



**ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ NANOPARTİKÜLLERİN
YEŞİL SENTEZİ VE BUĞDAY GENOTİPLERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DOKU
KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI**

Özge BALPINAR NALCI

**Yüksek Lisans Tezi
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanotıp Bilim Dalı
Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU**

2017

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ NANOPARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ
VE BUĞDAY GENOTİPLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DOKU
KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI**

Özge BALPINAR NALCI

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanotıp Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ ONAY FORMU



ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi ve Buğday Genotipleri Üzerindeki Etkilerinin Doku Kültüründe Araştırılması

Prof. Dr. Hayrunnisa Nadaroğlu danışmanlığında, Özge Balpınar Nalcı tarafından hazırlanan bu çalışma, 13/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanotıp Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hayrunnisa Nadaroğlu

Üye : Doç. Dr. Özlem Barış

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emre İlhan

İmza : 
İmza : 
İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **19.01/2017** tarih ve **03.../...37** nolu kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ NANOPARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ VE BUĞDAY GENOTİPLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI

Özge BALPINAR NALCI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanotıp Bilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Yapılan bu tez çalışmasında; ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartikül yapılarının yeşil sentez yoluyla sentezlenmesi, karakterize edilmesi, iki farklı buğday genotipi üzerine olgun embriyo kültür tekniği kullanılarak etkilerinin araştırılması amaç edinilmiştir.

Nanopartikül yapılarını sentezlemek için Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) bitkisi ekstraktından elde edilen peroksidaz enziminden faydalanılmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan peroksidaz enziminin %60-80 amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) bitkisinden 149.5 kat saflaştırıldığı belirlenmiştir. Peroksidaz enzimi kullanılarak ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartikül (NP)'lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; NP'lerin sentezi için pH, sıcaklık, zaman, metal iyonu konsantrasyonu gibi çeşitli biyokimyasal verilerin optimizasyon işlemleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerin sentezlenme süreleri sırasıyla 30 dk, 30 dk ve 15 dk olmuştur. Optimum sentezlenme pH'larının 7.5, 8.0 ve 11.0 olduğu saptanırken, 30°C, 25°C ve 20°C'ler optimum sentez sıcaklıkları olarak belirlenmiştir. Elde edilen nanopartikül yapılarının karakterizasyonu için FT-IR, XRD ve SEM spektrum analizleri yapılmıştır. ZnO NP yapıları 60-80 nm arasında boyutlara sahipken, CuO NP yapıları 50-120 nm arasında, γ -Fe₃O₄ NP yapılarının ise 30-80 nm arasında boyutları arasında olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın devamında ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin, Kırık ve ES-26 olmak üzere iki ayrı buğday (*Triticum aestivum* L.) genotipinin olgun embriyo kültüründe, mikro element olarak etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda NP yapılarının hem Murashige and Skoog besi ortamında var olan normal miktarıyla(1x), hem de bu miktarın iki(2x) ve üç(3x) katları şeklinde test edilmiştir. Çalışma negatif ve pozitif kontrollerle desteklenmiştir. Elde edilen bulgularda, nanopartikül içeren uygulamalarda gelişmeye bırakılan buğday embriyolarının nanopartikül yapılarından aktif bir biçimde yararlanamadığı düşünülmektedir. Sonuç olarak kontrole kıyasla nanopartikül içeren uygulamaların gelişimleri daha az olmuştur. Tüm uygulamalar arasında kallus oluşum oranı bakımından 3x CuO NP içeren ortamlar ile 3x ZnO NP içeren ortamların kontrollere kıyasla daha başarılı sonuç verdiği belirlenmiştir. Bitki oluşturma kabiliyeti bakımından en başarılı grup kontrol grubu olmuştur. Bu doğrultuda kontrole kıyasla bitki rejenerasyonunun nanopartikül uygulamalarıyla artış göstermediği görülmektedir. Ancak bu durumun temelde nanopartiküllerin bitki tarafından yararlanım süreciyle ilgili olduğu düşünülmektedir. Toksik bir etki oluşturup oluşturmadığı ise gelecek çalışmaların konusu olmaya adaydır. Bu çalışma, olgun embriyo kültüründe yeşil sentez yoluyla elde edilen NP yapılarının test edilmesi noktasında bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu durum embriyoların doku kültürü gelişim aşamalarına NP'lerin oluşturacağı etkilerin belirlenmesi noktasında literatürde bir eksikliği giderecektir.

2016, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, yeşil sentez, buğday, bitki doku kültürü, toksikoloji.

ABSTRACT

MS Thesis

GREEN SYNTHESIS OF ZnO, CuO, and γ -Fe₃O₄ NANOPARTICULES AND THE INVESTIGATION OF THESE NANOPARTICULES' EFFECTS ON WHEAT GENOTYPES IN TISSUE CULTURE

Özge BALPINAR NALCI

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nanoscience and nanoengineering
Department of Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

In this thesis study; ZnO, CuO and γ -Fe₃O₄ nanoparticle structures were synthesized by green synthesis, characterized, investigated by using mature embryo culture technique on two different wheat genotypes.

To synthesize nanoparticle structures, the peroxidase enzyme obtained from Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) plant extract was utilized. It was determined that the partially purified peroxidase enzyme was purified to 149.5-fold by the 60-80% ammonium sulfate precipitation method from the Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) plant. Green synthesis of ZnO, CuO and γ -Fe₃O₄ nanoparticles (NP) was performed using peroxidase enzyme. For this purpose; For the synthesis of NPs, various biochemical data such as pH, temperature, time, metal ion concentration were optimized. According to the findings, the synthesis times of ZnO, CuO and γ -Fe₃O₄ nanoparticles were 30 min, 30 min and 15 min respectively. Optimum synthesis pHs were found to be 7.5, 8.0, and 11.0, while optimum temperatures for synthesis at 30, 25, and 20 were determined. FT-IR, XRD and SEM spectrum analyzes were performed for the characterization of the obtained nanoparticle structures. ZnO NP structures have dimensions between 60-80 nm, CuO NP structures have been determined to be between 50-120 nm and γ -Fe₃O₄ NP structures have been found to be between 30-80 nm.

The effects of ZnO, CuO, and γ -Fe₃O₄ nanoparticles on two different wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes, namely, Kırık and ES-26, in mature embryo culture were investigated. In this context, NP constructions have been tested with both the normal amount (1x) and the two (2x) and three (3x) quantities available in the Murashige and Skoog media. The study was supported by negative and positive controls. In the results obtained, wheat embryos left to develop in applications containing nanoparticles are thought not to be actively exploited by nanoparticle structures. As a result, the development of nanoparticle-containing applications is less than control. It was determined that media containing 3x CuO NP and media containing 3x ZnO NP gave better results in terms of callus formation rate among all applications. The most successful group in terms of plant-building ability was the control group. In this direction, it is seen that plant regeneration did not increase with nanoparticle application compared to control. However, it is thought that this situation is mainly related to the utilization process of the nanoparticles by the plant. Whether or not it creates a toxic effect is the point of future studies. This study is a first in the test of NP structures obtained by green synthesis in mature embryo culture. This would lead to a shortage of literature in the point of determining the effects NPs will have on the tissue culture development stages of embryos.

2016, 80 pages

Keywords: Nanoparticle, green synthesis, wheat, plant tissue culture, toxicology.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi ve desteği benden esirgemeyerek, her an yanımda olan tez yöneticim ve değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na sonsuz teşekkürler ediyorum.

Aynı zamanda çalışmalar gerçekleştirdiğim Meslek Yüksek Okulu'nun Müdürü Sayın Prof.Dr. Dursun KAYA'ya da teşekkür ederim. Nanopartikül sentezi ile ilgili yardımları ve destekleri için Sayın Doç. Dr. Azize ALAYLI GÜNGÖR'e çok teşekkür etmekteyim. Laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen ekip arkadaşlarım doktora öğrencileri Sayın Aynur BABAGİL ve Hicran ÖNEM'e de çok teşekkür ediyorum.

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL ve Prof. Dr. Ümit DEMİR'e de destekleri dolayısıyla çok teşekkür ediyorum.

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri ABD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na çok teşekkür ederim. Ayrıca aynı anabilim dalında bulunan Sayın Dr. Arash Hossein POUR'a ve yüksek lisans öğrencisi Güller ÖZKAN'a yardımları için sonsuz teşekkür ediyorum.

Tüm hayatım boyunca her daim sonsuz sevgi ve umutla bana destek olan, yaşantımın en özel yerine sahip çok sevgili aileme; kalplerle dolu sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Tüm bunların yanında benden hiçbir zaman maddi/manevi desteğini esirgemedi, her daim her zorlukta benimle beraber bu yolda yürüyen çok sevgili eşim Arş. Gör. Kemal Alp NALCI'ya en özel teşekkürlerimi iletiyorum.

Özge Balpınar Nalcı

Aralık, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Malzemeler	19
3.2. Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi	19
3.2.1. Bitki örneklerinin toplanması ve bitki ekstraktının hazırlanması	19
3.2.2. Kısmi peroksidaz enzim saflaştırması - amonyum sülfat çöktürmesi	20
3.2.3. Peroksidaz enzim aktivite testi	20
3.2.4. ZnO nanopartiküllerinin sentezi	21
3.2.5. CuO nanopartiküllerinin sentezi.....	21
3.2.6. γ -Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin sentezi.....	21
3.2.7. ZnO, CuO ve γ -Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin sentezinin biyokimyasal özellikleri	22
3.3. ZnO, CuO, γ -Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin SEM, XRD, FT-IR Karakterizasyonu.....	22
3.4. Bitki Materyali	23
3.5. Bitki Doku Kültürü Ortamlarında Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları	23
3.5.1. MS makro elementler için stok solüsyonun hazırlanması.....	24
3.5.2. MS mikro elementler için stok solüsyonun hazırlanması	25
3.5.3. Nanopartikül içeren MS mikro stok solüsyonlarının hazırlanması	25
3.5.3.a. Normal miktarda ZnO NP içeren (1X ZnO NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	26

3.5.3.b. Normalin iki katı miktarda ZnO NP içeren (2X ZnO NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	26
3.5.3.c. Normalin üç katı miktarda ZnO NP içeren (3X ZnO NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	27
3.5.3.d. Normal miktarda CuO NP içeren (1X CuO NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	27
3.5.3.e. Normalin iki katı miktarda CuO NP içeren (2X CuO NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	28
3.5.3.f. Normalin üç katı miktarda CuO NP içeren (3X CuO NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	28
3.5.4. MS demir şelat için stok solüsyonunun hazırlanması	29
3.5.5. Nanopartikül içeren MS demir şelat stok solüsyonlarının hazırlanması	30
3.5.5.a. Normal miktarda γ -Fe ₃ O ₄ NP içeren (1X γ -Fe ₃ O ₄ NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	30
3.5.5.b. Normalin iki katı miktarında γ -Fe ₃ O ₄ NP içeren (1X γ -Fe ₃ O ₄ NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	31
3.5.5.c. Normalin üç katı miktarında γ -Fe ₃ O ₄ NP içeren (1X γ -Fe ₃ O ₄ NP) stok solüsyonunun hazırlanması.....	31
3.5.6. MS vitaminleri için stok solüsyonlarının hazırlanması	32
3.5.7. MS ortamının içerisindekilere ek olarak ilave edilen kimyasallar	33
3.6. Sterilizasyon Yöntemleri	34
3.6.1. Bitki doku kültürü çalışma ortamı ve aletlerin sterilizasyonu.....	34
3.6.2. Buğday tohumlarının yüzey sterilizasyonu	34
3.6.3. Besi ortamının ve diğer bileşenlerin sterilizasyonu	35
3.6.4. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanması	35
3.6.5. %1'lik sodyum hipoklorit solüsyonunun hazırlanması	35
3.7. Kallus ve Bitki Rejenerasyon Besin Ortamlarının Hazırlanması	35
3.8. Nanopartikül içeren kallus ve bitki rejenerasyon besin ortamlarının hazırlanması	36
3.9. Endosperm Destekli Olgun Buğday Embriyosu Kültürü	36
3.10. İncelenen Karakterler	38
3.10.1. Kallus oluşum (KO) oranı (%)	38

3.10.2. Embriyogenik kallus oluşum oranı (%).....	38
3.10.3. Cevap veren embriyogenik kallus oranı (%).....	38
3.10.4. Cevap veren somatik embriyo sayısı (adet)	39
3.10.5. Bitki Sayısı (BS).....	39
3.11. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	39
4. ARAşTIRMA BULGULARI	40
4.1. Nanopartiküllerin Yeşil Sentezinin Sonuçları	40
4.1.1. Yeşil sentezde kullanılan peroksidaz enziminin kısmi saflaştırma sonuçları ..	40
4.1.2. ZnO nanopartikül yeşil sentezi.....	40
4.1.3. CuO nanopartikül yeşil sentezi.....	41
4.1.4. γ -Fe ₃ O ₄ Nanopartikül Yeşil Sentezi	42
4.1.5. ZnO, CuO, γ -Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin sentezinin optimum biyokimyasal zellikleri	43
4.2. ZnO, CuO, γ -Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerinin SEM, XRD, FT-IR Karakterizasyonu.....	44
4.2.1. ZnO, CuO, γ -Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin SEM karakterizasyonu	44
4.2.2. ZnO, CuO, γ -Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin FT-IR karakterizasyonu	46
4.2.3. ZnO, CuO, γ -Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin XRD karakterizasyonu	48
4.3. Kallus Oluşum (KO) Oranı	51
4.4. Kallus Sayısına Göre Embriyogenik Kallus Oluşum (KSEKO) Oranı	57
4.5. Kallus Sayısına Göre Cevap Veren Embriyogenik Kallus Oluşum (KSCEKO) Oranı	60
4.6. Kallus Sayısına Göre Somatik Embriyo Oluşumu (KSSEO) Oranı.....	63
4.7. Kallus Sayısına Göre Cevap Veren Somatik Embriyo Oluşumu (KSCSEO) Oranı.....	64
4.8. Bitkicik Sayısı (BS).....	67
5. TARTIşMA ve SONUÇ	69
5.1. Tartışma.....	69
5.2. Sonuç ve neriler.....	75
KAYNAKLAR	77
ZGEMİş	81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
cm	Santimetre
dm	Desimetre
dk	Dakika
g	Gram
G	Merkezkaç kuvveti
kg	Kilogram
kPa	Kilo paskal
L	Litre
m	Metre
M	Molar
m ²	Metrekare
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Mol	Mol
nm	nanometre
N	Normal

Kısaltmalar

γ-Fe ₃ O ₄	Gama-Demir (III) Oksit
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
ABA	Absisik asit
ABST	2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid) diamonyum

Au	Altın
BS	Bitki sayısı
Ca	Kalsiyum
CuO	Bakır Oksit
Dikamba	3,6-Diklorobenzoik asit
Fe	Demir
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
IAA	İndol-3-asetik asit
KO	Kalus oluşum oranı
KSCEKO	Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oluşumu
KSCSE	Kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo sayısı
KSEO	Kallus sayısına göre somatik embriyo oluşumu
KSEKO	Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı
MES	2-(N-morpholino) ethansülfonik asit
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
MS	Temel besi ortamı, Murashige and Skoog (1962)
N	Azot
NAA	Naftelan asetik asit
NP	Nanopartikül
Pd	Paladyum
pH	Asitlik derecesi
ppm	Milyonda bir madde
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Serbestlik derecesi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
Si	Silisyum
TDZ	1-Fenil-3-(1,2,3-thidiazol-5yl) üre (Thidiazuron)
Ti	Titanyum
UV-VIS	Ultra Viole Visible
X	Kat
XRD	X-Işını Kırınımı
ZnO	Çinko Oksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

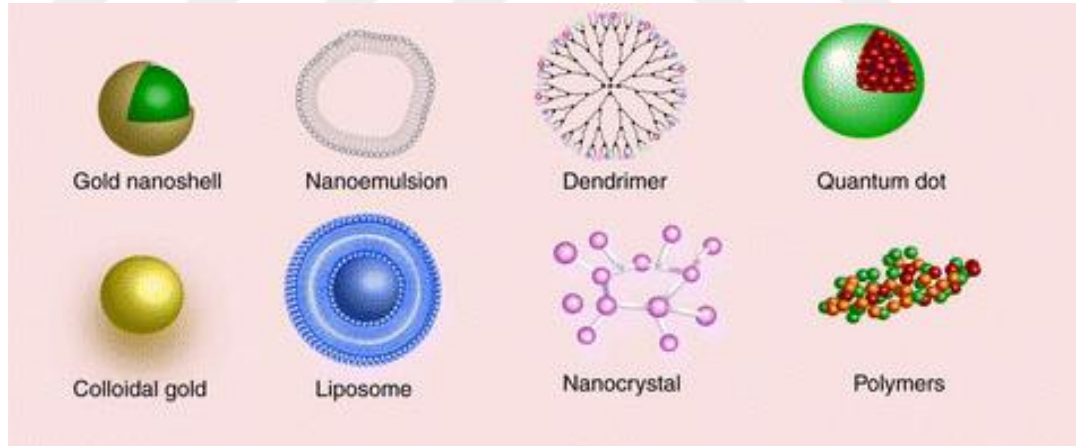
Şekil 1.1. Nanopartiküler yapı örnekleri.....	1
Şekil 1.2. NP'lerin kullanım alanları şeması	3
Şekil 2.1. NP'lerin toksik etki oluşturma süreçleri	17
Şekil 3.1. Tohum sterilizasyonu ardından olgun embriyonun kesim kısımlarının gösterimi	37
Şekil 4.1. ZnO nanopartikülünün yeşil sentezinin şematik gösterimi	41
Şekil 4.2. CuO nanopartikülünün yeşil sentezinin şematik gösterimi	42
Şekil 4.3. γ -Fe ₃ O ₄ nanopartikülünün yeşil sentezinin şematik gösterimi	42
Şekil 4.4. γ -Fe ₃ O ₄ Nanopartikül yapısının SEM görüntüsü.....	44
Şekil 4.5. CuO Nanopartikül yapısının SEM görüntüsü.....	45
Şekil 4.6. ZnO Nanopartikül yapısının SEM görüntüsü	46
Şekil 4.7. ZnO NP yapısının FTIR spektrumu.....	47
Şekil 4.8. CuO NP yapısının FTIR spektrumu	47
Şekil 4.9. γ -Fe ₃ O ₄ NP yapısının FTIR spektrumu	48
Şekil 4.10. ZnO NP yapısının XRD spektrumu.....	49
Şekil 4.11. CuO NP yapısının XRD spektrumu.....	50
Şekil 4.12. γ -Fe ₃ O ₄ NP yapısının XRD spektrumu.....	51
Şekil 4.13. Kırık buğday genotipinde kallus oluşumu	52
Şekil 4.14. ES-26 buğday genotipinde kallus oluşumu	53
Şekil 4.15. Kırık buğday genotipinde embriyogenik kallus oluşumu.....	58
Şekil 4.16. ES-26 buğday genotipinde embriyogenik kallus oluşumu	59
Şekil 4.17. Kırık buğday genotipinde cevap veren embriyogenik kallus oluşumu	61
Şekil 4.18. ES-26 buğday genotipinde cevap veren embriyogenik kallus oluşumu.....	62
Şekil 4.19. Kırık buğday genotipinde cevap veren somatik embriyo oluşumu	65
Şekil 4.20. ES-26 buğday genotipinde cevap veren somatik embriyo oluşumu.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Yeşil sentez ve bitki doku kültürü işlemleri için kullanılan cihazlar	19
Çizelge 3.2. MS ortamı içerisinde yer alan makro ve mikro elementler	24
Çizelge 3.3. MS mikro elementler içerisindeki nanopartikül elementlerin gösterimi	25
Çizelge 3.4. MS ortamı içerisinde bulunan organik maddelerin listesi	32
Çizelge 3.5. MS ortamına ilave edilen ek kimyasallar	33
Çizelge 3.6. MS ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri ve hazırlanışları ..	34
Çizelge 4.1. <i>Euphorbia</i> (<i>Euphorbia amygdaloides</i>) bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimine ait saflaştırma ve verim profili.....	40
Çizelge 4.2. ZnO, CuO, γ -Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin yeşil sentezinin optimum biyokimyasal özellikleri.....	43
Çizelge 4.3. Nanopartikül içeren ortamlarda gelişen olgun embriyoların <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlerine ait varyans analiz sonuçları.....	54
Çizelge 4.4. Nanopartikül içeren ortamlarda gelişen olgun ES-26 embriyolarının <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlerine ait veriler	55
Çizelge 4.5. Nanopartikül içeren ortamlarda gelişen olgun Kırık genotipi embriyolarının <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlerine ait veriler	56
Çizelge 4.6. Nanopartikül içeren ortamlarda gelişen olgun embriyoların <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlerine ait ortalama veriler.....	57

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, nano ölçekte fiziksel, biyolojik ve kimyasal olayların anlaşılması, kontrolü, üretimi ve taklit edilmesi amacıyla yapılan çalışmaları konu edinen multidisipliner bir bilim dalıdır. Nanoteknoloji bilim dalı kapsamında, özellikle 1 ile 100 nm boyut skalası dâhilinde yer alan partiküller ile çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu yapılar içerisinde nanokristaller, nanotüpler, nanoçubuklar, nanopartiküller, nanoteller gibi materyaller yer almaktadır. Nano materyaller sentetik ya da doğal kaynaklı maddelerden sentezlenebilmektedir. Üretimlerinde polimerik materyaller kullanılabildiği gibi yeşil sentez üretim sürecinde olduğu gibi bitkilerden de faydalanılabilmektedir. Bu şekilde farklı yollarla elde edilebilen nano yapılar; tıp, eczacılık, bilgisayar, genetik, biyoloji, kimya, mühendislik bilimleri gibi pek çok alanla ilişkili olarak kullanılabilmektedir.

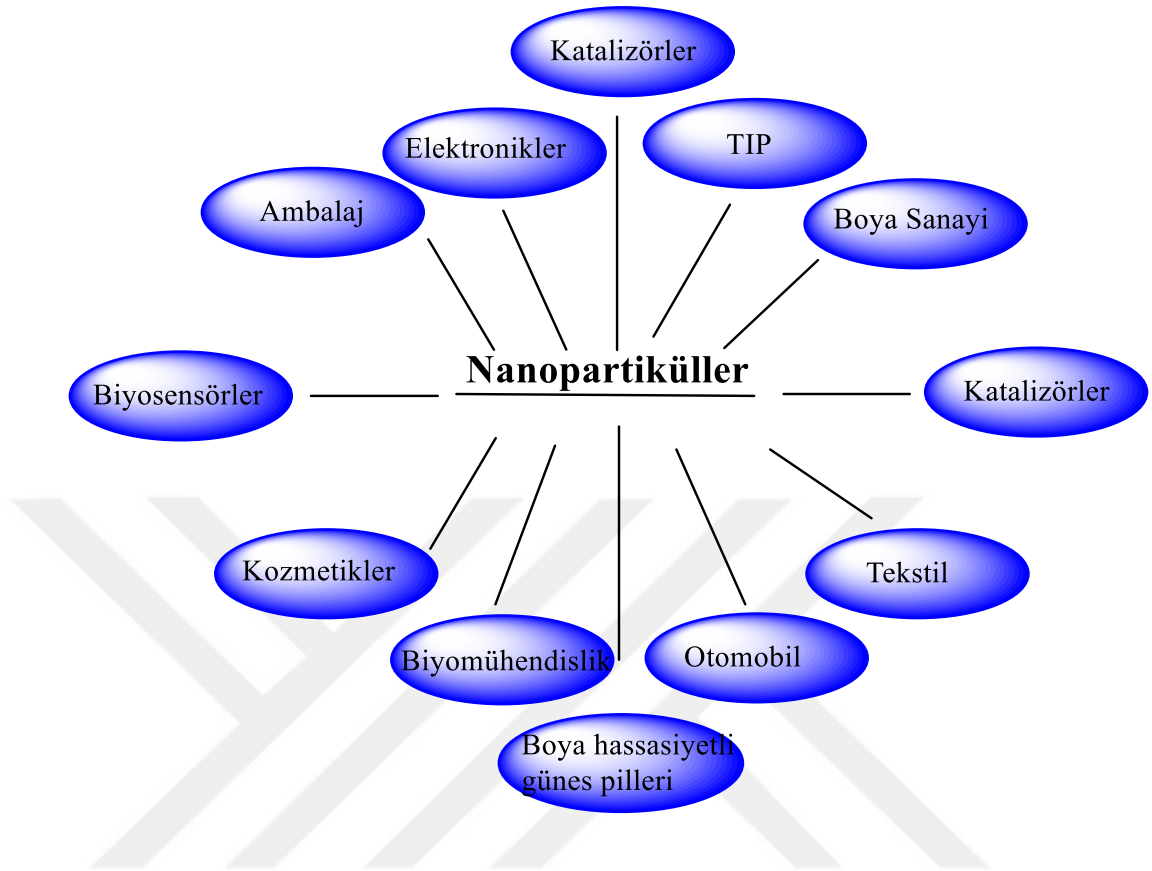


Şekil 1.1. Nanopartiküler yapı örnekleri (Hall *et al.* 2007)

Yenilenebilir enerji, tekstil, biyomedikal, sağlık hizmetleri, tarım, endüstri, elektronik, çevre gibi alanlarda aktif kullanım imkanı yakalamaktadır. Alt başlık halinde düşünüldüğünde nanoteknolojinin; kontrollü ilaç salınımı, kanser terapisi, ilaç taşınımı, ıslanmaya ve gaz geçişine dayanıklı kıyafetlerin tasarlanması, nano pigmentler, yiyeceklerin paketlenmesi, atık suların iyileştirilmesi, hidrojen üretim ve depolama

yapılarının üretimi, UV ışığı engelleme kapasitesinde kıyafetlerin üretimi, yüksek yoğunlukta bilgi depolama, kendi kendini temizleyebilen yüzeyler, nano boyutta elektronik devrelerin üretimi, yüksek hassasiyete sahip sensörlerin üretimi gibi pek çok alanda uygulama imkanı bulduğu söylenebilmektedir. Son dönemlerin gözde bilim dalı olan nanoteknoloji, özellikle kaliteli bir yaşam standardı sağlamanın ilk koşulu olan sağlığın kazanılması noktasında; hastalıklar için moleküler tedavi yaklaşımlarından, hastalıkların daha hızlı ve doğru bir şekilde teşhis edilmesine kadar pek çok açıdan hizmet imkânı sunmaktadır. Bunun yanında biyosensörler, kontrollü salım sistemleri ile patojenlerle mücadelede ve ayrıca bitkilerin besinleri daha kolay kullanabilme yeteneğinin artırılması yönünde, gıda ve tarım alanında da devrim niteliğinde gelişmeler sunmaktadır.

NP'ler sahip oldukları eşsiz özellikleri nedeniyle kullanılabildiği alanların şematik gösterimi Şekil 1.2'de verilmiştir. Özellikle medikal amaçlı olarak NP'lerin kullanım imkanı bulduğu alanlar hastalıkların daha kolay tanınabilmesi ve akabinde daha akılcı tedavi yöntemleri geliştirilmesi olarak ifade edilebilmektedir. Tıp alanında NP'lerin bu şekilde kullanılabiliyor olması, özellikle nanoküreler kullanılarak yapılabilecek gen terapilerini, kanser gibi son derece saldırgan olan hastalıkların daha erken teşhis ve tedavisinin yapılabilmesini, hedefe yönelik ilaç taşınımı gibi pek çok alanda bilim insanlarına olanak sağlamaktadır (Mbonyiryivuze *et al.* 2015).



Şekil 1.2. NP'lerin kullanım alanları şeması

Bunun yanında NP'ler yalnızca tıp alanında değil, aynı zamanda bilgisayarlar, bataryalar, elektronik cihazlar ve mobil iletişim sistemleri gibi alanlarda da mühendislik bilim dallarında da aktif bir şekilde kullanılabilmektedir (Mbonyiryivuze *et al.* 2015).

Optik sistemlerin içerisinde NP'lerin kullanımı, akabinde bu alanda NP'lerle üretilecek sensörler, lazerler ya da dedektörler de nanoteknolojinin NP'ler ile erişebildiği farklı alanların kapısını aralamaktadır.

Ayrıca, NP'ler tekstilde, otomotiv sektöründe, inşaat ile ilgili materyal ve benzeri hazırlık işlemlerinde, filtrelerin, boyaların ve daha pek çok endüstriyel alana yönelik materyal üretim uygulamalarının içerisinde yer almaktadır.

Tüm bunların yanı sıra NP'ler ile tarım ve gıda sektöründe de sıklıkla karşılaşma imkânı bulunabilmektedir. Gıda sektöründe özellikle işlenmiş gıdaların paketlenmesinde, mini sensör benzeri yapılar kullanılarak gıdaların raf ömrünün belirlenmesinde son derece sık bir biçimde NP'lerin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Tarımda NP'lerin kullanımı ise özellikle akıllı salınım sistemleri, gerçek zamanlı takip sistemleri ile yüksek verim, düşük pestisit, herbisit girişini sağlayacak çalışmalar kapsamında yerini almıştır. Bunun yanında tarımda NP'ler yer altı sularının ve tarlaların temizlenmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Demirbilek 2015).

İlerleyen zamanlarda, nano boyuttaki materyaller katalizör olarak kullanılarak, böceklerin ve istenmeyen yabancı otların ortadan kaldırılması amacıyla çok küçük dozlarda dahi etki edebilecek ürünler elde edilebilecektir. Nanoteknoloji yenilenebilir enerji kaynakları ve temiz enerji üretimi amacıyla da kullanılarak, çevre kirliliğinin azaltılması, filtre olarak kullanılabilecek nanokatalizörler ile doğada mevcut olan kirletici materyallerin temizlenmesine yardımcı olarak çevrenin korunmasında rol oynayacaktır (Scott and Chen 2002). Tüm bu bilgiler dolayısıyla günümüz dünyasında nano taneciklerin pek çok alanda aktif olarak kullanılarak üretildikleri, çalışmalara konu oldukları söylenebildiği gibi gelecek dönemlerde de nanoteknolojinin bilimsel anlamda pek çok alana hizmet edeceği açıkça görülmektedir.

NP'ler sahip oldukları özellikler dolayısıyla bilim dünyasında kendilerine kolaylıkla yer bulabilmektedir. NP'lerin avantaj olarak kabul edilen özellikleri ise şu şekilde sıralanabilmektedir:

1. Belirli boyut aralığında tüm maddeler ve dolayısıyla NP'ler, sahip oldukları hacimsel oran dolayısıyla farklı özellikler ve görevler kazanmaktadır. Bu durumun temel sebebi nano boyuttaki yapılara normal fizik kuralları yerine kuantum fizik kurallarının etki ediyor olmasıdır.
2. NP'lerin yüzey/hacim oranları son derece yüksektir. Bu durum hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda NP'lerin tercih edilmesinin temel sebebi haline gelmiştir.

3. NP'ler son derece küçük boyutlara sahiptir. Bundan dolayı kapillerden, porlardan rahatlıkla geçebilmektedir.

Tüm bu özelliklere sahip nanopartikülleri sentezlemek için kullanılan yöntemlerden biri olan yeşil sentez yöntemi, diğer bir ismiyle biyosentez, temelde basit yapıda olan materyallerden daha karmaşık yapılar elde etmeyi amaçlayan bir süreçtir. Bu işlem aslında canlıların metabolik süreçlerinde kimyasal olarak gerçekleşen olayları ifade etmek amacıyla kullanılan bir terimdir. Ancak nanoteknolojide bu olay, canlı organizmaları veya kimyasal materyalleri kullanarak NP elde etme işlemi olarak ifade edilmektedir. Bu süreçte rol oynayan canlı organizmalara; algler, bakteriler, bitkiler, mantarlar gibi organizmalar örnek olarak gösterilebilmektedir.

Son dönemlerde daha sık kullanılmaya başlanan bu yöntemin tercih edilmesi genel olarak; basit bir uygulama olması, toksik bir materyal ile işlem yapma zorunluluğunun bulunmayışı, ekonomikliği, büyük miktarlarda ticari üretime uygun yapıda olması, biyomedikal işlemlerde de uygulanabilir olması gibi nedenlerden ileri gelmektedir.

Yeşil sentez işleminde kullanılacak materyalin seçiminde, yeşil materyalin güvenli, yalnızca bir adet reaksiyon basamağı içeren, atık madde salınımına neden olmayan, çevre dostu, yenilenebilir nitelik taşıyan, verim kapasitesi %100'e yakın olan ve reaksiyonun sonunda basit bir şekilde ortamdan ayrışabilen yapıda bir materyal olması gerekmektedir (Raveendran *et al.* 2003). Tüm bu özellikleri bir araya toplamak zor olsa da, büyük çoğunluğunu ihtiva eden bir materyal seçimi, sentezin başarısının artmasında oldukça önemli olmaktadır.

Altın NP yapılarını sentezlemek için yapılan bir çalışmada bıldırcın yumurta sarısından faydalanılmış ve bu yöntemin pek çok açıdan diğer kimyasal veya fiziksel yöntemlere kıyasla daha ekonomik olduğu, yüksek basınç ve yüksek sıcaklık gerektirmemesi dolayısıyla daha kolay bir yöntem olduğu ifade edilmiştir (Nadaroglu *et al.* 2016).

Bu yönteme verilen diğ r bir ad ise yeşil kimyadır. Yöntemin metalik yapıda NP sentezinde de kullanıldığı bilinmektedir. Bu amaçla kullanılan yeşil materyalin mantar, bakteri, bitki ekstraktları gibi maddeler olduğu görülmektedir (Bar *et al.* 2009; Philip *et al.* 2010; Dubey *et al.* 2010). Yapılan bir çalışmada *Jatropha curcas* bitkisi kullanılarak yeşil sentez işlemi yapılmıştır. Bu bitkiden üretimi gerçekleştirilen lateks ile gümüş NP'ler elde edilmiştir (Bar *et al.* 2009). Yine başka bir çalışmada s tleğ n (*Euphorbia amygdaloides*) bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi kullanılarak gümüş nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilmiştir (Cicek *et al.* 2015). G r ld ğu gibi bu sentez yönteminde bitkiler, mantarlar, bakteriler veya bu yapılardan elde edilen enzim gibi ürünler kullanılarak işlem gerçekleştirilebilmektedir.

Nadaroglu ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada, platin nanopartikülleri sentezlemek için bıldırcın yumurtası kullanmışlar ve yeşil sentez yoluyla sentezlemiş oldukları bu platinium NP yapılarının karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Çinko (ZnO) NP yapıları, iyon formunda üretimi gerçekleştirildiği gibi ZnO formunda da üretilmektedir. Bu yapıların genel anlamda UV ışığı absorbe etme özelliği olması dolayısıyla, oğ nlukla güneş panellerini üretiminde kullanıldığı bilinmektedir. Ancak hem canlılara hem de çevreye olan toksisitesi henüz tam olarak bilinmemektedir (Kim *et al.* 2014). Bu konuda yeterli bilginin olmaması sebebiyle kullanımı sınırlı olsa dahi, Zn NP yapıları ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmada yer almakta olan diğ r bir nanopartikül olan Bakır (Cu^{2+}) NP yapıları özellikle katalizleme, optik ve yapısal özellikleri dolayısıyla tercih edilmektedir.  retimi için pek çok yol olmasına rağmen, bakır yapısının çok kolay okside olması üretimi için seçilmesi gereken metotları sınırlandırmaktadır. Demir ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$) NP'leri ise sahip oldukları manyetizma özellikleri dolayısıyla çalışmalara konu olduğu gibi, bunun yanında pek çok canlının yaşamsal faaliyetlerinin sürdürülmesinde de aktif rol oynaması dolayısıyla bilim dünyası tarafından ilgi görmektedir. Biyomedikal alışmaları, görüntüleme sistemleriyle ilgili çalışmalarda daha çok demir nanopartikül yapıları tercih edilmektedir. Özellikle inko, bakır ve demir NP yapılarının bitki gelişimi üzerine gösterdikleri etkilerin belirlenmesi kapsamında bu alanda yapılan çalışmaların toksisite boyutunu açıklama

noktasında yetersiz olması nedeniyle hala araştırılması gerekmekte olan konular arasında yer almaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalara bakıldığında, özellikle nanopartiküllerin fitotoksitesitesi, bitki tarafından kullanımı ve dolayısıyla akabinde besin zincirinde yer almasına dair çalışmaların azlığı dikkat çekmektedir. Bu nedenle bu alanda nanopartiküllerin toksisitesinin daha net bir biçimde ortaya konması amacıyla yeni çalışmaların literatüre kazandırılması gerekli görülmektedir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışma ile ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartikülleri yeşil sentez yöntemiyle üretilmiş ve bitki doku kültürü çalışmasıyla günümüz beslenme alışkanlığı içerisinde kendisine büyük oranda yer bulmakta olan buğday bitkisinin tohumlarına bu nanopartiküllerin etkisi araştırılmıştır.

Bitki doku kültürü, aseptik şartlarda arzu edilen bir bitki, o bitkinin organı ya da hücreleri vasıtasıyla tam bir bitki, yeni bir doku veya metabolit eldesi gerçekleştirmek adına yapılan işlemlerin tümüne verilen isimdir. Bu teknikle asıl hedeflenmekte olan bitki rejenerasyonudur (Purnhauser *et al.* 1987). Bu çalışmada kullanılmak üzere seçilen buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisi, sahip olduğu besin değeri, işlenme kolaylığı ve yüksek adaptasyon kabiliyeti dolayısıyla, dünyada ekiliş alanı ve üretim bakımından ilk sırada yer almaktadır. Buğday, dünya besin alım döngüsü içerisinde kendisine büyük oranda yer bulabilen bir bitki olması nedeniyle *in vitro* kültürde çalışması yoğun olarak yapılan bir bitkidir (Delporte *et al.* 2001). Dünyada yaklaşık olarak 50 ülkenin temel besini olduğu bilinmektedir. Ülkemizde de buğday ve buğday kaynaklı besinler, tüketilen bitkisel kaynaklı besinlerin %53'ünü oluşturmaktadır. Türkiye kişi başına yaklaşık olarak 250 kg buğday tüketimi gerçekleştirerek bu konu başlığında dünyada ilk sıralarda görülmektedir. Dünyanın %35'lik kısmının temel besin maddesi konumunda olan buğday, pek çok avantajlarından dolayı bugün büyük oranda ekiliş alanına sahiptir. Adaptasyon kabiliyetinin yüksek oluşu, depolama, işleme işlemlerinin kolaylığı, üretim sürecinin karmaşıklığından uzak olması sebeplerinden ötürü buğdayın tercih edilebilirliği son derece yüksek olmaktadır.

Buğday tanesi insan beslenmesinde son derece önemli bir konuma sahiptir. Sahip olduğu %65-70 nişasta oranının yanında tane içerisinde %8-15 oranında değişen protein ihtivası da söz konusudur. Bunların yanında bir buğday tanesinde bulunan yağ oranı %1-5 iken, şeker içeriği %1.5-3, içerdiği kül miktarı %1-2, nem oranı ise %11-13 olarak ifade edilmektedir. Bahis edilen içerik oranlarının yanında buğday tanesinde insan ve hayvan beslenmesinde son derece önemli olan vitaminlerin de var olduğu bilinmektedir (Kün 1988).

Buğday yetiştiriciliğinde ve ıslahında var olan problemlerin giderilmesi amacıyla doku kültürü ve biyoteknoloji kaynaklı yöntemlerin kullanımı son derece yaygındır. Buğday *in vitro* kültüründe kallus oluşumu ve rejenerasyon kabiliyetinin bitkinin sahip olduğu genetik bilgiyle birebir ilişkili olduğu unutulmamalıdır (Sehirali *et al.* 1988).

Bu kadar yoğun bir şekilde besin zinciri içerisinde kendisine yer edinmeyi başarmış olan bir bitki üzerine nanopartiküllerin etkisinin incelenmesi, literatürde eksikliği görülmekte olan bir çalışmadır. Bu kapsamda buğday bitkisinin olgunlaşmış embriyolarının ihtiyaç duyduğu mikro besin elementleri olarak ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin farklı dozlarının uygulanmasıyla birlikte çalışma negatif ve pozitif kontrol uygulamaları ile desteklenerek nanopartiküllerin bitki doku kültüründe gerçekleştirdikleri etkilerin kontrollü bir şekilde gözlemlenmesi hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nanoteknoloji terimini çağrıştıran ifadeler ilk olarak Dr. Richard Feynman tarafından kullanılmıştır. Katıldığı bir konferansta “Aşağıda daha çok boşluk var” sözüyle nanoteknolojinin kapılarını aralayan Feynman 1959 yılında Nobel ödülü almış ve atomların kuantum kurallarıyla kontrol edilebileceği fikrini ortaya atmıştır (Pittenger *et al.* 2008).

Nanoteknoloji teriminin tam olarak kullanılması ise 1974 yılında Dr. Nario Taniguchi tarafından gerçekleştirilmiştir. Taniguchi, mikro ve nano seviyesindeki yapıların birbirinden farklılığını ifade edebilmek adına bu terimi bilim dünyasına kazandırmıştır. Multi disiplinler bir bilim dalı olan nanoteknoloji, biyoloji, kimya, fizik, tıp, eczacılık, mühendislik, elektronik gibi pek çok bilim dalıyla koordineli bir şekilde çalışarak sonuçları ortaya koymaktadır.

Günümüz teknolojisinde var olan gelişmelerin daha küçük boyutlarda ve daha duyarlı bir formda üretilmesi nanoteknolojinin temel konuları arasındadır. Disiplinler arası gerçekleştirilen çalışmalar ile pek çok alanda nanomateryallerin sentezi doğrultusunda kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır.

Nanoteknolojiye konu olan malzemeler boyutları dolayısıyla daha büyük boyutlu malzemelerden çok daha farklı nitelikler göstermektedirler. Bu durum nanomalzemelerin optik, kimyasal reaktivite, elektriksel iletkenlik, manyetizma, fiziksel dayanıklılık gibi özelliklerde farklılık göstermesine neden olmaktadır (Joseph and Morrison 2006). Nano boyutta malzemelerin farklı özelliklerinin ortaya çıkmasına nano boyutta bu malzemelere kuantum fizik kurallarının etki etmesi neden olarak görülmektedir.

Son dönemlerde bu şekilde farklı nitelikler kazanan nanopartiküllerin yoğun bir şekilde çalışılması nedeniyle, bu partikül yapılarının toksik etkilerinin olup olmadığı, toksik bir

etkisi var ise nasıl bir mekanizmayla kendini gösterdiği konuları araştırılmaya başlanmıştır. Bu durum nanotoksikoloji olarak adlandırılan yeni bir bilim dalına kapıların açılmasını sağlamıştır. Nanotoksikolojinin bir konusu olarak; üretilen ve mühendislik üretimi olarak bir şekilde doğaya salınan nanopartiküllerin insanlar, bitkiler ve hayvanlar üzerine etkileri incelenmiştir. Genel olarak bu yapıların canlılar üzerine olumsuz etkilerde bulunduğu görülmüştür (Lin *et al.* 2007; Kumari *et al.* 2011; Demir vd 2014).

Canlı organizmalar arasında yer alan bitkilerle ilgili de nanopartikül uygulamalarını içeren yoğun olarak bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Bitkilerin hücre duvarlarının sahip oldukları por çaplarının, genellikle deneysel çalışmalarda kullanılan nanopartiküllerin boyutlarına nazaran daha küçük olduğu bilinmektedir (Chichiriccò and Poma 2015). Ancak nanopartiküllerin bitki hücrelerine giriş için farklı yollar kullandığı düşünülmektedir. Bu amaçla bitkiler aquaporinleri (Miwa *et al.* 2010), membran taşıma sistemlerini (Gojon *et al.* 2009), çevresel besinlerdeki organik kimyasallara veya proteinlere taşıyıcı olarak tutunarak (Rico *et al.* 2011), hücre duvarındaki yapısal maddelere çapraz bağlanıp yeni porlar oluşturarak (Fleischer *et al.*, 1999) ya da endositozu (Eggenberger *et al.* 2009) kullanarak nanopartikülleri hücre içerisine alabilmektedir. Bu şekilde kendilerine bir şekilde yol bulabilen NP yapılarının floem ve ksilem ile taşınarak bitki organizmalarında farklı dokularda birikim gösterebildiği bilinmektedir (Cifuentes *et al.* 2010).

Kumari ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmada soğan bitkisinin köklerine uyguladıkları dört farklı ZnO NP dozu sonucunda, NP yapılarının hem sitotoksik hem de genotoksik etki göstererek hücre bölünmesi oranında değişiklik oluşturduğunu kanıtlamışlardır. Bunun yanında mısır, salatalık gibi bitkiler üzerinde test edilen ZnO NP'lerinin de hem tohum oluşumunu hem de kök gelişimini belirli oranda inhibe ettiği saptanmıştır (Lin *et al.* 2007).

Yapılan bir çalışmada Fe₃O₄, TiO₂ ve karbonlu NP'ler ile yapılan çalışma sonucunda bu yapıların salatalık bitkisi üzerine etkilerine bakılmıştır. Bu NP'lerin salatalık tohum

çimlenme oranını ve kök uzamasını olumsuz yönde etkilediğini saptamışlardır (Mustaqh *et al.* 2011).

Nanopartikül formunda olan Al_2O_3 , SiO_2 , Fe_3O_4 ve ZnO metalleriyle yapılan başka bir çalışmada, *Arabidopsis thaliana* bitkisi üzerine bu metaller üç farklı dozda uygulanmıştır. 400, 2000, 4000 mg/dm³ dozajlarında uygulaması yapılan bu NP yapısındaki metallerin etkilerine bakıldığında; yaprak sayısı, tohum çimlenmesi ve kök uzaması üzerine en olumsuz etkiyi ZnO nanopartikül yapılarının ortaya çıkardığı görülmüştür. En düşük olumsuz etki AlO_3 yapısında gözlenirken daha küçük boyutta olan nanopartiküllerin oluşturdukları tahribatın çok daha ciddi düzeyde olduğu saptanmıştır (Lee *et al.* 2010)

Hem iyonik formdaki çinko, hem ZnO nanopartikülleri hem de yığın formdaki çinko yapıları, kanola bitkisi üzerinde test edilmiş ve biyokimyasal bileşikler ile antioksidant enzim aktiviteleri, çinko birikimi ve bu yapıların bitki büyümesi üzerine uzun dönemdeki etkileri incelenmiştir. Büyüme engelleyici etki bakımından en çok etki gösteren yapı iyonik çinko formu olurken, nanopartikül yapısı bu anlamda en masum uygulama olarak kaydedilmiştir. Bu durumda toksik etki olarak da çinko NP yapısının daha az toksik olduğunu söylemek mümkün olabilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmada antioksidant enzim aktivitesi ile biyokimyasal bileşikler üzerine etki bakımından her üç yapının da etkisi olduğu görülmüştür. Fenolik bileşiklerin üretiminde uygulamaların herhangi birinin etkin olduğu söylenememektedir (Kouhi *et al.* 2015).

ZnO NP yapılarının fıstık bitkisinin çimlenmesi, büyümesi ve verimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında 1000 ppm ZnO NP konsantrasyonunun, hem tohum çimlenmesinin sağlanmasında hem de bitki canlılığının korunmasında etkin bir role sahip olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanında düşük dozda uygulanan NP miktarının hem yapraklardaki klorofil sayısını artırdığı, hem de erken çiçeklenmeye neden olduğu ifade edilmiştir. Ancak 2000 ppm dozunda uygulanan ZnO NP yapısı ortaya çıkan inhibisyon etkisinin temel sebebi olarak nitelendirilmiştir. Normal çinko yapısına kıyasla 15 defa daha düşük dozda etkinliğini gösterebilen NP

ZnO formunun özellikle doz ayarlamaları konusunda mantıklı bir yol izlenmesi gerektiği ifade edilmiştir (Prasad *et al.* 2012).

Çim bitkisinde ZnO NP yapısının hem hücre içerisine alımında hem de bitki içerisinde dağılımı ve birikimiyle ilgili olarak bir çalışma yapılmıştır. Bu yapıların aynı zamanda çim bitkisi üzerine toksik etkisi olup olmadığı da değerlendirilmiştir. Bu kapsamda ZnO NP varlığında bitkinin yeşil aksamında azalma gözlenmiştir. Bunun yanında iyonik formdaki ZnO yapısının ZnO NP yapısına nazaran daha kolay alınabildiği için özellikle sürgünlerde bu yapının birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Lin *et al.* 2008).

Nanopartiküllerin oluşturduğu toksik etkilerin pek çok etkenle değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Canlıya nanopartikülün temas süresi ve temas şekli, nanopartikülün derişimi ve boyutuna göre değişen toksik etkilerin etki mekanizması henüz ayrıntılı bir biçimde ortaya konulamamıştır. Ayrıntılı olarak bilinmiyor olmasına rağmen, nanopartiküllerin toksik etkilerinin temel mekanizmasının Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak ifade edilen serbest oksijen radikallerini meydana getirmesi nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Hücre içerisinde serbest halde dolaşmaya başladıklarında sahip oldukları negatif yük dolayısıyla son derece saldırgan bir yapı sergileyen bu radikalik maddeler, hücre membran yapısının parçalanmasına, DNA hasarına, proteinlerin dolayısıyla enzimlerin oksidasyonuna sebep olarak geri dönüşümü zor olacak hatalara zemin hazırlamaktadırlar.

Nel *et al.* (2008) hazırlamış oldukları derleme çalışmada, NP'lerin ROS yapılarını ortaya çıkararak toksisiteye neden olduğu fikri en iyi ihtimal olarak ifade edilmiştir. NP'lerin hücre döngüsünün düzenlenmesinde ortaya çıkacak problemler, beyin ve periferik sinir sisteminin hasar görmesi, mutasyonlar, karsinogenesis gibi pek çok ciddi probleme neden olacağı öngörülmüştür.

Nanopartiküllerin boyutlarının ve derişimlerinin etkisinin değerlendirilmesi kapsamında yapılan bir çalışmada, seryum dioksit nanopartikülü 7 nm ve 25 nm boyutlarında üretilmiştir. Ardından bu partiküller salatalık bitkisine uygulandığında, bitkinin 7 nm

boyutundaki partikülü çok daha kolay ve fazla miktarda alabildiği belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2011).

Ce₂O₃ nanopartikülleri ile yapılan bir çalışmada bu NP'ler yeşil sentez yoluyla elde edildikten sonra antioksidan aktivitelerine bakılmış ve bu nanopartiküllerin yüksek derecede antioksidant aktivite sergilediği görülmüştür (Nadaroglu *et al.* 2016).

Su mercimeği *Landoltia punctata* bitkisi üzerine CuO nanopartikül yapılarının test edildiği bir çalışmada, nanopartikül uygulaması sonrasında bitki gelişiminin %50 oranında azaldığı saptanmıştır (Shi *et al.* 2011).

Aynı şekilde *Triticum aestivum* ve *Phaseolus radiatus* bitkileri üzerinde de test edilen CuO nanopartikülleri bu bitkilerin gelişimlerinde de yavaşlamaya neden olmuş, NP'lerin toksik etkisi gözle görülür bir formda vuku bulmuştur (Lee *et al.* 2011).

Bunların yanında hem bakır iyonları hem de bakır nanopartikülleri *Elodea densa* adlı bitki üzerinde test edildiğinde, bitkide artmış olan lipid peroksidasyon miktarında azalma gözlenmiştir. Ayrıca katalaz, süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitelerinde artış gözlenirken, fotosentezin 1 mg/dm³ bakır nanopartikül dozuyla birlikte baskılandığı tespit edilmiştir (Nekrasova *et al.* 2011).

Transgenik bir pamuk bitkisinde CuO NP yapısının toksisitesinin test edildiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan pamuk bitkisinin içerdiği *Ipt* geni dolayısıyla transgenik özellik taşıdığı, bu genin izopentenil transferaz enzimini kodladığı bilinmektedir. Bu kapsamda 3 farklı dozda uygulanan CuO NP'lerin düşük dozda büyüme ve gelişmeye herhangi bir etkide bulunmadığı, ancak yüksek dozlarda bu yapıların fitohormonların üretimini engellediği saptanmıştır (Van *et al.* 2016).

Fe₃O₄ nanopartikül yapıları kullanılarak yapılan ilk çalışmada, bu tip NP yapılarının balkabağı bitkisi tarafından alımının önemli bir seviyede olduğu ve bazı dokularda bu yapıların birikiminin gerçekleştiği ifade edilmiştir (Zhu *et al.* 2008).

Soya fasulyesinde yapılan bir çalışmada $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP yapılarının klorofil içeriğini olumsuz etkilediği saptanmıştır. Bunun yanında bu yapıların fotosentez reaksiyonlarının çeşitli evrelerinde hem biyokimyasal hem de enzimatik etkinliği üzerine negatif bir etki yapmış olabileceği ihtimali söz konusu olmuştur (Ghafariyan *et al.* 2013).

Hem demir iki oksit, hem de demir üç oksit nanopartiküllerinin buğday (*Triticum aestivum* L.) gelişimi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada dört ayrı dozda uygulanan $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP'leri test edilmiştir. Bu nanopartikül yapılarının buğday tohum oluşturma kabiliyeti, klorofil içeriği ve bitki büyümesi üzerine olumsuz bir etkide bulunmadığı saptanmıştır. Ayrıca bu NP'lerin bitkinin özellikle köklerinde antioksidant metabolik süreçlerinde rol oynayan enzimlerin aktivitesini artırdığı saptanmıştır. Bu durum her iki demir oksit nanopartikül yapısının da oksidatif stresi önlemede yardımcı bir rol üstlendiğini göstermektedir. Yapılan çalışmada bu NP'lerin fitotoksik olmadığı, hatta tarımsal uygulamalarda kullanılabileceği ifade edilmiştir (Iannone *et al.* 2016).

Atha ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmada ilk defa bakır nanopartiküllerin tarım bitkilerinde ve çim bitkilerinde DNA hasarını uyardığını ortaya çıkarmıştır. Turp (*Raphanus sativus*), çok yıllık delice otu (*Lolium perene*), tek yıllık delice otu (*Lolium rigidum*) bitkileri üzerinde laboratuvar koşullarında bakır nanopartikülleri test edilmiştir. Test sonucunda bu NP'lerin DNA yapısında mutagenik lezyonlara (7,8-dihidro-8-oksoguanin; 2,6-diamino-4-hidroksi-5 formamidopirimidin; 4,6-diamino-5-formamidopirimidin) neden olduğu ve güçlü bir şekilde bitki büyümesini engellediği görülmüştür.

Allium cepa bitkisi üzerine çinko oksit NP'lerin etkisini araştıran bilim insanları, bu yapıların bitki köklerinin gelişimini engellediğini ortaya koymuştur. 50 ile 100 nm arasında boyutları değişen NP yapıları 5 ile 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ miktarları arasında artan dozlarda bitkiye uygulanmıştır. Çinko oksit NP'lerinin hem hücresel hem de kromozomal seviyede hasara neden olduğu saptanmıştır (Ghodake *et al.* 2011).

Nanopartikül derişimlerinin etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada marul tohumlarının kök-gövde boy ölçümleri alınarak bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada etkisine bakılan Pd, Au, Si, Cu nanopartiküllerinin düşük ve yüksek derişimde çimlenmeye etkisi araştırılmıştır. Süregelen deneyin 15. gününde bitki gelişiminde kayda değer bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni ise, nanopartiküllerin doğrudan değer de, dolaylı bir yol ile bitki büyüme mekanizmasında yerini alması olarak ifade edilmiştir (Shah *et al.* 2009).

Nanopartiküllerin bitkiler üzerine etkileri konulu çalışmalar bugüne dek kısıtlı sayıda bitki ve nanopartikül türü ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin bitki büyümesine olan etkisinin merak ediliyor olması dolayısıyla bugüne kadar yapılmış olan çalışmaların çoğu bu alanda kendine yer bulmuştur (Rico *et al.* 2011).

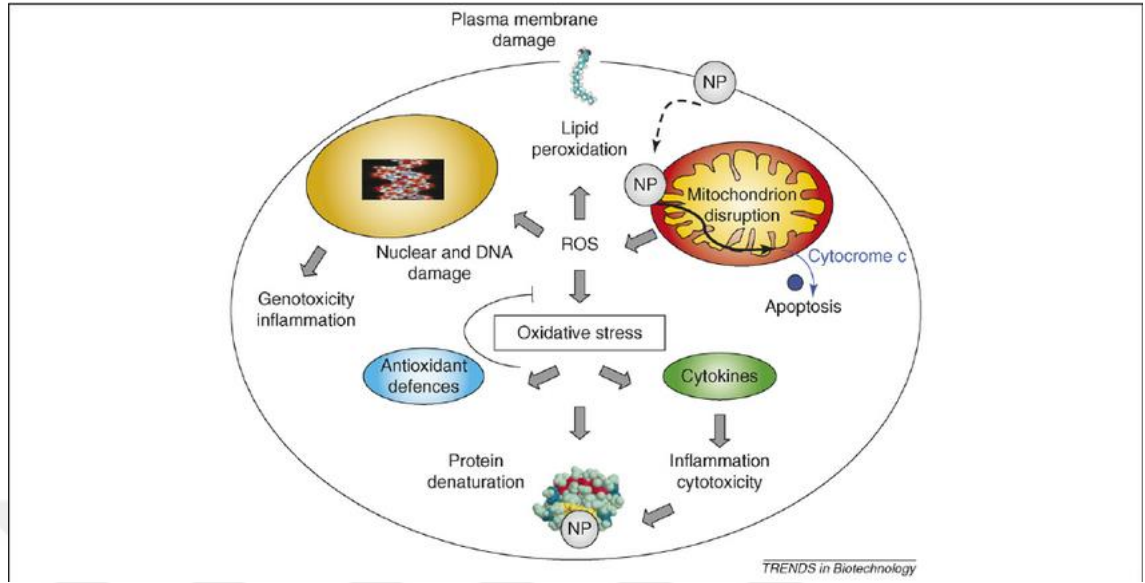
Bitkiler, nanoteknoloji ile evre, insan arasında bir bağ olarak görülmektedir. Nanopartiküllerin ara birim olarak kabul edilen bitkilerin ve onları tüketmekte olan hayvan ve insanların üzerinde ne gibi etkiler gerçekleştireceği ise hala bir merak konusudur. Bu sebeple nanopartiküllerin bitkiler üzerine etkisi ve akabinde bu nanopartiküllerin besin zincirine bitkiler yoluyla taşınıp taşınmadığı belirsizliğine yanıt olması amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bilindiği gibi bitkiler nanopartikülleri yapısal bir materyal olarak kullanabilmekte, metabolik süreçlerde rol verebilmekte, bazı bölümlerinde bu nanopartikülleri biriktirebilmektedirler. Partiküllerin türüne göre bitkiye etkisinin değericeği gibi, aynı zamanda bitkiye nanopartikülün etki türü de değeriklik gösterebilmektedir. Olumlu ya da olumsuz etkilerin yanında literatürde nanopartiküllerin bitki üzerinde nötr bir uygulama olduğu gerçekleri de görülmektedir. rnek olarak çinko oksit ve seryum dioksit nanopartiküllerinin soya fasulyesi üzerine etkisine bakıldığı Lopez-Moreno (2010) alışması verilebilmektedir. Yapılan çalışmada bu nanopartiküllerin soya fasulyesinin çimlenme sürecine herhangi bir etki etmediği halde, diğer gelişim evrelerinde seryum dioksit nanopartikülünün genotoksik bir etki yaptığı ortaya konulmuştur.

Nanopartiküllerin genel anlamda toksik etkilerini araştıran bilim dalına nanotoksikoloji denilmektedir. NP'lerin toksik etkileri incelenirken pek çok etkenin rol oynadığı bilinirken, bu etkenlerin başında NP'lerin dozu ve boyutları gelmektedir. Yapılan pek çok çalışmada NP'lerin toksik etkilerinin var olduğu ortaya konulmuştur. NP yapılarının yalnızca bitkiler için değil, diğer canlılar için de toksik etki oluşturduğu yapılan pek çok çalışmayla ortaya koyulmuştur.

Gubbins ve ark. (2011) yapmış olduğu çalışmada gümüş NP'lerinin çok düşük dozlarda dahi toksik etki sergilediği ortaya konulmuştur. Titanyum oksit NP'lerinin farelerde beyin hasarına neden olduğu belirlenmiştir. Farelere oral yolla verilen nano boyuttaki bakır elementinin böbrek, karaciğer ve dalakta mikro boyut partiküllerine kıyasla çok daha fazla hasara neden olduğu saptanmıştır (Chen *et al.* 2006).

Bu toksik etkilerin hangi mekanizma ile olduğu konusu, her ne kadar tam bir netlik kazanamamış olsa da, bu etkilerin olası mekanizmasının reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkması ile ilgili olduğu ifade edilmektedir. NP'lerin boyutları dolayısıyla pek çok alana kolaylıkla erişebilmesi, canlı organizmalarda oksidatif stresin artmasına, bu durum da dolaylı olarak hasarlara ve toksik etkilere neden olmaktadır.

ROS yapıları, normal oksijen molekülü ile kıyaslandığında, kimyasal olarak çok daha aktif ve saldırgan yapıya sahip olan maddelerdir. Süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\cdot$) yapılarının örnek olarak gösterilebileceği ROS yapıları; protein hasarı, membranda hasar, DNA yapısında mutasyonlar, mitokondriyal hasarlar gibi pek çok farklı negativiteye sebep olmaktadır (Şekil 2.1). Bu olumsuzluklar ise pek çok hastalığa neden olmaktadır: Down sendromu, diabet, Parkinson, amfizem, iskemi, akut renal yetmezlik vs.



Şekil 2.1. NP'lerin toksik etki oluşturma süreçleri (Sanvicens and Marco 2008)

NP'lerin bitkilerle ilgili çalışmalarda kullanımı yalnızca toksik etkilerini gözlemlemek adına yapılmamıştır. Tarımda nanopartiküller, hastalık etkenleri ve zararlılara karşı ilaç etkenlerinin akıllı salınım sistemleriyle, gerçek zamanlı bir takiple birlikte deneme alanına verilmesinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Nanotaşıyıcılar ile eşleştirilen veya enkapsüle formda ortama bırakılan etken maddeler, normal bir ilaca kıyasla çok daha aktif bir şekilde işlev gösterebilmektedir. Bu şekilde kullanılan etken maddelerin biyoyararlılıklarında artış olurken, bir yandan da salınımın sürekliliği ve biyoaktif etmenlerin devamlılığı sağlanmış olmaktadır. Liu et al. (2008) yapmış olduğu çalışmada bifenthrin etken maddesinin nanopartikül süspansiyonlarını üreterek, bu maddenin su içerisinde zayıf çözünürlüğünün, yağ içerisindeki yüksek çözünürlüğünün oluşturduğu riskli durumu ortadan kaldırmayı başaramışlardır. Bifenthrin, pamuk zararlısı olarak bilinen bir böceğin sinir sistemi üzerine etki eden sentetik bir insektisittir.

Demir oksit nanopartiküllerinin test edildiği bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda tarla şartlarında uygulanan demir oksit NP'lerinin soya fasülyesinin gelişimini pozitif şekilde etkilediği ve verimi artırdığı saptanmıştır. Bunun yanında bu NP'lerin fotosentez miktarını artırdığı, yapraklara demir transferinin daha etkili bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir (Sheykhabglou *et al.* 2010).

Gözenekli silika nanopartiküller içerisinde yüklenmiş etken maddeler de son dönemlerde oldukça yaygındır. Yuvarlak solucan olarak bilinen nematodlar ve eklem bacaklılar familyası olan artropodlara karşı etkili olan avermektin ile fungusit özelliği sergilemekte olan validamisin ilaçları da gözenekli silika partiküller ile enkapsüle edilmiştir (Wen *et al.* 2005). Patojenik bitki funguslarında fungusit özellik gösteren chlorothalonil etken maddesinin polimerik bir nanopartikül içerisinde aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Liu *et al.* 2001).

Gen aktarım çalışmalarında da bitkiler üzerinde kullanılan altın nanopartiküller ile yapılan çalışmada, plazmitin altın nanopartiküller ile transferinin yapılabildiği ortaya konulmuştur (Christou *et al.* 1998). Torney *et al.* (2007) yapmış oldukları çalışmada, silika nanopartiküllerinin yüzeye bağlanma ve enkapsülasyon açısından etkinliklerini gözlemlemişler ve gen aktarımında diğer yöntemlere nazaran çok daha etkili olduğunu açığa çıkarmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Malzemeler

Çizelge 3.1. Yeşil sentez ve bitki doku kültürü işlemleri için kullanılan cihazlar

Sıra	Cihaz
1	İklimlendirme Kabini
2	Santrifüj: Allegra X-30R +4c 1200 rpm
3	Kabin: class I hepa filtreli çift kişilik
4	Otoklav: Lica
5	+4°C ve -20°C buzdolapları: Bosch
6	Manyetik Karıştırıcı
7	Saf Su Cihazı
8	Spektrofotometre: Epoch nanodrop UV-VIS
9	Çalkalayıcı: Heidolph Titramax 100
10	Hassas Terazı
11	Blender
12	Evaporatör
13	pH-metre
14	Saf su cihazı
15	Epoch nanodrop UV-VIS spektrofotometre
16	Yüksek devirli santrifüj: Beckman coulter
17	Vorteks

3.2. Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi

3.2.1. Bitki örneklerinin toplanması ve bitki ekstraktının hazırlanması

Bu çalışmada *Euphorbia* (*Euphorbia amygdaloides*) bitkisi kullanılmıştır. Yeşil sentez işleminde kullanılacak olan bitki örnekleri Erzurum ilinin Hasankale ilçesi

dolaylarından toplanmıştır. Akabinde taksonomistler yardımıyla bitki türü tespit edilmiştir. Laboratuvara getirilen bitki örnekleri üzerindeki toz ve benzeri kalıntılardan arındırılmak amacıyla birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Bu işlem ardından bitki materyali yaklaşık 50 g ağırlığındaki küçük parçalara ayrıldı. 250 mL 10 mM konsantrasyonundaki sodyum fosfat tamponu içerisine alınan küçük parçalar blenderda homojen bir karışım olacak şekilde karıştırılmıştır. Ardından elde edilen homojen karışım 5000 xg'de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant enzim saflaştırma sürecinde kullanılmak üzere alınmıştır (Demir *et al.* 2008).

3.2.2. Kısmi peroksidaz enzim saflaştırması - amonyum sülfat çöktürmesi

Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) bitki homojenatı amonyum sülfat kullanılarak %60-80 oranında doymuş bir çözelti durumuna getirildikten sonra 8000 xg'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek peroksidaz enzimi pellet halinde elde edilmiştir. Peroksidaz pelleti 10 mM sodyum fosfat tamponunda çözündürülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Akabinde kullanılmaya kadar bu çözelti +4°C'de muhafaza edilmiştir (Demir *et al.* 2008).

3.2.3. Peroksidaz enzim aktivite testi

Bu işlem için pH değeri 6.0 civarında seyreden 0,1 M fosfat tamponu ile hazır hale getirilen 1mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid) diamonyum tuzu (ABST) substrat olarak kullanılmıştır. Bu tayin işleminde 2,8 mL ABTS bir tüpe aktarılmış, ardından deney tüpü içerisine 100 µl %80 çökelek ve 100 µl 3.2mM H₂O₂ solüsyonu ilavesi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı hazır hale geldikten sonra 3 dakika boyunca 1 dakika arayla UV-visible spektrofotometre (Epoch nanodrop UV-VIS spektrofotometre) yardımıyla 412 nm'de absorbans etkinliği saptanmaya çalışılmıştır. Bu işlem süresince kör numune olarak saf su kullanılmıştır.

3.2.4. ZnO nanopartiküllerinin sentezi

2.9 ml 1 mM Çinko klorür (ZnCl_2) örneği üzerine Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) bitki ekstraktından elde edilen peroksidaz enziminden 100 μL eklenmiştir. Ardından bu karışım 5 saat süreyle kapalı bir mekanda inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon süresinin sonunda çözelti ZnO nanopartiküllerinin varlığına işaret eden koyu yeşil-sarı bir renk almıştır. Bu işlem ardından evaporatör yardımıyla su uzaklaştırılmış, elde edilen çinko nanopartiküller bir gün süreyle 70°C 'de kurutulmuştur (Güngör 2011).

3.2.5. CuO nanopartiküllerinin sentezi

2.9 mL, 1 mM bakır (II) klorür (CuCl_2) örneği üzerine Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) bitki ekstraktından elde edilen peroksidaz enziminden 100 μL eklenmiştir. Ardından bu karışım 4 saat süreyle kapalı bir mekanda inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon süresinin sonunda çözelti CuO nanopartiküllerinin varlığına işaret eden bulanık bir mavi renk almıştır. Bu işlem ardından evaporatör yardımıyla su uzaklaştırılmış, elde edilen bakır oksit nanopartiküller bir gün süreyle 70°C 'de kurutulmuştur (Güngör 2011).

3.2.6. $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ nanopartiküllerinin sentezi

2.9 mL 1 mM $\text{FeCl}_2 - \text{FeCl}_3$ çözeltileri üzerine Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) bitki ekstraktından elde edilen peroksidaz enziminden 100 μL eklenmiştir. Ardından bu karışım 4 saat süreyle kapalı bir mekanda inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon süresinin sonunda çözelti $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ nanopartiküllerinin varlığına işaret eden koyu kahverengi bir renk almıştır. Bu işlem ardından evaporatör yardımıyla su uzaklaştırılmış, elde edilen $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ nanopartiküller bir gün süreyle 70°C 'de kurutulmuştur (Gungor *et al.* 2011).

3.2.7. ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin sentezinin biyokimyasal özellikleri

Sentezlenen nanopartikül yapılarının sıcaklıkları, pH değerleri, metal iyon konsantrasyonları ve kontakt zamanları ile ilişkili olarak optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

Optimum kontakt zamanı belirlemek için; 3'er dakikalık aralıklarla 0 ile 240 dakika arasında spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Bu çalışmada kör numune saf sudur.

Optimum pH değerini belirlemek için; 2-11 arasındaki pH değerlerinde ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin sentezi gerçekleştirilmiş ve UV visible spektrofotometre ile absorbans değerlerine bakılmıştır. pH ayarının gerçekleştirilmesinde 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılmıştır. Yine kör numune olarak saf su kullanılmıştır.

Sıcaklık değerini optimize edebilmek için; sentez reaksiyonları 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C'lerde sırasıyla, ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Her sıcaklıkta UV visible spektrofotometre ile reaksiyon karışımının absorbans değerlerine bakılmıştır. Saf su kör numune olarak kullanılmıştır.

Metal iyon konsantrasyonunun optimizasyonu içinse; 0,5 mM, 1mM, 3mM, 5mM, 7mM ZnCl₂, CuCl₂ ve FeCl₂-FeCl₃ çözeltileri kullanılarak sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Her uygulama için ayrı ayrı UV visible spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.3. ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin SEM, XRD, FT-IR Karakterizasyonu

Yeşil sentez yoluyla elde edilen nanopartikül yapılarının yüzeysel morfoloji görüntülerinin elde edilmesi amacıyla Zeiss marka Sigma 300 model Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak SEM görüntüleri alınmıştır. Bunun yanında X-Işını Kırınım

yöntemi olan PANalytical marka Empyrean modelindeki XRD cihazı kullanılarak nanopartiküllerin kristal formlarının tespiti sağlanmıştır. Ayrıca üretilen nanopartiküllerin içerisindeki elementler arasındaki bağların ortaya koyulması amacıyla Bruker VERTEX 80/80v markalı FT-IR cihazı ile FT-IR grafiklerinin eldesi sağlanmıştır. Bu çalışmaların gerçekleştirilmesi noktasında Atatürk Üniversitesi DAYTAM laboratuvarlarından yardım alınmıştır.

3.4. Bitki Materyali

Bu tez kapsamında kullanılan bitki genotipleri Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Kullanılan genotipler ekmeklik buğday olarak adlandırılan *Triticum aestivum* L. türünün Kırık ile ES-26 çeşitleridir. Dolgun, beyaz tanelere sahip olan Kırık buğday çeşidi, daha çok Doğu Anadolu Bölgesine önerilmekte olan kardeşlenme sayısı düşük bir bitki olarak bilinmektedir. ES-26 ise, kışa ve kurak şartlara dayanıklılığa sahip bir bitki olmasının yanında sarı pas hastalığına dayanıklı olmasıyla dikkat çekmektedir. Bu genotiplerin bu çalışma için seçilmiş olmalarının nedeni, kırık buğday genotipinin kallus oluşturma oranının son derece yüksek, ES-26 genotipinin ise kırık nispeten daha düşük kallus oluşturma oranına sahip olmasıdır.

3.5. Bitki Doku Kültürü Ortamlarında Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

Kallus gelişimi ve somatik embriyoların elde edilme sürecinde, Murashige and Skoog (1962) besi ortamında faydalanılmıştır. Bu ortamın hazırlanmasında makro elementler, mikro elementler, demir şelat ajanları ile birlikte organik materyaller kullanılmıştır. Bu materyallerin MS ortam içerisindeki miktarları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. MS ortamı içerisinde yer alan makro ve mikro elementler

Bileşik	Konsantrasyon (mg/L)
Makro Elementler	(MS, 1962)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Mikro Elementler	(MS, 1962)
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	15.6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
KI	0.83
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3

3.5.1. MS makro elementler için stok solüsyonun hazırlanması

Makro elementlerin MS ortam hazırlama sürecinde kullanımı için 20X stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bu kapsamda takip edilen basamaklar aşağıdaki gibidir:

- Çizelge 3.1’de verilmiş olan makro element miktarlarının tartımı 20 katlarına denk gelecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için hassas terazi kullanılmıştır.
- 2 litrelik bir beherde bulunan 600 mL’lik saf su içerisine bahsi geçen tartımı gerçekleştirilmiş materyaller tek tek erimesi sağlanarak çözelti içerisine ilave edilmiştir. Bu işlem esnasında beher içerisine manyetik balık bırakılmış ve akabinde manyetik karıştırıcının karıştırma işleminden faydalanılmıştır.

c) Tüm elementlerin çözünme işlemi tamamlandığında mezür kullanılarak karışımın hacmi 1 litreye tamamlanarak, solüsyon amber şişe içerisine alınmıştır. Etiketleme işleminin ardından stok solüsyon 4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5.2. MS mikro elementler için stok solüsyonun hazırlanması

100X derişiminde bir mikro element stok solüsyonu hazırlama işlemi için takip edilmiş olan işlem basamakları şu şekildedir:

- Çizelge 3.2’de yer alan materyallerden $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve Na_2EDTA haricindeki diğer tüm malzemeler 100 katları olacak şekilde hassas terazi kullanılarak tartılmıştır.
- İçerisinde yaklaşık 600 mL saf su bulunan beher, manyetik balıkla birlikte manyetik karıştırıcı üzerine koyulur. Ardından tartımı gerçekleştirilen mikro elementlerin sırayla, çözünmeleri beklenerek ilaveleri sağlanmıştır. Tüm materyallerin çözelti içerisinde çözünme süreçleri tamamlandıktan sonra mezür yardımıyla karışım 1 litreye tamamlanarak amber şişe içerisine alınmıştır. Etiketleme işlemi ardından solüsyon 4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5.3. Nanopartikül içeren MS mikro stok solüsyonlarının hazırlanması

Çizelge 3.3. MS mikro elementler içerisindeki nanopartikül elementlerin gösterimi

Mikro Elementler	(MS, 1962), (mg/l)
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	15.6
Nanopartikül ZnO	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Nanopartikül CuO	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.83
Nanopartikül $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$	27.8
Na_2EDTA	37.3

Nanopartikül içeren MS mikro stok solüsyonlarının hazırlanması sürecinde bahsi geçen NP mikro elementlerin her biri için 3 ayrı stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bu işlem için ZnO ve CuO nanopartikülleri hassas terazi kullanılarak 3'er farklı miktarda tartılmıştır. ZnO ve CuO nanopartiküllerinin normal MS mikro stok solüsyonu hazırlama işleminde tartılan miktarın kendisi, bu miktarın iki katı ve normal miktarın üç katı olacak şekilde 3 ayrı dozda tartımı gerçekleştirilmiştir.

3.5.3.a. Normal miktarda ZnO NP içeren (1X ZnO NP) stok solüsyonunun hazırlanması

FeSO₄.7H₂O ve Na₂EDTA haricindeki diğer tüm malzemeler 100X'lik bir çözelti hazırlanması dolayısıyla 100 katı tartılarak kenara alınmıştır. Aynı zamanda ZnO NP'nden de MS mikro çözeltisinde yer aldığı normal miktarda tartılmıştır. Bu işlemde 100X derişiminde 250 mL'lik bir karışım elde edilmiştir.

Beher içerisine 150 mL saf su koyularak, manyetik balık yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya başlanır. Tartımı gerçekleştirilen mikro elementler sırayla çözünmeleri beklenerek karışıma ilave edilmiştir. Tartımı gerçekleştirilen normal MS ortamında yer alan miktarda (1X) ZnO NP de karışıma ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır. Stok solüsyon etiketlenerek, solüsyonun adı, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi yazılarak +4°C'de saklanmıştır.

3.5.3.b. Normalin iki katı miktarda ZnO NP içeren (2X ZnO NP) stok solüsyonunun hazırlanması

FeSO₄.7H₂O ve Na₂EDTA haricindeki diğer tüm malzemeler 100X'lik bir çözelti hazırlanması dolayısıyla 100 katı tartılarak kenara alınmıştır. Aynı zamanda ZnO NP'nden de MS mikro çözeltisinde yer aldığı normal miktarın iki katı oranında tartılmıştır. Bu işlemde 100X derişiminde 250 mL'lik bir karışım elde edilmiştir.

Beher içerisine 150 mL saf su koyularak, manyetik balık yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya başlanır. Tartımı gerçekleştirilen mikro elementler sırayla çözünmeleri beklenerek karışıma ilave edilmiştir. Tartımı gerçekleştirilen normal MS ortamında yer alan miktarın iki katı miktara sahip (2X) ZnO NP de karışıma ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır. Stok solüsyon etiketlenerek, solüsyonun adı, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi yazılarak +4°C'de saklanmıştır.

3.5.3.c. Normalin üç katı miktarda ZnO NP içeren (3X ZnO NP) stok solüsyonunun hazırlanması

FeSO₄.7H₂O ve Na₂EDTA haricindeki diğer tüm malzemeler 100X'lik bir çözelti hazırlanması dolayısıyla 100 katı tartılarak kenara alınmıştır. Aynı zamanda ZnO NP'nden de MS mikro çözeltisinde yer aldığı normal miktarın üç katı oranında tartılmıştır. Bu işlemde 100X derişiminde 250 mL'lik bir karışım elde edilmiştir.

Beher içerisine 150 mL saf su koyularak, manyetik balık yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya başlanır. Tartımı gerçekleştirilen mikro elementler sırayla çözünmeleri beklenerek karışıma ilave edilmiştir. Tartımı gerçekleştirilen normal MS ortamında yer alan miktarın üç katı miktara sahip (3X) ZnO NP de karışıma ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır. Stok solüsyon etiketlenerek, solüsyonun adı, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi yazılarak +4°C'de saklanmıştır.

3.5.3.d. Normal miktarda CuO NP içeren (1X CuO NP) stok solüsyonunun hazırlanması

FeSO₄.7H₂O ve Na₂EDTA haricindeki diğer tüm malzemeler 100X'lik bir çözelti hazırlanması dolayısıyla 100 katı tartılarak kenara alınmıştır. Aynı zamanda CuO NP'nden de MS mikro çözeltisinde yer aldığı normal miktarda tartılmıştır. Bu işlemde 100X derişiminde 250 mL'lik bir karışım elde edilmiştir.

Beher içerisine 150 mL saf su koyularak, manyetik balık yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya başlanır. Tartımı gerçekleştirilen mikro elementler sırayla çözünmeleri beklenerek karışıma ilave edilmiştir. Tartımı gerçekleştirilen normal MS ortamında yer alan miktarda (1X) CuO NP de karışıma ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır. Stok solüsyon etiketlenerek, solüsyonun adı, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi yazılarak +4°C'de saklanmıştır.

3.5.3.e. Normalin iki katı miktarda CuO NP içeren (2X CuO NP) stok solüsyonunun hazırlanması

FeSO₄.7H₂O ve Na₂EDTA haricindeki diğer tüm malzemeler 100X'lik bir çözelti hazırlanması dolayısıyla 100 katı tartılarak kenara alınmıştır. Aynı zamanda CuO NP'nden de MS mikro çözeltisinde yer aldığı normal miktarın iki katı oranında tartılmıştır. Bu işlemde 100X derişiminde 250 ml'lik bir karışım elde edilmiştir.

Beher içerisine 150 ml saf su koyularak, manyetik balık yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya başlanır. Tartımı gerçekleştirilen mikro elementler sırayla çözünmeleri beklenerek karışıma ilave edilmiştir. Tartımı gerçekleştirilen normal MS ortamında yer alan miktarın iki katı miktara sahip (2X) CuO NP de karışıma ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır. Stok solüsyon etiketlenerek, solüsyonun adı, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi yazılarak +4°C'de saklanmıştır.

3.5.3.f. Normalin üç katı miktarda CuO NP içeren (3X CuO NP) stok solüsyonunun hazırlanması

FeSO₄.7H₂O ve Na₂EDTA haricindeki diğer tüm malzemeler 100X'lik bir çözelti hazırlanması dolayısıyla 100 katı tartılarak kenara alınmıştır. Aynı zamanda CuO NP'nden de MS mikro çözeltisinde yer aldığı normal miktarın üç katı oranında tartılmıştır. Bu işlemde 100X derişiminde 250 mL'lik bir karışım elde edilmiştir.

Beher içerisine 150 mL saf su koyularak, manyetik balık yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya başlanır. Tartımı gerçekleştirilen mikro elementler sırayla çözünmeleri beklenerek karışıma ilave edilmiştir. Tartımı gerçekleştirilen normal MS ortamında yer alan miktarın üç katı miktara sahip (3X) CuO NP de karışıma ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır. Stok solüsyon etiketlenerek, solüsyonun adı, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi yazılarak +4°C'de saklanmıştır.

3.5.4. MS demir şelat için stok solüsyonunun hazırlanması

100X derişimindeki demir şelat stok solüsyonunun hazırlanması için takip edilmiş olan adımlar aşağıdaki gibidir:

- a) Çizelge 3.2'de verilen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ maddelerinin miktarı 100 kat olacak şekilde hassas terazi kullanılarak tartılır.
- b) 300 mL saf su içeren bir beher, içerisine manyetik balık koyularak ısıtıcı ve manyetik karıştırıcısı çalışmakta olan bir karıştırıcı üzerine alınır. Akabinde $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ beher içerisine bırakılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin sona ermesiyle birlikte hazırlanan materyalin hacmi mezür ile oda sıcaklığındaki saf su ile 400 mL'ye tamamlanmıştır.
- c) Başka bir beher içerisine alınan 300 mL saf su içerisine yine manyetik balık bırakılarak, ısıtıcı ve karıştırıcısı açılan manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuştur. Akabinde tartımı gerçekleştirilen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ maddesi beher içerisine bırakılarak çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamen sona erdiğinde mezür yardımıyla karışımın hacmi 400 mL'ye tamamlanmıştır.
- d) Hazırlanmış olan bu iki çözelti karıştırılarak hacimleri mezür yardımıyla 1 litreye tamamlanmıştır. Açık sarı renge sahip olan çözelti amber şişeye koyularak etiketlenmesi tamamlanmış, ardından 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.5. Nanopartikül içeren MS demir şelat stok solüsyonlarının hazırlanması

3.5.5.a. Normal miktarda γ -Fe₃O₄ NP içeren (1X γ -Fe₃O₄ NP) stok solüsyonunun hazırlanması

Na₂-EDTA ve γ -Fe₃O₄ NP'ü normal MS mikro çözeltisinde yer aldığı miktarı, 100 kat olacak şekilde hassas terazi kullanılarak tartılır. Bu aşamada karışım 100X derişiminde 250 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

80 mL saf su içeren bir beher, içersine manyetik balık koyularak ısıtıcı ve manyetik karıştırıcısı çalışmakta olan bir karıştırıcı üzerine alınır. Akabinde Na₂-EDTA beher içersine bırakılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin sona ermesiyle birlikte hazırlanan materyalin hacmi mezür ile oda sıcaklığındaki saf su ile 110 mL'ye tamamlanmıştır.

Başka bir beher içersine alınan 80 mL saf su içersine yine manyetik balık bırakılarak, ısıtıcı ve karıştırıcısı açılan manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuştur. Akabinde tartımı gerçekleştirilen γ -Fe₃O₄ NP maddesi beher içersine bırakılarak çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamen sona erdiğinde mezür yardımıyla karışımın hacmi 110 mL'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanmış olan bu iki çözelti karıştırılarak hacimleri mezür yardımıyla 250 mL'ye tamamlanmıştır. Açık sarı renge sahip olan çözelti amber şişeye koyularak etiketlenmesi tamamlanmış, ardından 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.5.b. Normalin iki katı miktarında γ -Fe₃O₄ NP içeren (1X γ -Fe₃O₄ NP) stok solüsyonunun hazırlanması

Na₂-EDTA ve γ -Fe₃O₄ NP'ü normal MS mikro çözeltisinde yer aldığı miktarın 2 katı miktarında, 100 kat olacak şekilde hassas terazi kullanılarak tartılır. Bu aşamada karışım 100X derişiminde 250 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

80 ml saf su içeren bir beher, içersine manyetik balık koyularak ısıtıcı ve manyetik karıştırıcısı çalışmakta olan bir karıştırıcı üzerine alınır. Akabinde Na₂-EDTA beher içersine bırakılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin sona ermesiyle birlikte hazırlanan materyalin hacmi mezür ile oda sıcaklığındaki saf su ile 110 mL'ye tamamlanmıştır.

Başka bir beher içersine alınan 80 mL saf su içersine yine manyetik balık bırakılarak, ısıtıcı ve karıştırıcısı açılan manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuştur. Akabinde tartımı gerçekleştirilen γ -Fe₃O₄ NP maddesi beher içersine bırakılarak çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamen sona erdiğinde mezür yardımıyla karışımın hacmi 110 mL'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanmış olan bu iki çözelti karıştırılarak hacimleri mezür yardımıyla 250 mL'ye tamamlanmıştır. Açık sarı renge sahip olan çözelti amber şişeye koyularak etiketlenmesi tamamlanmış, ardından 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.5.c. Normalin üç katı miktarında γ -Fe₃O₄ NP içeren (1X γ -Fe₃O₄ NP) stok solüsyonunun hazırlanması

Na₂-EDTA ve γ -Fe₃O₄ NP'ü normal MS mikro çözeltisinde yer aldığı miktarın 3 katı miktarında, 100X'e uygun olacak şekilde hassas terazi kullanılarak tartılır. Bu aşamada karışım 100X derişiminde 250 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

80 mL saf su içeren bir beher, içerisine manyetik balık koyularak ısıtıcı ve manyetik karıştırıcısı çalışmakta olan bir karıştırıcı üzerine alınır. Akabinde Na₂-EDTA beher içerisine bırakılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin sona ermesiyle birlikte hazırlanan materyalin hacmi mezür ile oda sıcaklığındaki saf su ile 110 mL'ye tamamlanmıştır.

Başka bir beher içerisine alınan 80 mL saf su içerisine yine manyetik balık bırakılarak, ısıtıcı ve karıştırıcısı açılan manyetik karıştırıcı üzerine koyulmuştur. Akabinde tartımı gerçekleştirilen γ -Fe₃O₄ NP maddesi beher içerisine bırakılarak çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamen sona erdiğinde mezür yardımıyla karışımın hacmi 110 mL'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanmış olan bu iki çözelti karıştırılarak hacimleri mezür yardımıyla 250 mL'ye tamamlanmıştır. Açık sarı renge sahip olan çözelti amber şişeye koyularak etiketlenmesi tamamlanmış, ardından 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.6. MS vitaminleri için stok solüsyonlarının hazırlanması

Aşağıda Çizelge 3.4'de verilmiş olan organik materyaller 100x derişiminde bir stok solüsyon hazırlanması amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. MS ortamı içerisinde bulunan organik maddelerin listesi

Organik Maddeler	Konsantrasyon(mg/L), (MS,1962)
Glisin	2
Myo-inositol	100
Nikotonik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Tiamin-HCl	0.1

100X MS vitamin stok solüsyonunun hazırlanması amacıyla aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

- a) Çizelge 3.3’de verilmiş olan maddelerin 100 katı miktarında maddeler hassas terazi yardımıyla tartılmıştır.
- b) 700 mL saf su içeren bir behere, bahsi geçen vitamin tozları sırayla çözündürülerek ilave edilmiş, manyetik balık yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde çözeltinin hazırlanması sağlanmıştır. Tüm organik maddelerin çözünme süreci tamamlandığında mezür yardımıyla hacmin 1 litreye tamamlanması sağlanmıştır. Ardından hazırlanmış olan stok solüsyon amber şişe içerisine alınıp etiketlenmiştir. Muhafazası, 4°C’de gerçekleştirilmiştir.

3.5.7. MS ortamının içerisindekilere ek olarak ilave edilen kimyasallar

MS ortamı içerisine çeşitli nedenlerle ilave edilen ek kimyasallar Çizelge 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.5. MS ortamına ilave edilen ek kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Miktarı
Askorbik Asit	100 mg/L
MES Hidrate	1.95 g/L
Phytigel	2 g/L
Sakkaroz	20 g/L

MS ortamına ilave edilen bir diğer kimyasal grubu ise bitki büyüme düzenleyicileridir. Çizelge 3.6’da bu tez deneyleri kapsamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri olan oksin (Dicamba ve IAA) ve sitokininin (TDZ) hazırlama şekilleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. MS ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri ve hazırlanışları

Hormon Tipi	Çözücü	Seyreltici	Muhafazası	Çalışma Konsantrasyonu
Dicamba	Su/Etil Alkol	Su	4°C	1 mg/mL
IAA	Etil Alkol	Su	4°C	1 mg/mL
TDZ	Dimetil Sülfoksit	Su	4°C	1 mg/mL

3.6. Sterilizasyon Yöntemleri

3.6.1. Bitki doku kültürü çalışma ortamı ve aletlerin sterilizasyonu

Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan steril kabin içi, çalışma yapılmadan en az 10-15 dk önce %70'lik etil alkolle temizlenerek, UV lambası ile sterilize edilmiştir. Çalışmadan önce en az yarım saat açık kalan UV lambası, çalışmaya başlamadan hemen önce kapatılarak kültüre alma işlemlerine başlanmıştır. Bistüri, pens gibi doku kültüründe kullanılan alet ve edevatlar da %70'lik alkole batırılıp, aleve tutularak yüzeyleri sterilize edilerek kullanılmıştır. Eksplant kesimi için kullanılacak olan 10x15 cm niteliklerindeki kurutma kağıtları ise alüminyum folyo içerisine sarılarak otoklavda sterilize edilmiştir.

3.6.2. Buğday tohumlarının yüzey sterilizasyonu

Bitki doku kültüründe kullanılacak olan tohumlar, üstlerine yapışmış olan tozdan arındırmak amacıyla musluk suyuyla yıkanmıştır. Ardından %70'lik etil alkolde 5 dakika süreyle çalkalayıcı cihazında karıştırılması suretiyle muamele edilmiştir. Ardından steril kabin içerisinde alkolden çıkarılan tohumlar 3 defa saf su ile durulanmış, akabinde %1'lik sodyum hipoklorit (%20'lik ticari çamaşır suyu)

çözeltisinde 35 dakika süreyle çalkalanarak inkübe edilmiştir. Tekrar steril kabin içerisinde tohumlar 3 defa saf su ile durulanarak işlem sonlandırılmıştır.

3.6.3. Besi ortamının ve diğer bileşenlerin sterilizasyonu

105 kPa basınç ile 121°C’de 20 dakika süreyle otoklavda bekletilerek besi ortamlarının sterilizasyonu sağlanmıştır. Yüksek sıcaklıklar dolayısıyla yapılarında bozulmalar meydana gelebilecek organik moleküllerin (vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri vs.) sterilizasyon işlemleri 0.22 µm çapında porlara sahip olan selüloz nitrat filtreler (milipor) yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

3.6.4. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanması

%70’lik Etil Alkolün Hazırlanması: %96’lık saf etil alkolden alınan 700 mL alkolün hacmi 960 mL’ye tamamlanarak elde edilmiştir.

3.6.5. %1’lik sodyum hipoklorit solüsyonunun hazırlanması

%5 NaOCl (Sodyum Hipoklorit) barındıran ticari bir marka olan ACE çamaşır suyundan 200 mL alınmış ve son hacim saf su kullanılarak bir litreye tamamlanmıştır. Elde edilen solüsyon amber şişeye doldurularak oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.7. Kallus ve Bitki Rejenerasyon Besin Ortamlarının Hazırlanması

Bir litrelik hacme sahip beher içerisine manyetik balık atılarak, 600 mL distile su koyulup manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırma işlemi başlatılmıştır. Ardından daha önceden hazırlanan MS Makro element solüsyonundan 50 ml, MS mikro element ve demir şelat solüsyonundan ise 10’ar mL alınarak beher içerisine bırakılmıştır. Akabinde 20 g sakaroz, 1.95 g MES Hydrate tartılarak karışıma ilave edilmiştir. Bu materyaller eriyinceye kadar karıştırılması sağlanmıştır. Erime süreci sona erdiğinde son hacim 950

ml olarak ayarlanmış ve akabinde 1N NaOH ve 1N HCl solüsyonlarının gerekli olduğu durumlarda kullanılmasıyla pH 5.8'e ayarlanmıştır. Bu işlem ardından hacim 985 mL olarak ayarlanıp, içerisine 2 g jel yapıcı madde olarak adlandırılan Phytigel ilave edilerek erlen içerisine aktarılmıştır. Erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak otoklavda 20 dakika süreyle 105 kPa basınç altında 121°C'lik sıcaklık ile sterilize edilmiştir.

Otoklav içerisinde bozulan vitamin ve hormon karışımı otoklav işleminin ardından besin ortamı içerisine filtre edilerek ilave edilmiştir. Bu işlem için öncelikle 50 mL hacme sahip beher içerisine MS vitamin solüsyonundan 10 mL, askorbik asit solüsyonundan (50 mg/L) 1 mL ilave edilerek son hacmin saf su yardımıyla 15 mL olması sağlanmıştır. Otoklavdan çıkan besi ortamının sıcaklığı yaklaşık 40-45°C'ye ulaştığında 0,22 µm por çapına sahip selüloz nitrat yapısındaki filtreden geçirilerek vitamin ve hormon karışımı besin ortamına ilave edilmiştir.

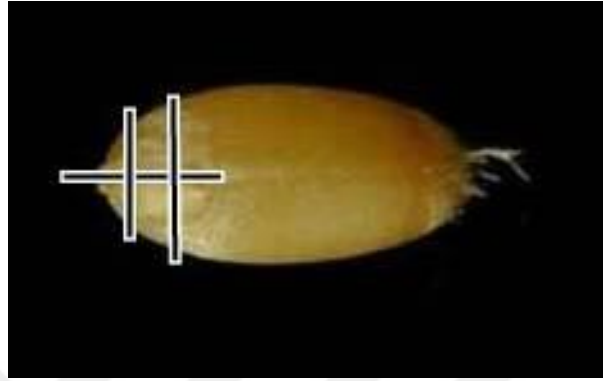
3.8. Nanopartikül içeren kallus ve bitki rejenerasyon besin ortamlarının hazırlanması

Bu işlem için normal besin ortamı hazırlarken yapılan işlemlerin aynısı yapılmıştır. Ancak ZnO NP materyalinin 1X, 2X ve 3X dozlarında içeren besin ortamlarının hazırlanması sürecinde, daha önceden hazırlanmış olan NP içeren stok solüsyonlar kullanılmıştır. Aynı işlemler CuO ve γ -Fe₃O₄ NP'leri için de gerçekleştirilmiştir.

3.9. Endosperm Destekli Olgun Buğday Embriyosu Kültürü

Bu işlem için Aydın (2011) çalışmasında yer alan endosperm desteli olgun embriyo kültür aşamaları kullanılarak uygulama gerçekleştirilmiştir. Bu uygulama sürecinde gerçekleştirilen basamaklar ise şu şekildedir:

a) Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş tohumlar steril kabin içerisinde, steril koşullarda olgun embriyolar tohumdan ayrılmayacak şekilde 6 parçaya bölünmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tohum sterilizasyonu ardından olgun embriyonun kesim kısımlarının gösterimi

- b) Embriyoları kesilen tohumlar kallus gelişimi için, 12 mg/L dikamba (3,6-Diklorobenzoik asit), 0.5 mg/L IAA (İndol-3-asetik asit), 20 g/L sakkaroz, 2 g/L phytigel ve 1.95 g/L MES [(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid)] ilave edilen MS ortamında $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 30 gün süreyle karanlıkta inkübe edilmiştir.
- c) Bir ay sürenin sonunda gelişim gösteren kallus yapıları hormon içermeyen MS ortamında bitki rejenerasyonunu sağlayabilmek adına 15 gün süreyle inkübe edilmiştir.
- d) 0.5 mg/L TDZ, 2 mg/L phytigel ve 20 g/L sakaroz içeren MS ortamına aktarılan kalluslar $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat ışık:karanlık fotoperiyodunda 30 gün süreyle bekletilmiştir. Aydınlatma kaynağı olarak $62\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu ayarlanmış olan flüoresan lamba kullanılmıştır.

Tüm uygulamalar için hazırlanmış besi ortamı içeren petri kaplarının her birine 10 adet olgun buğday embriyosu ekimi yapılmıştır. Her bir uygulama 4 tekerrürlü olacak şekilde çalışma gerçekleştirilmiş ve bu doğrultuda tamamlanmıştır.

3.10. İncelenen Karakterler

Buğday olgun embriyo kültüründe nanopartiküllerin test edildiği bu tez kapsamında aşağıda verilen karakterler incelenmiştir.

3.10.1. Kallus oluşum (KO) oranı (%)

Kallus oluşum oranını elde ederken aşağıda verilmiş olan formül baz alınmıştır (Aydın 2010).

$$Kallus\ oluşum\ oranı(\%) = \frac{Olışan\ kallus\ sayısı}{Kültüre\ alınan\ eksplant\ sayısı} \times 100$$

3.10.2. Embriyogenik kallus oluşum oranı (%)

Embriyogenik kallus yapısının sert nitelikte, dağılabilir bir formda, pürüzlü ve sıkı bir yapıya sahip olduğu ve aynı zamanda bir embriyo oluşturma kapasitesinde olduğu ifade edilmektedir. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı hesaplanmıştır (Aydın 2010).

$$KSEKO\ oranı\ (\%) = \frac{Embriyogenik\ kallus\ sayısı}{Kallus\ sayısı} \times 100$$

3.10.3. Cevap veren embriyogenik kallus oranı (%)

Eksplantlardan meydana gelen kallus sayısına göre verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır (Aydın 2010).

$$KSCEK\ oranı\ (\%) = \frac{Cevap\ veren\ embriyogenik\ kallus\ sayısı *}{Kallus\ sayısı} \times 100$$

3.10.4. Cevap veren somatik embriyo sayısı (adet)

Eksplantlardan meydana gelen kallus sayısına aşağıdaki formül kullanılarak elde edilmiştir (Aydın 2010).

$$KSCEK = \frac{\text{Cevap veren somatik embriyo sayısı} *}{\text{Kallus sayısı}} \times 100$$

3.10.5. Bitki Sayısı (BS)

Elde edilen toplam bitki sayısıdır.

*Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kallus veya somatik embriyo sayısı.

3.11. Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler SPSS istatistik analiz programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde hesaplanmıştır. Verilerin istatistik olarak anlaşılandırılması amacıyla Duncan çoklu karşılaştırma varyans analiz testi kullanılmış ve bu yöntemle sonuçlar ortaya konulmuştur. Araştırılan karakterler bakımından sonuçlar ise Pearson katsayısı ile elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Nanopartiküllerin Yeşil Sentezinin Sonuçları

4.1.1. Yeşil sentezde kullanılan peroksidaz enziminin kısmi saflaştırma sonuçları

Peroksidaz enzimi *Euphorbia* (*Euphorbia amygdaloides*) bitkisinin ekstraktı kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu süreçte %60-80 oranında amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen peroksidaz enziminin hem aktivite ölçümü hem de protein tayini gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerden elde edilen veriler kullanılarak bazı hesaplamalar yapılmıştır. Hesaplaması yapılan parametreler arasında; aktivite, toplam aktivite, spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı, % verim parametreleri yer almaktadır. Çizelge 4.1’de bu verilerden elde edilen parametrelerin değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Euphorbia* (*Euphorbia amygdaloides*) bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimine ait saflaştırma ve verim profili

Basamaklar	Hacim mL	Aktivite EU/mL	Toplam Aktivite EU %		Protein (mg protein (mL)	Spesifik aktivite EU/mg protein	Saflaştırma katsayısı
Ham ekstrakt	50	236.4±1.0	11.82x10 ³	100	3.82*10 ² ±0.7	0.62	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%60-80)	20	174.3±1.02	3.49 x10 ³	29.5	1.88±0.16	92.71	149.54

4.1.2. ZnO nanopartikül yeşil sentezi

Gerçekleştirilen biyokimyasal optimizasyon süreçlerinde, ZnO nanopartikülü sentez işlemi için optimum kontakt süresi 30 dakika olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında optimum sentez pH değeri 7,5 olurken, sentez sürecinin en etkili gerçekleştiği sıcaklığın 30°C olduğu bulunmuştur. Ayrıca ZnO NP sentezi için en uygun iyon

konsantrasyonunun 1 mM olduğu saptanmıştır. Tüm bu işlemler ZnO NP'lerin maksimum absorbens verdiği 338 nm'de UV-Vis spektrofotometre ile ölçülerek belirlenmiştir.



şekil 4.1. ZnO nanopartikülünün yeşil sentezinin şematik gösterimi
A: ZnCl₂ zltisi, B: ZnO nanopartikülü

4.1.3. CuO nanopartikül yeşil sentezi

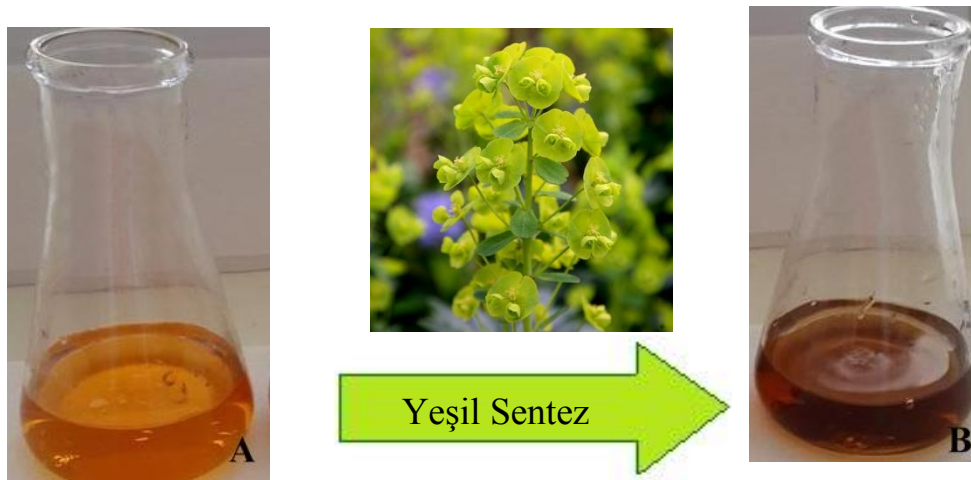
CuO NP için gerçekleştirilen yeşil sentezin biyokimyasal optimizasyon işlemlerinde en uygun sentez pH değerinin 8 olduğu saptanmıştır. Bunun yanında en uygun kontakt süresi 30 dakika bulunurken, optimum sentez sıcaklığının ise 25°C olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 350 nm dalga boyunda gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümlere göre en başarılı üretim sonucunu veren iyon konsantrasyonunun 1 mM olduğu grlmştir.



Şekil 4.2. CuO nanopartikülünün yeşil sentezinin şematik gösterimi

4.1.4. γ -Fe₃O₄ Nanopartikül Yeşil Sentezi

γ -Fe₃O₄ NP için gerçekleştirilen yeşil sentezin biyokimyasal optimizasyon işlemlerinde en uygun sentez pH değerinin 11 olduğu saptanmıştır. Bunun yanında en uygun kontakt süresi 15 dakika bulunurken, optimum sentez sıcaklığının ise 20°C olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 330-345 nm dalga boyları aralığında gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümlere göre en başarılı üretim sonucunu veren iyon konsantrasyonunun 1 mM olduğu görülmüştür.



Şekil 4.3. γ -Fe₃O₄ nanopartikülünün yeşil sentezinin şematik gösterimi

A: FeCl₂ – FeCl₃ çözeltisi B: γ -Fe₃O₄ nanopartikülü

4.1.5. ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin sentezinin optimum biyokimyasal özellikleri

Çizelge 4.2. ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin yeşil sentezinin optimum biyokimyasal özellikleri

NP	pH	Sıcaklık	Kontakt Süresi	Metal İyon Konsantrasyonu	Dalga Boyu	Partikül Boyutu
ZnO	7.5	30°C	30 dk	1 mM	338 nm	60-80 nm
CuO	8.0	25°C	30 dk	1 mM	350 nm	5-120 nm
γ -Fe ₃ O ₄	11.0	20°C	15 dk	1 mM	330-345 nm	30-80 nm

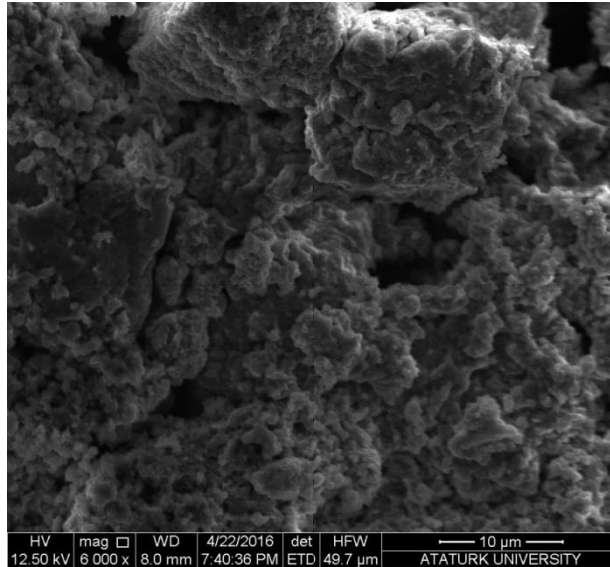
Yeşil sentez işleminde, sentez sürecine etki edebilecek biyokimyasal faktörlerin, hangi değerde maksimum verim sergilediğini belirlemek adına optimizasyon çalışması yapılmıştır. Her üç nanopartikülün sentezinde de her bir biyokimyasal faktör için en uygun değerler belirlenmiştir. Her üç nanopartikül için de 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C sıcaklıkları arasından hangisinde daha etkin bir sentez gerçekleştiği test edilmiştir. Aynı şekilde pH 2-11 değerlerinde de benzer işlemler uygulanmıştır. 0,5mM, 1mM, 3mM, 5mM ve 7mM olarak 5 ayrı metal iyonu konsantrasyonu test edilmiştir. Bunun yanında en uygun kontakt süresinin saptanması için de 3'er dakikalık aralıklarla 0 ile 240 dk arasında spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Bu doğrultuda her üç nanopartikülün sentezi için optimum biyokimyasal değerler tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Metal iyonu konsantrasyonları her üç nanopartikül sentezi için de aynı değerde optimum nitelik sergilerken, optimum pH değerleri olarak tüm nanopartiküller bazik nitelikte pH değerlerinde optimum verim sergilemiştir. ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin optimum sentez sıcaklıkları değerleri ise sırasıyla 30°C, 25°C ve 20°C olmuştur.

4.2. ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ Nanopartiküllerinin SEM, XRD, FT-IR Karakterizasyonu

4.2.1. ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin SEM karakterizasyonu

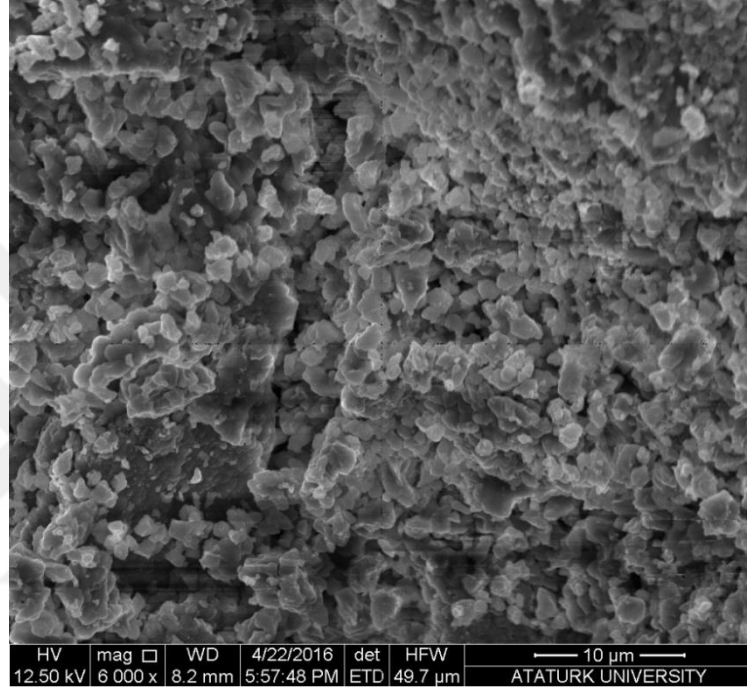
SEM (Scanning Electron Microscope), temelde yüzey morfolojisinin görüntüsü alınmak istenen bir materyalin, elektronlar yardımıyla taranması sonucu görüntüler elde edilmesi esasıyla çalışmaktadır. Kaynakları tungsten uç olan elektronlar, taranmak istenen yüzeye gönderilir. Ardından saçılan elektronların dedektör vasıtasıyla yakalanması sonucunda görüntü oluşturulur. Bu şekilde çalışmada yer almakta olan nanopartiküllerin SEM cihazında alınan görüntüleri Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da verilmiştir.

SEM cihazı ile elde edilen görüntüler hem 10 μ m hem de 5 μ m boyutlarında kaydedilmiştir. γ -Fe₃O₄ NP yapısı için kaydedilen SEM görüntüsünde daha çok birbirlerinin üstüne yerleşen, yumuşak yapılabileceğini düşündüren, daha çok toz zerresini andıran bir görüntü elde edilmiştir. Bu görüntü 10 μ m boyutundaki NP yapılarının görüntüsüdür. Yapılan yüzey karakterizasyonu işlemi ile elde edilen bu nanopartikül yapılarının ortalama 30 ile 80 nm boyutları arasında olduğu belirlenmiştir.



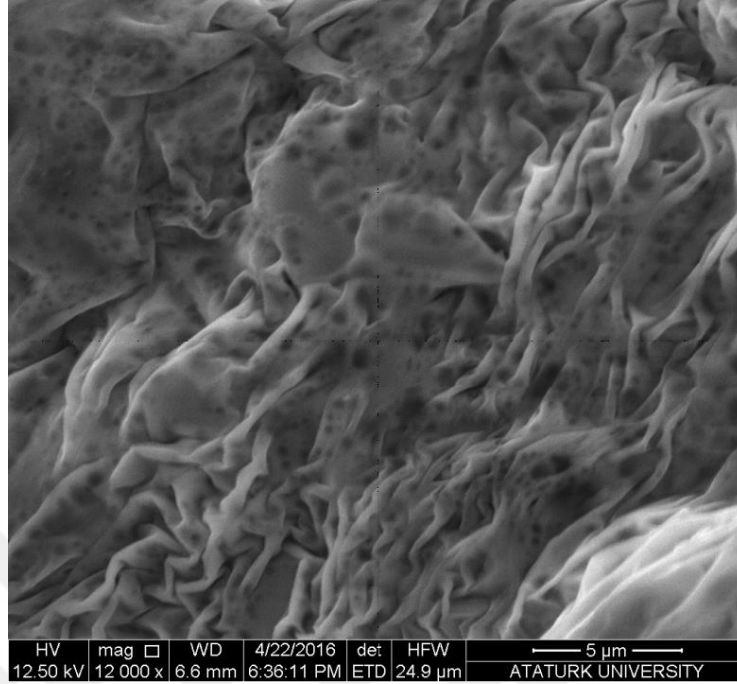
Şekil 4.4. γ -Fe₃O₄ Nanopartikül yapısının SEM görüntüsü

CuO NP yapısı için elde edilen 10 μm boyutundaki görüntüde ise, daha çok küçük yuvarlak grupların bir araya gelerek oluşturduğu, pürüzlü bir yüzeyin göze çarptığı bir kesit elde edilmiştir. Bu küçük yuvarlak veya küresel yapıların boyutlarının daha çok 5 ile 120 nm arasında değişiklik gösteren boyutlara sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. CuO Nanopartikül yapısının SEM görüntüsü

ZnO NP yapısının görüntüsü 5 μm boyutunda alınmıştır. Bu görüntüde göze çarpan detay, NP yapısının daha çok dalgalı bir yüzey sergiliyor olmasıdır. Genellikle peroksidaz enzimi içeren sıvı, toz ve pul benzeri yapılarından oluşmakta olan ZnO nanopartikül oluşumlarının birleşim göstermesine engel olmaktadır. Ancak bu enzim sıvısının uçurulmasının ardından toz ve pul yapılarının bazı bölgelerde birleşim göstererek dalgalı görünüm sergilediği görülmektedir. ZnO nanopartiküllerinin yüzey karakterizasyon analizi ardından bu yapıların ortalama 60 ile 80 nm arasında değişiklik gösterdiği saptanmıştır.

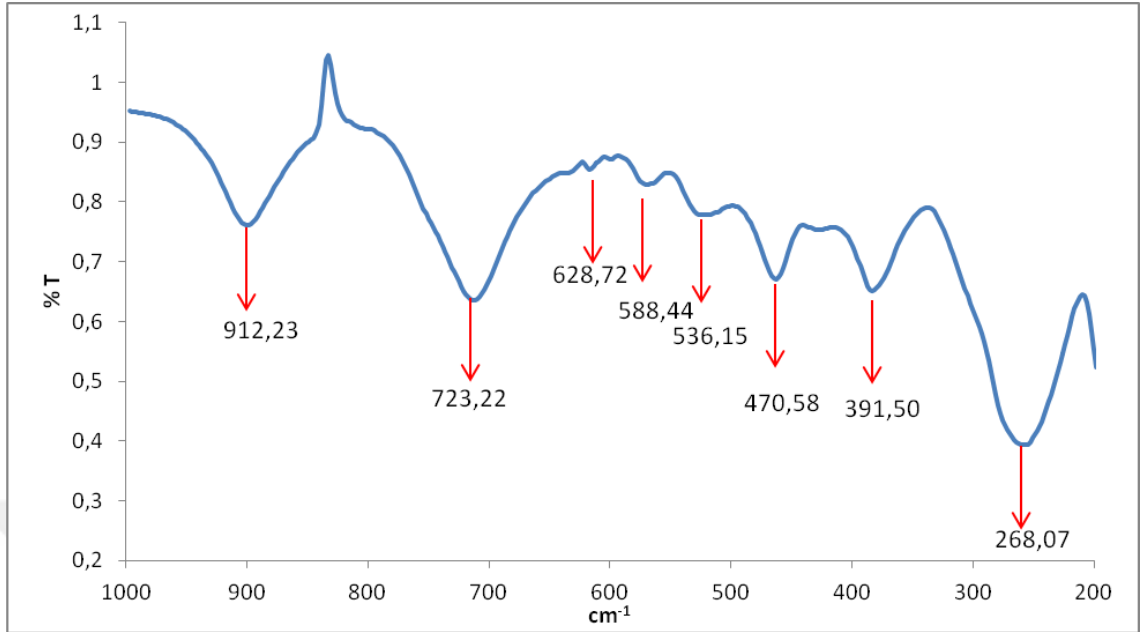


Şekil 4.6. ZnO Nanopartikül yapısının SEM görüntüsü

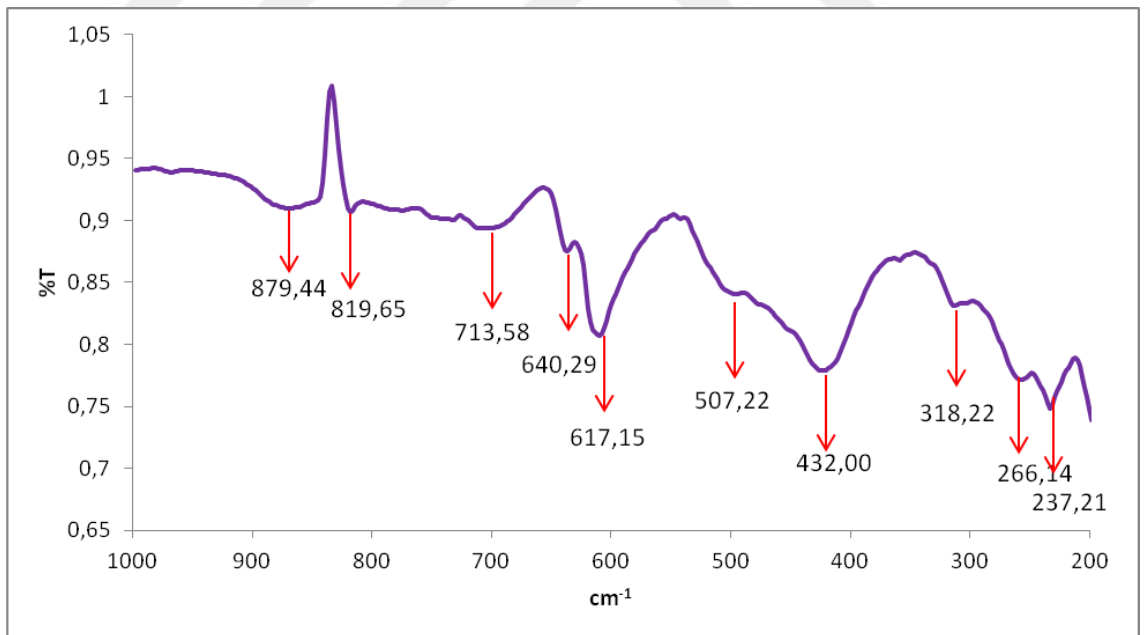
4.2.2. ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin FT-IR karakterizasyonu

Fourier Dönüştümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR), ölçümü yapılmak istenen yapı içerisinde var olan elementler arasındaki bağ oluşumlarını tespit etmek amacıyla yapılmaktadır. Bu doğrultuda yapı içerisindeki bağ oluşumlarının belirli frekanslarda yaymış oldukları titreşimin ölçülmesi suretiyle, numunenin sahip olduğu yapısal oluşum anlaşılabilir. Bu durum ölçümü yapılan materyalin içerisindeki fonksiyonel grupların tespitinde yardımcı olmaktadır. ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin FTIR karakterizasyonları sırasıyla Şekil 4.7, Şekil.4.8 ve Şekil 4.9’da verilmiştir.

Şekil 4.7’de verilen ZnO nanopartikülü FTIR spektrumuna bakıldığında, yeşil sentez yoluyla sentezlenen metal nanopartiküllerin stabilizasyon yeteneği ve bant genişliklerini ortaya koyarak biyomolekülü tespit etmek amacıyla yapılan bu analizde Zn-O bağ oluşumunu göstermekte olan 510-564 cm⁻¹ aralığındaki absorbanı görebilmek mümkündür (Gnanasangeetha and Sarala 2014).



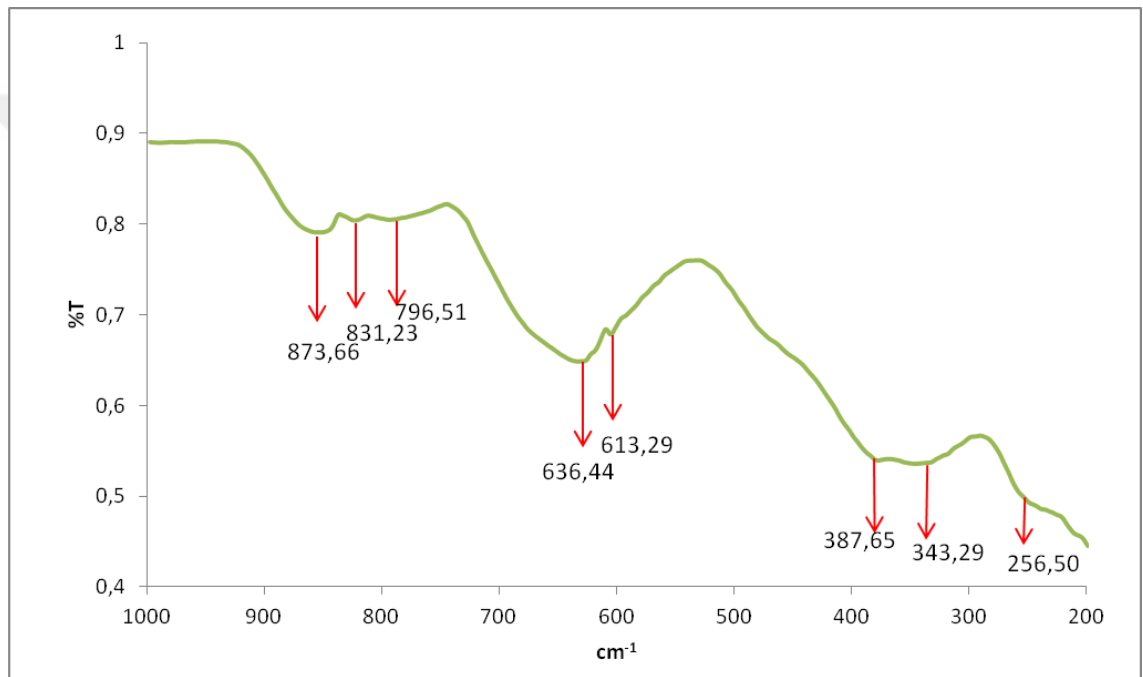
Şekil 4.7. ZnO NP yapısının FTIR spektrumu



Şekil 4.8. CuO NP yapısının FTIR spektrumu

Şekil 4.8’de verilen CuO nanopartikül yapılarına ait FT-IR diagramına bakıldığında, 432 cm^{-1} ile 713 cm^{-1} arasında gerçekleşen salınımlar analiz edilen yapının Cu=O bağıni ihtiva ettiğini açıkça göstermektedir.

Şekil 4.9'da verilen γ -Fe₃O₄ NP yapısına ait FT-IR spektrumunda, demir elementiyile oksijenin oluşturduğu bağ yapılarının salınımları yer almaktadır. Bu nanopartikül yapısının daha çok 200 ile 650 cm⁻¹ değerleri arasında salınım gösterdiği bilinmektedir (Zhang X et al 2013). Bu doğrultuda grafikte de görüldüğü gibi yeşil sentez yoluyla elde edilen γ -Fe₃O₄ nanopartikül yapısı 256 cm⁻¹ ile 636 cm⁻¹ arasında demir ile oksijen elementleri arasındaki spesifik bağları belirten salınımlar sergilemiştir.



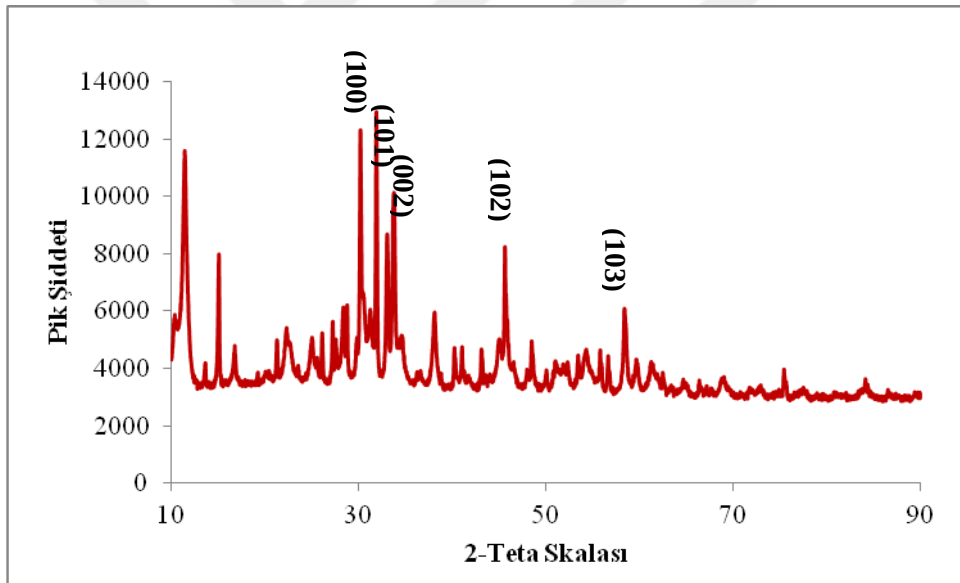
Şekil 4.9. γ -Fe₃O₄ NP yapısının FTIR spektrumu

4.2.3. ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin XRD karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan NP'lerin kristalize yapılarının analizinin gerçekleştirilmesi için XRD yani X-Işını Kırınım yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde her yapının ortaya koyacağı kırınım deseni farklı olacağından, yapının sahip olduğu simetrik ya da periyodik şekilde dizilmiş elementlerin düzlemsel yapısının tespiti sağlanabilmektedir. Bu amaçla ZnO, CuO, γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin gerçekleştirilen XRD çalışması sonrasında bazı grafikler elde edilmiştir. Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 ile verilen

spektrumlarda ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin XRD analizi sonucunda elde edilen grafikler verilmiştir.

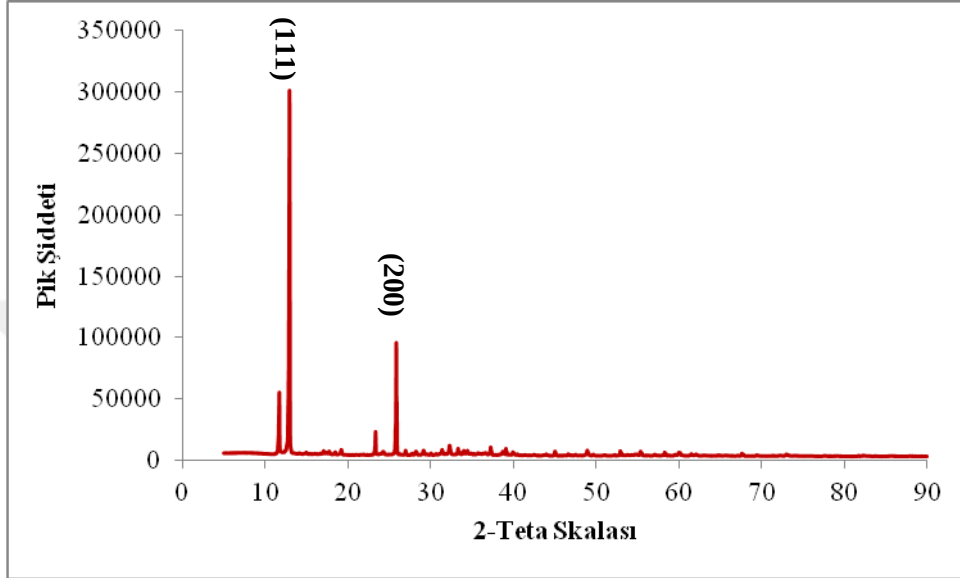
ZnO nanopartikülünün kristalize yapısını ortaya koymak adına yapılan XRD analizi grafiğinde, 100, 002, 101, 102, 110, 103, 200, 112, 201, 004 ve 202 düzlemleri tespit edilmiştir. ZnO nanopartikül yapısında bulunan atomların verilen düzlem uzaklıklarına karşılık gelen 31.77°, 34.40°, 36.22°, 47.61°, 56.58°, 62.85°, 66.41°, 67.93°, 69.08°, 72.54° ve 76.85° 2 θ açı değerlerinde konumlandığı grafikten elde edilmiştir. Bu durumda XRD grafiği, analizini gerçekleştirdiğimiz nanopartikülün ZnO nanopartikülü olduğunu doğrulamıştır.



Şekil 4.10. ZnO NP yapısının XRD spektrumu

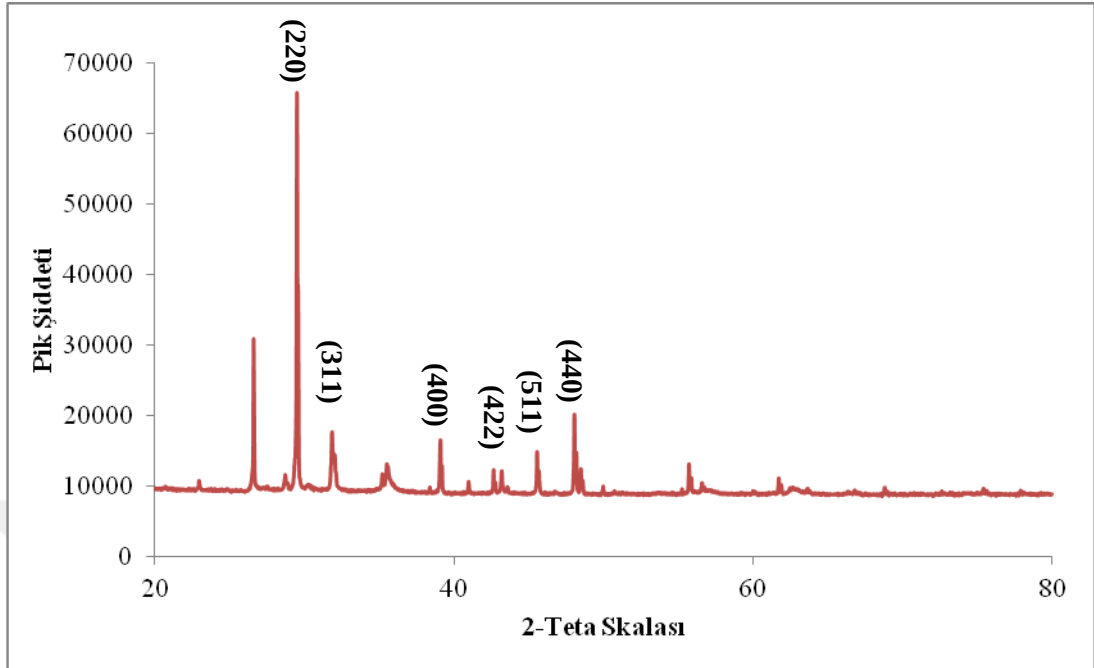
Euphorbia bitki ekstraktından elde edilen peroksidaz enzimi yardımıyla sentezi gerçekleştirilen CuO nanopartikül yapısının XRD analizi sonucunda, CuO nanopartikül yapısının varlığını gösteren spesifik pikler görülmüştür. Bu doğrultuda elde edilen grafikte CuO nanopartikülünün spesifik 2 θ değerleri olan 19.86°, 24.55°, 58.71°, 75.22° değerleri saptanmıştır. Bu 2 θ değerleri kullanılarak hesaplanan kristal düzlemler arası mesafe 111, 200, 220 belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda, bakır oksit

nanopartikül yapısından beklendiği gibi yüzey merkezli kübik bir kristalinin varlığı görülmüştür.



Şekil 4.11. CuO NP yapısının XRD spektrumu

Şekil 4.12’de görülen γ -Fe₃O₄ NP XRD spektrumunda elde edilen pikler, gerçekleştirilen yeşil sentez sürecinde istenilen nanopartikül yapısının elde edildiğini ortaya koymaktadır. Bu nanopartiküle spesifik olan 2θ değerleri 30°, 33°, 44°, 53°, 56°, 62° olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda belirlenen düzlemler arası uzaklıklar ise sırasıyla 220, 311, 400, 422, 511, 440’tır. Bu bilgiler ışığında γ -Fe₃O₄ NP yapısının küresel bir form arz eden kristal yapısında olduğu tespit edilmiştir.



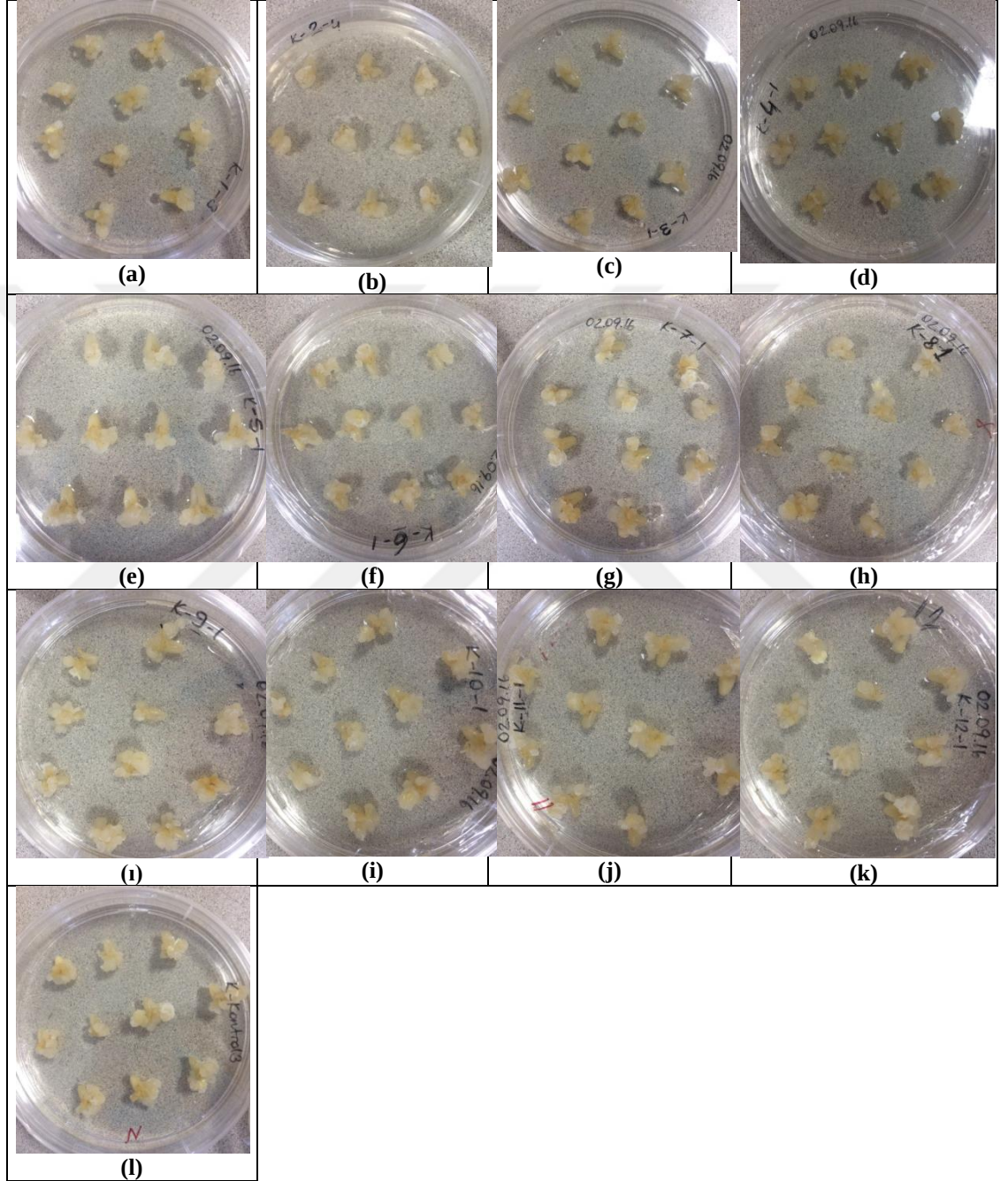
Şekil 4.12. $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP yapısının XRD spektrumu

Tez kapsamında Kırık ve ES-26 buğday genotipleri üzerinde ZnO, CuO ve $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP'lerin etkileri incelenmiştir. Bitki doku kültüründe gerçekleştirilen çalışmada NP yapılarının bitkinin gelişim aşamalarına (kallus, embriyogenik kallus, cevap veren embriyogenik kallus, somatik embriyo, cevap veren somatik embriyo, bitki sayısı) etkisi tek tek incelenmiştir. Gerçekleştirilen çalışma her petri kabında 10 tohum ve her uygulama 4 tekrar olacak şekilde uygulanmıştır. Bu şekilde elde edilen tüm bulgular SPSS programıyla analiz edilmiştir.

4.3. Kallus Oluşum (KO) Oranı

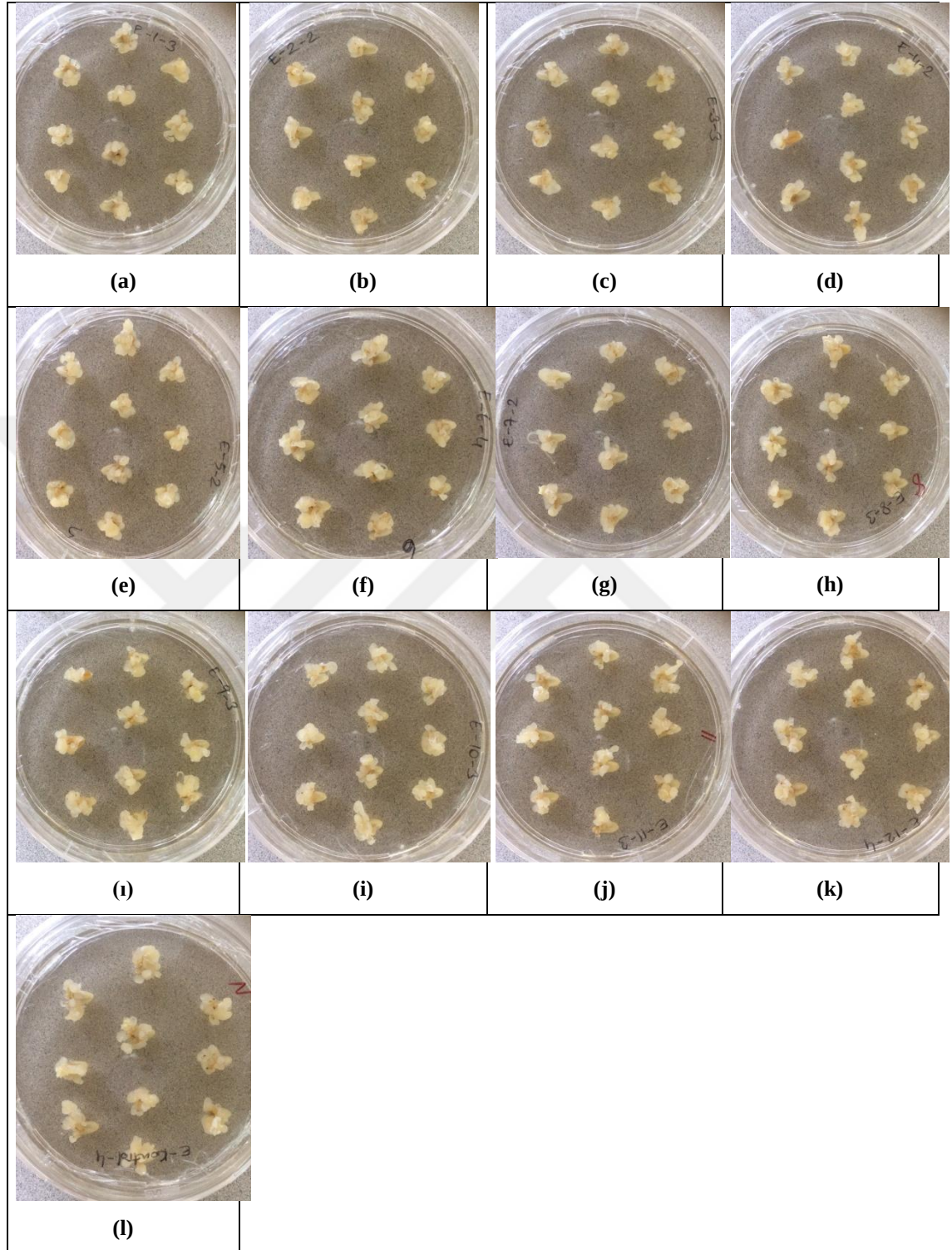
Eksplantların besi ortamına ekiminin yapılmasının 3-4 gün sonrasında kallus yapılarının ortaya çıktığı görülmüştür. Kallus yapısı; bitki dokularının yaralanmaları sonucunda ortaya çıkan, daha çok organize olmamış, tümörleşmiş hücre topluluğu olarak ifade edilmektedir. Negatif kontrol de dahil olmak üzere ekim gerçekleştirilen her besi ortamında, 3 günün ardından kallus oluşumu gözlenmiştir. Ancak NP içeren ortamlarda

ortaya çıkan kallus yapılarında kontrole kıyasla az miktarda da olsa bir küçülmeden söz etmek mümkündür.



Şekil 4.13. Kırıkcı buğday genotipinde kallus oluşumu

a) ZnO NP içermeyen MS ortamı **b)** 1x ZnO NP içeren MS ortamı **c)** 2x ZnO NP içeren MS ortamı **d)** 3x ZnO NP içeren MS ortamı **e)** CuO NP içermeyen MS ortamı **f)** 1x CuO NP içeren MS ortamı **g)** 2x CuO NP içeren MS ortamı **h)** 3x CuO NP içeren MS ortamı **i)** γ -Fe₃O₄ NP içermeyen MS ortamı **j)** 1x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **k)** 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** Kontrol grubu



Şekil 4.14. ES-26 buğday genotipinde kallus oluşumu

a) ZnO NP içermeyen MS ortamı **b)** 1x ZnO NP içeren MS ortamı **c)** 2x ZnO NP içeren MS ortamı **d)** 3x ZnO NP içeren MS ortamı **e)** CuO NP içermeyen MS ortamı **f)** 1x CuO NP içeren MS ortamı **g)** 2x CuO NP içeren MS ortamı **h)** 3x CuO NP içeren MS ortamı **ı)** γ -Fe₃O₄ NP içermeyen MS ortamı **i)** 1x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **j)** 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **k)** 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** Kontrol grubu

Kallus oluşum (KO) oranına genotipin etkisi çok önemli ($p<0.01$) iken, gerçekleştirilen NP uygulamalarının bir önemi olmamıştır. Yine genotip x uygulama interaksiyonunun da KO oranı üzerine etkisinin analiz sonuçlarında önemsiz olduğu görülmüştür. (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3. Nanopartikül içeren ortamlarda gelişen olgun embriyoların *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlerine ait varyans analiz sonuçları

Kareler Ortalaması							
Varyasyon Kaynağı	SD	KO	KSEKO	KSEO	KSCSE	EKSE	BS
Genotip (A)	1	1075.51**	104097.97**	615.43**	1.11**	17.162**	2.855
Uygulama (B)	12	29.920	220.16*	1.68**	0.69**	2.17*	6.12**
A*B	12	44.130	265.46*	0.94	0.29*	1.11	1.587
Hata	78	40.776	114.320	0.70	0.15	0.92	
Toplam	104						

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$ düzeyinde önemlidir

ES-26 genotipinde ise en yüksek KO oranı %97.5 olmuş ve bu orana sahip uygulamalar; 2x ZnO, 3x ZnO, 3x CuO ve kontrol uygulaması olarak kaydedilmiştir. Bu genotipte en düşük KO oranına sahip uygulama ise 3x γ -Fe₃O₄ uygulaması olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.4)

Kırık genotipinde yalnızca 1x oranında γ -Fe₃O₄ içeren besi ortamı ile 2x oranında ZnO içeren besi ortamındaki kallus gelişim oranları %100 olmamıştır. Diğer tüm ortamlarda kallus gelişim oranı %100 olmuş, bu genotip için en düşük KO oranı %97.5 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.5).

Elde edilen verilere göre ortalama en yüksek KO oranı %99.42 ile Kırık genotipinde gözlemlenirken, ES-26 genotipinin ortalama KO oranı %92.99 değerinde kalmıştır (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. Nanopartikül içeren ortamlarda gelişen olgun ES-26 embriyolarının *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlerine ait veriler

Genotip	Yöntem	KO (%)	KSEKO (%)	KSCEKO (adet)	KSSEO (adet)	KSCSEO (adet)	BS (adet)
ES-26	None ZnO	95.00	15.83 ^c	0.61	0.38 ^{bc}	1.92	3.50
	1x ZnO	90.00	16.73 ^c	0.73	0.52 ^{bc}	2.38	4.75
	2x ZnO	97.50	18.61 ^c	0.63	0.15 ^{bc}	1.00	1.50
	3x ZnO	97.50	41.38 ^{ab}	1.00	0.69 ^{ab}	1.70	6.75
	None CuO	87.22	35.20 ^{abc}	0.77	0.48 ^{bc}	1.43	4.25
	1x CuO	89.72	39.58 ^{ab}	1.12	0.69 ^{ab}	1.56	6.25
	2x CuO	95.00	21.38 ^{bc}	0.43	0.052 ^c	0.21	0.50
	3x CuO	97.50	30.55 ^{abc}	0.79	0.53 ^{bc}	2.48	5.25
	None γ -Fe ₃ O ₄	91.94	22.69 ^{abc}	0.25	0.09 ^c	0.38	0.75
	1x γ -Fe ₃ O ₄	92.50	22.01 ^{abc}	0.55	0.40 ^{bc}	1.63	3.75
	2x γ -Fe ₃ O ₄	92.50	27.43 ^{abc}	0.73	0.44 ^{bc}	1.38	4.00
	3x γ -Fe ₃ O ₄	85.00	22.91 ^{abc}	0.69	0.37 ^{bc}	1.19	3.25
	Kontrol	97.50	42.22 ^a	1.58	1.18 ^a	2.94	11.25
	Total	92.99 ^B	27.42 ^B	0.76	0.46	1.55	4.29

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

Çizelge 4.5. Nanopartikül içeren ortamlarda gelişen olgun Kırık genotipi embriyolarının *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlerine ait veriler

Genotip	Yöntem	KO (%)	KSEKO (%)	KSCEKO (adet)	KSSEO (adet)	KSCSEO (adet)	BS (adet)
Kırık	None ZnO	100.00	95 ^a	5.83	0.72 ^{bcd}	0.75	2.75
	1x ZnO	100.00	92.5 ^{ab}	5.65	0.05 ^d	0.06	0.25
	2x ZnO	97.50	90 ^{ab}	4.64	0.39 ^{cd}	0.41	0.75
	3x ZnO	100.00	95 ^a	5.33	0.6 ^{bcd}	0.63	2.50
	None CuO	100.00	87.5 ^{ab}	5.10	0.4 ^{cd}	0.47	1.25
	1x CuO	100.00	97.5 ^a	5.90	0.85 ^{abc}	0.86	5.25
	2x CuO	100.00	87.5 ^{ab}	5.35	0.4 ^{cd}	0.43	2.25
	3x CuO	100.00	90 ^{ab}	6.65	1.15 ^{ab}	1.30	4.75
	None γ -Fe ₃ O ₄	100.00	97.5 ^a	5.25	0.27 ^{cd}	0.28	0.50
	1x γ -Fe ₃ O ₄	97.50	97.5 ^a	6.54	0.86 ^{abc}	0.90	2.75
	2x γ -Fe ₃ O ₄	100.00	80 ^b	4.28	0.45 ^{bcd}	0.54	1.75
	3x γ -Fe ₃ O ₄	100.00	85 ^{ab}	5.95	1.45 ^a	1.69	9.00
	Kontrol	97.50	84.16 ^{ab}	6.67	1.11 ^{ab}	1.30	9.25
	Total	99.42 ^A	90.70 ^A	5.63	0.67	0.74	3.31

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

Çizelge 4.6. Nanopartikül içeren ortamlarda gelişen olgun embriyoların *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlerine ait ortalama veriler

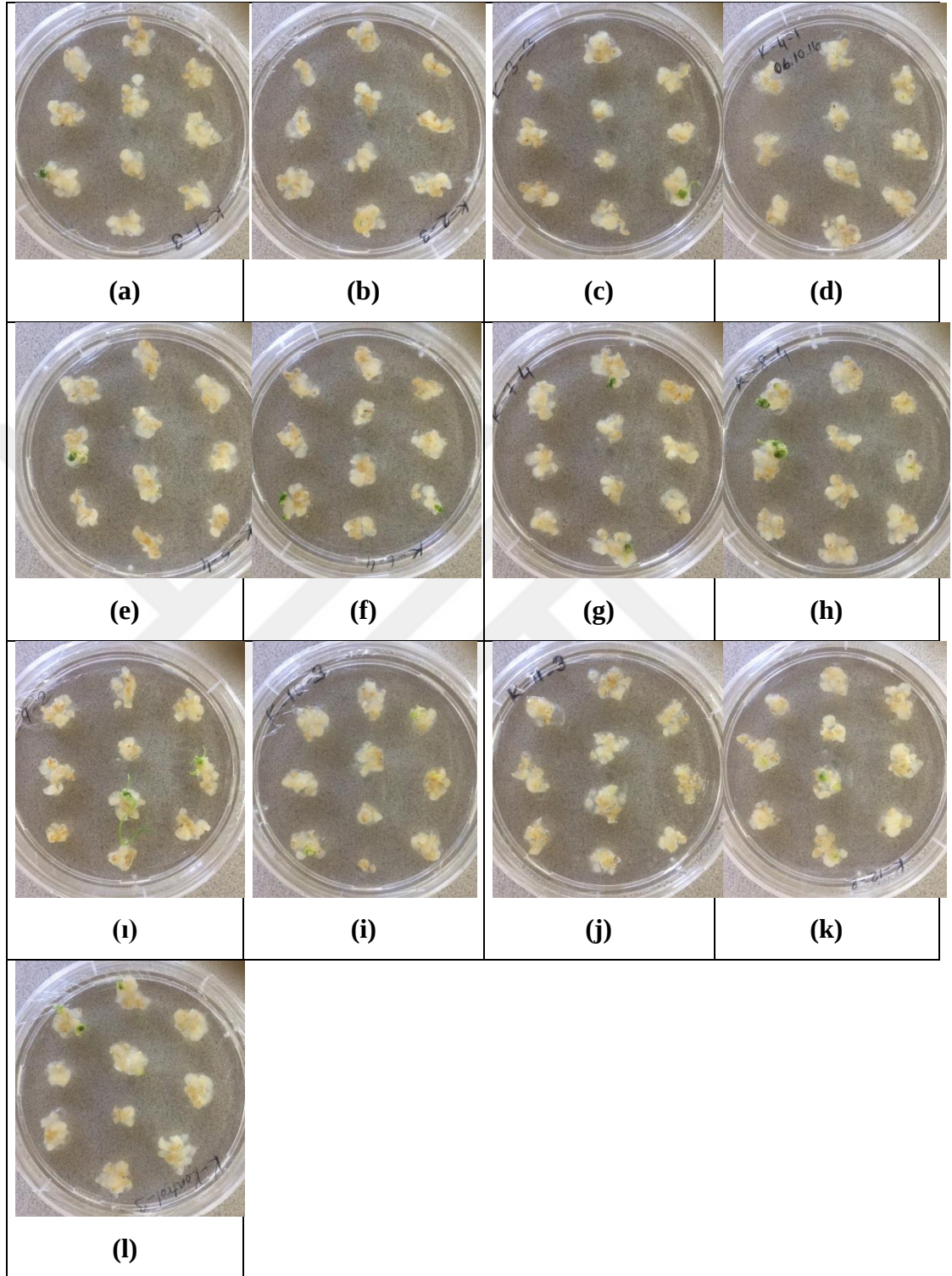
	Yöntem	KO (%)	KSEKO (%)	KSCEKO (adet)	KSSEO (adet)	KSCSEO (adet)	BS (adet)
Uygulama Ortalamaları	None ZnO	97.50	55.41 ^B	3.21 ^{ABCD}	0.55 ^{BCDE}	1.33 ^{ABC}	3.12 ^{BCDE}
	1x ZnO	95.00	54.61 ^B	3.18 ^{ABCD}	0.28 ^{DE}	1.21 ^{ABC}	2.5 ^{CDE}
	2x ZnO	97.50	54.30 ^B	2.63 ^{CD}	0.27 ^{DE}	0.70 ^C	1.12 ^E
	3x ZnO	98.75	68.19 ^A	3.16 ^{ABCD}	0.64 ^{BCD}	1.16 ^{ABC}	4.62 ^{BCD}
	None CuO	93.61	61.35 ^{AB}	2.93 ^{BCD}	0.44 ^{CDE}	0.95 ^{BC}	2.75 ^{BCDE}
	1x CuO	94.86	68.54 ^A	3.50 ^{ABC}	0.77 ^{ABC}	1.20 ^{ABC}	5.75 ^{BC}
	2x CuO	97.50	54.44 ^B	2.88 ^{BCD}	0.22 ^{DE}	0.32 ^C	1.37 ^{DE}
	3x CuO	98.75	60.27 ^{AB}	3.72 ^{AB}	0.84 ^{ABC}	1.88 ^{AB}	5 ^{BC}
	None γ -Fe ₃ O ₄	95.97	60.09 ^{AB}	2.75 ^{BCD}	0.18 ^E	0.32 ^C	0.62 ^E
	1x γ -Fe ₃ O ₄	95.00	59.75 ^{AB}	3.54 ^{ABC}	0.63 ^{BCD}	1.26 ^{ABC}	3.25 ^{BCDE}
	2x γ -Fe ₃ O ₄	96.25	53.71 ^B	2.50 ^D	0.44 ^{CDE}	0.95 ^{BC}	2.87 ^{BCDE}
	3x γ -Fe ₃ O ₄	92.50	53.95 ^B	3.31 ^{ABCD}	0.91 ^{AB}	1.43 ^{ABC}	6.12 ^B
	Kontrol	97.50	63.19 ^{AB}	4.12 ^A	1.15 ^A	2.11 ^A	10.25 ^A
	Total	96.21	59.07	3.19	0.57	1.15	3.80

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

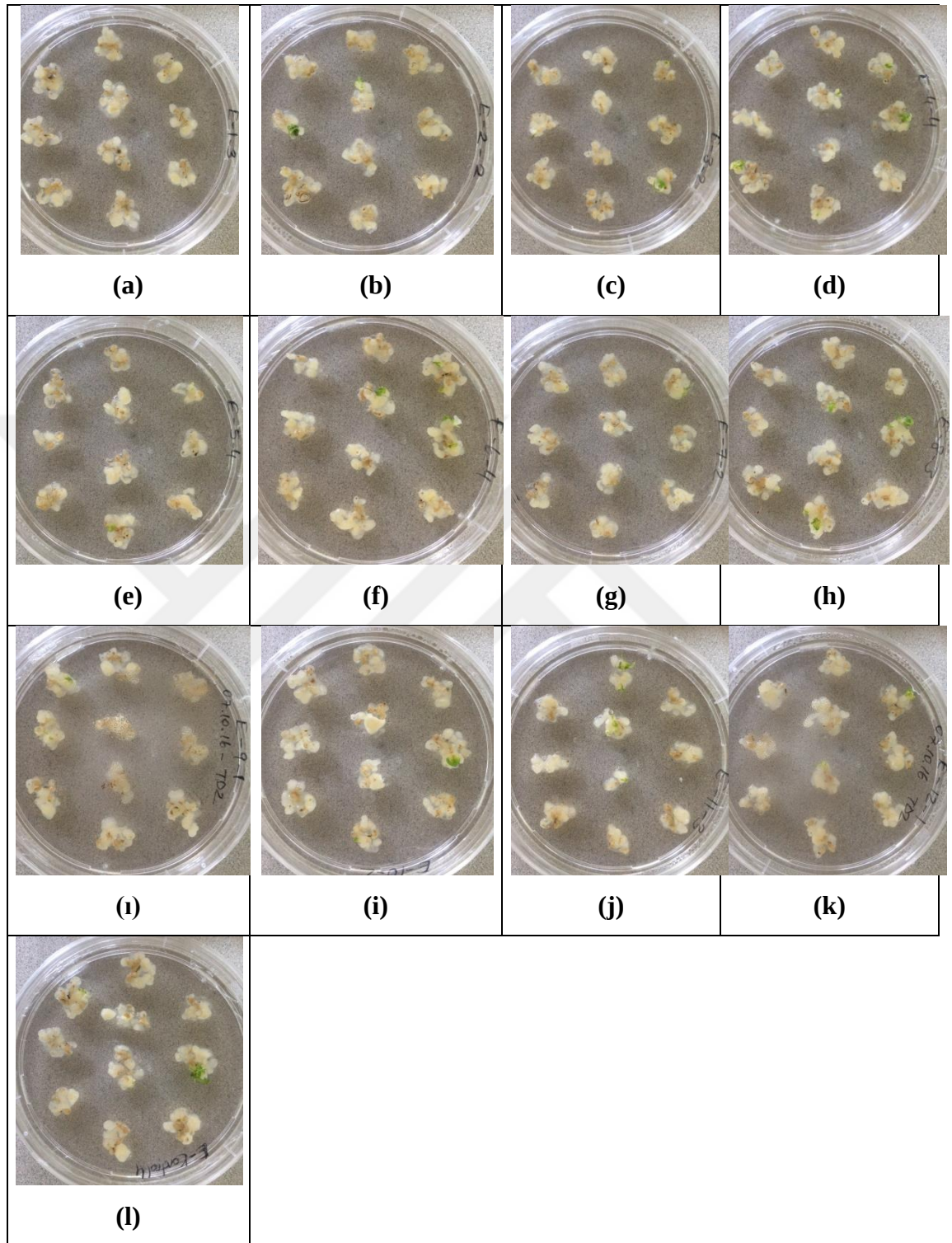
4.4. Kallus Sayısına Göre Embriyogenik Kallus Oluşum (KSEKO) Oranı

Embriyogenik kallus yapısı, kallus gelişiminin 30 gün sonrasında ortaya çıkan sert bir doku yapısında olan, dağılılabılır gibi nazik nitelikte olan, sıkı bir yapı teşkil eden, krem renkli oluşumlar olarak ifade edilmektedir. Embriyogenik kallus olmayan yapılar ise, embriyogenik kallusun aksine beyaz renkli ve sulu oluşumlar olarak ifade edilmektedir. İfade edilen embriyogenik kallus yapıları kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı olarak değerlendirilerek veriler elde edilmiştir. Kallus oluşumları 30 günlük karanlık ortamda inkübasyonunun ardından, hormon içermeyen MS ortamına aktarılmalardan 7-8 gün sonra embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamışlardır.



Şekil 4.15. Kırık buğday genotipinde embriyogenik kallus oluşumu

a) ZnO NP içermeyen MS ortamı **b)** 1x ZnO NP içeren MS ortamı **c)** 2x ZnO NP içeren MS ortamı **d)** 3x ZnO NP içeren MS ortamı **e)** CuO NP içermeyen MS ortamı **f)** 1x CuO NP içeren MS ortamı **g)** 2x CuO NP içeren MS ortamı **h)** 3x CuO NP içeren MS ortamı **i)** γ -Fe₃O₄ NP içermeyen MS ortamı **j)** 1x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **k)** 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** Kontrol grubu



Şekil 4.16. ES-26 buğday genotipinde embriyogenik kallus oluşumu

a) ZnO NP içermeyen MS ortamı **b)** 1x ZnO NP içeren MS ortamı **c)** 2x ZnO NP içeren MS ortamı **d)** 3x ZnO NP içeren MS ortamı **e)** CuO NP içermeyen MS ortamı **f)** 1x CuO NP içeren MS ortamı **g)** 2x CuO NP içeren MS ortamı **h)** 3x CuO NP içeren MS ortamı **i)** γ -Fe₃O₄ NP içermeyen MS ortamı **j)** 1x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **k)** 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **m)** Kontrol grubu

Çizelge 4.3'e göre, KSEKO oranının oluşumunda genotipin etkisi çok önemli olurken ($p<0.01$), uygulamanın bu oluşum oranına etkisi önemli olmuş, yine aynı şekilde genotip x uygulama interaksiyonunun bu oluşum oranına etkisi de önemli olmuştur ($p<0.05$). Kırık genotipinde, KSEKO oranının toplamda %90.70'lik bir başarı yüzdesine sahip olduğu görülmüştür. Bu genotipte en yüksek oluşum oranının %97.5 ile $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ içermeyen ve 1x oranında $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP içeren ortamlarda olduğu kaydedilmiştir. Bunun yanında bu genotip içerisinde en düşük KSEKO oranını oluşturan uygulamanın ise %80 oranıyla 2x $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP içeren uygulama olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

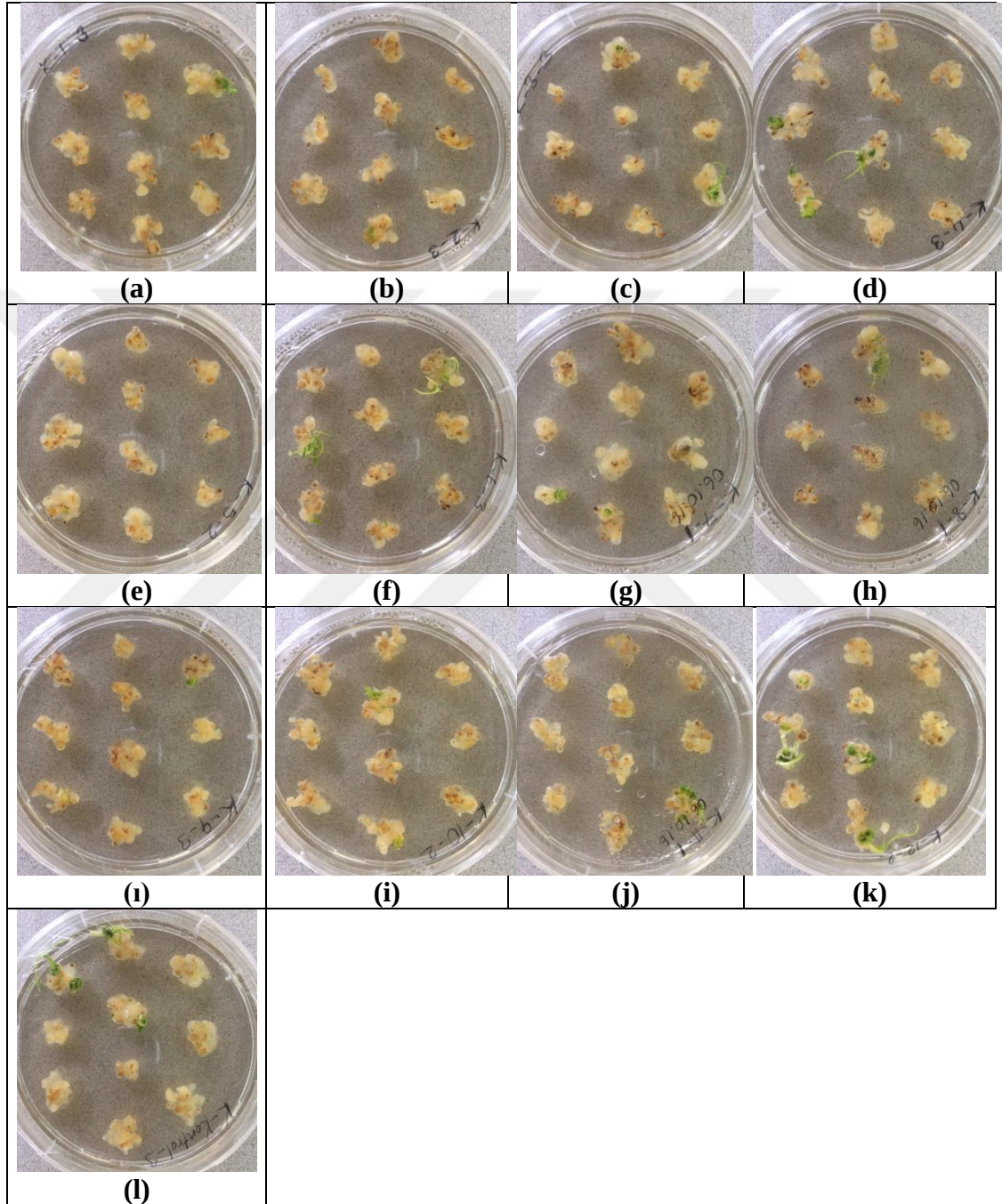
ES-26 genotipindeki KSEKO oranı verilerine bakıldığında, toplamda bu genotipin bu oluşum için başarı oranının %27.42 oranında kaldığı görülmüştür. KSEKO oranı bakımından ES-26 genotipinde en yüksek oluşum yüzdesini veren uygulama %42.22 ile kontrol uygulaması olmuştur. Bunun yanında en düşük oluşum oranına sahip ES-26 uygulamasının ise %15.83 ile ZnO NP yapısını içermeyen uygulama olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Gerçekleştirilen NP uygulamalarının ortalamalarına bakılarak yapılan analizde, en yüksek KSEKO oranının %68.19 ile 3x oranında ZnO NP içeren ortamda olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında en düşük uygulama ortalamasının ise %53.71 ile 2x oranında $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP içeren ortamda yapılan uygulamaya ait olduğu anlaşılmıştır (Çizelge 4.6).

4.5. Kallus Sayısına Göre Cevap Veren Embriyogenik Kallus Oluşum (KSCEKO) Oranı

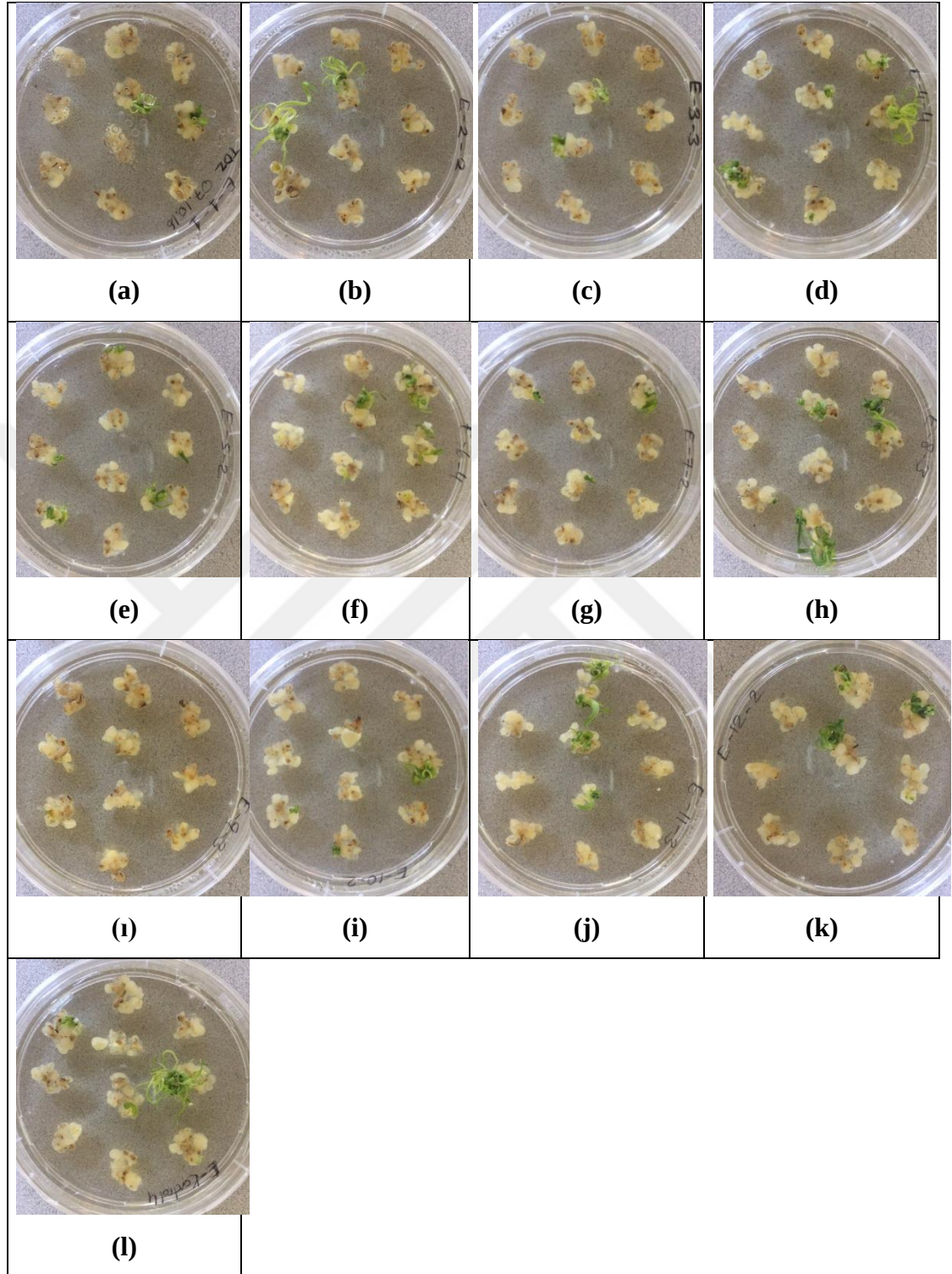
Kök ve sürgün yapısına sahip olacak şekilde bitkicik meydana getirme kabiliyetinde olan yeşil renkli oluşumlara genel anlamda cevap veren embriyogenik kallus denilmektedir. Bu yapılar, embriyogenik kallus oluşumunun ardından yeşil aksam oluşturma yolunda kendilerini gösteren yapılardır. Oluşan embriyogenik kallusların ardından, cevap verenler belirlenmiş ve bu oluşumların verilerine de kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oluşumu (KSCEKO) denilmiştir. Embriyogenik

kallus oluşumunun ardından 7-8 gün sonrasında cevap veren embriyogenik kallus oluşum oranları not edilmiştir.



Şekil 4.17. Kırık buğday genotipinde cevap veren embriyogenik kallus oluşumu

a) ZnO NP içermeyen MS ortamı **b)** 1x ZnO NP içeren MS ortamı **c)** 2x ZnO NP içeren MS ortamı **d)** 3x ZnO NP içeren MS ortamı **e)** CuO NP içermeyen MS ortamı **f)** 1x CuO NP içeren MS ortamı **g)** 2x CuO NP içeren MS ortamı **h)** 3x CuO NP içeren MS ortamı **ı)** γ -Fe₃O₄ NP içermeyen MS ortamı **i)** 1x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **j)** 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **k)** 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** Kontrol grubu



Şekil 4.18. ES-26 buğday genotipinde cevap veren embriyogenik kallus oluşumu

a) ZnO NP içermeyen MS ortamı **b)** 1x ZnO NP içeren MS ortamı **c)** 2x ZnO NP içeren MS ortamı **d)** 3x ZnO NP içeren MS ortamı **e)** CuO NP içermeyen MS ortamı **f)** 1x CuO NP içeren MS ortamı **g)** 2x CuO NP içeren MS ortamı **h)** 3x CuO NP içeren MS ortamı **i)** γ -Fe₃O₄ NP içermeyen MS ortamı **j)** 1x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **k)** 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** Kontrol grubu

Çizelge 4.3'te verilen analiz sonuçlarına göre KSCEKO oranına genotipin etkisi çok önemli ($p<0.01$) olurken, yine aynı şekilde gerçekleştirilen uygulamaların da KSCEKO oranına etkisi çok önemli ($p<0.01$) olmuştur. Bu uygulama oranına genotip x uygulama interaksiyonunun etkisi ise önemli olmamıştır.

ES-26 genotipinde ortalama KSCEKO oranı 0,46 adetle sınırlı kalmıştır. Bunun yanında en yüksek cevap veren embriyogenik kallus oluşum adedine sahip uygulama ise 1,58 adetle kontrol uygulaması olurken, en düşük KSCEKO oran adedine sahip uygulama ise 0.25 adetle γ -Fe₃O₄ NP içermeyen yöntem olmuştur (Çizelge 4.4).

Kırık genotipinde ise ortalama olarak KSCEKO oluşum oranı adet bazında 5.63 değerini ortaya koymuştur. Bununla birlikte bu genotipin en yüksek KSCEKO oranına sahip yöntemi ise 6.67 adetle kontrol olurken, buna çok yakın bir değer sergileyen 3x CuO NP içeren yöntem de 6.65 adet KSCEKO oranı sergilemiştir. En düşük KSCEKO oranına sahip kırık genotipi yöntemi 4.28 adetle 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren yöntem olmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.6'da verilen değerlere göre, gerçekleştirilen yöntemlerin tüm uygulamaları baz alınarak elde edilen ortalama değerler kapsamında en yüksek KSCEKO oranına sahip yöntem 3x CuO NP içeren uygulama olurken, en düşük KSCEKO oranına sahip yöntem ise 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren yöntem uygulaması olarak belirlenmiştir.

4.6. Kallus Sayısına Göre Somatik Embriyo Oluşumu (KSSEO) Oranı

Somatik embriyo, somatik hücrelerden elde edilen, totipotensi özelliğine sahip olup tüm bir bitkiyi oluşturma kabiliyeti taşıyan yapılardır. Tohumların besin ortamlarına ekiminden 45 gün sonra, 1 ng/l oranında TDZ içeren ortamlara aktarılan yapıların her biri somatik embriyo olarak ifade edilmektedir. Gerçekleştirilen uygulamalarda farklı sayıda somatik embriyo elde edilmiştir. Farklı sayıda somatik embriyo elde edilmesi gerçekleştirilen uygulamalarla ilişkilidir.

Bu kapsamda kırık genotipinde ortalama olarak 0.67 adet somatik embriyo elde edilirken, en yüksek KSSEO oranının 1.45 adet ile 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren yöntemin uygulamasında olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında en düşük KSSEO oranına ise 0.05 adetle 1x ZnO NP içeren yöntem uygulamasında rastlanmaktadır (Çizelge 4.5).

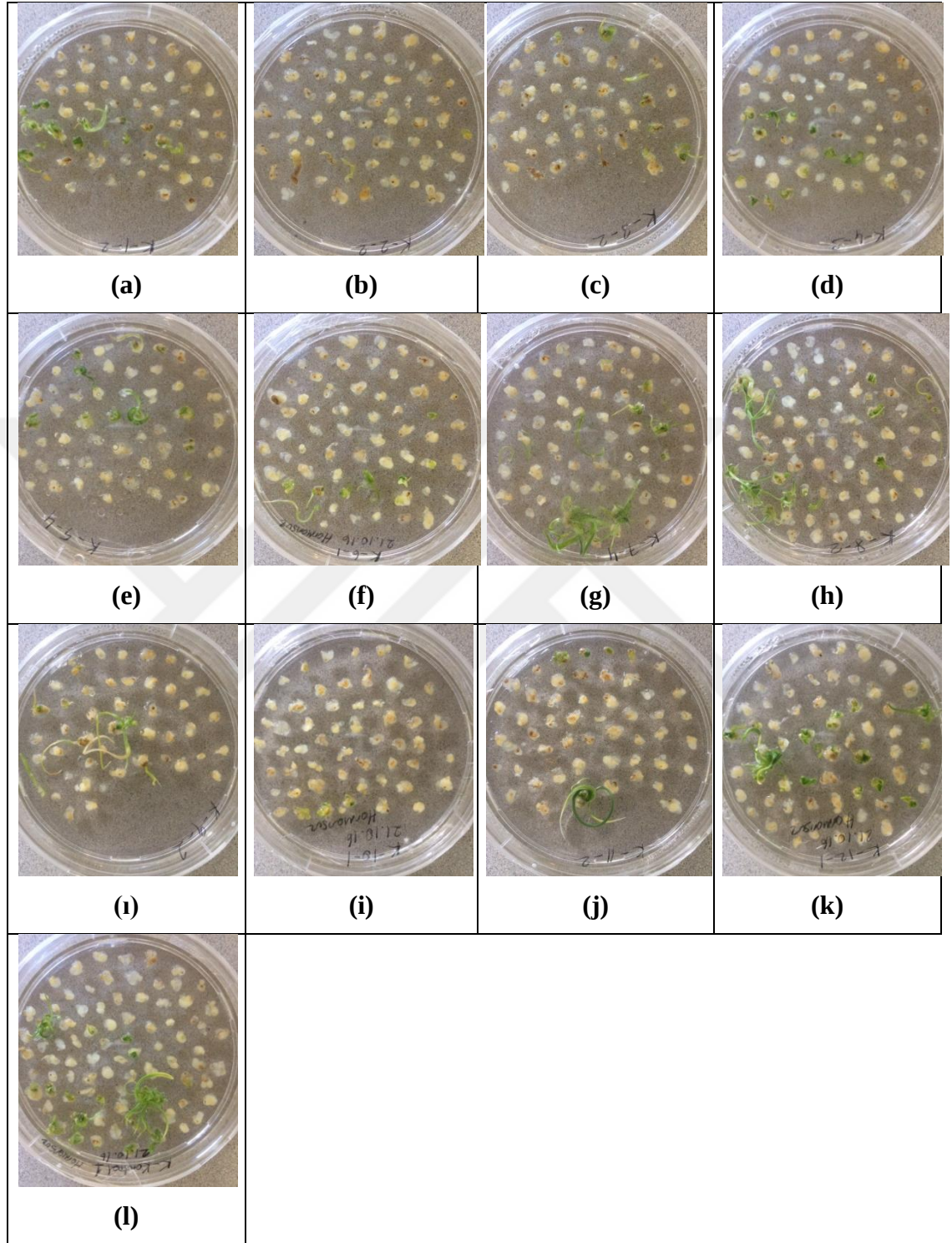
Çizelge 4.4'te de görüldüğü üzere, ES-26 genotipinin ortalama KSSEO oranı 0.46 olarak belirlenmiştir. En yüksek KSSEO oranının 1.18 adetle kontrol uygulamasında olduğu görülmektedir. En düşük KSSEO oranı ise 0.052 adetle 2x CuO NP içeren yöntem uygulamasında olduğu tespit edilmiştir.

Uygulanan yöntemlerin ortalamalarına bakıldığında en yüksek KSSEO oranına sahip yöntemin 1.15 adetle kontrol uygulamasına ait olduğu görülmektedir. Bunun yanında en düşük KSSEO oranının ise 0.18 adetle γ -Fe₃O₄ içermeyen uygulamaya ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Genel anlamda KSSEO oranı üzerine yapılan varyans analizinde çıkan sonuca göre genotipin bu orana olan etkisinin çok önemli ($p<0.01$), gerçekleştirilen yöntem uygulamalarının da çok önemli ($p<0.01$) olduğu anlaşılmıştır. Genotip x uygulama interaksyonu ise KSSEO oranı üzerine önemli ($p<0.05$) düzeyde etkili olmaktadır (Çizelge 4.3).

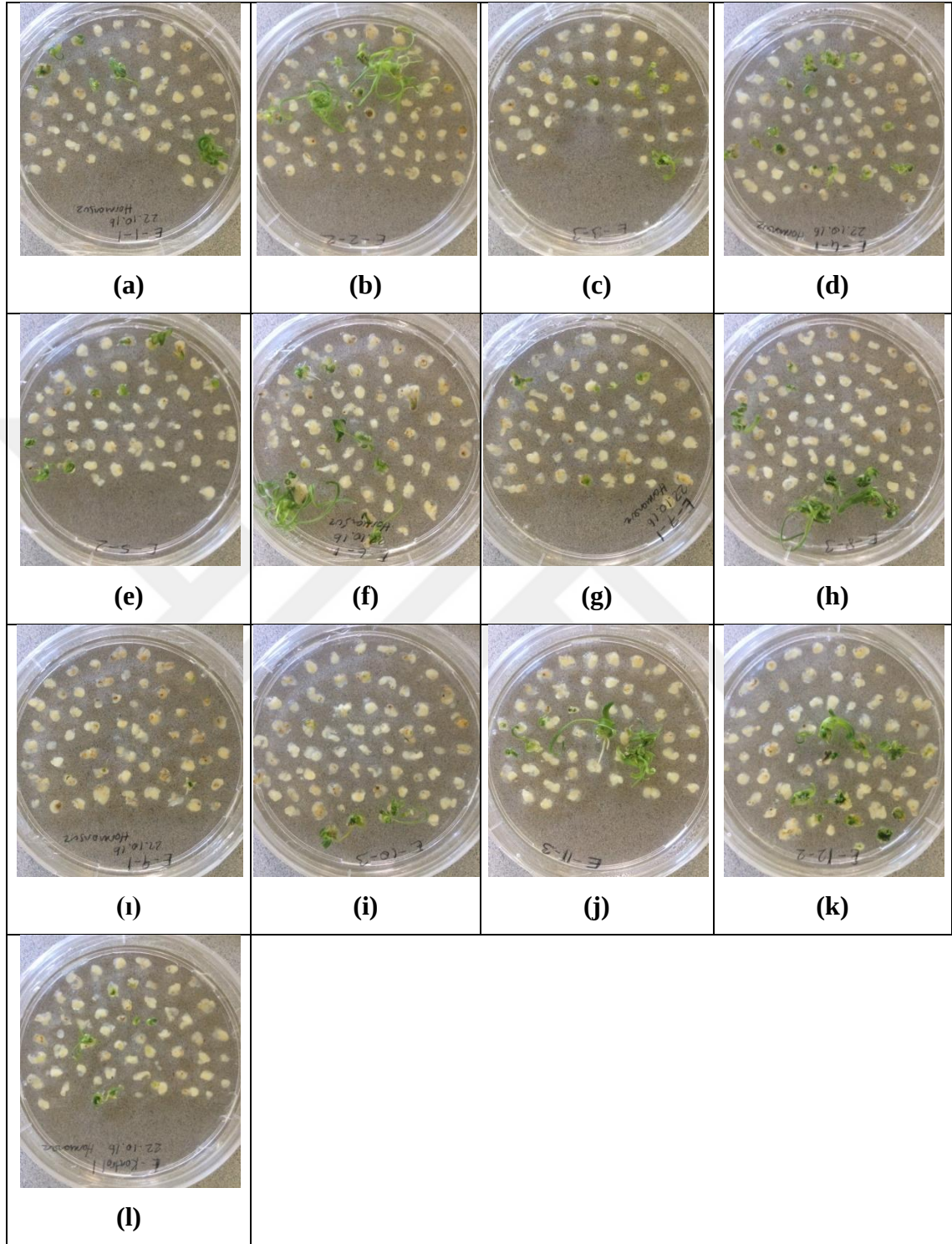
4.7. Kallus Sayısına Göre Cevap Veren Somatik Embriyo Oluşumu (KSCSEO) Oranı

TDZ içeren ortama aktarılan somatik embriyolar, sitokinin sağladığı uyarım dolayısıyla sürgün oluşturmaya teşvik edilirken, bu gelişim sürecine sürgün yani yeşil aksam oluşturarak yanıt verirse cevap veren somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyoların cevap veren niteliği embriyogenik kallus oluşum sürecinde dahi gözlenebilmektedir. Ancak tüm somatik embriyoların gözlenip, hangisinin cevap verdiğinin belirlenebilmesi adına somatik embriyoların eldesinden sonra değerlendirme yapmak en doğrusu olarak bilinmektedir.



Şekil 4.19. Kırık buğday genotipinde cevap veren somatik embriyo oluşumu

a) ZnO NP içermeyen MS ortamı **b)** 1x ZnO NP içeren MS ortamı **c)** 2x ZnO NP içeren MS ortamı **d)** 3x ZnO NP içeren MS ortamı **e)** CuO NP içermeyen MS ortamı **f)** 1x CuO NP içeren MS ortamı **g)** 2x CuO NP içeren MS ortamı **h)** 3x CuO NP içeren MS ortamı **i)** γ -Fe₃O₄ NP içermeyen MS ortamı **j)** 1x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **k)** 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** Kontrol grubu



Şekil 4.20. ES-26 buğday genotipinde cevap veren somatik embriyo oluşumu

a) ZnO NP içermeyen MS ortamı **b)** 1x ZnO NP içeren MS ortamı **c)** 2x ZnO NP içeren MS ortamı **d)** 3x ZnO NP içeren MS ortamı **e)** CuO NP içermeyen MS ortamı **f)** 1x CuO NP içeren MS ortamı **g)** 2x CuO NP içeren MS ortamı **h)** 3x CuO NP içeren MS ortamı **i)** γ -Fe₃O₄ NP içermeyen MS ortamı **j)** 1x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **k)** 2x γ -Fe₃O₄ NP içeren MS ortamı **l)** Kontrol grubu

Çizelge 4.3'te verildiği gibi, KSCSEO oranına genotipin etkisi çok önemli ($p<0.01$) olmuştur. Gerçekleştirilen uygulamalar ise bu oluşum oranına önemli ($p<0.05$) derecede etki etmiştir. Bu iki etkenin, yani genotip x uygulama interaksiyonunun bu oluşum oranına etkisi ise önemsiz olarak belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen uygulamaların elde edilen ortalama değerlerine bakıldığında, en yüksek KSCSEO oranına sahip uygulama 2.11 adetle kontrol yöntemi olmuştur. Bunun yanında en düşük ortalama sahip olan yöntemler ise 0.32 adetle 2x CuO NP içeren uygulama ile γ -Fe₃O₄ NP içermeyen uygulama olarak saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Kırık genotipinin KSCSEO oranı yönünden ortalama değerinin 0.74 adet olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında en yüksek KSCSEO oranına sahip yöntemin 1.69 adetle 3x γ -Fe₃O₄ NP yapısı içeren uygulama olduğu görülürken, en düşük KSCSEO oranına sahip uygulamanın 0.06 adetle 1x ZnO NP yapısı içeren yöntem olduğu açıkça görülmektedir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4'te de görüldüğü gibi, ES-26 genotipinin KSCSEO oranı ortalaması 1.55 adet olarak belirlenmiştir. En yüksek KSCSEO oranına sahip ES-26 genotipini taşıyan uygulamanın 2.94 adetle kontrol uygulaması olduğu saptanmıştır. En düşük KSCSEO oranının ise 0.21 adet cevap veren somatik embriyo oluşumuyla 2x CuO NP yapısı içeren yöntem uygulamasına ait olduğu görülmüştür.

4.8. Bitkicik Sayısı (BS)

Bitkicik sayısı, uygulanan bitki doku kültürü süreciyle birlikte elde edilen kök ve sürgün yapılarına sahip küçük bitki formlarının sayımıyla elde edilen veridir. Bitki doku kültürü ile geliştirilen bitkicikler, öncelikle magenda olarak adlandırılan aklimatizasyon kutularına aktarılmakta, ardından kademeli bir şekilde sera koşullarına veya tarlaya aktarılmaktadır. Ancak bu çalışmada elde edilen bitkicikler magenda kutularına aktarılmamış, çalışma bu noktada sonlandırılmıştır.

Elde edilen BS verilerine göre; genotipin BS oranına etkisi önemsiz olmuş, uygulamanın bu orana etkisi ise çok önemli ($p<0.01$) olarak ölçülmüştür. Genotip x uygulama interaksyonunun BS üzerine etkisi ise önemsiz olarak nitelendirilmiştir (Çizelge 4.3).

Gerçekleştirilen uygulamaların BS elde etmedeki başarılarını gösteren Çizelge 4.6 incelendiğinde, en yüksek BS elde edilen uygulamanın 10.25 adetle kontrol uygulaması olduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda en düşük BS elde edilen uygulama ise 0.62 adet bitkicik üretimiyle içeriğinde $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ bulundurmeyen yöntem olarak tespit edilmiştir. Tüm uygulamaların ortalaması ise 3.8 adet bitkicik elde edildiğini ortaya koymaktadır.

Bunların yanında BS elde etmede kırık genotipinin başarısının sonuçlarına yer verilen Çizelge 4.5'te de görüldüğü gibi, bu genotipin en başarılı uygulaması olarak 9.25 adet bitkicik elde eden kontrol yöntemi öne çıkmaktadır. Bitkicik üretiminde en başarısız sonuçları ortaya koyan kırık genotipi uygulaması ise 0.25 adet bitkicik üretimiyle 1x ZnO NP içeren yöntem olmuştur. Kırık genotipinin tüm uygulamaların ortalaması olarak toplamda 3.31 adet bitkicik üretmeyi başardığı gözlenmektedir.

BS açısından ES-26 genotipinin tüm uygulamalarda ortalama olarak toplamda 4.29 adet bitkicik üretimi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. ES-26 genotipinin bitkicik üretiminde en başarılı uygulamasının 11.25 adet bitkicik sayısı ile kontrol uygulaması olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında bitkicik üretiminde en başarısız ES-26 genotipi uygulaması ise 0.5 adet bitkicik üretimiyle 2x CuO NP içeren uygulama olmuştur (Çizelge 4.4).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

Son dönemlerin gözde bilim dalları arasında kendini gösteren nanoteknolojide kolay, maliyeti düşük, çevre dostu ve etkin nanopartikül oluşturabilme yeteneğinde olan nanopartikül sentez yöntemlerinin geliştirilmesi son derece önem arz etmektedir. Yeşil sentez, bu noktada nanoteknoloji alanında oldukça önemli bir ihtiyacın giderilmesinde kilit bir rol oynamaktadır. Her ne kadar üretilecek nanopartikül boyutları standarda indirgenemiyor olsa da, yöntemin sahip olduğu avantajlar dolayısıyla yeşil sentez nanopartikül üretiminde nanoteknoloji biliminde kendine oldukça önemli bir yer bulmaktadır. Bu yöntem kullanılarak üretilen ZnO, CuO ve γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin SEM, FT-IR ve XRD analizleri gerçekleştirilmiş ve bu analizler sonucunda sentezlenen nanopartikül yapılarının elde edilmek istenen nanopartikül yapıları olduğu tespit edilmiştir. Bu durum çevre dostu bir yöntem olan yeşil sentez yönteminin nanopartikül sentezinde başarısını göstermektedir. Elde edilen nanopartiküllerin FT-IR grafiklerinde, çinko oksit yapısında açık bir şekilde görülmesi gereken Zn=O bağının absorbansı görülebilmekte, aynı şekilde demir ile oksijen, bakır ile oksijen arasındaki bağların da absorbansı alınan FI-IR spektrumlarında net bir şekilde tespit edilebilmektedir. Aynı şekilde CuO ve γ -Fe₃O₄ NP yapıları için de yapılan FT-IR grafikleri bu nanopartikül yapılarının sentez işlemlerinin başarısı ile doğru ürünler elde edildiğini ortaya koyar niteliktedir. Bu elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle de örtüşmektedir (Kumar and Rani 2013; Zhang *et al.* 2013; Taufik and Saleh 2016).

Euphorbia bitkisinden elde edilen peroksidaz enzimi, sentez işleminde kullanılmadan önce verim ve aktivite tayinleri gerçekleştirilerek, kısmi olarak saflaştırılan enzimin işlevsel olup olmadığı test edilmiştir. Bu işlem sonuçlarına göre yeşil sentez işlemi için Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) bitkisinden kısmi olarak elde edilen peroksidaz enziminin aktivitesinin son derece yeterli olduğu saptanmıştır. Bu yeterlilik enzimin %32.4'lük bir verimle aktivite sergiliyor olmasından kaynaklanmaktadır. Yeterli oranda aktivite sergileyen peroksidaz enziminin bu çalışmada olduğu gibi nanopartikül

sentezinde kullanılması, belirli bir aralıkta boyutları değişen nanopartiküllerin elde edilmesi durumunun oluşturabileceği olumsuz durumlar haricinde son derece efektif bir yöntem olarak görülmüştür.

Yeşil sentez işleminden en efektif sonuçların elde edilmesi için, biyokimyasal bazı faktörlerin optimum değerlerinin saptanması için yapılan çalışmada, her üç nanopartikülün de farklı değerler sergilediği belirlenmiştir. Bu durum her bir nanopartikülün farklı elementer yapıya sahip bileşiklerden elde edilmesinden kaynaklıdır. Her üç nanopartikül sentezinde de aynı olan tek optimum değerin metal iyonu konsantrasyonu olduğu saptanmış, bu durumun da çok küçük boyutlu partikül yapılarının sentezlenmesi için daha yoğun konsantrasyonlara ihtiyaç duyulmamasıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Her bir nanopartikülün en efektif sentez işlemi için ihtiyaç duyduğu pH değeri farklılık arz etmektedir. Sahip oldukları yük değerlerinden, bağ yapabilme kapasitelerine kadar pek çok farklı özelliğe sahip olmaları dolayısıyla farklı pH değerlerinde optimum sentez işlemi gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunların yanında kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için belirli bir sıcaklık değerine ihtiyaç duyulmakta, bu değer her bileşik ya da element yapısı için farklılık arz etmektedir. Bu nedenle her nanopartikülün optimum sentezlenme sıcaklıklarının da aynı olmadığı açıkça görülmektedir. Kontakt süresi, yeşil sentezin ana materyali olan bitki ekstraktından elde edilen peroksidaz enzimi ile nanopartikülü sentezlenecek bulk bileşik yapısının temas halinde olduğu süreyi ifade etmektedir. Bu süre, bakır oksit ve çinko oksit yapılarında aynı olurken, demir içeren NP yapısının sentezinde daha az olmuştur. Bakır ve çinko iyon yapılarının benzer yüklere sahip olmaları ve akabinde aynı sürede nanopartikül yapılarının optimum sentez işlemlerinin gerçekleşmiş olması, bu işlemin nanopartikül formuna getirilecek elementin sahip olduğu yüklerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen nanopartiküllerin boyutları sabit bir standartta olmamakta, belirli bir aralıkta değişiklik göstermektedir. Belirli bir boyutta olması istenilen nanopartikül üretimi için bazı maddelerin sentez esnasında katkısına ihtiyaç duyulmaktadır (Zhang *et al.* 2015). Aynı zamanda bir nano yapının nano boyuttaki bir

materyal olarak adlandırılabilmesi adına 1-100 nm boyutları arasında olması gerekliliği dolayısıyla, SEM ile yüzey görüntüleri alınan nanopartikül yapılarının XRD ile boyutları da saptanmaktadır. Küresel formda olduğu saptanan CuO nanopartiküllerinin 5-120 nm arasında değişen boyutlara sahip olduğu tespit edilmiştir. ZnO nanopartiküllerinin pul gibi görünüm arz ettikleri ve boyutlarının 60 ile 80 nm aralığında olduğu belirlenmiştir. γ -Fe₃O₄ NP yapılarının sahip olduğu görünüm daha çok küresel olup boyut aralığının ise 30 ile 80 nm arasında değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, farklı boyutlara sahip nanopartikül üreten yeşil sentez yönteminin, nanoteknoloji biliminde kabul gören boyut aralığını büyük ölçüde yakalayabildiğini ortaya koymaktadır.

Sentezlenen NP yapılarının karakterizasyon sürecinin bir basamağı olarak XRD ile kristal yapılarının analizi de gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda CuO nanopartiküllerinin SEM görüntülerinde küresel formda görüntü vermesine karşın, kristal formunun yüzey merkezli kübik bir yapıya sahip olduğu ortaya koyulmuştur. γ -Fe₃O₄ nanopartiküllerinin küresel nitelik sergileyen kristalize formu da XRD sonuçlarında ortaya çıkmıştır. Bilindiği gibi nanopartiküllerin şekilleri de NP yapısının etkisinde oldukça etkin bir rol oynamaktadır (Service 2004).

Nanopartiküller sahip oldukları özellikler dolayısıyla günümüz dünyasında pek çok çalışmaya konu olmuştur. Normal kütleli formda olan bir madde nano boyuta indirgendiğinde, bu materyalin pek çok özelliğinde değişimler gözlenmektedir. Bulk formuna kıyasla nano yapılar optik, kimyasal reaktivite, elektriksel iletkenlik, manyetizma, fiziksel dayanıklılık gibi özellikler bakımından farklılıklar sergilemektedir (Joseph and Morrison 2006). Nano yapıların normal formlarına kıyasla farklı nitelikler sergiliyor oluşu, bu yapıların toksik etkilerinin araştırılması noktasında genel bir çıkış noktası olarak görülmektedir. Nitelikleri farklılaşan nano yapıdaki elementlerin normal element halinden farklı olarak nasıl bir yol izleyerek etki göstereceği bilim dünyasında merak konusu olmuştur. Bu noktada bu yapıların insanlar ve hayvanlara olan etkilerinin araştırılması kadar, dünyanın oksijen-karbondioksit döngüsünde hayati rol oynamakta

olan bitkiler üzerine olan etkilerinin de araştırılması literatürde oldukça geniş bir şekilde kendine yer bulmaktadır.

Nanotoksikolojinin bitkilerle olan ilişkisinin incelendiği pek çok çalışmada, farklı sentez yöntemleriyle üretilen nanopartikül yapılarının bitki gelişimini olumsuz yönde etkilediği, kök gelişimi, tohum üretimi gibi önemli doku organ kısımlarının gelişiminde bitkide büyük oranda negativiteye neden olduğu belirlenmiştir (Lin *et al.* 2007; Kumari *et al.* 2011; Mustaqh *et al.* 2011). Farklı bitki türleriyle gerçekleştirilen çalışmaların sonuçlarında farklı dozlarda uygulanan nanopartikül yapılarının morfolojik etkileri olduğu kadar biyokimyasal olarak da enzim aktivitelerinde azalmalara sebep olduğu görülmüştür (Nekrasova *et al.* 2011; Ghafariyan *et al.* 2013; Kouhi *et al.* 2015; Van *et al.* 2016). Bitkiler üzerine yapılan bu çalışmalar genel olarak nanopartikül yapılarının daha toksik yan ürün oluşturan sentez yöntemleriyle üretildiği ve bitkinin topraktaki gelişimine etkisinin araştırıldığı çalışmalardır. Ancak son dönemlerde bitki gelişiminin kallus oluşumuyla birlikte gözlenebildiği bitki doku kültürü tekniğini içeren çalışmaların azlığı dikkat çekmektedir (Namrata *et al.* 2009; Mandeh *et al.* 2012).

Bu tez kapsamında uygulanan deneysel çalışmada, bitki doku kültüründe bahsi geçen nanopartikül yapılarının buğday bitkisinin gelişimine olan etkisi araştırılmış ve elde edilen verilerin bilim dünyasına yeni bilgiler kazandıracak nitelikte olduğu görülmüştür. Uygulanan yöntemlerin tüm genotipler baz alınarak hesaplanan ortalamalarının sunduğu verilere bakıldığında, kallus oluşturma oranı bakımından kontrolden (%97.5) daha yüksek oranda kallus oluşumu sağlayabilen yöntemlerin 3x CuO NP içeren uygulamalar (%98.75) ile 3x ZnO içeren uygulamalar (%98.75) olduğu görülmektedir. Yine aynı şekilde embriyogenik kallus oluşturma oranı bakımından da kontrole kıyasla bazı uygulamaların ortalama olarak daha başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. 3x ZnO NP içeren uygulama ile 1x CuO içeren uygulamaların kontrolden daha başarılı bir şekilde embriyogenik kallus oluşturabildiği görülmektedir. Ancak bitkicik gelişimi bakımından sonuçlar aynı başarı oranıyla devam etmemektedir. Yöntem ortalamaları çizelgesi Çizelge 4.4'te de görüldüğü gibi 10.25 adet bitkicik üretimiyle kontrol grubu en başarılı uygulama olurken, diğer uygulamaların yaklaşık olarak kontrol grubu değerlerinin

yarısı ve aşağısında bir dağılım gösterdikleri görülmektedir. Elde edilen bu ortalama verileri doğal olarak genotip ayrımı yapmaksızın hesaplanmış ortalama değerleri ifade etmektedir. Kallus oluşum oranında kontrolden daha yüksek bir değere sahip olan uygulama ortalamasının, genotiplerin hangisiyle daha çok ilişkili olduğunun belirlenmesi adına genotiplere ait çizelgelerin incelenmesi gerekmektedir.

Bu tez kapsamında yapılan araştırmada elde edilen verilere göre, bitki doku kültüründe çinko, demir ve bakır minerallerinin normal formu yerine nanopartikül formunun kullanılması buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisinin farklı genotiplerinin gelişimlerine pozitif anlamda katkı sağlayamamıştır. Araştırmada kullanılan her iki genotipe ait uygulamaların kallus oluşum oranlarının kontrol uygulamasının altında kaldığı görülmektedir. Genellikle kontrol grubuna kıyasla; kontrole yakın veya daha az gelişim gösterdiği görülen bitkilerin, aynı şekilde bitkicik oluşturma oranı bakımından da kontrol grubunun çok altında gelişim gösterdiği açıkça görülmektedir. ES-26 genotipinde kontrolden (11.25 adet) sonra en yüksek bitkicik oluşturma oranı 6.75 adet bitkicik ile 3x ZnO NP içeren uygulamada olduğu görülmektedir. Bu durum ES-26 genotipinde NP içeren ortamlardan en iyi gelişim gösteren uygulamanın dahi kontrol grubunun yarısı kadarlık bir gelişim sergileyebildiğini net bir şekilde ortaya koymaktadır. Kırık genotipinde ise en yüksek bitkicik geliştirme oranı 9.25 ile kontrol grubuna aitken, bu değere en yakın bitkicik gelişimi sağlayan uygulamanın 9 adet bitkicik eldesi ile 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren uygulama olduğu görülmüştür. Her ne kadar 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren uygulama kontrole çok yakın değerinde bir sonuç vermiş olsa da, diğer uygulamalarla kontrol arasında büyük farklar göze çarpmaktadır. Bu durum akıllara nanopartikül yapılarının bitki tarafından faydanılabilirliği konusunda sorular getirmektedir. Nanopartikül yapılarının besi ortamına ilavesinin çözelti şeklinde gerçekleşmesi esnasında oluşabilecek çözülme hali ve bunun yanında besi ortamındaki formundan farklı nitelik taşıyor olması; bu yapıların bitki tarafından kullanımını, faydanılabilirliğini azaltmış olabileceği düşünülmektedir.

Bitki gelişiminde özellikle biyokimyasal süreçlerde, enzimlerin ihtiyaç duyduğu kofaktör olarak aktif bir şekilde kullanılmakta olan mineraller arasında çinko, bakır ve

demir de bulunmaktadır. Bitki gelişimi açısından önemli olan bu yapıların nanopartikül formlarının istenilen etkiyi vermemiş olması, nano yapıların boyutları dolayısıyla kazandıkları farklı özelliklerden de kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Farklı sentez yöntemleriyle elde edilen nano yapıların kullanımı ile gerçekleştirilen literatürdeki diğer çalışmalarda da bu negatif etki açık bir şekilde fark edilmektedir. Gerçekleştirilmiş olan bu çalışmaların varlığına rağmen, bitki doku kültüründe gelişmekte olan bir bitkinin nanopartikül boyutundaki çinko, bakır ve demir minerallerinden daha etkin bir şekilde faydalanıp faydalanmayacağı, bu yapıların normal işlevlerine ek olarak bir olumsuz etkiye sebep olup olmayacağı literatürde bir eksiklik sergilemekteydi. Bu sebeple gerçekleştirilen bu tez araştırmasında, bu yapıların buğday genotiplerinde efektif bir biçimde kullanılmaması dolayısıyla gelişime katkı sağlayamadığı açıkça görülmektedir. Toksik olmayan ve yan ürün bırakmayan yeşil sentez yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin bitki gelişimine olan etkisinin daha çok nanopartiküllerin kullanım şekli dolayısıyla negatif bir görünüm arz ettiği düşünülmektedir.

Tez araştırma bulgularında görüldüğü gibi gelişim basamaklarında elde edilen verilere bakılarak, ES-26 genotipi ile gerçekleştirilen uygulamaların tamamı kontrol grubundan daha alt seviye bir değerde gelişim göstermiştir. Bu durumda kullanılan nanopartiküllerin, hem negatif kontrol olarak kullanılan NP içermeyen uygulamalarda hem normal MS ortamında olan miktarı içeren 1x NP içeren uygulamalarda, hem de 2x ve 3x oranında NP içeren ortamlarda gelişimi beklenen buğday bitkisine beklenenden daha düşük bir gelişim göstermesi noktasında etkin kullanılmadığı son derece aşikârdır.

Kırık genotipi ile yapılan deneysel çalışmalarda özellikle 3x γ -Fe₃O₄ NP içeren uygulamanın tüm doku kültürü gelişim basamaklarında kontrole yakın değerlerde gelişim gösterdiği görülmüştür. 3x CuO NP içeren uygulamalarının da BS oranına kadar genel anlamda kontrole yakın değerlerde sonuçlar verdiğini söylemek mümkündür. Ancak bitki sayısı anlamında 3x CuO NP içeren uygulamanın (4.75 adet) kontrol grubu (9.25 adet) değerinin yarısı kadar sayıda bitki elde edebildiği görülmektedir. Elde edilen veriler ışığında kırık genotipinde, her ne kadar kontrole yakın değerler üretebilen

uygulamaların varlığı göze çarpıyor olsa da, kontrolden daha yukarıda değerler sergileyebilecek, yani nanopartikülün efektif bir biçimde kullanılarak rejenerasyonun teşvik edildiği bir uygulamanın varlığından söz edebilmek mümkün değildir. Bu nedenle bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda uygulanan NP yapılarından, ilgili konsantrasyonlar, kullanım şekli, besi ortamına ilave edilen bileşik formunun farklılığı gibi nedenler dolayısıyla gelişimi teşvik etme konusunda etkin bir biçimde faydalanılamadığı düşünülmektedir.

Bitki doku kültürünün uygulanma amacı, genel anlamda bitkilerin sahip olduğu rejenerasyon kabiliyetini artırmak, tek bir bitkiden bütün bir bitki oluşturma kapasitesine sahip birden fazla bitki üretebilmektir. Bitki gelişimini destekleyip rejenerasyon oranını artırabileceği öngörülerek test edilen nanopartiküllerin, normalde buğday doku kültüründe rutin olarak gerçekleştirilene kıyasla etkili bir rejenerasyon oranı sergileyemediği açıktır. Bu durum kullanılan nanopartiküllerin bitki doku kültürü besi ortamı içerisindeki bileşiklerden farklı nitelik taşıyan nanopartikül formlarıyla ilişkili olabileceği gibi, bu yapıların çözelti içerisinde çözünme oranlarındaki farklılıklar, bitkilerin bu yapıları etkin bir şekilde kullanamamış olması gibi sebeplerden kaynaklanabileceği ihtimalleri üzerinde durulmaktadır.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Düşük maliyetli, kolay ve toksisitesi az olan bir yöntem olan yeşil sentez yönteminin üretilecek nanopartiküllerin etkin bir şekilde üretim amaçlı kullanımı bu çalışma ile oldukça mümkün görünmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda sentezlenen nanopartiküllerin nanoteknoloji biliminde kabul gören boyut aralığında olduğu ve bu sayede üretilebilen NP'lerin bilimsel çalışmalarda kullanılabileceği bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Farklı minerallerin farklı doz aralığında, farklı buğday genotipleri üzerinde test edildiği bu çalışma kapsamında elde edilen veriler, bitki rejenerasyonunu artırma amacıyla bu yapıların bahsi geçen oranlarda, verilen kullanım şekli ile kullanımının beklenen

sonuçları vermediği görülmektedir. Bu durumu gidermek, bitki gelişimini artırmak ve totipotensi özelliğine sahip hücrelerin sayısını artırmak için; bu nano yapıların bitki doku kültüründe belirtilen bileşik formlarında, daha farklı miktarlarda test edilmesi gerekmektedir. Bunun yanında bitkilerin bu yapıları daha etkin bir biçimde kullanıp, yararlanabilmeleri için standart MS ortamında gelişim gösteren olgun embriyolar üzerinde bu nanopartiküllerin etkisinin test edilmesi de bu nanopartiküllerin gelişimi ne derece desteklediğini daha net ortaya koyan bir çalışma olacaktır.

Boyutları dolayısıyla farklı özellikler kazanabilen çinko, demir, bakır gibi nano yapıların bu çalışmada olduğu gibi sahip oldukları faydalı nitelikleri yanında etkin biçimde metabolizmaya dahil edilemediği, faydalanılabilirliğinin düşük olabileceği durumlarının varlığı da mevcuttur. Bilim dünyasında bir boşluğu dolduran bu çalışma ile tez konusu olan nanopartiküllerin belirtilen dozlarda, gelişim açısından yeterli oranda kullanılmadığı, bu nedenle gelişimde bir eksiklik sergilendiği görülmektedir. Bu nanopartiküllerin hangi dozlarda bitki gelişimini artırabileceği, hangi dozlarda gelişimin tamamen durmasına neden olabileceği ise bir başka araştırmanın konusu olmaya adaydır.

Yapılan bu tez çalışmasının ardından, NP'lerin bitki gelişimini teşvik edecek dozlarının belirlenmesi amacıyla çalışmaların yapılması önerilmektedir. Ayrıca farklı bitki gelişiminde farklı özelliklere sahip olan nanopartiküllerin kullanımı sağlanarak etkilerin kıyaslanması sağlanacaktır. Bu sayede normale kıyasla daha verimli bitkilerin elde edilmesinde hangi nanopartiküllerin hangi dozda kullanılması gerektiği belirlenebilecek, özellikle istenen özelliğin gelişimini artırıcı nitelikteki NP'lerin saptanması gerçekleştirilecektir. Aynı zamanda yüksek düzeyde antibakteriyel etkiye sahip oldukları bilinen nanopartiküller sayesinde bitkileri zararlılara karşı korumak için pestisid, herbisid gibi yüksek toksisiteye sahip oldukları bilinen kimyasalların kullanımına gerek kalmadan bitkilerin korunmaları da sağlanacaktır. Bütün elde edilen veriler ışığında nanoteknoloji sayesinde gelecekte her bitkiye spesifik gübre üretimleri yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

- Atha DH, Wang H, Petersen EJ, Cleveland D, Holbrook RD, Jaruga P, Dizdaroglu M, Xing B, Nelson BC. Environ Sci Technol. 2012;46(3):1819-1827. DOI: 10.1021/es202660k.
- Aydın, M., 2010. Bazı Ekmeklik Ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinin Olgun Embriyo Kültürüne Tepkilerinin Belirlenmesi., Atatürk Üniversitesi,, Fen Bilimleri Enstitüsü, 109. pp
- Aydın, M., Tosun, M. and Haliloglu, K., 2011. Plant regeneration in wheat mature embryo culture. African Journal of Biotechnology, 10 (70), 15749-15755.
- Bar H., Bhui D.Kr., G. P. Sahoo., Sarkar P., De S. P., Misra A., 2009, Green synthesis of silver nanoparticles using latexes of *Jatropha curcas*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 339, 134-139.
- Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicol Lett. 2006;163:109–20.
- Chichiriccò, G., Poma, A., 2015. Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants. Nanomaterials 5, 851–873;. doi:http://dx.doi.org/10.3390/nano5020851.
- Christou, P., McCabe, D. and Swain, W., 1998. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. Plant Physiology, 87: 671-674.
- Cicek S., Gungor A.A., Adiguzel A., Nadaroglu H., Biochemical Evaluation and Green Synthesis of Nano Silver Using Peroxidase From Euphorbia (*Euphorbia amygdaloides*) and Its Antimicrobial Activity, Journal of Chemistry, 2015 7 pages Volume 2015 (2015), Article ID 486948, 7 pages http://dx.doi.org/10.1155/2015/486948
- Cifuentes, Z., Custardoy, L., de la Fuente, J.M., Marquina, C., Ibarra, M.R., Rubiales, D., Pérez-de-Luque, A., 2010. Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants. J. Nanobiotechnol. 8, 26.
- Delporte, F., O. Mostade and J. M. Jacquemin. 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 67: 73-80.
- Demir E, Kaya N, Kaya B. Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of *Allium cepa* by comet assay. Turkish Journal of Biology 2014;38: 31-39.
- Demir Y., AlaylıGüngör A., Demir N., “Purification of Peroxidase from Latex of Euphorbia (*Euphorbia Amygdaloides*) and Investigation of Kinetic Properties”, Asian Journal of Chemistry, 20 (1) 477-482 - 2008.
- Dubey S. P., Lahtinen M., Sillanpaa M., 2010, Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles, Process Biochemistry 45, 1065-1071.
- Demirbilek E.M, 2015. Tarimda Ve Gıda Nanoteknoloji, Journal of Food and Feed Science - Technology 15: 46-53.
- Eggenberger, K., Birtalan, E., Schröder, T., Bräse, S., Nick, P., 2009. Passage of Trojanpeptoids into plant cells. Chembiochem 10, 2504–2512.

- Ghafariyan, M.H., Malakouti, M.J., Dadpour, M.R., Stroeve, P., Mahmoudi, M., 2013. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10645-10652.
- Ghodake G, Seo YD, Lee DS. *J Hazard Mat.* 2011;186: 952-955. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.11.018.
- Gojon, A., Nacry, P., Davidian, J.C., 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 328–338.
- Gubbins EJ, Batty LC, Lead JR (2011) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution*. 159: 1551–1559.
- Hall J.B., Dobrovolskaia M.A., Patri A.K., McNeil S.E., Characterization of Nanoparticles for Therapeutics Nanomedicine, 2007;2(6):789-803.
- Hossein Pour A., 2016. Kimyasal Mutagen Uygulamalarının Buğdayda Bazı *İn Vitro* Karakterler Ve Kuraklığa Tolerans Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Abd.
- Iannone MF., Groppa MD., Sousa ME., Raap MBF., Benavides MP., Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany*, 131 (2016) 77–88.
- Joseph, T. and Morrison, M., 2006. Nanotechnology in agriculture and food. Nanoforum report, Institute of Nanotechnology.
- Kavaz D., 2011. Nanopartiküller. *Nanobülten*, Mayıs, 12-19.
- Kim Y-R, Park J-I, Lee EJ, *et al.* Toxicity of 100 nm zinc oxide nanoparticles: a report of 90-day repeated oral administration in Sprague Dawley rats. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9(Suppl 2):109-126. doi:10.2147/IJN.S57928.
- Kouhi, S.M., Lahouti, M., Ganjeali, A. *et al.* *Water Air Soil Pollut* (2015) 226: 364. doi:10.1007/s11270-015-2628-7.
- Kumar H, Rani R, 2013. Structural and Optical Characterization of ZnO Nanoparticles Synthesized by Microemulsion Route, *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 14: 26-36.
- Kumari M, Khan SS, Pakrashi S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of Hazardous Materials* 2011;190:613–621.
- Kün, E. 1988. Serin İklim Tahılları. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 1032. 322 s., Ankara.
- Lee CW, Mahendra S, Zodrow K, Li D, Tsai YC, Braam J, Alvarez PJJ. *Environ Toxicol Chem.* 2010;29(3):669-675. DOI: 10.1002/etc.58.
- Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 2007;150:243-250.
- Lin D, Xing B. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42 (15), pp 5580–5585.
- Liu, Y., Tong, Z. and Prud'homme, R. K., 2008. Stabilized polymeric nanoparticles for controlled and efficient release of bifenthrin. *Pest Management. Science*, 64: 808-812.
- Liu, Y., Yan, L., Heiden, P. and Laks, P., 2001. Use of nanoparticles for controlled release of biocides in solid wood. *Journal of Applied Polymer Science*, 79: 458-465.

- López-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J.A., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7315–7320.
- Mandeh, M., Omid, M. & Rahaie, M. *Biol Trace Elem Res* (2012) 150: 376. doi:10.1007/s12011-012-9480-z
- Mbonyirivuze, A. , Zongo, S. , Diallo, A. , Bertrand, S. , Minani, E. , Yadav, L. L. , Mwakikunga, B. , Dhlamini, S. M. , & Maaza, M. (2015). Titanium Dioxide Nanoparticles Biosynthesis for Dye Sensitized Solar Cells application: Review. *Physics and Materials Chemistry*, 3(1), 12-17.
- Miwa, K., Tanaka, M., Kamiya, T., Fujiwara, T., 2010. Molecular mechanisms of boron transport in plants: involvement of Arabidopsis NIP5;1 and NIP6;1. *Adv. Exp. Med. Biol.* 679, 83–96.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Mushtaq YK. *J Environ Sci Health A, Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2011;46(14):1732 1735. DOI: 10.1080/10934529.2011.633403.
- Nadaroglu H, Gungor A.A, Ince S, Babagil A. Green synthesis and characterization of platinum nanoparticles using quail egg yolk” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 172, 43-47, 2015
- Nadaroglu, H., Ince, S., Alayli G. A., Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using with Quail Egg Yolk and Investigation of Some Using Area, *Green Processing & Synthesis (GPS)* DOI 10.1515/gps-2016-0091, in press, 2016.
- Nadaroglu, H., Onem, H., Gugor, A.A., Green Synthesis of Cerium (III) oxide (Ce₂O₃) Nanoparticles and Determination of It's Antioxidant Activity. *IET Nanobiotechnology* IET Nanobiotechnology, DOI: 10.1049/iet-nbt.2016.0138 , in press, 2016.
- Namrata M, Avinash I, Aniket G, Mahendra R (2009) Synthesis of silver nanoparticles using callus extract of *Carica papaya*—a first report. *J Plant Biochem Biotechnol* 18:1
- Narayanan K. B., Sakthivel N., 2010, Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Advances in Colloid and Interface Science* 156, 1–13.
- Nekrasova GF, Ushakova OS, Ermakov AE, Uimin MA, Byzov IV. *Russ J Ecol.* 2011;42(6):458-463. DOI: 10.1134/S1067413611060117.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. *Science.* 2006;311:622-627. DOI: 10.1126/science.1114397.
- Philip D., Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*, *Physica E* 42 (2010) 1417-1424.
- Prasad, P. Sudhakar, Y. Sreenivasulu, P. Latha, V. Munaswamy, K.Raja Reddy, T. S. Sreeprasad, P. R. Sajanlal & T. Pradeep (2012): Effect Of Nanoscale Zinc Oxide particles On The Germination, Growth And Yield Of Peanut, *Journal of Plant Nutrition*, 35:6,905-927.
- Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33: 88-109.
- Purnhauser, L., P. Medgyesy, M. Czako, P. J. Dix and L. Marton. 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana glauca* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell.*, 6: 1-4.

- Raveendran P., Fu J., and Wallen S. L., 2003, Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (46), pp 13940–1394.
- Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J. Agric. Food Chem.*, 2011;59(8):3485–3498.
- Sanvicens, N and Marco, MP. Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.*, 2008: 26: 425-433
- Sarac N, Toplan N, The Light Solid Material In The World: Aerogels. Metal Dunyasi, <http://www.metaldunyasi.com.tr/tr/guncel/58/dunyanin-en-hafif-kati-malzemesi-aerogeller.html> (25.10.2016).
- Scott, R.S. and Chen, H., 2002. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. Overview of USDA/CSREES Nanotechnology Programs. The US Department of Agriculture. [http://www.csrees.usda.gov/nea/technology/pdfs/Overview of USDA.pdf](http://www.csrees.usda.gov/nea/technology/pdfs/Overview%20of%20USDA.pdf) (Accessed 01.08.2014)
- Sehirali, S. ve M. Özgen, 1998. Bitki ıslahı, Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları:1059, Ders kitabı: 310, Ankara Üniv. Basımevi, Ankara 261 s.
- Service RF, 2004. Nanotechnology Grows Up, *Science*, 304: 5678; 1732-1734.
- Shah V, Belozeroval I. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollut.* 2009;197:143-148.
- Sheykhabglou R, Sedghi M, Tajbakhsh Shishvan M, Seyed Sharifi R. Effect of nano. iron particles on agronomic traits of soybean. *Not Sci Biol.* 2010;2(2):112–113.
- Shi J, Abid AD, Kennedy IM, Hristova KR, Silk WK (2011) To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution? *Environ Pollut* 159:1277–1282
- Taufik A, Saleh R, 2016. Synthesis of iron(II,III) oxide/zinc oxide/copper(II) oxide (Fe₃O₄/ZnO/CuO) nanocomposites and their photocatalytic property for organic dye removal, *Journal of Colloid and Interface Science* 491 (2017) 27–36.
- Torney F, Trewyn BG, Lin V S-Y, Wang K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature Nanotechnology.* 2007;2:295–300.
- Wen, L. X., Li, Z. Z., Zou, H. K., Liu A. Q. and Chen J. F., 2005. Controlled release of avermectin from porous hollow silica nanoparticles. *Pest Management. Science*, 61: 583-590.
- Van L.N., Rui Y., Cao W., Shang J., Liu S., Quang TN., Liu L., *Journal of Plant Interactions.* 2016; 11(1):108-116.
- Zhang X., Niu Y., Meng X., Li Y., Zhao J., Structural evolution and characteristics of the phase transformations between α -Fe₂O₃, Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ nanoparticles under reducing and oxidizing atmosphere, The Royal Society of Chemistry, 2013.
- Zhang Z, He X, Zhang H, Ma Y, Zhang P, Ding Y, Zhao Y. Uptake and distribution of ceria nanoparticles in cucumber plants. *Metallomics*, 2011; 3:816-822.
- Zhang, W., Zhang, L. & Sun, Y. *Front. Chem. Sci. Eng.* (2015) 9: 494. doi:10.1007/s11705-015-1527-1
- Zhu, H., Han, J., Xiao, J.Q., Jin, Y., 2008. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J. Environ. Monit.* 10, 713-717.

ÖZGEÇMİŞ

Özge Balpınar Nalcı 1991 yılında Adana'nın Ceyhan ilçesinde dünyaya geldi. İlk ve orta öğrenimini başarıyla tamamladıktan sonra, lise eğitimini İbni Sina Anadolu Lisesi'nde 2009 yılında tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimine başladı. Moleküler Biyoloji ve Genetik eğitimi kapsamında gerçekleştirdiği staj çalışması ise Çukurova Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında yapılmıştır. Üçüncülük derecesiyle tamamladığı lisans eğitiminin mezuniyet tarihi 2013 yılıdır. Eğitim öğretim hayatı boyunca çeşitli poster ve bildiri çalışmalarında görev almıştır.