppm CaO (+)	1,7457±0,260 ^a
0.8 ppm ZnO 50 mM NaCl (+)	2,0548±0,260 ^a
0.8 ppm CuO 50 mM NaCl (+)	2,4061±0,260 ^a
0.8 ppm CaO 50 mM NaCl (+)	2,4005±0,260 ^a
Kontrol	1,1589±0,260 ^a
50 mM NaCl	1,7398±0,260 ^a
0.8 ppm ZnO (-)	1,9880±0,260 ^a
0.8 ppm CuO (-)	0,6741±0,260 ^b
0.8 ppm CaO (-)	1,6147±0,260 ^a
0.8 ppm ZnO 50 mM NaCl (-)	1,6574±0,260 ^a
0.8 ppm CuO 50 mM NaCl (-)	2,3167±0,260 ^a
0.8 ppm CaO 50 mM NaCl (-)	1,9674±0,260 ^a

(+): Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması

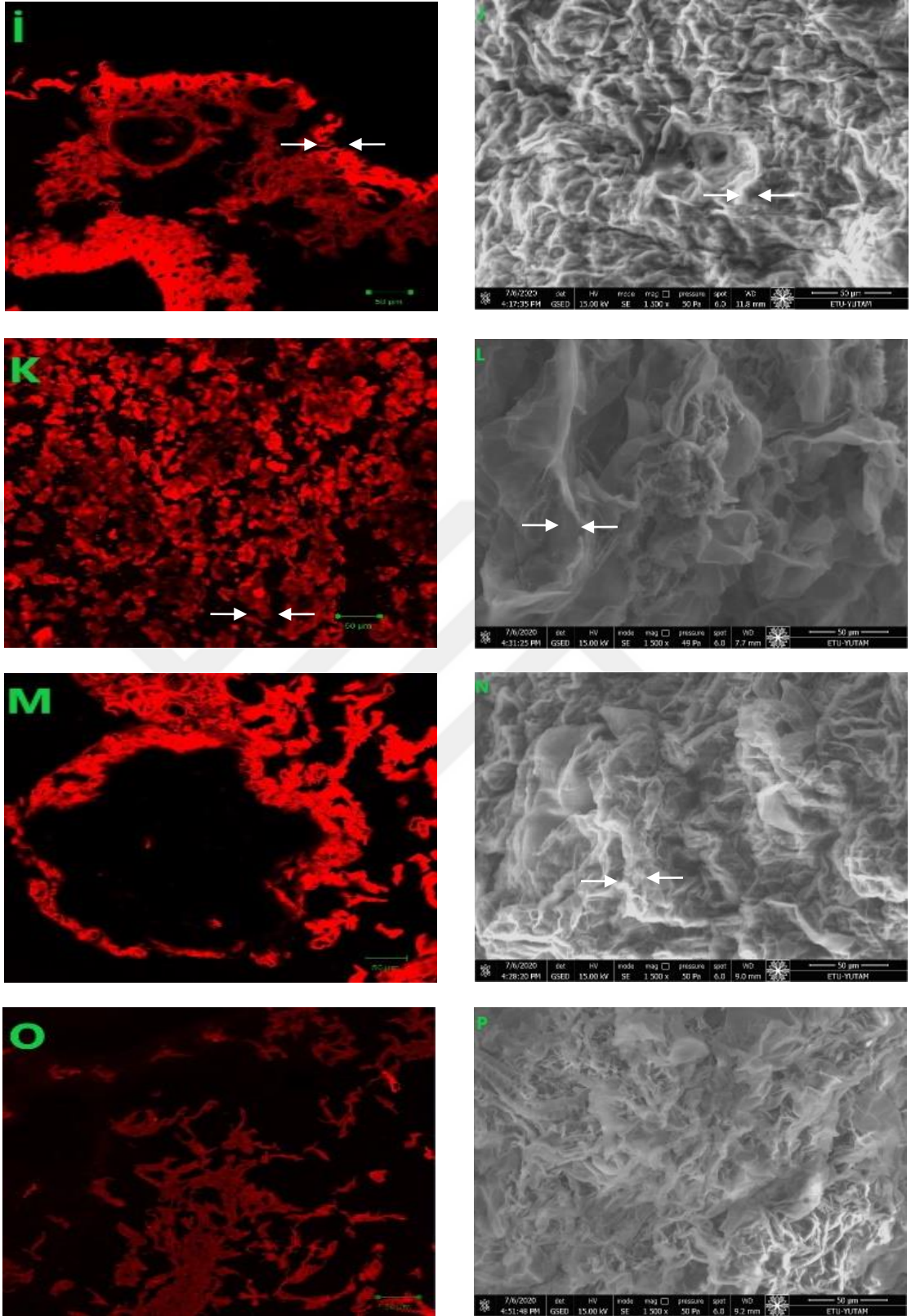
(-): Kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulaması

(p < 0.005)

Çizelge 4.4'e göre protein oranı 0,6741 g⁻¹ FW ile 2,3167 g⁻¹ FW arasında değişiklik göstermiştir. Hücreye en az miktarda protein bulunan muamele kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulanan 0.8 ppm CuO konsantrasyonundaki protein oranı 0,6741 g⁻¹ FW'dir. Hücreye en fazla miktarda protein bulunan ise kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 0.8 ppm CuO 50 mM NaCl konsantrasyonundaki protein oranı 2,4061 g⁻¹ FW'dir. Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulanan Zn, Cu ve Ca oksit NP'ler karşılaştırıldığında en iyi sonucu veren Zn NP (2,0439 g⁻¹ FW) iken kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulanan Zn, Cu ve Ca oksit NP'ler karşılaştırıldığında en iyi sonuç Zn oksit NPs (1,9880 g⁻¹ FW)'dir.

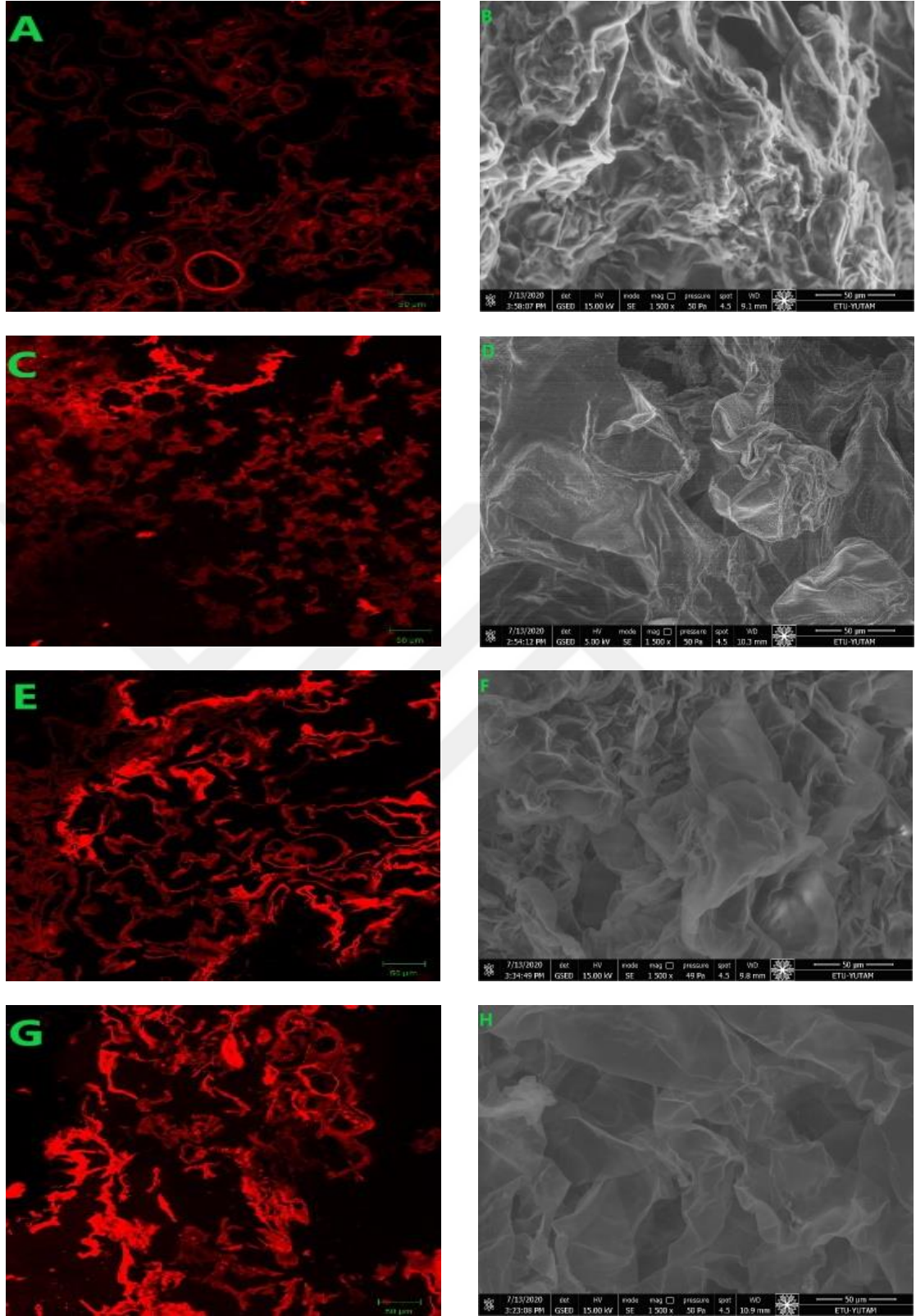


Şekil 4.5a Birinci hafta *Muş* genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri A: Kontrol CLSM görüntüsü, B: Kontrol SEM görüntüsü, C: 0.8ppm CaO CLSM görüntüsü, D: 0,8 ppm CaO SEM görüntüsü, E: 0,8 ppm ZnO CLSM görüntüsü, F: 0,8 ppm ZnO SEM görüntüsü, G: 0,8 ppm CuO CLSM görüntüsü, H: 0,8 ppm CuO SEM görüntüsü

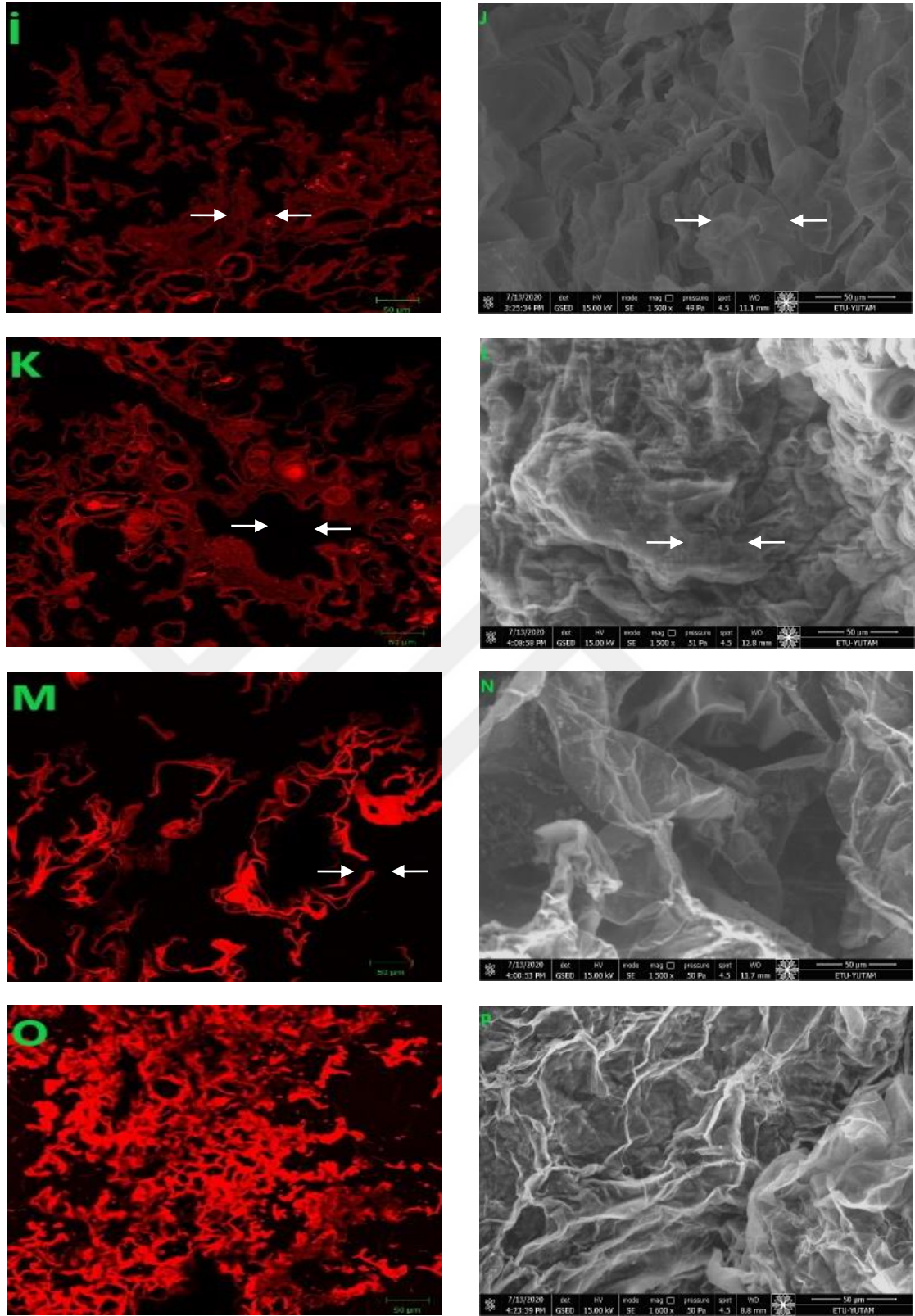


Şekil 4.5b Birinci hafta *Muş* genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri İ: 50 mM NaCl CLSM görüntüsü, J: 50 mM NaCl SEM görüntüsü, K: 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO CLSM görüntüsü, L: 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO SEM görüntüsü, M: 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO CLSM görüntüsü, N: 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO SEM görüntüsü, O: 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO CLSM görüntüsü, P: 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO SEM görüntüsü

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

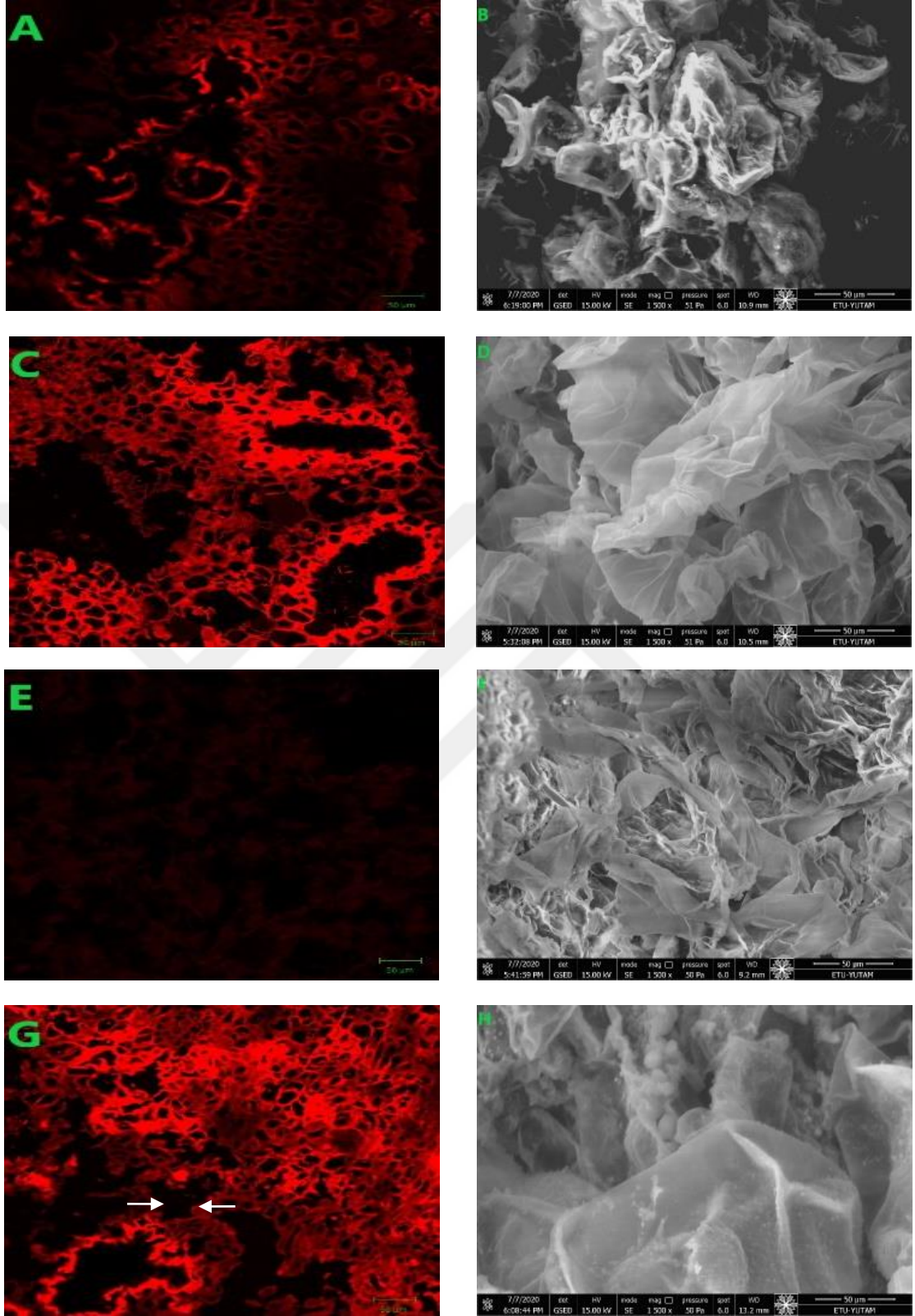


Şekil 4.6a İkinci hafta *Mus* genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri A: Kontrol CLSM görüntüsü, B: Kontrol SEM görüntüsü, C: 0,8 ppm CaO CLSM görüntüsü, D: 0,8 ppm CaO SEM görüntüsü, E: 0,8 ppm ZnO CLSM görüntüsü, F: 0,8 ppm ZnO SEM görüntüsü, G: 0,8 ppm CuO CLSM görüntüsü, H: 0,8 ppm CuO SEM görüntüsü

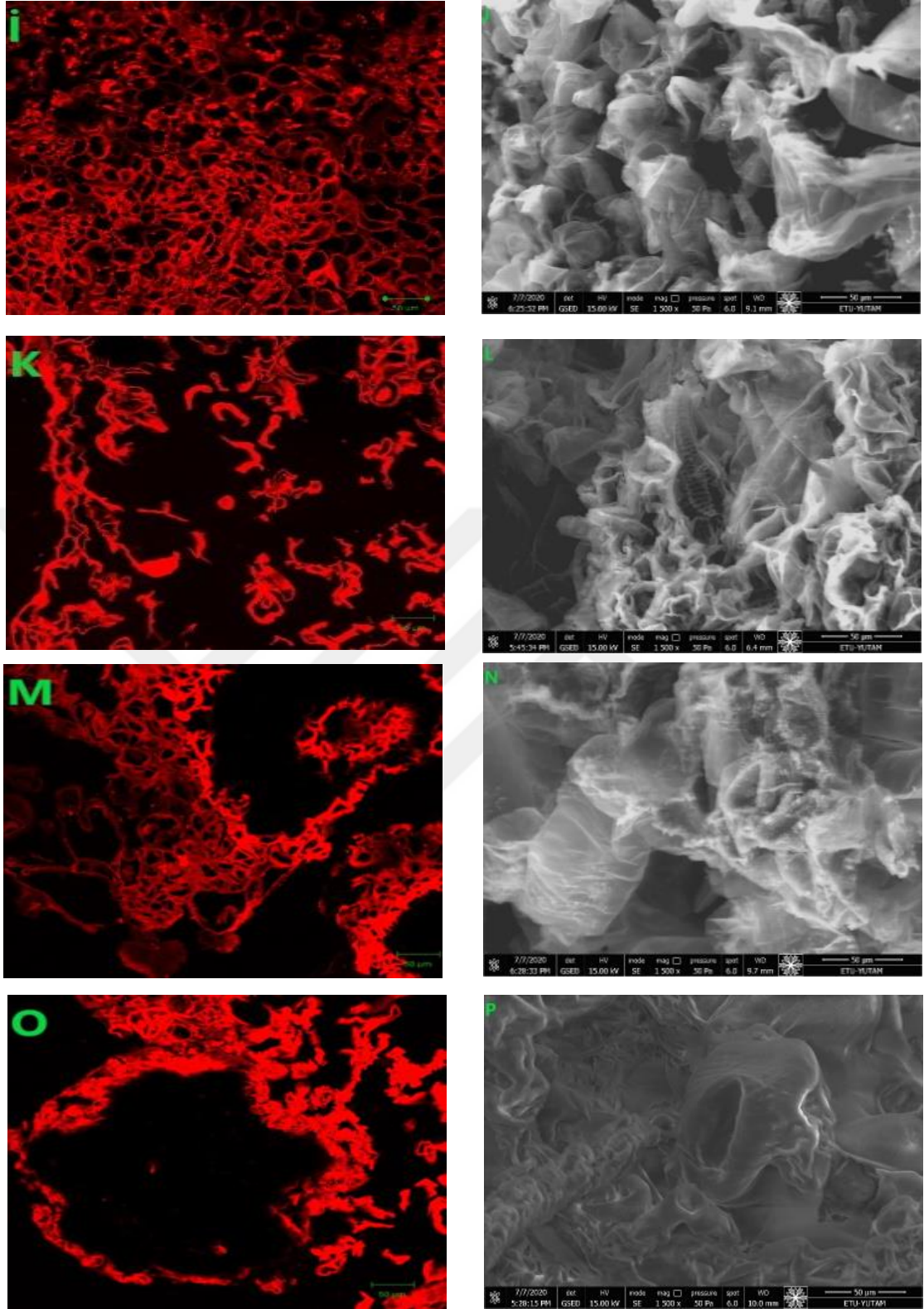


Şekil 4.6b İkinci hafta *Muş* genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri İ: 50 mM NaCl CLSM görüntüsü, J: 50 mM NaCl SEM görüntüsü, K: 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO CLSM görüntüsü, L: 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO SEM görüntüsü, M: 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO CLSM görüntüsü, N: 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO SEM görüntüsü, O: 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO CLSM görüntüsü, P: 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO SEM görüntüsü

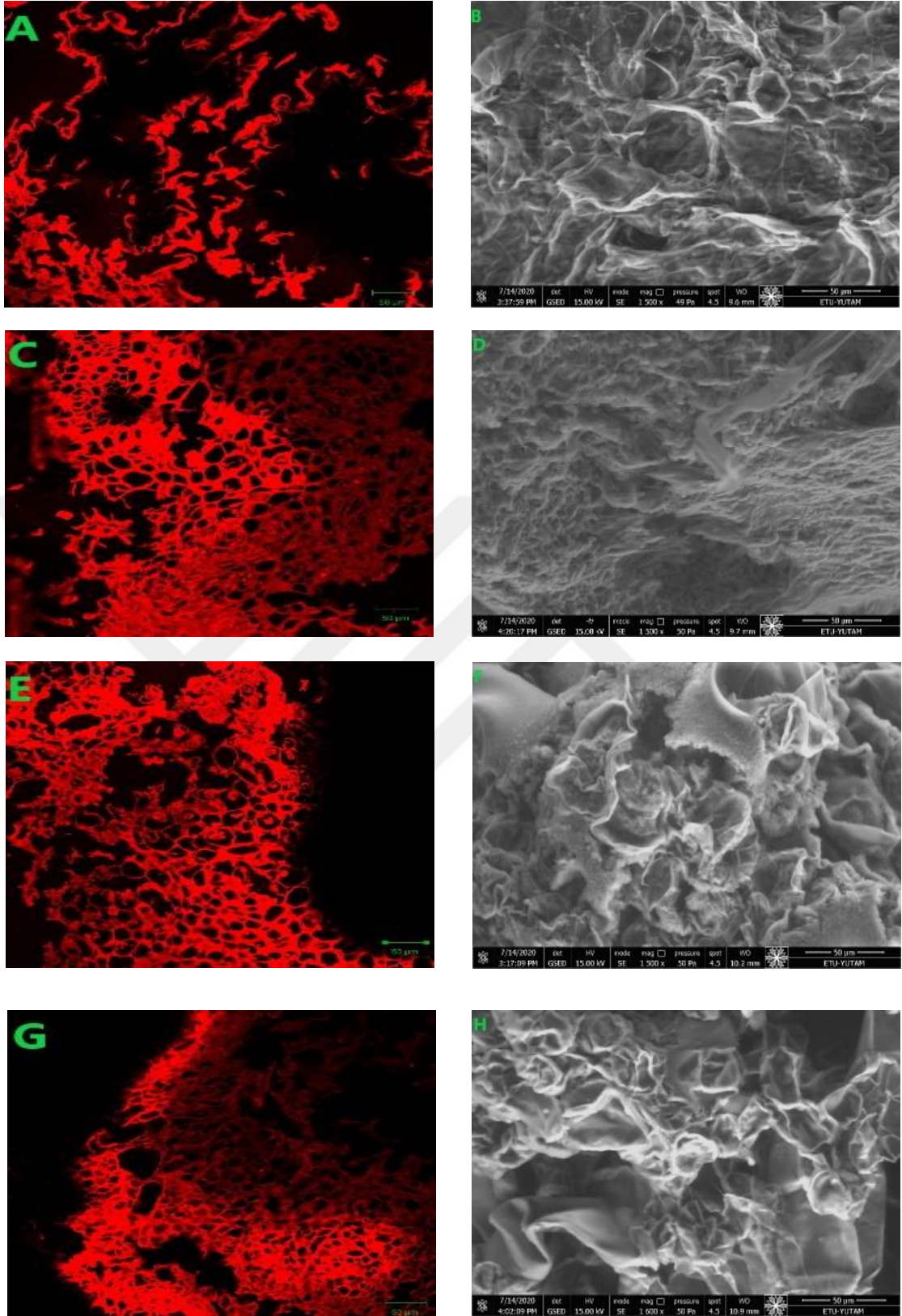
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.7a Birinci hafta *Erzurum* genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri A: Kontrol CLSM görüntüsü, B: Kontrol SEM görüntüsü, C: 0.8 ppm CaO CLSM görüntüsü, D: 0,8 ppm CaO SEM görüntüsü, E: 0,8 ppm ZnO CLSM görüntüsü, F: 0,8 ppm ZnO SEM görüntüsü, G: 0,8 ppm CuO CLSM görüntüsü, H: 0,8 ppm CuO SEM görüntüsü

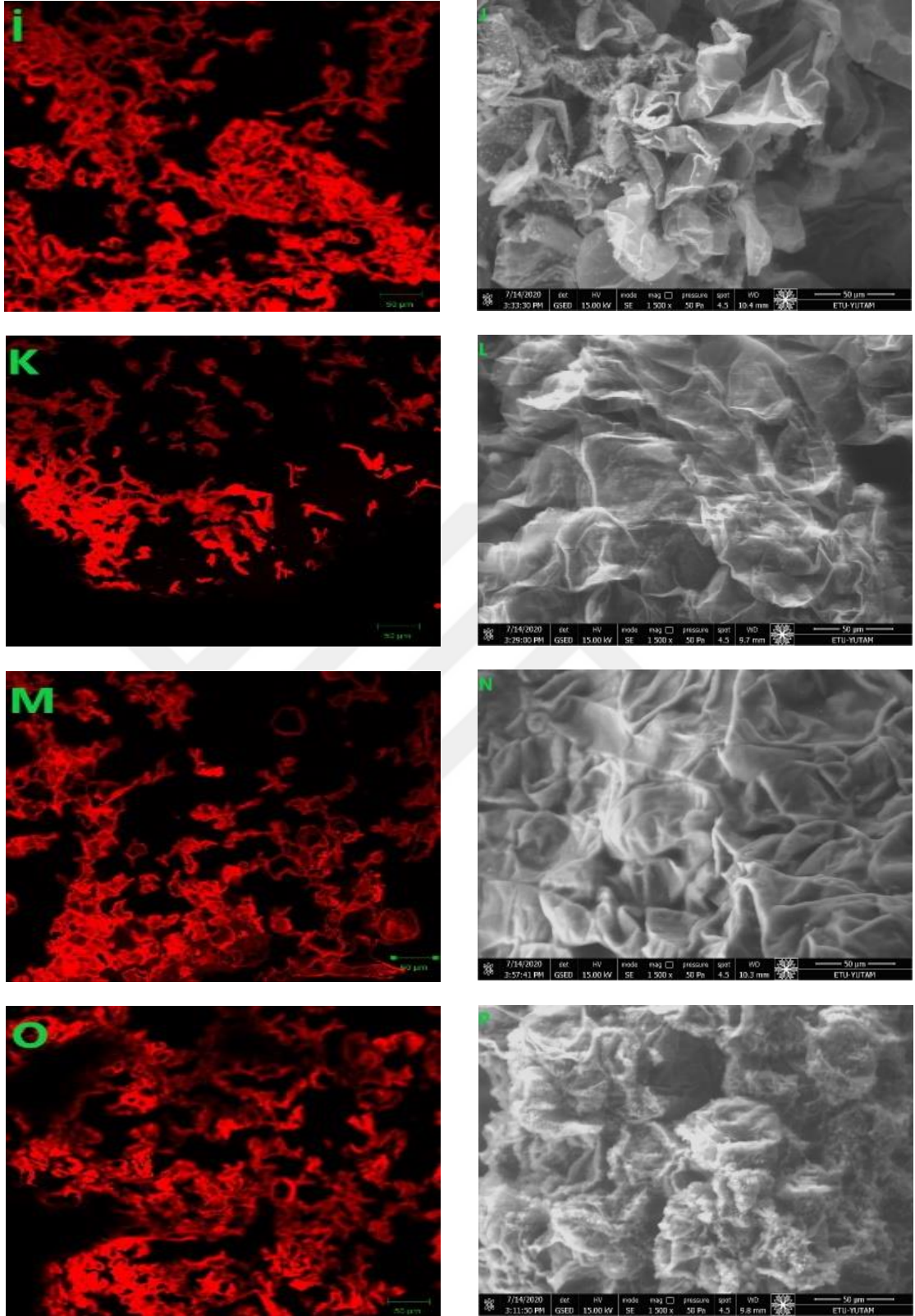


Şekil 4.7b Birinci hafta *Erzurum* genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri İ: 50 mM NaCl CLSM görüntüsü, J: 50 mM NaCl SEM görüntüsü, K: 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO CLSM görüntüsü, L: 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO SEM görüntüsü, M: 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO CLSM görüntüsü, N: 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO SEM görüntüsü, O: 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO CLSM görüntüsü, P: 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO SEM görüntüsü



Şekil 4.8a İkinci hafta *Erzurum* genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri A: Kontrol CLSM görüntüsü, B: Kontrol SEM görüntüsü, C: 0,8 ppm CaO CLSM görüntüsü, D: 0,8 ppm CaO SEM görüntüsü, E: 0,8 ppm ZnO CLSM görüntüsü, F: 0,8 ppm ZnO SEM görüntüsü, G: 0,8 ppm CuO CLSM görüntüsü, H: 0,8 ppm CuO SEM görüntüsü

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.8b İkinci hafta *Erzurum* genotipinin CLSM ve SEM görüntüleri İ: 50 mM NaCl CLSM görüntüsü, J: 50 mM NaCl SEM görüntüsü, K: 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO CLSM görüntüsü, L: 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO SEM görüntüsü, M: 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO CLSM görüntüsü, N: 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO SEM görüntüsü, O: 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO CLSM görüntüsü, P: 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO SEM görüntüsü

Tuz stresi bitki dokularında tüm morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde yer alır. Bu süreçler de bitkilerde makro-moleküler arasındaki etkileşimi, plasma membran fonksiyonlarını ve enzimatik reaksiyonların değişmesini etkiler. Bitkilerde tuz stresinin olumsuz etkileri çeşitli parametrelerle tanımlanabilir. Bu parametreler bitki büyüme kontrolü, besin içeriği, fotosentetik potansiyel ve biyokimyasal yollardan oluşmaktadır.

Birçok çalışma tuz stresinin fizyolojik fonksiyonlarını anlamak için eksojen nanopartikül uygulaması yapılmış olmasına rağmen yonca bitkisinin kallus dokularının nanopartikülün tuz stresi üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Nanopartiküllerin günümüzde tarımsal faaliyetlerde bitki savunma yanıtları iyi bilinmektedir. Bizim çalışmamızdaki deneysel analizler nanopartikül uygulamasında tuz stresinin MDA, POD, H₂O₂, CLSM ve SEM analizleri üzerine idi. *In vitro* kültür ortamı genellikle eksplant kaynağı, genotip, ortam sıcaklığı ve hormon konsantrasyonu gibi birçok faktöre bağlıdır. Çalışmamızın sonuçları yonca kalluslarına uygulanan farklı nanopartiküllerin tuz stresine nasıl yanıt verdiği, muamele süresi ve genotipe bağlı olduğunu göstermiştir. Bu sonuca benzer bulgular Yazıcılar ve ark. 2020'de yaptıkları çalışmada *tritikale* kallusları üzerine CaO nanopartikül uygulamasının tuz stresine yanıtının kısa süreli uygulamalarda daha fazla iyileştirici özelliğe sahip olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca Bezirganoğlu 2017'de yaptığı başka bir çalışmada farklı NaCl seviyelerinin 5 farklı *tritikale* genotipine verdikleri yanıtta genotipler arasında önemli farklılıklar bulunduğunu rapor etmiştir. Nalcı ve ark. 2019 yılında FeO nanopartikülünün herhangi bir stres faktörü uygulamaksızın FeO nanopartikülünün buğday kallusları üzerine yaptıkları başka bir çalışmada ise kallus oluşumunun genotipe bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Tuz stresi şiddetinin gelişimi farklı genotiplerde ve farklı zaman aralığında farklı seviyelerde yanıt verdiği gözlemlenmiştir. MDA analizi sonuçlarımızda yonca kallus dokularında tuz stresi altında MDA aktivitesinde önemli bir şekilde artış gözlenmiş olup genotipler arasında kısa süreli uygulamada belirgin farklar olmasına rağmen uzun süreli uygulamalarda belirgin değişiklik gözlenmemektedir. Membran zarar gördükten sonra MDA ürününün hızlı bir şekilde üretilmesini doğrulamaktadır. Yine de özellikle ZnO ve

CaO nanopartiküllerinin tuz stresini önemli ölçüde iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu durum kallus dokusunun hücre membranı üzerine reaktif oksijen türevlerinin lipid peroksidasyonu ile ilgili olmakta olup tuzla uyarılmış Ca, sitoplazma ve kofullarda bağlanma kapasitesini artırmıştır.

Koyro et al. 2006 yılında yaptıkları çalışmada tuza dayanıklı çeşitlerin, hassas çeşitlere nazaran daha az miktarda ürettikleri MDA, doku ve iyon sızıntısını da beraberinde getirmektedir. Tuz stresi altındaki susam bitkilerinde MDA içeriğinin arttığı ve 100 mM NaCl konsantrasyonun da en yüksek değere çıktığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda kallus dokularında MDA birikimi tuz stresine yanıtı bağlı olup genotipler arasındaki farklılık ve muamele süreleri bu hipotezi doğrulamaktadır. Yonca kallus dokuları tuz ve nanopartikül varlığında H₂O₂ biriktirdiği gözlemlenmiştir. Çizelge 4.2'deki sonuçlar diğer muamelelerle karşılaştırılınca özellikle CaO nanopartikülünün etkili bir şekilde iyileştirici sonucu olduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalar, tuza dayanıklı çeşitlerin, stres koşullarında H₂O₂ aktivitelerini arttırdığını göstermiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda fasulyede tuz stresi koşullarında H₂O₂ aktivitesinin arttığını göstermişlerdir (Erdal 2012). Bu çalışmada, tuz stresi çalışılan tüm çeşitlerin kallus dokularında H₂O₂ aktivitesi kademeli olarak artmıştır (Şekil 4.2). Tuz stresi altındaki buğday çeşitlerinin, H₂O₂ aktivitesi açısından benzer bir cevap bulunmuştur (Sairam and Srivastava 2002). Bu sonuçlar hem tuzla muamele edilmiş hem de CuO, ZnO ve CaO nanopartikülleri ile muamele edilmiş koşullar altında tuz stresi ile H₂O₂ arasında anlamlı bir pozitif ilişki olduğunu göstermiştir. Bu sonuç H₂O₂ bitkilerin çeşitli dokularında tuz stresine yanıtta direk rol oynadığının kanıtıdır.

POD aktivitesi H₂O₂ toksik konsantrasyonuna karşı hücreleri korur aynı zamanda tuz stresi altında fenolik bileşiklerin oksidasyonunda önemli bir role sahiptir. Bütün kallus kültüründe nanopartikül uygulamaları POD aktivitesine yanıtta tuz stresinin olumsuz etkisini pozitif yönde iyileştirmiştir. Stresin şiddetindeki azalma *Erzurum* genotipinin ikinci haftasında 1,7257 g⁻¹ FW değerinde *Muş* genotipinin birinci haftasında 0,4983 g⁻¹ FW değerindedir. Bu değerler gösteriyor ki strese maruz kalma süresi POD aktivisinde ana faktör olabilir (Şekil 4.3). Benzer sonuçları Mozafari et al.

2018’de yaptıkları çalışmada çilek bitkilerine *in vitro* şartlarda nanopartikül uygulaması kuraklık stresinin olumsuz etkisinin engellenebileceğini bildirmişlerdir.

Protein miktarı açısından birinci hafta *Erzurum* kallus hücreleri CaO nanopartikül uygulaması tuz stresini engellemiştir ve kontrol kallus hücreleri ile karşılaştırılınca önemli miktarda iyileştirici özellik göstermiştir (Şekil 4.4). İkinci hafta *Erzurum* kallus hücrelerinde protein miktarında herhangi bir değişiklik göstermeksizin kontrol hatları ile benzer durum göstermiştir (Şekil 4.4). Hücre içindeki toplam protein miktarı farklı büyüme koşulları altında metabolik aktivitenin bir işaretidir. Çinko mikro besin elementi olup metabolik aktiviteyi düzenler ve bitki hücrelerinin protein biyosentezi kofaktör olarak önemlidir (Priyanka et al. 2019). Tüm nanopartikül uygulamaları protein artışı ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından yapılan farklı bitki türlerinin çalışmaları ile uyumaktadır. Domates bitkisinde tuz stresi altında yapılan çalışmada ZnO uygulaması protein içeriğini arttırdığını bildirmişlerdir (Alharby et al. 2016). Benzer sonuçlar tütün bitkisi kallus hücreleri üzerinde yapılan çalışmada kloroplast gelişimine ZnO kritik enzim biyosentezinde olumlu sonuç verdiklerini bildirmişlerdir (Yoshihara et al. 2019). Bu sonuçlar ZnO formunun Zn iyon formundan hücresel seviyede daha etkili olduğunu belirlemişler fakat ZnO yüksek dozlarda iyon toksisitesine sebep olduklarını bildirmişlerdir.

Nanopartiküller bitki yaprak ve hücrelerine girme yeteneğine sahip olup hücreler içerisine apoplast yolu ile korteks, epidermis ve kök yüzeyine yapışarak taşınırlar. Nanopartikülün etkinliği kimyasal kompozisyon, yüzey reaktif, doz etkisine ve en önemlisi bitki türü ve hücre tipine bağlıdır.

CLSM analizi sonuçlarımızda kontrol örnekleri, yalnız NaCl uygulanan yalnız nanopartikül içeren ve hem NaCl hemde nanopartikül içeren kallus hücrelerinde stres gelişimi farklı seviyelerde olduğunu doğrulamıştır. (Şekil 4.5a, Şekil 4.5b, Şekil 4.6a, Şekil 4.6b, Şekil 4.7a, Şekil 4.7b, Şekil 4.8a ve Şekil 4.8b). *Muş* genotipi kalluslarının birinci hafta tuz muamelesinde hücre ölümlerinin artmasıyla birlikte CuO, ZnO ve CaO nanopartikül uygulaması hücre ölümlerini azaltarak tuz stresinin gelişimini engellemişlerdir. Ayrıca birinci hafta CLSM örneklerinin nanopartiküllerin hücre

içindeki birikimi ikinci hafta örneklerinden daha etkili oldukları görülmüştür (Şekil 4.5a ve Şekil 4.5b). Şekil 4.5 K'de kallus hücrelerinde CaO birikimi daha yoğun kırmızı renkte biriktiği bu hipotezi doğrulamaktadır. Tuza dayanıklılığın seviyesi kallustaki protein miktarı ve nanopartikülün iyileştirici etkisi ile doğrudan alakalıdır. Tuz stresinde proteinler temel bileşen olarak rol oynarlar çünkü bitki hücre döngüsü ve işlevinde protein metabolizması, gen ifadesinin düzenlenmesi, enerji, protein, ozmolit metabolizması savunması ile ilgili proteinler, fito-hormonlar, yağ ve sekonder metabolitler, hücre içi sinyal iletim yollarını içeren tuz aklimatizasyonuna yardımcı hücre süreçlerinin faaliyetlerine katılırlar.

Radi et. al. 2018 yılında TEM analizi ile Zn yüksek konsantrasyonlarının hücrede biriktiğini hücrenin alt bileşenlerine ciddi zarara sebep olduklarını doğrulamışlardır. Benzer sonuçları Yazıcılar ve ark. 2020 yılında CaO nanopartikülünün yüksek konsantrasyonlarının tritikale kallus hücrelerinde benzer hücre hasarına sebep olduklarını CLSM analizi ile doğrulamışlardır. Bu Zn, Ca ve Cu yüksek miktarda üretimi ROS'i uyararak enzim metabolizmasını, yukarı akış gen düzenlemesini stres ile ilgili proteinlerin biyosentezini engelleyerek hücreyi ölüme götürmektedir (Hou et al. 2018).

CLSM ve SEM analizi Kontrol, 50 mM NaCl, 0,8 ppm CaO, 0,8 ppm CuO, 0,8 ppm ZnO, kallus oluşum öncesi 50 mM NaCl 0.8 ppm CaO, 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO, 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO uygulaması için yapılmıştır. CLSM görüntüleri, Nikon Eclips TE2000 Lazer Taramalı Mikroskobu ile 50 µm boyutunda, SEM görüntüleri ise Quante FEG 250 Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak 50 µm boyutunda alınmıştır. Kullanılan dozların miktarları daha önceden yapılan araştırmalar sonucu belirlenmiştir (Yazıcılar ve ark. 2020). Rodamin boyası kullanılarak alınan görüntüler kontrol uygulamasına karşı nanopartikül uygulaması partiküllerin hücre içerisine giriş yaptığını fakat kısa süreli ve uzun süreli uygulamalar genotipten genotipe değişiklik göstermiştir (Şekil 4.5a, Şekil 4.5b, Şekil 4.6a, Şekil 4.6b, Şekil 4.7a, Şekil 4.7b, Şekil 4.8a ve Şekil 4.8b)

CLSM ve SEM analizi sonuçlarına bakıldığında birinci hafta *Muş* genotipinde CaO nanopartikül uygulaması tuz stresi üzerine beklenen düzeyde iyileştirici bir etki

sağlamıştır. Özellikle CLSM görüntülerinde CaO uygulaması ZnO ve CuO uygulamasından 50 mM NaCl'nin negatif etkisini daha hızlı bir şekilde engelleyerek hücre içerisinde yoğun dağılım göstermiştir (Şekil 4.5b K). SEM görüntüleri CLSM analizinden alınan sonuçları desteklemektedir (Şekil 4.5b J, Şekil 4.5b L, EK 1 ve EK 2). Benzer sonuçları Chaudhury and Qu (2000) köpek dişi bitkisinin embriyogenik olmayan kallus dokularının SEM görüntüleri üzerinde uzamış ve tübüler yapıları gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da kallus hücrelerinde CaO nanopartikül uygulaması uzamış tübüler yapılar gözlemlenmiştir.

İkinci haftaya göre *Muş* genotipinin CuO nanopartikül uygulaması en iyi sonucu göstermiş olup birinci hafta ile karşılaştırınca CuO nanopartikülü kısa süreli uygulamada hücrenin belli kısımlarında yoğun birikim göstermiş, süre uzadıkça hücre içerisine eş zamanlı dağılım göstererek tuzun negatif etkisini engellemiştir (Şekil 4.6b O). Nogueira et al. 2007'deki çalışmalarında *Byrsonima intermediate* bitkisinin embriyogenik olmayan kallusların erken aşamasında nanopartikül uygulamaksızın 140 x 30 µm boyutunda görüntüler gözlemlemişlerdir. ZnO uygulamasının hücre içerisine alım kapasitesinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6b M). İlginç bir şekilde birinci hafta CaO uygulaması ikinci hafta ile karşılaştırılınca ikinci hafta uygulamasında tuzun stresinin negatif etkisi üzerine herhangi bir olumlu sonucu görülmemiştir (Şekil 4.6b K). Bu sonuca bakılarak, büyük olasılıkla CaO nanopartikülleri hücre içerisine hızlı bir şekilde girmekte olup kısa süreli uygulamalar için önerilmektedir.

Birinci hafta *Erzurum* kallus hücreleri CLSM ve SEM görüntülerine göre tuzun stresine karşı 0.8 ppm ZnO uygulaması en iyi sonucu göstermiştir (Şekil 4.7b M). ZnO alımı CaO ve CuO ile karşılaştırılınca daha yavaş olmasına rağmen *Erzurum* genotipinde farklı bir durum göstererek ZnO alımı daha hızlı bir şekilde etkili olmuştur. Bu sonuç kallus kültüründe hormon ve nanopartikül uygulamasının büyük oranda genotipe bağlı olduğunu göstermektedir. Kokina et al. 2017 yılında *Linum usitatissimum* L. bitkisinin embriyogenik kalluslarına herhangi bir stres faktörü uygulamadan yalnız Fe₃O₄ uygulaması 9 haftalık kültür koşullarında somatik embriyo gelişimini önemli oranda arttırdığını kallus görüntülerinin yumuşak ve globüler halinde oluştuğunu hem SEM hemde AFM mikroskobu altında gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da tuz stresine karşı en iyi engelleyici etkinin kallus görüntüleri ve

değerleri SEM altında 50 mM NaCl 0.8 ppm ZnO uygulamasında gözlemlenmiştir (Şekil 4.7b J, Şekil 4.7b N, EK 3 ve EK 4).

İkinci hafta *Erzurum* genotipinin CLSM ve SEM görüntülerinde ise en iyi CuO uygulamasında alınmıştır (Şekil 4.8b O). CLSM altında birinci hafta uygulaması ile karşılaştırılınca ikinci haftada hücre içerisine yoğun bir dağılım göstermiştir. SEM görüntüsü bu yoğun dağılım miktarını doğrulamaktadır (Şekil 4.7a, Şekil 4.7b, Şekil 4.8a ve Şekil 4.8b). Yukarıda bahsettiğimiz Kokina et al. 2017 9 haftalık ęalıŐması benzer Şekilde Fe₃O₄ ün hücre içerisine girdiği uzun süreli uygulamada yoğun bir dağılım gösterdiği SEM görüntüsünde gözlemlenmiştir. Basu et al. 1997 yılında ęeltik bitkisinin kallusları üzerine yaptıkları ęalıŐmada ise SEM görüntülerinin kontrol kalluslarının daha fazla globüler Şekiller gösterdiği tuz uygulamasını globüler yapıların daha ciddi bir Şekilde azalttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar bizim ęalıŐmamızdaki tuz stresine karşı SEM analizi sonucunu ve değerlerini destekler niteliktedir (Şekil 4.8b J, Şekil 4.8b P, EK 5 ve EK 6).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada *Muş* ve *Erzurum* genotiplerinin *in vitro* koşullarda kallus oluşum öncesi nanopartikülle uygulama yapılan ve tuz stresine bırakılan ve kallus oluşum sonrası nanopartikülle uygulama yapılmayan ve tuz stresine bırakılmayan yonca genotiplerinin verdikleri yanıtlar belirlenmiştir. Bunun yanında kallusların 7 ve 14 günlük nanopartikül ve tuz stresi altında antioksidan enzim aktivitesi, CLSM ve SEM görüntüleri de belirlenmiştir. 7 ve 14 günlük zaman dilimlerinde nanopartikül ve tuz stresine bırakılan kallusların MDA, hidrojen peroksit miktarları ve protein içeriklerine de bakılmıştır.

Yapılan analiz sonuçlarına bakıldığı zaman tuz stresi altında hücreye en fazla hasarlar kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulamaları olduğu sonucuna varılmıştır, Bu sonucu CLSM ve SEM görüntüleri de desteklemiştir.

Analiz sonuçlarına göre birinci hafta *Muş* ve *Erzurum* genotiplerinin diğer haftalara göre farklılıklar göstermiştir. Genotiplerin MDA analiz sonuçlarına bakıldığı zaman hücreye en az hasar kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulaması yapılan 0,8 ppm CaO 50 mM NaCl konsantrasyonu, en çok hasarı ise kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulanan 0,8 ppm CaO 50 mM NaCl olduğu görölmüştür. Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulamaları karşılaştırıldığında MDA analizine göre en iyi sonucu CaO nanopartikülü vermiştir, kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulamaları karşılaştırıldığında ise en iyi sonucu ZnO nanopartikülü vermiştir.

Genotiplerin H₂O₂ analiz sonuçlarına bakıldığı zaman hücreye en az hasar kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulaması yapılan 0,8 ppm CuO konsantrasyonu, en çok hasarı ise kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 0,8 ppm CuO olduğu görölmüştür. Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulamaları karşılaştırıldığında H₂O₂ analizine göre en iyi sonucu CaO nanopartikülü vermiştir, kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulamaları karşılaştırıldığında ise en iyi sonucu CuO nanopartikülü vermiştir.

Genotiplerin POD analizi sonuçlarına bakıldığı zaman hücreye en az hasar kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 0,8 ppm CuO konsantrasyonu, en çok hasarı ise 50 mM NaCl'nin verdiği görülmüştür. Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulamaları karşılaştırıldığında POD analizine göre en iyi sonucu CaO nanopartikülü vermiştir, kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulamaları karşılaştırıldığında ise en iyi sonucu CuO nanopartikülü vermiştir.

Genotiplerin protein miktarlarının sonuçlarına bakıldığı zaman hücrede en fazla protein miktarı kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 0,8 ppm CuO 50 mM NaCl konsantrasyonu, hücrede en az protein miktarı kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulaması yapılan 0,8 ppm CuO olduğu görülmüştür. Kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulamaları karşılaştırıldığında içerdikleri protein miktarlarına göre en iyi sonucu ZnO nanopartikülü vermiştir, kallus oluşum sonrası nanopartikül uygulamaları karşılaştırıldığında ise en iyi sonucu ZnO nanopartikülü vermiştir.

Nanopartiküllerin hücre içine geçişlerini doğrulamak için kallusların CLSM görüntüleri alınmıştır. Kalluslardan preparat hazırlanarak CLSM görüntüleri alınan dokuların *in vitro* koşullarda nanopartikül ve tuz stresi altında hücre içerisinde ne kadar biriktiklerini göstermiştir. Kullanılan nanopartikül çeşitleri yonca genotiplerinde ne kadar birikim gösterdiğini kolayca tespit edilebileceği ortaya çıkmıştır.

Muş genotipinin birinci hafta CLSM görüntüleri sonucuna bakıldığında kontrol kesitine kıyasla, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO kesitinde en fazla nanopartikül birikimi olduğu, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO kesitinde daha çok hücre etrafında nanopartikül biriktiği, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO kesitinde ise hücre içerisinde en az nanopartikül birikimi olduğu gözlemlenmiştir.

Muş genotipinin ikinci hafta CLSM görüntüleri sonucuna bakıldığında kontrol kesitine kıyasla, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO kesitinde en fazla nanopartikül birikimi olduğukallus oluşum öncesi

nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO kesitinde ise hücre içerisinde en az nanopartikül birikimi olduğu gözlemlenmiştir.

Erzurum genotipinin birinci hafta CLSM görüntüleri sonucuna bakıldığında kontrol kesitine kıyasla, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO kesitinde en fazla nanopartikül birikimi olduğu, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO kesitinde daha çok hücre etrafında nanopartikül biriktiği, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO kesitinde ise hücre içerisinde en az nanopartikül birikimi olduğu gözlemlenmiştir.

Erzurum genotipinin ikinci hafta CLSM görüntüleri sonucuna bakıldığında kontrol kesitine kıyasla, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO kesitinde en fazla nanopartikül birikimi olduğu, kallus oluşum öncesi nanopartikül uygulaması yapılan 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO kesitinde ise hücre içerisinde en az nanopartikül birikimi olduğu gözlemlenmiştir.

Preparat hazırlanarak SEM görüntülerine bakılan kallusların tuz stresi ve nanopartikül uygulamasında dokuların nasıl şekillendikleri görülmüştür. SEM analiz sonuçlarına bakıldığından CLSM görüntüleriyle uyum sağladığı yani CLSM görüntüleri destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Yapılan araştırmalar ve sonuçlar doğrultusunda aşağıdaki öneriler verilebilir;

- ✓ Yonca genotiplerinde yapılan bu çalışmada diğer baklagiller içinde *in vitro* koşullarda tuz stresi altında nanopartikül çalışmaları içinde uygulanabilir.
- ✓ Laboratuvar koşullarında başka stres kaynaklı seleksiyon için daha fazla sayıda örneklerin seçiminde kullanılması için hızlı bir yöntemdir.
- ✓ Tarla denemelerinde meydana gelebilecek kontrol dışı sorunlar bu şekilde önlenabilir.
- ✓ Bitki fizyolojik parametre analizleri ve mikroskop görüntüleri daha güvenilir sonuçlar alınmasına imkan sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Aarti, P.D., Tanaka, R., Tanaka, A. 2006. Effects of oxidative stress on chlorophyll biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons, *Physiologia Plantarum*, 128(1), 186–197.
- Akbar, Mozafari A., Dedejani, S., Ghaderi, N. 2018. Positive responses of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) explants to salicylic and iron nanoparticle application under salinity conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(2), 267-275.
- Akbaş, T. and Özarslan, C. 2007. Nanoteknoloji ve tarımda uygulama olanakları. Tarımsal Mekanizasyon 24. Ulusal Kongresi, 5-6 Eylül, Kahramanmaraş Sütü İmam Üniversitesi, Bildiri Özetleri Kitabı, ÇDT-24, Kahramanmaraş.
- Alharby, H. F., Metwali, E. M., Fuller, M. P., Aldhebiani, A.Y. 2016. Impact of application of zinc oxide nanoparticles on callus induction, plant regeneration, element content and antioxidant enzyme activity in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under salt stress. *Archives of Biological Sciences*, 68(4), 723-735.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M. A. 2013. “Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881.
- Alloway, B. J. 2009. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans, *Environmental Geochemistry and Health*, 31(5), 537–548.
- Arbona, V., Manzi, M, Ollas, C. D., Gómez-Cadenas, A. 2013. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Science*, 14(3), 4885–911.
- Arinze, E. A., Schoenau, G. J., Sokhansanj, S., Adapa, P. 2003. Aerodynamic separation and fractional drying of alfalfa leaves and stems. *Drying Technology*, 21(9), 1669-1698.
- Armstrong, JM. 1954. Cytological studies in alfalfa polyploids. *Canadian Journal of Botany*, 32, 531 542.
- Bagavathiannan, M.V., Julier, B., Barre, P., Gulden, R. H., Van Acker, R. C. 2010. Genetic diversity of feral alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations occurring in

- Manitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: an analysis using SSR markers and phenotypic traits. *Euphytica*, 173(3), 419-432. Bal, H and Sezgin, M. 2007. Teknolojik Gelişim ve Ulusal Teknolojik Düzeyimiz. *Kalkınmada Anahtar Verimlilik, DergiPark*, 218 (19), 10-11.
- Bansal, P., Duhan, J. S., Gahlawat, S.K. 2014. Biogenesis of nanoparticles: a review, *African Journal of Biotechnology*, 13(28), 2778–2785.
- Basu, S., Gangopadhyay, G., Mukherjee, B. B., Gupta, S. 1997. Plant regeneration of salt adapted callus of indica rice (var. Basmati 370) in saline conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50(3), 153-159.
- Batista, C. A. S., Larson, R. G., Kotov, N. A. 2015. Nonadditivity of nanoparticle interactions. *Science*, 350(6257), 1242477.
- Benjamin, F.T. and Raymond, T. J. 1978. *Diagnostic Electron Microscopy*. John Wiley and Sons, 1980, New York.
- Beykaya, M. and 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.
- Bezirganoğlu, İ. 2017. Response of five triticale genotypes to salt stress in in vitro culture. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41(5), 372-380.
- Bhargava, S. and Sawant, K. 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132(1), 21–32.
- Bozzola, J. J. and Russell, L. D. 1998. *Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologist*. Jones and Bartlett Publishing, 542, London.
- Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D., Delmer, D. P. 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, 205(4411), 1144-1147.
- Chance, B. and Maehly, A. C. 1955 Assay of Catalase and Peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
- Chaudhury, A., and Qu, R. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60(2), 113-120.

- Chee, G., Shafel, T., Park, S. H., Jun, S. 2015. Pulsed- CO₂ Laser Beam Photothermal Technology Combined with Conjugated Gold Nanoparticles for the Selective Elimination of Surface *Escherichia Coli* K12 from Fresh Fruits. *Journal of Food Process Engineering*, 38(5), 437-444.
- Chen, H., Seiber, J. N., Hotze, M. 2014. ACS select on nanotechnology in food and agriculture: a perspective on implications and applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1209–1212.
- Cho, K. H., Park, J. E., Osaka, T., Park, S. G. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 51(5), 956–960.
- Dai, A. 2012. Drought under global warming: a review. *Wires Climate Change*, 2(1), 45–65.
- Demirkıran, A. 2019. Nanoteknolojinin İnsan Sağlığına Faydalı ve Zararlı Yönleri. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(2), 136-148.
- Dietz, K. J., and Herth, S. 2011. Plant nanotoxicology. *Trends in plant science*, 16(11), 582-589.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D.E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W.P., Boyanov, M. I., Anderson, A. J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9), 1125.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., Ballenger, J. A., Palmer, J. D. 1996. The distribution and phylogenetic significance of a 50-kb chloroplast DNA inversion in the flowering plant family *Leguminosae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(2), 429-438.
- Elfattah, M. S. A. 2010. Sustainable use of leaf cutting bee hives for alfalfa pollination. *Munis Entomology and Zoology*, 5(2), 807-811.
- El-Temsah, Y. S. and Joner, E. J. 2012. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental Toxicology*, 27(1), 42–49.

- Erdal, S. 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 1-7.
- Etienne, H., Lartaud, M., Carron, M. P., Michaux-Ferrière, N. 1997. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Journal of experimental botany*, 48(1), 129-137.
- Everhart, T. E., and Hayes, T. L. 1972. The scanning electron microscope. *Scientific American*, 226(1), 54-69.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable Agriculture*, 29, 153-188.
- Flora, S. J. S., Mittal, M., Mehta, A. 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 501-523.
- Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 307-319.
- Fowke, L. C. 1995. Transmission and scanning electron microscopy for plant protoplasts, cultured cells and tissues. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 229-238.
- Gangloff, W. J., Westfall, D. G., Peterson, G. A., Mortvedt, J. J. 2006. Mobility of organic and inorganic zinc fertilizers in soils. *Communications Soil Science Plant Analysis*, 37(1-2), 199-209.
- Ghosh, M., Bhadra, S., Adegoke, A., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A. 2015. MWCNT uptake in *Allium cepa* root cells induces cytotoxic and genotoxic responses and results in DNA hyper-methylation. *Mutation Researches/ Fundamental Molecular Mechanisms Mutagenesis*, 774, 49-58
- Gruhn, P., Goletti, F., Yudelman, M. 2000. Integrated nutrient management, soil fertility, and sustainable agriculture: current issues and future challenges. *International Food Policy Research Institute*, 32, Washington.

- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1–11.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. 2013. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. *Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture*, 13, 169-205.
- Haverkamp, R. G. and Marshall, A. T. 2009. The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(6), 1453-1463.
- Hayat, M. A. 1978. Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy. *Biological applications*, 1, 273.
- Heath, R. L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hou, J., Wu, Y., Li, X., Wei, B., Li, S., Wang, X. 2018. Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. *Chemosphere*, 193, 852-860.
- Huggins, D. R., Randall, G. W., Russelle, M. P. 2001. Subsurface drain losses of water and nitrate following conversion of perennials to row crops. *Agronomy Journal*, 93(3), 477-486.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture Biology*, 11(1), 100–105.
- Jaleel, C. A., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R. 2007. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turkish Journal of Biology*, 32(2), 79–83.
- James, R. A., Blake, C., Byrt, C. S., Munns, R. 2011. Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2939–2947.

- Jammes, F., Hu, H. C., Villiers, F., Bouten, R., Kwak, J.M. 2011. Calcium-permeable channels in plant cells. *The FEBS Journal*, 278(22), 4262–4276.
- Katano, K., Honda, K., Suzuki, N. 2018. Integration between ROS Regulatory Systems and Other Signals in the Regulation of Various Types of Heat Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3370.
- Kaveh, R., Li, Y. S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C. L., Van Aken, B. 2013. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environmental Science Technology*, 47(18), 10637–10644.
- Khalid, R., Alhazaa, A. N., Khan, M. M. 2018. Synthesis, characterization and properties of Mn-doped ZnO nanoparticles. *Applied Physics A*, 124(8), 536
- Khalil, M. M. H., Ismail, E. H., El-Magdoub, F. 2012. Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract: 1st nano updates. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4), 431–437.
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931
- Kokina, I., Mickeviča, I., Jahundoviča, I., Ogurcovs, A., Krasovska, M., Jermaļonoka, M., Gerbreders, V. 2017. Plant explants grown on medium supplemented with Fe₃O₄ nanoparticles have a significant increase in embryogenesis. *Journal of Nanomaterials*, 2017.
- Koyro, H. W. 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environmental and Experimental Botany*, 56(2), 136-146.
- Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 407(19), 5243–5246.
- Landa, P., Vankova, R., Andrlova, J., Hodek, J., Marsik, P., Storchova, H., Vanek, T. 2012. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *Journal of hazardous materials*, 241, 55-62.

- Lee, C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y. C., Braam, J., Alvarez, P. J. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(3), 669–675.
- Lee, H., Lee, G., Jang, N., Yun, J., Song, J. K. B. 2011. Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract. *Nanotechnology*, 1(1), 371–374
- Lesins, K. and Gillies, C. B. 1972. Taxonomy and cytogenetics of *Medicago*. *Alfalfa science and technology*, 15, 53-86.
- Lesins, K. A. and Lesins, I. 1979. Genus *Medicago* (*Leguminosae*): a taxogenetic study. Springer Science & Business Media, 227, New York.
- Li, W. L., Li, X. H., Zhang, P. P., Xing, Y. G. 2011. Development of nano-ZnO coated food packaging film and its inhibitory effect on *Escherichia coli* in vitro and in actual tests. In *Advanced Materials Research*, 152, 489-492
- Liu, H. H., Cohen, Y. 2014. Multimedia environmental distribution of engineered nanomaterials. *Environmental science and technology*, 48(6), 3281-3292.
- Liveri, V. T. 2006. *Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems*. Springer Science & Business Media, 166, New York.
- Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A. S., Janardhan Reddy, K. 2006. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer, 1-14.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C., Sohrabi, E. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4(8), 580.
- Mamalis, A. G. 2007. Recent advances in nanotechnology. *Journal of Materials Processing Technology*, 181(1-3), 52-58.
- Marton, L. 1968. *Early history of the electron microscope*. San Francisco Press, 1, 1-8. San Francisco.
- Mezni, M., Albouchi, A., Bizid, E., 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., Rumbaugh, M. D. 1988. World Distribution and Historical Development. *Alfalfa and Alfalfa improvement*, 29, 25-91.

- Miller, J. C., Serrato, R., Represas-Cardenas, J. M., Kundahl, G. 2004. The Handbook of Nanotechnology : Business, policy and intellectual property law, 368, New Jersey.
- Minta, A., Kao, J. P., Tsien, R. Y. 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 8171-8.
- Mishra, A. K. and Singh, V.P. 2011. Drought modeling—a review. *Journal of Hydrology*, 403(1-2), 157–175.
- Mishra, S., Singh, B.R., Singh, A., Keswani, C. Naqvi, A.H., Singh, H.B. 2014. Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *PLoS One*, 9(5), e97881.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J.T., Yacaman, M. J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2354.
- Mortvedt, J. J. 1992. Crop response to level of water-soluble zinc in granular zinc fertilizers. *Fertilizer Research*, 33(3), 249–255.
- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
- Murashige, T. and Skoog, F. A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. Sreekanth, T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants:a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216.
- Nalci, O. B., Nadaroglu, H., Pour, A. H., Gungor, A. A., Haliloglu, K. 2019. Effects of ZnO, CuO and γ -Fe₃O₄ nanoparticles on mature embryo culture of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136(2), 269-277.
- Nezhadahmadi, A., Hossain Prodhon, Z., Faruq, G. 2013. Drought tolerance in wheat. *The Scientific World Journal*, 1–12.

- Ngamcharussrivichai, C., Meechan, W., Ketcong, A., Kangwansaichon, K., Butnark, S. 2011. Preparation of heterogeneous catalysts from limestone for transesterification of vegetable oils—Effects of binder addition *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 17(3), 587-595.
- Nogueira, R. C., Paiva, R. P., Porto, J. M. P., Nicioli, P. M., Stein, V. C., Deuner, S., Alves, E. 2007. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Revista Brasileira de Biociências*, 5(S2), 48-50.
- 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.
- Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmed, A. S., Ahmed, F., Ahmad, E., Sherwani, A., Owais, M., Azam, A. 2013. Antibacterial and cytotoxic efficacy of extracellular silver nanoparticles biofabricated from chromium reducing novel OS4 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One*, 8(3), e59140.
- Owolade, O., Ogunleti, D., Adenekan, M. 2008. Effects of titanium dioxide on the diseases, development and yield of edible cowpea. *Journal of Plant Protection Research*, 48(3), 2942–2947.
- Oza, G., Reyes-Calderón, A., Mewada, A., Arriaga, L. G., Cabrera, G. B., Luna, D. E., Sharma, A. (2020). Plant-based metal and metal alloy nanoparticle synthesis: a comprehensive mechanistic approach. *Journal of Materials Science*, 1-22.
- Panda, K. K., Achary, M. M., Krishnaveni, R., Padhi, B. K., Sarangi, S. N., Sahu, S. N., 2011. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. *Toxicol In Vitro*, 25(5), 1097–1105.
- Panda, S. K., Chaudhury, I., Khan, M. H. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, 46(2), 289–294.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genectolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52(3), 199–223.

- Pelaez, M., Nolan, N. T., Pillai, S. C., Seery, M. K., Falaras, P., Kontos, A. G., Dunlop, P. S., Hamilton, J. W., Byrne, J. A., O'Shea, K. 2015. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, 125, 331–349.
- Peven, D. R. and Gruhn, J.D. 1985. The Development of Electron Microscopy. *Arch. Pathol Lab. Med*, 683-691.
- Philip, D. 2010. Rapid green synthesis of spherical gold nanoparticles using *Mangifera indica* leaf. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77(4), 807–810.
- Putnam, D., Russelle, M., Orloff, S., Kuhn, J., Fitzhugh, L., Godfrey, L., Long, R., 2001. Alfalfa, wildlife, and the environment. California Alfalfa and Forage Association, 168, California.
- Quiros, C. F. and Bauchan, G. R. 1988. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. *Alfalfa and Alfalfa improvement*, 29, 93-124.
- Quiros, C. F. 1982. Tetrasomic segregation for multiple alleles in alfalfa. *Genetics* 101(1), 117-127.
- Rahnama, A., James, R. A., Poustini, K., Munns, R. 2010. Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. *Functional Plant Biology*, 37(3), 255–263
- Rai, V., Acharya, S., Dey, N. 2012. Implications of nanobiosensors in agriculture. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3,10
- Rai M., A. 2012. Ingle, Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 287–293
- Ramli, M., Rossani, R. B., Nadia, Y., Darmawan, T. B., Ismail, Y. S. 2019. Nanoparticle fabrication of calcium oxide (CaO) mediated by the extract of red dragon fruit peels (*Hylocereus Polyrhizus*) and its application as inorganic–anti-microorganism materials. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509(1), 012090.
- Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A. 2012. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Mater Letters*, 71, 114–116.

- Rana, R. M., Rehman, S. U., Ahmed, J., Bilal, M. A. 2013. Comprehensive overview of recent advances in drought stress tolerance research in wheat (*Triticum aestivum* L.) Asian Journal Agriculture Biology, 1, 29–37.
- Rao, C. N. R., Müller, A., Cheetham, A. K. 2005. The chemistry of nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications. John Wiley & Sons, 740, New York.
- Rascio, N. and Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyper accumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? Plant Science, 180(2), 169–181.
- Rashid, A., and Ryan, J. 2004. Micronutrient constraints to crop production in soils with Mediterranean-type characteristics: a review, Journal Plant Nutrition, 27(6), 959–975.
- Rell'an-Álvarez, R., Ortega-Villasante, C., Álvarez-Fernández, A., Del Campo, F. F., Hernández, L. E. 2006. Stress responses of Zea mays to cadmium and mercury. Plant and Soil, 279(1-2), 41–50.
- Riahi-Madvar, A., Rezaee, F., Jalali, V. 2012. Effects of alumina nanoparticles on morphological properties and antioxidant system of *Triticum aestivum*. Iranian Journal of Plant Physiology, 3(1), 595–603.
- Rolls, G. O., Farmer, N.J., Hall, J.B. 2012. Melbourne (Australia): Leica Biosystems Pty Ltd. Artefacts in histological and cytological preparations, 106.
- Roy A. and Bhattacharya J. 2011. Microwave-assisted synthesis and characterization of CaO nanoparticles.” International Journal of Nanoscience, 10(03), 413-418.
- Rozema, J. and Flowers, T. 2008. Ecology: crops for a salinized world. Science, 322(5907), 1478–1480.
- Sairam, R. K., Rao, K. V., Srivastava, G. C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant science, 163(5), 1037-1046.
- Salehi-lisar, S. Y., Motafakkerzad, R., Hossain, M. M., Rahman, I. M. M. 2012. Water stress in plants: causes, effects and responses, water stress. Published by Intech, 300, Croatia.

- Sang, L., Zhao, Y., Burda, C. 2014. TiO₂ nanoparticles as functional building blocks, *Chemical Reviews*, 114(19), 9283–9318.
- Schreiber, L. 2010. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in plant science*, 15(10), 546-553.
- Schützendübel A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *The Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1351–1365.
- Sergieva, I., Alxieva, V., Karanov, E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comp Rend Acad Bulg Sci*, 51(3), 121-124.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A., Zhao, C. X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331(3), 215–225.
- Sharma, R., Chistib, Y., Banerjee, U.T. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627–662.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26.
- Sharma, P. R., Sharma, S. K., Antoine, R., Hsiao, B. S. 2019. Efficient removal of arsenic using zinc oxide nanocrystal-decorated regenerated microfibrillated cellulose scaffolds. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(6), 6140-6151.
- Shaw, A. K. and Hossain, Z. 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa L.*) seedlings. *Chemosphere*, 93(6), 906–915.
- Sheykh, B. N., Hasanzadeh, G. T. A., Baghestani, M. M., Zand, B. 2009. Study the effect of zinc foliar application on the quantitative and qualitative yield of grain corn under water stress. *Electronic Journal of Crop Production*, 2(2), 59-73.
- Shobha, G., Moses, V., Ananda, S. 2014. Biological synthesis of copper nanoparticles and its impact. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 3(8), 6–28.

- Shukla, P. K., Misra, P., Kole, C. 2016. Uptake, translocation, accumulation, transformation, and generational transmission of nanoparticles in plants. In *Plant Nanotechnology*, 183-218.
- Singh, J. 2006. Nanomaterials and Nanotechnology. *Asian Journal of Chemistry*, 18(5), 3271-3274.
- Singh, A., Singh, N. B., Hussain, I., Singh, H., Yadav, V. 2017. Synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and its impact on germination of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. *Tropical Plant Research*, 4(2), 246-253.
- Sinskaya, E. N. 1959. Diploid and tetraploid species of wildgrowing alfalfa in the flora of the U.S.S.R. *Canadian Journal of Botany*, 37(5), 1136-1138.
- Sridar, R., Ramanane, U. U., Rajasimman, M. 2018. ZnO nanoparticles–Synthesis, characterization and its application for phenol removal from synthetic and pharmaceutical industry wastewater. *Environmental nanotechnology, monitoring & management*, 10, 388-393.
- Stanford, E.H. 1951. Tetrasomic inheritance in alfalfa 1. *Agronomy Journal*, 43(5), 222-225
- Sumberg, J.E., Murphy, R.P., Lowe, C.C. 1983. Selection for fiber and protein concentration in a diverse alfalfa population 1. *Crop Science*, 23(1), 11-14
- Süzer, Ş. 2006. Nanoteknoloji, Kimyanın Sihirli Değneği ve Yüzeyle. *Bilim ve Teknik*, 9, 5-7.
- Takkar, P.N. and Walker, C.D. 1993. The distribution and correction of zinc deficiency, in: A.D. Robson (Ed.), *Zinc in Soils and Plants, Development in Plant and Soil Science*, 151–165.
- Tang, Y., He, R., Zhao, J., Nie, G., Xu, L., Xing, B. 2016. Oxidative stress induced toxicity of CuO nanoparticles and related toxicogenomic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution*, 212, 605–614.
- Tarhan, Ö., Gökmen, V., Harsa, Ş. 2010. Nanoteknolojinin gıda bilim ve teknolojisi alanındaki uygulamaları. *Gıda*, 35(3), 219-225.
- Tavallali, V., Rahemi, M., Maftoun, M., Panahi, B., Karimi, S., Ramezani, A., Vaezpour, M. 2009. Zinc influence and salt stress on photosynthesis, water

- relations, and carbonic anhydrase activity in pistachio. *Scientia Horticulturae*, 123(2), 272-279.
- Trenberth, K. E., Dai, A., Van Der Schrier, G., Jones, P. D., Barichivich, J., Briffa, K. R., Sheffield, J. 2014. Global warming and changes in drought. *Nature Climate Change*, 4(1), 17–22.
- Turkan, Y. 2015. The effects of nanotechnology investments on costs. *Journal of Economics Finance and Accounting*, 2(4).
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1), 59–66.
- Wahid, A. 2007. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *Journal of plant Research*, 120(2), 219-228.
- Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, G., Siosemardeh, A., Ghassemi-Golezani, K. 2012. Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max L.*). *Plant Omics*, 5(2), 60.
- Wuana, R. A. and Okieimen, F. E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *Ecology*, 2011, 2011.
- Xie, Y., He, Y., Irwin, P. L., Jin, T., Shi, X. 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied Environmental Microbiology*, 77 (7), 2325–2331.
- Xu, N. and Bewley, J. D. 1992. Contrasting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfalfa (*Medicago sativa L.*) as revealed by scanning electron microscopy. *Plant cell reports*, 11(5-6), 279-284.
- Yan, S., Zhao, L., Li, H., Zhang, Q., Tan, J., Huang, M., He, S., Li, L. 2013. Singlewalled carbon nanotubes selectively influence maize root tissue development accompanied by the change in the related gene expression. *Journal of Hazardous Materials*, 246, 110–118.

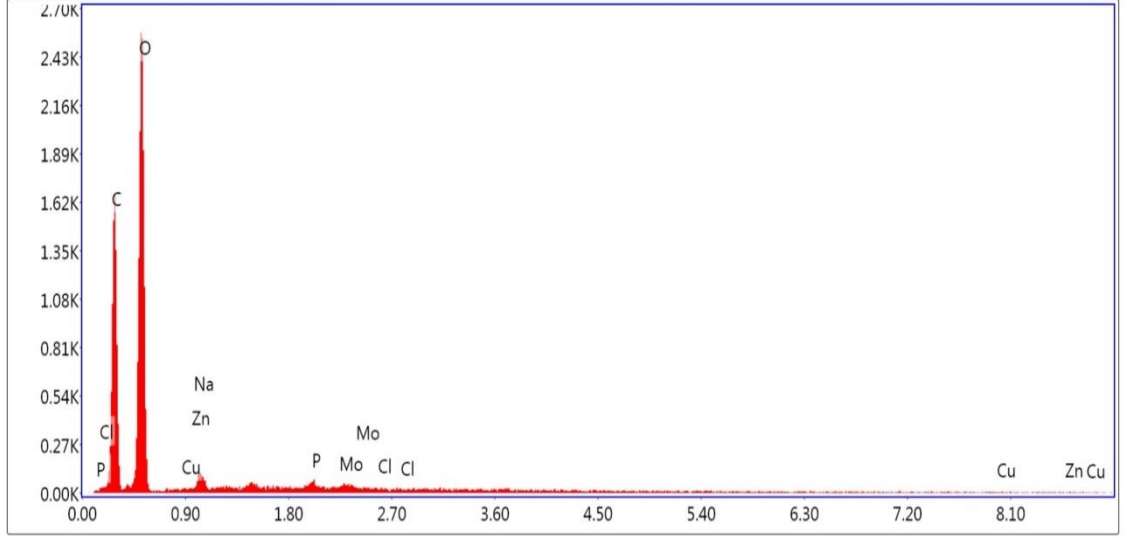
- Yao, K. S., Li, S. J., Tzeng, K. C., Cheng, T. C., Chang, C. Y., Chiu, C. Y., Lin, Z. P. 2009. Fluorescence silica nanoprobe as a biomarker for rapid detection of plant pathogens. In *Advanced materials research*, 79, 513-516.
- Yazıcılar, B., Böke, F., Alaylı, A., Nadaroglu, H., Gedikli, S., Bezirganoglu, I. 2020. In vitro effects of CaO nanoparticles on Triticale callus exposed to short and long-term salt stress. *Plant Cell Reports*, 1-14.
- Yee, Y., Tam, N. F. Y., Wong, Y. S., Lu, C. Y. 2003. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to water logging. *Environmental and Experimental Botany*, 49(3), 209-221.
- Yoshihara, S., Yamamoto, K., Nakajima, Y., Takeda, S., Kurahashi, K., Tokumoto, H. 2019. Absorption of zinc ions dissolved from zinc oxide nanoparticles in the tobacco callus improves plant productivity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(2), 377-385.
- Yu, J., Xu, D., Guan, H. N. 2016. Facile one-step green synthesis of gold nanoparticles using *Citrus maxima* aqueous extracts and its catalytic activity. *Materials Letters*, 166, 110–112.
- Yu, G., Wu, W., Zhao, Q., Wei, X., Lu, Q. 2015. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 288-294.
- Zengin, F. K. and Munzuroglu, O. 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47(2), 157–164.
- Zhang, P., Li, S., Zhao, P., Guo, Z., Lu, S. 2019. Comparative Physiological Analysis Reveals the Role of NR-Derived Nitric Oxide in the Cold Tolerance of Forage Legumes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1368.
- Zhou, B., Yao, W., Wang, S., Wang, X., Jiang, T. 2014. The metallothionein gene, TaMT3, from *Tamarix androssowii* confers Cd²⁺ tolerance in Tobacco. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 10398–10409.

Zlatev, Z. and Lidon, F. C. 2012. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24, 57–72.



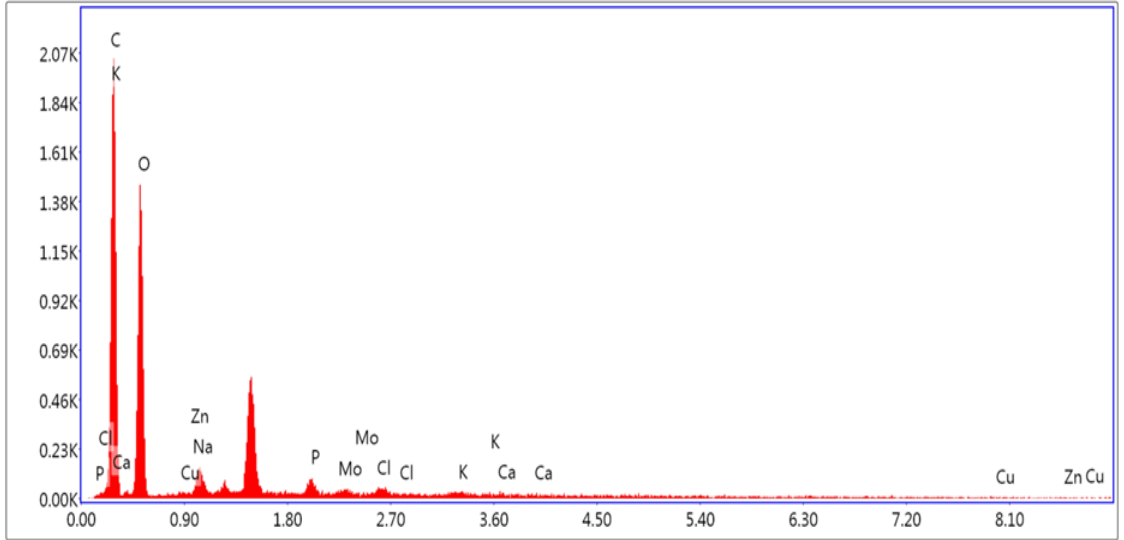
EKLER

EK-1



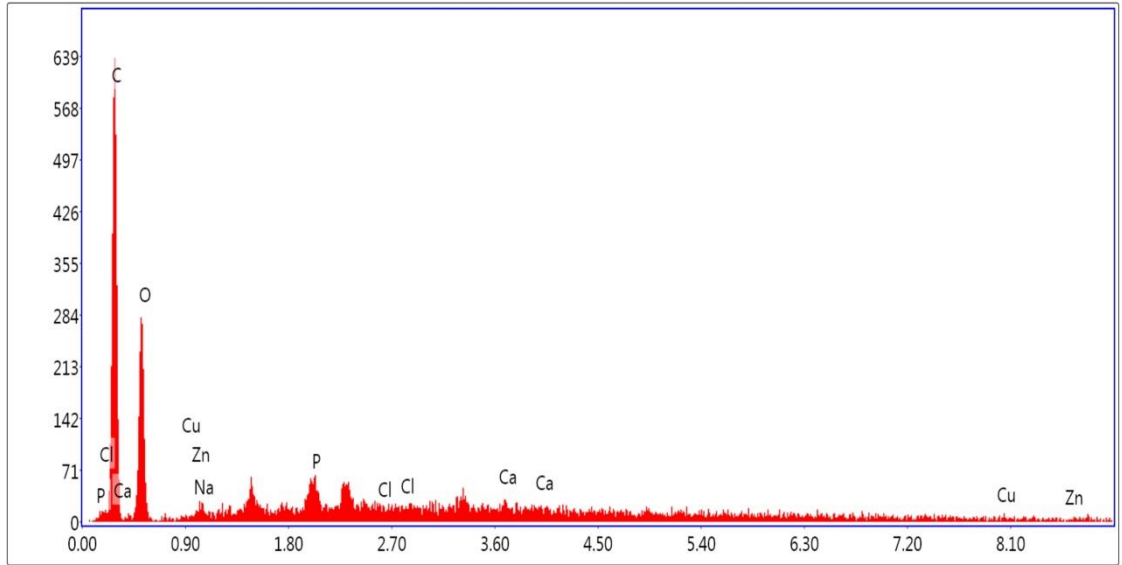
Birinci hafta Muş genotipinin 50 mM NaCl SEM analiz sonucu

EK-2



Birinci hafta *Muş* genotipinin 50 mM NaCl 0,8 ppm CaO SEM analiz sonucu

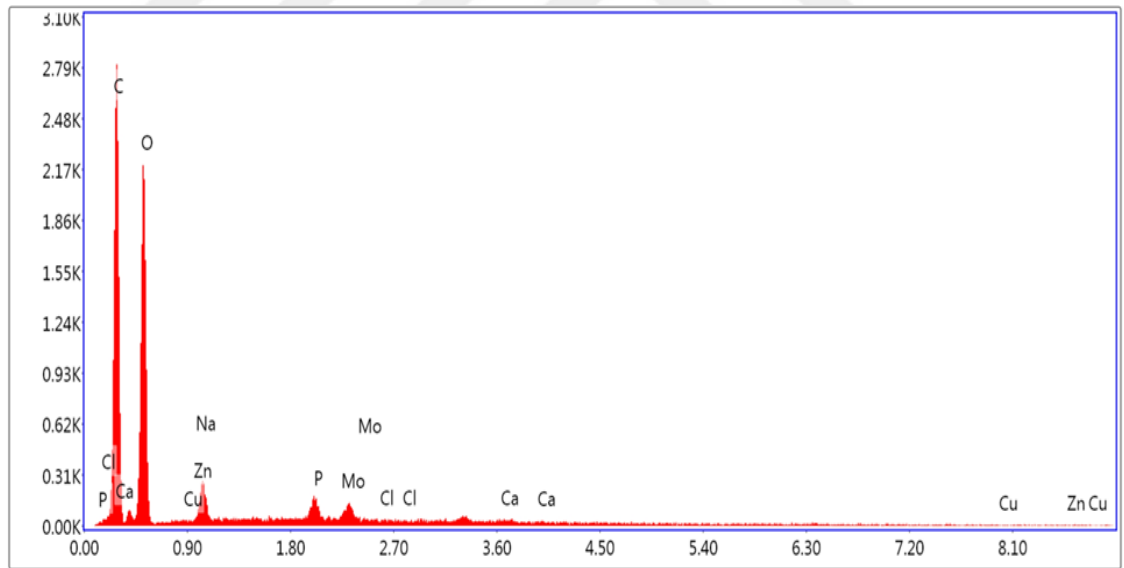
EK-3



Lsec: 28.10 Cnts 0.000 keV Det: Octane Pro Det

Birinci hafta *Erzurum* genotipinin 50 mM NaCl SEM analiz sonucu

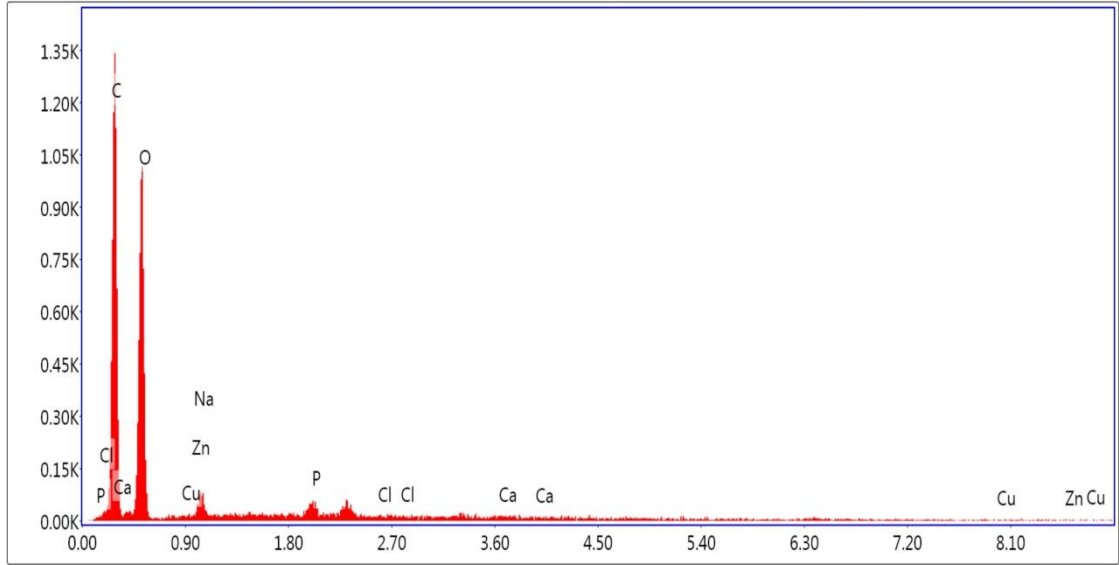
EK-4



Lsec: 28.30 Cnts 0.000 keV Det: Octane Pro Det

Birinci hafta *Erzurum* genotipinin 50 mM NaCl 0,8 ppm ZnO SEM analiz sonucu

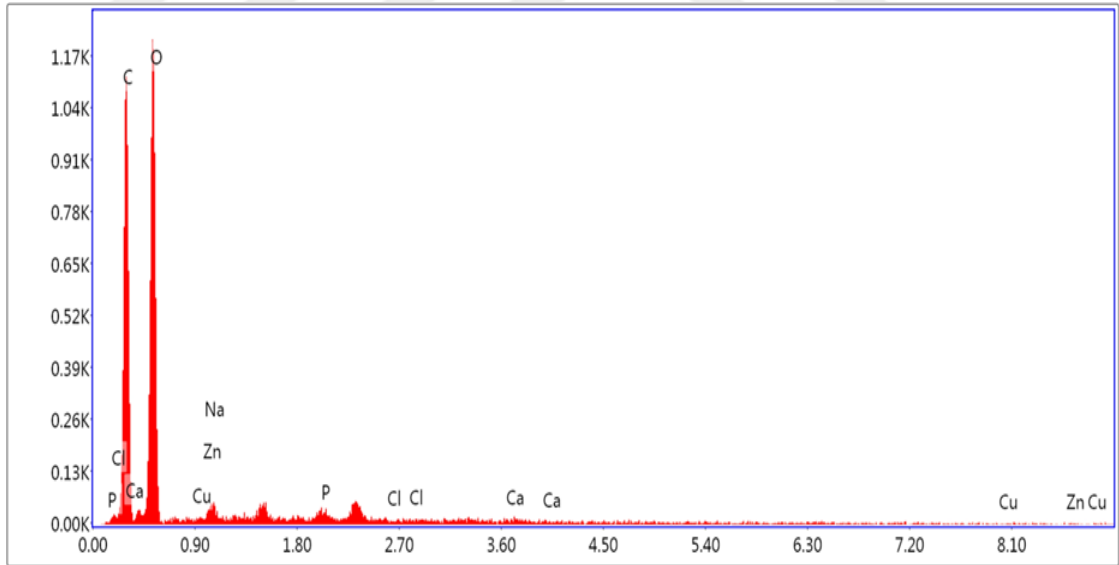
EK-5



Lsec: 28.3 0 Cnts 0.000 keV Det: Octane Pro Det

İkinci hafta *Erzurum* genotipinin 50 mM NaCl SEM analiz sonucu

EK-6



Lsec: 28.4 0 Cnts 0.000 keV Det: Octane Pro Det

İkinci hafta *Erzurum* 50 mM NaCl 0,8 ppm CuO SEM analiz sonucu