

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANO BOYUTLU SIFIR DEĞERLİKLİ DEMİRİN,
ŞEKER OTU (STEVIA REBAUDIANA BERT.),
ALEV AĞACI (PHOTINIA X FRASERI DRESS) VE TÜTÜN
(NICOTIANA TABACUM L.) BİTKİLERİNİN
MİKROÇOĞALTIMINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

GÜLCAN AKKÖK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANO BOYUTLU SIFIR DEĞERLİKLİ DEMİRİN,
ŞEKER OTU (*STEVIA REBAUDIANA* BERT.),
ALEV AĞACI (*PHOTINIA X FRASERI* DRESS)
VE TÜTÜN (*NICOTIANA TABACUM* L.)
BİTKİLERİNİN MİKROÇOĞALTIMINA
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

GÜLCAN AKKÖK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**DETERMINATION OF THE EFFECT OF
NANO-SIZE ZERO-VALUE IRON ON THE
MICROPROPAGATION OF STEVIA
(*STEVIA REBAUDIANA* BERT.), FRASER'S
PHOTINIA (*PHOTINIA X FRASERI* DRESS)
AND TOBACCO (*NICOTIANA TABACUM* L.)**

GÜLCAN AKKÖK
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE

2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02/02/2023 tarih ve 2023/09 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Gülcan AKKÖK'ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Doç. Dr. Özlem AKKAYA

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Nanopartiküller (NP'ler); tohum çimlenmesini iyileştirmek, bitki büyümesini ve verimini artırmak, bitki genetik modifikasyonunu sağlamak ve bitki korumasını sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıfır değerlikli demir nanopartikülü (nZVI), dünya çapında nadir olarak kullanılan inorganik temelli (metal ve metal oksitler) NP'lerden biridir. nZVI'nın fitotoksitesisi hakkında sadece sınırlı sayıda araştırma yürütüldüğünden ve bunların çoğu nispeten yüksek nZVI konsantrasyon veya düşük konsantrasyonlarda uygulandığı için nZVI bitkilere maruziyetinin gerçek etkileri hala belirsizdir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda (12.5-25-50 mg/L) nZVI; alev ağacı (*Photinia fraseri* X Dress.) bitkisinin gövde uçlarına ve nodal eksplantlarına, şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bert.) bitkisinin nodal eksplantlarına, tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisinin yaprak eksplantlarına *in vitro* koşullarda uygulanarak söz konusu NP'nin ilgili bitkilerinin mikroçoğaltımına olan etkileri belirlenmiştir. 30, 60 ve 90 gün kültürleme sonrasında denenen nZVI'nın tütün ve şeker otu bitkisinin gelişimine olumlu bir etkisi olduğu, alev ağacı bitkisine ise olumsuz etki ettiği anlaşılmıştır. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan NP'in farklı bitkilerin *in vitro* mikroçoğaltımına olan etkisinin türe özgü olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, nZVI, *Nicotiana tabacum* L., *Photinia fraseri* X Dress, *Stevia rebaudiana* Bert., *in vitro*.

SUMMARY

Nanoparticles (NPs); It is widely used to improve seed germination, increase plant growth and yield, provide plant genetic modification and provide plant protection. Although iron is generally quite abundant in most agricultural soils, approximately 30% of the world's soils are known to limit iron for plant growth. Therefore, it is essential to develop efficient and environmentally friendly iron fertilizers in agricultural applications. Among the iron fertilizers, nanosized zerovalent iron (nZVI) has recently become popular with its high reducing properties and high reactivity. The actual effects of nZVI exposure to plants are still unclear, as only limited research has been conducted on the phytotoxicity of nZVI. Therefore, different concentrations of nZVI (12.5; 25;50 mg/L) are added to the plant tissue culture medium to elicit its effect on the *in vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana*, *Photinia fraseri* X Dress and *Nicotiana tabacum* L. The shoot tips are used for fraser photinia and stevia, while the leaves are used for tobacco *in vitro* germinated seedlings. After 30, 60, 90 days of *in vitro* culture in the plant growth culture chamber, the percentage of proliferation/regeneration, the average number of microshoots per explant, and the average microshoot length were calculated. It was observed that the tested nZVI had a positive effect on the development of tobacco and stevia plant, while it had a negative effect on the photinia. As a result, it was concluded that the effect of NP used in the study on *in vitro* proliferation of different plants is species specific.

Keywords: Nanoparticle, nZVI, *Nicotiana tabacum* L., *Photinia fraseri* X Dress, *Stevia rebaudiana* Bert., *in vitro*.

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, motivasyonu ile beni destekleyen ve zor zamanlarımda yanımda olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye,

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini eksik etmeyen hocam sayın Mine GÜL ŞEKER'e

Bu tez çalışması için gerekli demir materyali sağlayan hocam sayın Prof Dr. Anatoli DİMOGLO'ya,

Lisans eğitimimden bu yana her zaman yanımda olan; motivasyonu ile beni destekleyen, bana olan inancı, güveni ve sevgisini her daim hissettiğim çok değerli dostum Serap SAKARYA'ya,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını ve desteklerini her an hissettiğim, dostlukları ile her zaman yanımda bulunan ve sevgiyle beni saran çok kıymetli arkadaşlarım Sinem KURT KASIM, Gül Çiçek KILIÇ, Nil TÜRKÖLMEZ, Halime Eda SEFER, Neslihan EL, Tuğçe ARIT ve İlkay İLHAN'a,

Son olarak maddi ve manevi hiçbir destekten kaçınmayan, umutsuz olduğum her an bana sapa sağlam durmayı öğreten ve sonsuz desteğiyle yanımda olan canım kardeşlerim Nazlı AKKÖK, Murat AKKÖK ve Gülsüm MERT'e, bu hayattaki en büyük şansım olan canım annem Fatma AKKÖK ve babam Hüseyin AKKÖK'e bana olan güvenleri ve tüm fedakarlıkları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	4
2. LİTERATÜR ÖZETİ	6
2.1. Tütün Bitkisi	6
2.2. Şeker Otu Bitkisi	7
2.3. Alev Ağacı Bitkisi	9
2.4. Nanopartiküller	10
2.4.1. Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikülü (nZVI) ve Yapılan Çalışmalar	12
2.5. Bitki Doku Kültürü	13
2.5.1. Bitki Doku Kültürü Tarihçesi	13
2.5.2. Bitki Doku Kültürü ve Yöntemleri	14
2.5.2.1. Organogenez	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan Bitki Materyalleri	17
3.1.1.1. Alev Ağacı Bitkisinin Temini	17
3.1.1.2. Şeker Otu Bitkisinin Temini	17
3.1.1.3. Tütün Bitkisinin Temini	17
3.1.2. Kullanılan Nanopartikül Materyali	17
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	18
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	19

3.2. Yöntem	19
3.2.1. Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikül Stok Çözeltisi Hazırlama	19
3.2.2. Bitkilerin Doku Kültürü için Hazırlanması	20
3.2.2.1. Alev Ağacının Doku Kültürü	20
3.2.2.1.1. nZVI'nın Alev Ağacının <i>in vitro</i> Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi	21
3.2.2.2. Şeker Otu Bitkisinin Doku Kültürü	23
3.2.2.2.1. Bitki Eksplantların Sterilizasyon Optimasyonu	23
3.2.2.2.2. BAP Konsantrasyon Optimasyonu	24
3.2.2.2.3. nZVI'nın Şeker Otu Bitkisinin <i>in vitro</i> Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi	24
3.2.2.3. Tütün Bitkisinin Doku Kültürü	25
3.2.2.3.1. Tütün Bitkisinin Çimlendirilmesi	25
3.2.2.3.2. nZVI'nın Tütün Bitkisinin <i>in vitro</i> Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi	26
3.2.3. Ölçüm ve Analizler	27
4. SONUÇLAR	29
4.1. Bitki Materyallerinin nZVI Denemeleri için Hazırlanması	29
4.1.1. Şeker Otu Bitkisi için BAP konsantrasyon Optimasyonu	29
4.1.2. Tütün Bitkisinin Çimlendirilmesi	31
4.2. nZVI'nın İlgili Bitkilerin <i>in vitro</i> Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi	32
4.2.1. nZVI'nın Alev Ağacı Bitkisinin <i>in vitro</i> Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi	32
4.2.2. nZVI'nın Tütün Bitkisinin <i>in vitro</i> Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi	41
4.2.3. nZVI'nın Şeker Otu Bitkisinin <i>in vitro</i> Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi	50
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
dH ₂ O	: Distile su
G	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
pH	: Power of hydrogen
BAP	: 6-Benzil amino purin
G.O.K.	: Gövde oluşturma kapasitesi
HCl	: Hidrojen klorür
K.O.K.	: Kök oluşturma kapasitesi
MS	: Murashige Skoog
NAA	: Naftalen asetik asit
NaCl	: Sodyum klorür
NaOCI	: Sodyum hipoklorit
NM	: Nanomateryal
NP	: Nanopartikül
nZVI	: Sıfır değerlikli nano demir
TMV	: Tütün mozaik virüsü
QL	: Quoirin and Lepoivre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Tütün bitkisinin doğada görünümü.	6
2.2: Stevia (şeker otu) bitkisinin genel görünümü (orijinal).	8
2.3: Photinia (Alev ağacı) süs bitkisinin genel görünümü (orijinal).	9
2.4: Doku kültürü yoluyla mikro çoğaltımın özeti.	14
4.1: Farklı BAP konsantrasyonların şeker otu nodal eksplantlarına 30 günlük etki grafikleri.	30
4.2: Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamında şeker otu nodal eksplantların 30 gün sonrası değişimi.	31
4.3: Çimlendirilen tütün tohumlarının 15 gün sonrası görüntüleri.	31
4.4: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın alev ağacı nodal ve gövde ucu eksplantlarına olan 30 günlük etkisinin grafikleri.	33
4.5: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında alev ağacı gövde ucu ve nodal eksplantların 30 gün sonrası değişimi.	35
4.6: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın alev ağacı nodal ve gövde ucu eksplantlarına olan 60 günlük etkisinin grafikleri.	36
4.7: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında alev ağacı gövde ucu ve nodal eksplantların 60 gün sonrası değişimi.	38
4.8: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın alev ağacı nodal ve gövde ucu eksplantlarına olan 90 günlük etkisinin grafikleri.	39
4.9: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında alev ağacı gövde ucu ve nodal eksplantların 90 gün sonrası değişimi.	41
4.10: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın tütün yaprak eksplantlarına olan 30 günlük etkisinin grafikleri.	42
4.11: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında tütün yaprak eksplantlarının 30 gün sonrası değişimi.	44
4.12: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın tütün yaprak eksplantlarına olan 60 günlük etkisinin grafikleri.	45
4.13: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında tütün yaprak eksplantlarının 60 gün sonrası değişimi.	47

4.14:	Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın tütün yaprak eksplantlarına olan 90 günlük etkisinin grafikleri.	48
4.15:	Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında tütün yaprak eksplantlarının 90 gün sonrası değişimi.	50
4.16:	Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın şeker otu nodal eksplantlarına olan 30 günlük etkisinin grafikleri.	51
4.17:	Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında şeker otu nodal eksplantların 30 gün sonrası değişimi.	53
4.18:	Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın şeker otu nodal eksplantlarına olan 60 günlük etkisinin grafikleri.	53
4.19:	Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında şeker otu nodal eksplantların 60 gün sonrası değişimi.	55
4.20:	Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın şeker otu nodal eksplantlarına olan 90 günlük etkisinin grafikleri.	56
4.21:	Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında şeker otu nodal eksplantların 90 gün sonrası değişimi.	57

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler.	18
3.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.	19
3.3: nZVI stok çözeltisinin besiyerlerinde kullanım miktarı.	20
3.4: QL besi ortamı stok çözeltilerinin içerikleri (1L).	21
3.5: 1 mg/L BAP içeren QL besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).	22
3.6: MS0 besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.	23
3.7: Farklı konsantrasyonlardaki (1; 2; 4 mg/L) BAP içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.	24
3.8: ½ MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.	25
3.9: 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.	26
4.1: Farklı BAP konsantrasyonların, 30 gün sonrası eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.	30
4.2: Farklı nZVI konsantrasyonların, 30 gün sonrası gövde ucu ve nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.	32
4.3: Farklı nZVI konsantrasyonların, 60 gün sonrası gövde ucu ve nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.	35
4.4: Farklı nZVI konsantrasyonların, 90 gün sonrası gövde ucu ve nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.	38
4.5: Farklı nZVI konsantrasyonların, 30 gün sonrası yaprak eksplantların hesaplanan gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri.	44
4.6: Farklı nZVI konsantrasyonların, 60 gün sonrası yaprak eksplantların hesaplanan gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri.	47
4.7: Farklı nZVI konsantrasyonların, 90 gün sonrası yaprak eksplantların hesaplanan gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri.	49

4.8:	Farklı nZVI konsantrasyonların, 30 gün sonrası nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.	52
4.9:	Farklı nZVI konsantrasyonların, 60 gün sonrası nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.	54
4.10:	Farklı nZVI konsantrasyonların, 90 gün sonrası nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.	57

1. GİRİŞ

Günümüzde, tarım ve sürdürülebilir gıda güvenirliliğinin giderek azalması bu alanda yaşanan zorlukları aşabilmek için son yıllarda tarım alanında önemli stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. 2050 yılına kadar, şu an yaklaşık 9 milyar olan dünya insan nüfusunun besin ihtiyaçlarının karşılanması için şu an üretilenden %50 daha fazla gıda gerekmektedir. Bu hedefin gerçekleşmesi için yeterli toprak ve su kaynaklarına sahip olmamıza rağmen bitki verimliliğini arttırmaya yönelik tekniklerin müdahaleleri ile bu sorunun çözümlenebileceği ön görülmektedir [Dwivedi et al., 2016]. Bu tekniklerin başında bitki doku kültürü çalışmaları ve uygulamaları gelmektedir.

Bitki doku kültürü, bitkilerin herhangi bir hücresinin bütün bir bitkiye farklılaşabilme potansiyeline sahip olmasına yani totipotensi özelliğine dayanmaktadır. Bu kültürler kontrollü beslenme ve ortam koşulları altında hücrelerin, dokuların, organların gibi bitki eksplantlarının *in vitro* steril kültürlenmesiyle oluşmaktadır [George, 2008]. Bitki doku kültürü teknikleri; bitki gelişim süreçlerinin araştırılması, fonksiyonel gen çalışmaları, ticari bitki mikroçoğaltımı, belirli ticari ve tarımsal özelliklere sahip transgenik bitkilerin eldesi, bitki ıslahı ve mahsul iyileştirme çalışmaları, vejetatif olarak üretilen bitki mahsullerinin germplazmasının korunması ve muhafaza edilmesi, nesli tehdit altında veya tükenmekte olan bitki türlerinin kurtarılması gibi birçok amaç için en sık kullanılan biyoteknolojik araçlardır. Ayrıca bitki hücre ve organ kültürleri, ticari ve eczacılık sektöründe büyük öneme sahip ikincil metabolitlerin üretimi için ilgi çekici olmuştur [Loyola and Ochoa, 2018].

Tütün (*Nicotiana tabacum* L.), dünyada ticari gıda dışı ürün olarak yetiştirilen en eski ve önemli bitkilerden biridir. Solanaceae ailesine ait en değerli bitkilerden biridir. *Nicotiana tabacum* L., boyu 1 ila 2 metre kadar uzayabilen, bir yıllık, küçük dallı bir bitkidir. Tütün bitkisinin diğer türleri süs bitkisi veya yabani ot olarak yetiştirilmektedir. Güney Amerika, Güney Batı Afrika ve Güney Pasifik'te bulunan yerli bir bitki türüdür ve dünyaya Amerika'dan yayılmıştır [Kishore, 2014]. 70'i aşkın tür içeren tütün bitkisinin günümüzde birçok türü biyomühendislik, biyosentez, moleküler biyoloji ve diğer bilimsel çalışma alanlarında kullanılırken; sıradan tütün

olarak bilinen *Nicotiana tabacum* L., dünyada ekonomik açıdan en önemli endüstriyel ürün olarak üretilmektedir [Popova, 2020].

Tütün bitkisi, Skoog ve Miller'ın (1957) yaptıkları çalışmalardan günümüze kadar rejenerasyon üzerine yapılan *in vitro* çalışmalarda model bitki olarak kullanılmaktadır. Olgun bitkilerin tek hücrelerden rejenerasyonu ilk kez *Nicotiana tabacum*'da tanımlanmıştır [Vasil and Hildebrandt, 1965]. 1984'te tütün doku kültüründen rejenere ürünlerin değişkenliği gözlenmiştir [Nikova and Zagorzka, 1984]. Protoplast füzyonu ile hibrit bitki eldesi [Shinde et al., 2021], herbisit direncinin geliştirilmesi [Freyssinet, 1986], TMV (tütün mozaik virüsü) kontaminasyonundaki tütün bitkinden kallus kültürü vasıtasıyla sağlıklı bitkicik elde edilmesi [Sanger et al., 1986] ve antikorların *in vitro* büyüme yanıtı üzerindeki etkisinin belirlenmesi [Zhang et al., 1998] tütün doku kültüründen başarıyla elde edilmiştir.

Fraser Photinia (*Photinia* × *fraseri* Dress), Japon *Photinia glabra* ile Çin *Photinia serrulata* bitkilerinin hibritleştirilmesiyle ortaya çıkan melez bir bitkidir. Ülkemizde Alev ağacı olarak bilinen Fraser photinia, Rosaceae ailesine ait bir türdür. Maksimum 3-5 metre boy ve 2-4 metre ene ulaşabilen, yaprak dökmeyen çok yıllık bir çalı türüdür. Şu ana kadar tahmini 60 türe sahip olduğu bilinmektedir ve bu türlerin çoğu Çin asıllıdır [Llorente and Larraburu, 2012]. Alev ağacının fiziksel en belirgin özelliği yeşil genç yapraklarının uç kısmında canlı kırmızımsı renkte yapraklarının bulunmasıdır. Bu görüntü sebebiyle günümüzde çit veya süs bitkisi olarak yaygın olarak kullanılmadığı [Gilman and Watson, 2006]. Bu özelliğine ek olarak yapılan çalışmalar sunucunda alev ağacının topraktaki ağır metallerden etkilenmeyip büyüme ve gelişme gösterdiği ortaya çıkmıştır [Yang et al., 2004]. Alev ağacı yaprakları sadece görüntüsü olarak değil içerdiği sorbitol, polifenoller, saponin ve ursolik asit vb. uçucu yağ gibi birçok sağlığa faydalı tıbbi değeri yüksek biyomoleküller nedeniyle de önemli bir ekonomik değere sahiptir [Song et al., 2021].

Alev ağacı ile yapılan bir dizi çalışma sonucunda bitkinin çelikle köklenme ile üretimde köklenmenin geç olduğu ve bu nedenle bitkinin mevsimler arzını karşılayacak çoğaltımının yapılamadığı görülmüştür [Merkle and Dean, 2000], [Aderkas and Bonga, 2000]. Bu nedenle hem hızlı hem de fazla ürün oluşturabilmek için alev ağacı üretiminde, *in vitro* mikroçoğaltım kullanım tekniklerinin geliştirilmesi düşünülmüş ancak günümüzde bu konu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır.

Stevia rebaudiana, Asteraceae ailesine ait bir türdür ve Güney Amerika'ya özgü çok yıllık bir bitkidir. Ticari olarak Çin, Tayvan, Tayland, Kore, Japonya, Hindistan gibi ülkelerde yetiştirilmektedir [Bidabadi and Jain, 2020]. Stevia yaprakları steviosidler, rebaudiositler, rubosidler steviolbiyozitler ve dulcosidler gibi tatlılığı sakkarozaya göre 100-300 kat daha yüksek olan diterpen glikozitler içerir ve bu nedenle şeker otu olarak da bilinir. Ayrıca, stevia yaprakları alkaloidler, flavonoidler, suda çözünür klorofiller ve ksantofiller, hidroksisinnamik asitler (kafeik, klorojenik vb.), serbest şekerler, amino asitler, lipitler, uçucu yağlar, vitaminler, polifenoller ve diğer antioksidanları içermektedir [Özcan ve Arabacı, 2012].

Stevia yapraklarının toz halindeki şekeri, diyabetik hastalar için herhangi bir yan etki olmaksızın hem hipoglisemik hem de vücut ağırlığı azaltıcı etkiye sahiptir [Summon et al., 2008]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO), hayvanlar üzerinde yaptığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar; steviosidlerin ve rebaudiosidlerin tüketiminin mutajenite bir etkisinin olmadığını ve kanser oluşumunu indüklemediği görülmüştür [Mizutani and Tanaka, 2002]. Stevia ayrıca farmakolojik çalışmalarda bir antimikrobiyal olarak hareket edebilir. *S. rebaudiana* yapraklarının ham yaprak kloroform özütü; antihipertansiyon, antikanserojenik, antihiperglisemik, anti-human rotavirus ve benzeri birçok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılabilirliği bildirilmiştir. Bu faydalarının dışında yüksek sıcaklıklılara direnç özelliği sayesinde; reçellerde, soslarda, şekerlemelerde, içeceklerde ve diğer ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [Lee et al., 2001].

Stevia'nın geleneksel yetiştirme veya çoğaltma yöntemleri düşük çoğaltım verimine sahip olması nedeniyle zaman alıcıdır. Bununla birlikte tohumların düşük çimlenmesi (yaklaşık %10) nedeniyle generative çoğaltımında da sorunlar vardır. Bu sorunların çözümü için *in vitro* koşullarda klonal çoğaltımına olanak tanıyacak mikroçoğaltım tekniklerinin kullanılması olduğu düşünülmüştür. Bu sayede kısa sürede büyük miktarlarda stevia bitkisi üretme potansiyeline sahip olunabilecektir [Uddin et al., 2006].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Şeker otu [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni], yapraklarındaki steviosid ve rebaudiozitler gibi glikozitlerin varlığı nedeniyle sukrozdan daha tatlı olarak bilinir. Bu nedenle günümüzde kalorisiz doğal tatlandırıcı olarak başta diyabet olmak üzere obezite ve kanser hastalıklarının tedavisinde ön plana çıkmaktadır. Ancak şeker otu bitkisine ait tohumların çimlenme yüzdesi düşüktür ve vejetatif üretiminde de az sayıda yeni bitki oluşturma sorunu nedeniyle hızlı çoğaltılamamaktadır.

Alev ağacı (*Photinia X fraseri* Dress.) süs bitkisi olarak ticari açıdan büyük bir öneme sahiptir. Buna ek olarak; bitkinin içerdiği sorbitol, ursolik asit, betulinik asit, saponin ve uçucu yağ gibi tıpta ve farmokolojide büyük öneme sahip biyomoleküller içermektedir. Ancak alev ağacının geç köklenme gibi sorunlara sahip olması vejetatif çoğaltılmasında zorluklara yol açmaktadır.

Tütün (*Nicotiana tabacum* L.)'ün günümüze kadar rejenerasyon üzerine yapılan *in vitro* çalışmalarda kullanılması tütünü eşsiz bir model organizma yapmaktadır. Ayrıca hem ticari tütün ürünü olarak hem de ticari enzimlerin, rekombinant aşılardan, farmasötik bileşiklerin ve antikorların geliştirme amaçlı üretimlerinin olmasıyla tütün yüksek ekonomik değere sahiptir.

Bu tip üretim sorunları olan bitkilerde doku kültürü tekniklerinden olan mikroçoğaltım yöntemi hızlı ve etkin klonal çoğaltımı sağlamaktadır. Önerilen tez çalışmasında bu nedenle literatürde bitki gelişiminde olumlu sonuçlar veren sıfır değerlikli demir nanopartikülünün şeker otu, alev ağacı ve tütün bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımına olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Stevia ve alev ağacının geleneksel çoğaltma ve yetiştirme prosedürleri sınırlıdır. Hem endüstriyel hem de tıbbi açıdan son derece önemli bu iki bitki ve tütün için *in vitro* çoğaltma prosedürlerine önemli bir katkı olarak nZVI'nin kullanımı düşünülebilir. Ekonomik değeri yüksek, tıbbi-aromatik bitki grubunda bulunan stevia bitkisinin ve süs bitkisi grubunda olan alev ağacının dünyada üretiminin hızlanması ve öneminin giderek artışı söz konusudur. Dolayısıyla Türkiye'de bu gibi çalışmaların öneminin anlaşılması ve stevia ile alev ağacının bitkisinin üretiminin hızlanması, bilime katkısı olduğu kadar ekonomiye de katkısı olacaktır. Tez kapsamında tıbbi-aromatik otsu bitki grubunda yer alan stevia, odunsu süs bitkisi grubunda yer alan alev ağacı ve bir model organizma olan tütünden elde

edilen sonuçlar doğrultusunda benzer gruptaki bitkiler üzerinde nZVI'nın etkisi hakkında bir fikir sahibi olunabilir. Stevia, alev ağacı ve tütün ile nZVI ilgili bitki doku kültürü çalışmaları literatürde bulunmaması nedeniyle öngörülen tez çalışması, literature katkı sağlayarak; bu bitkilerin üretime ve çoğaltımına yardımcı olarak, bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

Bu çalışmada tütün tohumları çimlendirilerek elde edilen bitkiciğin steril şartlarda yaprak eksplantlarının; alev ağacı bitkisinin steril koşullarda gövde ucu ve nodal eksplantlarının; şeker otu bitkisinin bitki büyüme düzenleyici [6-benzilamino pürin (BAP)] optimasyonu yapılması sonrası sterilizasyon işlemiyle doku kültüne alınan nodal eksplantlarının, farklı konsantrasyonlardaki nZVI ile muamelesi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 30, 60 ve 90. gün sonrası oluşan değişimler belirli parametreler doğrultusunda gözlemlendi ve hesaplandı. Bu sayede nZVI'nın tütün bitkisinin *in vitro* rejenerasyona; şeker otu ve alev ağacı bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımına olan etkisi yapılan analizlerle belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Tütün Bitkisi

Tütün (*Nicotiana tabacum* L.), Solanaceae familyasında bulunan doku kültürü çalışmalarında uzun süredir kullanılan en önemli bitkilerden biri olmuştur [Popova, 2020]. Tütün bitkisi temel olarak Güney Amerika'nın tropikal bölgelerinde, Güney Pasifik ve Güney Batı Afrika'da yerli olarak yetişen bir bitki türüdür [Nielsen, 1989], [Charlton, 2004] (Şekil 2.1). Dünya'ya yayılması Kolombiya öncesi dönemlere dayanmaktadır [Gebhardt, 2016]. Tahmini 70 tür *Nicotiana* cinsi vardır. *Nicotiana tabacum*, ticari amaçlı bir tütün ürünü olarak, akademik araştırma ve geliştirme çalışmalarda en çok tanınan bir tür olmuştur [Olmstead et al., 2008].



Şekil 2.1: Tütün bitkisinin doğada görünümü.

Tütün, son 15 yılda bitki doku kültürü, transgenik araştırma ve genetik mühendisliğinin ilerlemesinde deneysel benzersizliği nedeniyle tercih edilen model bitkilerin en başında yer alır [Kaya et al., 2013]. Tütün bu özelliklerinin yanı sıra ticari olarak çok değerli bir bitki olarak görülmektedir ve çeşitli kullanımları için birçok üretim yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler başlıca ticari enzimler, rekombinant aşılar, farmasötik bileşikler ve antikorların geliştirme amaçlı üretim yöntemleridir [Ma et al., 2015], [Habibi, 2019]. Ayrıca tütün, aşı üretim çalışmalarında daha hızlı üretim ve maliyet düşürmek amaçlı yapılan bitkinin model

organizma olarak kullanılan ilk çalışmalarda başarılı olmuştur [Demurtas et al., 2016], [Zhong et al., 2014].

Nicotiana cinsinin fizyolojisi ve genetiği, olgun bir organizma oluşturmak için farklılaşmamış hücrelerden özel dokulara dönüşme yeteneği de dahil olmak üzere kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [Mohammed, 2021]. *Nicotiana tabacum* L., belirli konsantrasyondaki sitokinin ve oksin içeren kallus kültürlerinde organogenez çalışmaları için uzun süredir model tür olarak sınıflandırılmaktadır [Skoog and Miller, 1957], [Maeda and Thorpe, 1979].

2.2. Şeker Otu Bitkisi

Anavatanı Brezilya, Arjantin ve Paraguay olan bu bitki ilk olarak Paraguay yerlilerin (guaraniler) "tatlı bitki" ve "ballı yaprak" gibi farklı isimler verilmiş ve geleneksel mateyi tatlandırmak amaçlı kullanılmıştır. İlk olarak 1987 yılında Paraguay'da kullanılan şifalı bitkiler hakkında araştırma yapan Güney Amerikalı bilim insanı Antonia Bertoni tarafından keşfedilmiştir [Goerzen and Salas, 2011]. 1889 yılında ise İsviçreli Botanist Moises Santiago Bertoni tarafından bitkinin sınıflandırılması yapılarak *Eupatorium rebaudianum* olarak isimlendirilmiştir. Bertoni tarafından üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda 1905'te bilimsel açıdan yeni bir bitki olarak tespit edilmiş ve günümüzdeki ismini "*Stevia rebaudiana* Bertoni" almıştır [Turgut et al., 2015].

Stevia bitkisi, Asteraceae ailesine ait çok yıllık, yabani, otsu, küçük bir çalı türüdür (Şekil 2.2). Günümüzde 230'u aşkın türü bilinmektedir. Bu türlerden sadece *S. rebaudiana* ve *S. phlebophylla* türlerine ait bitkilerden steviol glikozitleri üretilmektedir [Özcan ve Arabacı, 2012]. Nemli ortamları seven *stevia* bitkisi, doğada kendiliğinden yetişebilme özelliğine sahiptir. *Stevia* bu özelliğinin yanı sıra pH ve ısıya dayanıklılık, yüksek lif oranı, ağızda acı metalimsi tat bırakmama, alkolde çözünürlük, sıfır kalori içermesi ve piyasadaki tatlandırıcılardan (aspartam, neotame, sakkarin, sukraloz vb.) en az 250-300 kat daha fazla tatlı olması nedeniyle bilimsel araştırmalar için ilgi odağı bir bitki olmuştur [Soliman, 1997], [İnanç ve Çınar, 2009]. *Stevia* bitkisi yapraklarında steviosid, rebaudiosid A, B, C, D, E ve dulcosid-A glikozitleri bol miktarda içermesi nedeniyle sakarozdan daha tatlıdır [Carneiro et al., 1997].



Şekil 2.2: Stevia (şeker otu) bitkisinin genel görünümü (Oriijinal).

Stevia bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstraktlar gıda enstitüsünün dışımda tıpta mide sorunlarının tedavisinde, düşük kan şekeri tedavisinde, kan basıncı düşürülmesinde ve ağrı kesici özelliği sebebiyle ilaç yapımında da kullanılmaktadır [Singh and Rao, 2005]. Ayrıca Japonya’da yapılan bir çalışmada stevia bitkisinin fare üzerindeki testlerinde kanserojen, mutajen olmadığı ve herhangi toksik bir etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır [Mizutani and Tanaka, 2002].

Uzun yıllar uzak doğu ülkelerinde gıda maddesi olarak ticari üretimi yapılmasına rağmen Avrupa’ya 2011, ABD’ye 2008 yıllarından sonra üretim izini verilmiştir. Türkiye’de şeker otu olarak adlandırılmaktadır ve 2013 yılı itibari ile üretime geçilmiştir [Yıldırım, 2017]. Şeker otu ekonomik olarak çok değerli bir bitki olmasına rağmen ülkemizde yetiştiricilik ve yapılan bilimsel çalışmalar oldukça yetersizdir.

Ülkemizde yapılan araştırmalara göre şeker otunun yetiştirilmesinde en uygun yer Akdeniz bölgesinin olduğu görülmüştür [Turgut et al., 2015]. Karadeniz Bölgesinde yapılan çay endüstrisi ile şeker otunun bir arada kullanımı düşüncesiyle yapılan çalışmalarda bitkinin tohumunun toprağa düşük oranda tutunma ve çimlenme sorunları olduğu görülmüştür [Yücesan ve ark., 2016]. Bu sorunlar göz önüne alınarak şeker otunu ticari olarak üretimini artırmak amaçlı yapılan bir çalışmada; bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak önce sera sonra tarla denemesinde ekilen

fidelerin yüksek oranda gelişim gösterdiği ve şeker otunun Tokat şartlarında adaptasyon sağlayabileceği görülmüştür [Yıldırım, 2017].

2.3. Alev Ağacı Bitkisi

Alev ağacı (*Photinia* × *fraseri* Dress.), yeşil alanlarda süs bitkisi olarak kullanılan en fazla 3-5 metre yüksekliğe ve 2-4 metre genişliğe sahip olabilen yaprak dökmeyen çok yıllık bir çalı türüdür (Şekil 2.3). Dünyada çoğunlukla Asya ve Meksika'da yayılım gösteren 43'ü Çin'e özgü olmak üzere yaklaşık 60 tür alev ağacı bitkisi bulunmaktadır [Kane et al., 1987]. Alev ağacı, *Rosaceae* ailesine ait bir türdür ve Japon asıllı *Photinia glabra* ile Çin asıllı *Photinia serrulata* bitkilerinin hibritleşmesiyle oluşturulmuştur [Llorente and Larraburu, 2012].

Alev ağacının dikdörtgen, yassı, parlak yaprakları soğuğa dayanıklılık sağlamaktadır ve çok yıllık olgun yeşil yapraklarının ucundaki yoğun kırmızı renkli genç yaprakların bulunması bitkiyi oldukça göz alıcı yapmaktadır. Bitki ilkbahar-yaz aylarında 2-3 hafta büyük, hoş kokulu beyaz çiçeklere sahiptir. Sonbahar aylarında ise genç kırmızı yapraklar oluşur ve 2-4 hafta sonra kırmızı olan genç yapraklar yeşile döner.



Şekil 2.3: Photinia (Alev ağacı) süs bitkisinin genel görünümü (Orijinal).

Hava kirliliği, kurak toprak gibi sorunlara sahip ve sulamanın yetersiz olduğu kentsel alanlarda bile sorunsuz yetişebilmesi nedeniyle sıklıkla çit veya süs bitkisi olarak tercih edilmektedir [Gilman and Watson, 2006]. Ağır metal kirliliği bulunan topraklarda yapılan bir çalışmada alev ağacının ağır metalden etkilenmeden gelişim ve büyüme gerçekleştiği görülmüştür. Bu çalışma alev ağacının ağır metal soğurma yeteneğinin yapılacak sonraki çalışmalara öncü olacağı düşünülmüştür [Yang et al., 2004]. Ayrıca alev ağacı yapraklarının; sorbitol, saponin, polifenoller ve ursolik asit gibi insan sağlığı için tıbbi değeri yüksek olan besleyici biyomoleküller içerdiği yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır [Song et al., 2021].

Photinia'nın geleneksel çoğaltma yöntemi, apikalden yaklaşık 10-13 cm uzunluğunda alınan kesimlerin yüksek konsantrasyonlu fitohormon darbeleri ile köklendirilmesiyle yapılmaktadır [Beeson, 2000]. Alev ağacı ile yapılan çalışmalar sonucunda bitkinin çelikle köklenmesinde birtakım zorluklar olduğu görülmüştür [Bonaminio and Blazich, 1983], [Dirr, 1990]. Bitkinin köklenme sorununu, gövde çeliklerinin geç köklenmesi nedeniyle oluşturduğu mevsimsel talebin karşılanamaması gibi sorunları ortadan kaldırmak ve hastalığa dirençli bitkilerin elde edilip gen aktarımı için hedef materyal sağlanması amacıyla alev ağacı bitkisi için çoğaltma yöntemi olarak mikro çoğaltma teknikleri önerilmiştir. Buna rağmen günümüzde alev ağacının çoğaltılması için doku kültürü çalışmaları sınırlı sayıdadır [Kane et al., 1987], [Leifert et al., 1992], [Merkle and Dean, 2000], [Aderkas and Bonga, 2000]. Ancak yapılacak mikro çoğaltım teknikleri bitki performansını azaltan bazı biyokimyasal ve histolojik modifikasyonlar oluşturabilmektedir. Bu sebeple bu değişimleri önleyebilecek biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

2.4. Nanopartiküller

Nanoteknoloji bilimi, ilk olarak ABD Çevre Koruma Ajansı tarafından ISO/TS 27687:2008'de tanımlanmış ve ISO/TS 80004-2:2015'te yenilenmiştir. Avrupa Birliği, nanomalzemeleri (NM'ler); parçacıkların %50'si veya daha fazlasının 1-100 nm aralığında olduğu, bağlanmamış halde aglomera veya agrega halinde parçacıklar içeren malzeme olarak tanımlamaktadır [Rodríguez, 2018]. Bitki bilimi sistemlerindeki nanoteknoloji uygulamaları "Fitonanoteknoloji" olarak tanımlanmaktadır [Fincheira et al., 2019].

Nanopartiküller (NP) 100 nm'den daha küçük oldukları için çıplak gözle görünemeyen parçacıklardır. Nanopartiküllerin bu kadar küçük boyutlara sahip olması onlara çok yüksek yüzey / hacim oranı sağlamaktadır. Nanopartiküller bazı kaynaklarda Nano-kristaller olarak da geçebilmektedir. NP'lere şekillerine göre nanotüp, nanoçiçek, nanotel, nanoküp vb. isimler de verilmektedir [Khatami et al., 2018], [Karthik et al., 2018].

Günümüzde bu nano yapılar başta tıp ve mühendislik olmak üzere kozmetikte, tekstilde ve inşaat sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır [Khan et al., 2017]. NP'ler, diğer yapı malzemelerine göre üstün fiziksel, mekanik, kimyasal, termal ve biyolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan biyolojik çalışmalara göre NP'lerin anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-anjiyojenik özelliklere sahip olduğu ortaya çıkmıştır [Ghosh et al., 2019], [Barzan et al., 2014].

NP'ler boyutuna, şekline, nasıl sentezlendiğine ve doğasına göre kendine has kullanım özelliklerine sahiptir. Bu benzersiz özellikler nedeniyle karbon nanotüpler, demir nanopatiküller, alüminyum, bakır, altın, gümüş, titanyum, çinko vb. gibi birçok metal nanopartiküller ve sezyum oksit, çinko oksit gibi çeşitli metal oksitlerden nano boyutta çeşitli malzemeler geliştirilmektedir [Timoteo et al., 2019], [Miri et al., 2018].

NP'lere bitkinin gelişim safhalarında bitkinin büyüme ve gelişme sistemini düzenlemedeki yetkinlikleriyle bilimsel çalışmalar için çok değerli görülmektedir [Kamle et al., 2020]. Bu nanoparçacıklar, ekosistemde yaşanan kayıpları en aza indirmek amacıyla besinlerin kullanım verimliliğini ve kontrollü salınım yapılarak iyileştirmeye dayanan akıllı bir sistemin gelişmesine öncü olmuştur [Solanki et al., 2015]. Ayrıca NP'ler, düşük maliyetli olmaları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, düşük toksisiteleri ve daha yüksek enzim aktiviteleri ile tarım uygulamalarında büyük ölçekli üretimlerde tercih edilmektedir [Kalia et al., 2020]. Metal nanopartiküller içerisinde demir, kobalt ve nikel nanopartikülleri eşsiz kendine özgü manyetizmalara sahiptirler ve bu nedenle tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır [Toledo et al., 2018].

2.4.1. Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikülü (nZVI) ve Yapılan Çalışmalar

Günümüzde nZVI'in çekirdeğinde metalik demir, kabuğunda Fe (II) ve Fe (III) hidroksitleri bulunan bir çekirdek-kabuk yapısı ile karakterize edilir [Vilardi et al., 2018]. nZVI'nın farklı mikrobiyal ve hayvan sistemleri üzerinde toksik etkisinin olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bakterilerde [Auffan et al., 2008], siyanobakterilerde ve planktonlarda [Marsalek et al., 2012] belirgin sitotoksosite göstermiştir ve midyelerde DNA hasarı, mikrogial ve nöronal hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi gözlenmiştir [Kadar et al., 2011]. Son zamanlarda nZVI, ağır metaller ve pestisitler gibi farklı kirletici türlerini toprak veya sulu çözeltilerden uzaklaştırmak için sentezlenen önemli bir endüstriyel malzeme olarak ilgi görmektedir. Ancak bitkiler sistemlerindeki etkisini inceleme amaçlı yapılan çalışmalar sınırlıdır [Vilardi et al., 2018].

Fenton Reaksiyonu ile H_2O_2 ve OH^- radikalleri üretebilme özelliği sayesinde nZVI, bitkilerde kök büyümesi ve uzamasında önemli bir süreç olan kök hücre duvarı yıkımında önemli bir rol alır. Bu durum göz önüne alınarak nZVI'nın oksidasyon yeteneğinin kök uzamasını arttırdığı öne sürülerek *A. thaliana*'da yapılan bir çalışmada bitkinin köklerdeki pektin-polisakkaritlerin parçalanmasını artırarak kök uzamasının %150–200 artırdığı görülmüştür [Kim et al., 2014]. *A. thaliana* ile yapılan bir başka çalışmada ise nZVI, stomaların açılmasında görevli ve kuraklık direncini artıran *AHA2'nin* gen ekspresyonunu yukarı doğru düzenlediği görülmüştür [Kim et al., 2015].

Tohum çimlenmesi ve bitki büyümesinin temel fototoksosite uç noktaları, yer fıstığında düşük konsantrasyonlarda ($<320 \mu\text{mol/l}$) büyümenin teşvik edildiğini ama pirinçte $>500 \text{ mg/kg}$, kedikuyruğu ve hibrit kavakta $>200 \text{ mg/l}$ konsantrasyonlarında inhibisyonun gerçekleştiği ortaya çıkmıştır [Ma et al., 2013], [Wang et al., 2016], [Li et al., 2015]. Soya fasulyesi ile yapılan bir çalışmada; bitkinin tohumları sıfır değerlikli demir, bakır ve kobalt nanokristalin tozları ile muamele edilmiş ve çimlenme oranının kontrol şartlarına göre artan bir grafik çizdiği görülmüştür [Ngo et al., 2015].

In vitro tütün BY-2 hücrelerine düşük konsantrasyonlarda maruz bırakılan nZVI'nın, yüksek ROS alımı ve üretiminin bir sonucu olarak sitotoksitesi ve genotoksitesi olduğu ortaya çıkmıştır [Ghosh et al., 2019]. Cr (VI) ile kirletilmiş

suya nZVI eklenerek oluşturulan bir çalışmada ise kontamine su ile muameledeki domatesin büyüme performansı bakıldığında; yaprak klorofil ve karotenoid oranında önemli bir artış gözlenirken, Olgun meyvelerdeki karotenoidler, yağda çözünen vitaminler ve nikotianamin seviyelerinde önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir [Brasili et al., 2020].

2.5. Bitki Doku Kültürü

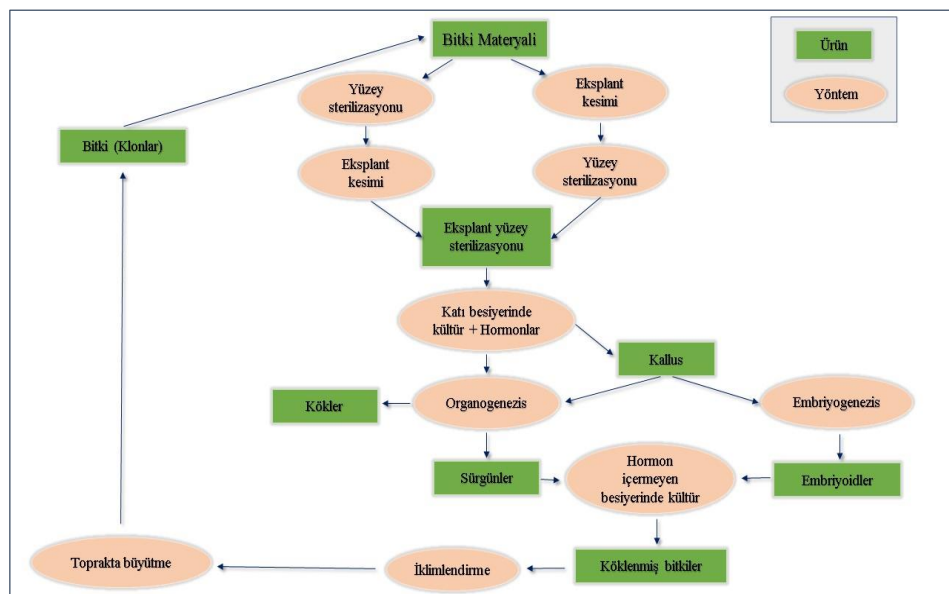
2.5.1. Bitki Doku Kültürü Tarihçesi

Bitki doku kültürünün teorik temeli 1838 yılında; Schwann ve Schleiden'in, bir hücrenin hücre bölünmesiyle tüm genomu ifade edebildiği ve bütün bir bitkiye farklılaşabilecek potansiyelde olduğunu ortaya koyan totipotens kavramına dayanmaktadır [Thorpe, 2007]. 1934 yılında, White tarafından *Lycopersicon esculentum* bitkisinde yapılan bir çalışmada ilk kez kalıcı kök ve meristem kültürleri başarılı olmuştur, ardından Gautheret ve Nobecourt *Daucus*'un havuç ile yaptıkları çalışma kalıcı kallus kültürü yapılan ilk çalışma olmuştur [Pierik, 1997]. Daha sonra Gautheret, çalışmalarını geliştirerek *Salix* kallus kültürlerini 18 ay aseptik koşulda altkültür yapmayı başarmış ve 1942'de yabani havuç kallus kültürlerinden metabolitlerin üretimini başarmıştır [Bigot, 1987]. Bu çalışmaları takip eden çalışmalar sonucunda oksinin tanımlanması, kök ve sürgün uçlarının laboratuvarda çoğaltımı, olgun embriyoların kültüre alınması ve kallus kültürlerinin sürdürülebilirliği gibi birçok gelişme gerçekleşmiştir. 1995'te ilk rekombinant gıda üretiminin gerçekleşmesiyle birlikte bitki doku kültürü çalışmaları yoğun ilgi ve hız kazanmıştır [Thorpe, 2007]. Bitki hücrelerinin bu eşsiz yeteneği, *in vitro* doku kültürünü araştırma amaçlı yapılan çalışmaların haricinde bitki üretim ve yetiştirme enstitüsü programlarında kullanılan bir teknik olarak da kullanılmasına olanak sağlamaktadır [Idowu et al., 2009].

2.5.2. Bitki Doku Kültürü ve Yöntemleri

Bitki doku kültürü sistemleri, laboratuvarında kontrollü aseptik koşullar altında tüm bitkilerin, organların, dokuların veya hücrelerin yetiştirilmesine dayanmaktadır. Bu kültür sistemleri, bazal bir ortam kurulması amacıyla bitki veya alınan eksplantın büyümesi için gerekli tüm besinleri, enerjiyi ve suyu sağlamaktadır. Ek olarak uygun inkübasyon koşullarını oluşturmak amaçlı büyümeyi destekleyici optimize edilmiş ışık ve uygun sıcaklık ayarları sağlanmaktadır. Bitki gelişimi daha sonra, büyüme veya olgunlaşmanın belirli aşamalarında bitkinin ortamına bitki büyüme düzenleyicilerinin (PGR'ler) olarak bilinen doğal veya sentetik fitohormonların eklenmesiyle manipüle edilebilmektedir [Phillips and Garda, 2019]. Bu PGR'ler, hücre bölünmesi ve büyümesi, farklılaşması, organogenez ve morfogenezin sayısız gelişimsel programını etkiler [George, 2008].

Kısaca bitki doku kültürleri; aseptik koşullarda, içeriği belirli kimyasal ve fiziksel ortamda bulunan hücre veya eksplantların toplu olarak çoğaltılmasına olanak sağlayan bir *in vitro* kültür tekniğidir. Eksplant; olgunlaşmamış bir embriyo, bir tohum, yaprakların bir kısmı, kökler veya sürgünler, bir anter, bir polen tanesi, bir yumurta hücresi, bir meristem veya apikal meristem gibi bitkinin herhangi bir kısmından alınabilir [Bidabadi and Jain, 2020]. Şekil 2.4'te doku kültürü ile mikro çoğaltım teknikleri bir şema ile gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Doku kültürü yoluyla mikro çoğaltımın özeti.

Bitki doku kültürü teknolojisi genel anlamda; haploid bitki üretimi, germplazm korunumu, yeni bitki çeşitlerinin oluşturulması, ender ve tükenme riski bulunan bitkilerin korunması, üreme sorunu yaşayan bitkilerin çoğaltılmasında, ikincil metabolitlerin üretilmesi ve transgenik bitki oluşturma gibi hedefleri gerçekleştirmekte kullanılmaktadır [Ahloowalia et al., 2004].

In vitro çoğaltım bitkilere; kısa zamanda yüksek oranda fazla ürün elde edilmesi, çalışmaların her mevsim yapılabilmesi, *in vitro* üretilen bitkilerin çoğunlukla her türlü kontaminasyondan uzak kalabilmesi ve bu sayede önemli genotiplere etki eden virüslerden korunabilmesi gibi birçok avantaj sağlamaktadır [Arora, 2010].

Bunlara ek olarak doku kültürü uygulamaları sayesinde bitkilerin veya eksplantlarının istenen vadede depolanma ve korunması yapılabilmektedir. Ayrıca bitki eksplantını sıvı nitrojen (-196 °C) ile muamele edilerek kriyoprezervasyon olarak bilinen dondurarak koruma işlemi uygulanmasıyla bitkiler süresiz bir şekilde saklanabilir ve koruma sağlanabilmektedir [Callow, 1997].

Bitki doku kültürü yöntemleri, besiyeri için kullanılan materyallerin farklılığına göre aşağıdaki gibi 5'e sınıflandırılabilir. Bunlar;

- Hücre kültürü; sıvı besiyerinin çoğunlukla çalkalama yöntemiyle havalandırıldığı bir ortamda üretimin yapıldığı kültür,
- Kallus kültürü: Eksplantların uygun katı besi ortamında kallus dokusu oluşturulan steril kültür,
- Protoplast kültürü; kültür ortamında bulunan hücre veya bitki dokularından bitki protoplastının aseptik izole edilmesiyle oluşturulan kültür,
- Organ kültürü; embriyo, yumurtalık, anter, yaprak, kök ve sürgün vb. gibi bitki organlarının steril kültürü,
- Meristem kültürü; uç veya yanal meristemlerin uygun besi ortamında steril kültürü olarak tanımlanabilir [Hazarika, 2006].

2.5.2.1. Organogenez

Organogenez, bitkisel hücrelerin totipotent yeteneğine sahip olması esasına dayanır. Bir bitkinin hücre zarı ve çekirdeği zarar görmemişse mitoz bölünmeler geçirmesi vasıtasıyla yeni bitkisel dokular oluşturabilmektedir. Bitki bu bölünmeler sonucunda doğrudan adventif kök veya sürgünler oluşmuş ise buna olaya direkt organogenez, fakat ilk önce kallus sonra kallustan kökler veya sürgün oluşmuş ise indirekt organogenez denilmektedir [Babaoğlu vd., 2001]. Organogenez olayının sorunsuz gerçekleşmesi için besi ortamına uygun oranda sitokin ve oksin eklenmesi gerekmektedir. Eğer besi ortamında sitokin konsantrasyonu oksininkinden az veya hiç bulunmuyorsa kök oluşumu, oksin konsantrasyonu sitokininden az veya hiç bulunmuyorsa sürgün oluşumu tetiklendiği görülmüştür [Kocaçalışkan, 2008].

Organogenez için gerekli birçok basamağın sorunsuz gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu basamaklar;

- Bitkinin seçilmesi ve bitki dokusunun sterilizasyonu,
- Kullanılacak eksplantların (yaprak, meristem, kök ve sürgün ucu v.b) alınarak besi ortamına konulması,
- Kültürde sürgün artışının gözlenmesi,
- Sürgün gelişimi ve köklendirme,
- *In vitro* bitkicikleri dış ortama alıştırma şeklindedir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Bitki Materyalleri

Bu çalışmada bitki materyali olarak alev ağacı (*Photinia fraseri* x Dress), şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bert.) ve tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisi kullanılmıştır.

3.1.1.1. Alev Ağacı Bitkisinin Temini

Alev ağacı (*Photinia fraseri* X Dress.) bitkisi kendi laboratuvarımıza ait başka bir çalışmadan temin edilmiştir.

3.1.1.2. Şeker Otu Bitkisinin Temini

Şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bitkisi, ticari bir firmadan fide şeklinde temin edilmiştir.

3.1.1.3. Tütün Bitkisinin Temini

Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisinin tohumları (Samsun wt türü) kendi laboratuvarımızdan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Nanopartikül Materyali

Bu çalışmada nanopartikül olarak da sıfır değerlikli demir nanopartikülü (nZVI) kullanılmıştır. Kullanılan sıfır değerlikli demir nanopartikülü, kuru madde olarak Sn. Prof. Dr. Anatoli Dimoglo (Düzce Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü) ve ekibinden temin edilmiştir.

ZVI-NP'ler, ultrasonik bir işlem uygulanmadan bir kimyasal indirgeme prosedürü ile demir tuzlarının indirgenmesiyle üretilmiştir. Stabilizatör olarak düşük

moleküler kütleli (poli N-vinilpirolidon) (PVP) kullanılmıştır. Manyetik çekirdek boyutu 12.0 ve 12.4 Å'dir. Parçacık boyutu 200 nm'dir.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
KH ₂ PO ₄	Chem Cruz	7778770
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	M-7899
KNO ₃	Duchefa	011852.14
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	M-7899
NH ₄ NO ₃	Sigma	M-1651
Ca(NO ₃). 4H ₂ O	Sigma	C-2786
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	F-8263
Na ₂ EDTA	Sigma	4503
Myo-inositol	Sigma	I-3011
6-Benzil amino purin (BAP)	Sigma	B-3408
Naftalen asetik asit (NAA)	Sigma	20K3255
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Merck	K33960252
Domestos (Ticari çamaşır suyu)	Domestos	-
Agar	Duchefa	012290.02
MS	Duchefa	M022
Sukroz	Duchefa	S0809
Glisin	Merck	1.04201.0100
Nikotonik Asit	Sigma	N-0765
Piridoksin HCl	Sigma	P-8666
MnSO ₄ .4H ₂ O	Sigma	M-7899
H ₃ BO ₃	Sigma	B-9645
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	Z-1001
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma	C-2911

Tablo 3.1: Devam.

CoCl ₂ .6H ₂ O	Sigma	C-2911
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sigma	M-1651
KI	Riedel-De Haen	03124
Tiamin-HCl	Sigma	T-3902

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihaz Modeli	Firma Adı
Laminar Akıllı Kabin	Cleanair	PMU Company
Hassas Terazı	TP3030	Denver Instrument
pH Metre	pH 209	Hanna Instrument
Etüv	DIN 12880	Binder
Otoklav	HV-110L	Hirayama
Bitki Büyütme Odası	RivaCold	Genpa Mühendislik
Manyetik Karıştırıcı	MR3001	Heidolph
-20 Buzdolabı	GS26DN13NE	Simens
+4 Buzdolabı	RG 1380	İndesit
Sterilizatör	Steri 350	Swiss Made
Ultrasonik Su Banyosu	D-77960	Julabo

3.2. Yöntem

3.2.1. Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikül Stok Çözeltisi Hazırlama

Temin edilen kuru nZVI’dan 50 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlanmak için aşağıdaki hesaplama yapılarak miktar tayini yapıldı. nZVI’nın sıvı iken oksijen ve ışık gibi etmenlerden etkilenip okside olma riski olduğu için Hesaplama yapılırken düşük miktarlarda stok çözelti hazırlandı.

$$50 \text{ mg/mL} \xrightarrow{10x} 500 \text{ mg/10mL} \xrightarrow{\frac{1}{4}} 125 \text{ mg/2,5 mL} \quad (3.1)$$

Kuru Fe⁰ NP (nZVI)'den 125 mg hassas terazide tartıldı ve 2,5 mL'lik epondorfun içine konuldu. Daha sonra kuru Fe⁰ NP (nZVI)'nin stok çözeltisi için çözücü olarak DMSO (dimetil sülfoksit) çözeltisi çeker ocakta 2,5 mL hazırlandı ve Fe⁰ NP bulunan epondorfun üzerine damla damla 2,5 ml DMSO çözeltisi eklendi. Yukarıda bahsedilen oksidasyon olayının gerçekleşmemesi için parafilm ile epondorfun ağzı kapatılıp alüminyum folyo ile kaplandı. Daha sonra ultrasonik su banyosunda 20 dk 27°C'de tutularak 50 mg/mL nZVI stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözelti kullanıma kadar oda sıcaklığında (25 °C) karanlık bir yerde muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan stoğun besiyerlerinde kullanım miktarı Tablo 3.3'teki gibi hesaplanmıştır.

Tablo 3.3: nZVI stok çözeltisinin besiyerlerinde kullanım miktarı.

Besiyeri hacmi	Stok çözeltiden alınan miktar	Besiyerinde oluşan nZVI konsantrasyonu
100 mL	100 µl	50 mg/L nZVI
100 mL	50 µL	25 mg/L nZVI
100 mL	25 µL	12,5 mg/L nZVI

3.2.2. Bitkilerin Doku Kültürü için Hazırlanması

3.2.2.1. Alev Ağacının Doku Kültürü

Tez kapsamında alev ağacının doku kültürü çalışmaları için bitki büyüme düzenleyicilerinden 6-benzilamino pürin (BAP) (1 mg/L) içeren QL besi ortamı [Quoirin and Lepoivre, 1977] kullanılmıştır. QL besi ortamına ait içerikler Tablo 3.4'te listelenmiştir.

Tablo 3.4: QL besi ortamı stok çözeltilerinin içerikleri (1L).

	Kimyasallar	QL (1mg/L)
Makro Elementler	KNO ₃	1800
	MgSO ₄ .7H ₂ O	356
	KH ₂ PO ₄	272
	NH ₄ NO ₃	400
	Ca(NO ₃). 4H ₂ O	1204
Mikro Elementler	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	MnSO ₄ .4H ₂ O	16,9
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Demir Kelatör	FeSO ₄ .7H ₂ O	55,6
	Na ₂ EDTA	74
Organik Bileşikler	Piridoksin HCl	0,5
	Tiamin-HCl	0,1
	Nikotonik Asit	0,5
	Myo-inositol	100
	Glisin	2

3.2.2.1.1. nZVI'nin Alev Ağacının *in vitro* Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi

nZVI'nin alev ağacının *in vitro* mikroçoğaltımına olan etkilerinin belirlenmesinde kullanılacak ilk besi ortamı olan 1 mg/L BAP içeren QL besi ortamı Tablo 3.5'te listelenen bileşenlerin ilgili oranlarda karıştırılması ile hazırlanmıştır. Daha sonra 121 °C'ta 20 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir.

Tablo 3.5: 1 mg/L BAP içeren QL besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler (1 L).

Bileşen adı	Miktar
Sukroz	30 g
Myo-Inositol	100 mg
Makro Elementler	56.96 ml
Mikro Elementler	10 ml
Demir Kelatör	20 ml
MS Vitamin Karışımı	1 ml
BAP (1mg/L)	1 ml
dH ₂ O	1 L'ye tamamlanacak
Agar	7 g
pH	6.0

Otoklavdan çıkan besiyerine eklenecek olan nZVI stok çözeltisi 27 °C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 15 dk boyunca inkübe edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyeri 50-55 °C sıcaklığına gelince nZVI Tablo 3.3'te belirtildiği miktarlarda aseptik koşullarda besiyeri ile bir araya getirilmiştir. 12,5 mg/L nZVI, 25 mg/L nZVI, 50 mg/L nZVI içeren ve kontrol (nZVI içermeyen) olacak şekilde gövde ucu ve nodal eksplantlar için ayrı 2 tekrarlı 4 deney grubuna eşit miktarlarda petrilere dökülerek paylaştırılmıştır. Besiyeri donduktan sonra petri streçlenerek 20-25°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Doku kültüründeki yetişkin alev ağacı bitkilerinden laminar hava akımlı steril kabinde gövde ucu ve nodal eksplantlar alınarak yukarıda belirtilen deney gruplarına her vitrovente 10 eksplant olacak şekilde yerleştirilmiştir.

Kültürler, 16/8 saat aydınlık/karanlık döngüsü ve 25 ± 2 °C sıcaklıkta programlanan bir büyütme odasında 30 gün inkübe edilmiştir ve gerekli analizler laminar hava akımlı steril kabinde aseptik koşullarda yapılmıştır. Daha sonra kültürler nZVI içermeyen 1mg/L BAP içeren QL besi ortamına (proliferasyon ortamı) aktarılmıştır. Aynı prosedür 60. ve 90. günlerde de yapılması doğrultusunda kültürler yukarıda belirtildiği koşullarda bitki büyütme odasında inkübe edilmiştir.

3.2.2.2. Şeker Otu Bitkisinin Doku Kültürü

3.2.2.2.1. Bitki Eksplantların Sterilizasyon Optimasyonu

Şeker otu bitkisi fidelerinden nodal eksplantların sterilizasyonu optimasyonu için farklı konsantrasyondaki (%1,5; %2; %2,5) çamaşır suyu (NaOCl) denemesi yapılmıştır. Bu süreçte besi ortamı olarak kullanılan MS0 [Murashige and Skoog, 1962] besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 3.6'da listelenmiştir. Optimasyon için 500 ml MS0 besiyeri hazırlanarak 121 °C'de 20 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra aseptik koşullarda her konsantrasyon grubu 2 tekrarlı olacak şekilde petrilere paylaştırılarak dökülmüştür.

Tablo 3.6: MS0 besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.

Bileşen adı	Miktar (1 L için)	Miktar (500ml için)
MS	2,2 g	1,1 g
Sükroz	20 g	10 g
Agar	7 g	3,5 g
dH ₂ O	1 L'ye tamamlanacak	500 ml'ye tamamlanacak
pH	5,8	5,8

Şeker otu bitkisi fidelerinden elde edilen nodal eksplantlar yüzey sterilizasyonu için 100 dk akan musluk altında bekletildi. Daha sonra 3 grup (%1,5; %2; %2,5 NaOCl) olacak şekilde laminar hava akımlı steril kabinde falkonlara paylaştırılarak %70'lik EtOH ile 10-15 sn muamele edildi. Ardından NaOCl ile 20 dk çalkalama yapıldı ve 3 kez 10 dk steril su ile durulama gerçekleştirildi. Daha sonra nodal eksplantlar hazırlanan MS0 besiyerine uygun gruplarına paylaştırıldı. Kültürler, 16/8 saat aydınlık / karanlık döngüsü ve 25 ± 2 °C sıcaklıkta programlanan bir büyüme odasında 15 gün inkübe edilmiştir ve gerekli analizler yapılmıştır.

3.2.2.2.2. BAP Konsantrasyon Optimasyonu

Şeker otu bitkisinden BAP konsantrasyon optimasyonu için farklı konsantrasyonlardaki (1; 2; 4 mg/L) BAP içeren 500ml MS besi ortamı hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 3.7’de listelenmiştir.

Tablo 3.7: Farklı konsantrasyonlardaki (1; 2; 4 mg/L) BAP içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.

Bileşen adı	Miktar (1 L için)	Miktar (500ml için)
MS	2,2 g	1,1 g
Sükroz	20 g	10 g
Her besiyeri için farklı konsantrasyondaki BAP	BAP (1mg/L) için 1 ml	BAP (1mg/L) için 500 µl
	BAP (2mg/L) için 2 ml	BAP (2mg/L) için 1 ml
	BAP (4mg/L) için 4 ml	BAP (4mg/L) için 2 ml
dH ₂ O	1 L’ye tamamlanacak	500 ml’ye tamamlanacak
Agar	7 g	3,5 g

Şeker otu bitkisinden nodal eksplantlar alınarak optimasyon sonucu oluşturulan protokol doğrultusunda sterilizasyon işlemi yapıldı. Daha sonra laminar hava akımlı steril kabinde (1; 2; 4 mg/L) BAP içeren MS ortamına aseptik koşullarda aktarıldı.

Kültürler, 16/8 saat aydınlık/karanlık döngüsü ve 25 ± 2 °C sıcaklıkta programlanan bir büyütme odasında 30 gün inkübe edilmiş ve gerekli analizler yapılmıştır.

3.2.2.2.3. nZVI’nın Şeker Otu Bitkisinin *in vitro* Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Gerekli optimizasyonlar sonucu uygun besiyerine eklenecek olan nZVI stok çözeltisi 27°C’ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 15 dk boyunca inkübe edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyeri 50-55 °C sıcaklığına gelince nZVI Tablo 3.3’te belirtildiği miktarlarda aseptik koşullarda besiyeri ile bir araya getirilmiştir. 12,5 mg/L nZVI, 25 mg/L nZVI, 50 mg/L nZVI içeren ve kontrol (nZVI içermeyen) olacak şekilde nodal eksplantlar için 2 tekrarlı 4 deney grubuna eşit miktarlarda

vitroventlere dökülerek paylaştırılmıştır. Besiyeri donduktan sonra ağzı streçlenerek 20-25 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Şeker otundan alınan eksplantlar, optimasyon sonucunda uygun görülen sterilizasyon işlemi yapıldı ve laminar hava akımlı steril kabinde aseptik koşullarda farklı konsantrasyonda nZVI ve 2 mg/L BAP içeren MS içeren besi ortamlarına her vitrovente 10 eksplant olacak şekilde yerleştirilmiştir.

Kültürler, 16/8 saat aydınlık/karanlık döngüsü ve 25 ± 2 °C sıcaklıkta programlanan bir büyütme odasında 30 gün inkübe edilmiştir ve gerekli analizler laminar hava akımlı steril kabinde aseptik koşullarda yapılmıştır. Daha sonra kültürler nZVI içermeyen 2mg/L BAP içeren MS besi ortamına (proliferasyon ortamı) aktarılmıştır. Aynı prosedür 60 ve 90. günlerde de yapılması doğrultusunda kültürler yukarıda belirtildiği koşullarda bitki büyütme odasında inkübe edilmiştir.

3.2.2.3. Tütün Bitkisinin Doku Kültürü

3.2.2.3.1. Tütün Bitkisinin Çimlendirilmesi

Tütün bitkisine ilk olarak yüzey sterilizasyon işlemleri yapılmıştır. Sterilizasyon için $\frac{1}{2}$ MS besi ortamı hazırlanmasında kullanılan bileşenler Tablo 3.8’de listelenmiştir. Çimlendirme için 500 ml $\frac{1}{2}$ MS besi ortamı hazırlanarak 121°C’de 20 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir.

Tablo 3.8: $\frac{1}{2}$ MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.

Bileşen adı	Miktar (1 L için)	Miktar (500ml için)
MS	1,5 g	750 mg
Sükroz	20 g	10 g
Gelrite	3 g	1,5 g
dH ₂ O	1 L’ye tamamlanacak	500 ml’ye tamamlanacak
pH	5,8	5,8

Sterilizasyon için ilk önce hassas tartıda 4,5 mg tütün tohumu tartılarak bir ependorfun içine koyuldu. Daha sonra laminar hava akımlı steril kabinde aseptik koşullarda ependorfun içine önce 700 µl dH₂O sonra 300 µl NaClO ilave edilerek

20 dk çalkalandı. Ardından 3 kez 5 dk steril su ile durulama gerçekleştirildi ve tohumlar filtre kağıdının üzerine alınarak steril ½ MS ortamı içeren petri kaplarının merkezine yan yana ekilmiştir.

Tohumlar 4 °C sıcaklıkta 3 gün boyunca karanlıkta bekletilmiştir. 3. günün sonunda petri kapları 16/8 saat aydınlık/karanlık döngüsü ve 25 ± 2 °C sıcaklıkla programlanan bir bitki büyüme odasına alınarak 15 gün inkübe edilmiştir.

3.2.2.3.2. nZVI'nın Tütün Bitkisinin *in vitro* Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi

nZVI'nın tütün bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımına olan etkilerinin belirlenmesinde kullanılacak besi ortamı olan 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L naftalen asetik asit (NAA) içeren MS besi ortamı Tablo 3.9'da listelenen bileşenlerin ilgili oranlarda karıştırılması ile hazırlanmıştır. Daha sonra 121 °C'de 20 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir.

Tablo 3.9: 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamının hazırlanmasında kullanılan bileşenler.

Bileşen adı	Miktar (1 L için)
MS	2,2 g
Sükroz	20 g
Gelrite	3 g
BAP (1mg/L)	1 ml
NAA (1mg/L)	1 ml
dH ₂ O	1 L'ye tamamlanacak
pH	5,8

1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS ortamına eklenecek olan nZVI stok çözeltisi 27 °C'ye ayarlanmış ultrasonik su banyosunda 15 dk boyunca inkübe edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyeri 50-55 °C sıcaklığına gelince nZVI Tablo 3.3'te belirtildiği miktarlarda aseptik koşullarda besiyeri ile bir araya getirilmiştir. 12,5 mg/L nZVI, 25 mg/L nZVI, 50 mg/L nZVI içeren ve kontrol (nZVI içermeyen) olacak şekilde 2 tekrarlı 4 deney grubuna eşit miktarlarda vitroventlere dökülerek

paylaştırılmıştır. Besiyeri donduktan sonra ağzı streçlenerek 20-25°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

15 günlük inkübasyon sonucunda oluşan tütün bitkiciklerinden aseptik koşullarda laminar hava akımlı steril kabinde yaprak eksplantı alındı. Daha sonra yapraklar farklı konsantrasyonlarda nZVI (12.5; 25; 50 mg/L) ve 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamı bulunan vitroventlere her birinde 10 eksplant olacak şekilde yerleştirilmiştir.

Kültürler, 16/8 saat aydınlık/karanlık döngüsü ve 25 ± 2 °C sıcaklıkta programlanan bir büyütme odasında 30 gün inkübe edilmiştir ve gerekli analizler laminar hava akımlı steril kabinde aseptik koşullarda yapılmıştır. Daha sonra kültürler nZVI içermeyen 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamına (rejenerasyon ortamı) aktarılmıştır. Aynı prosedür 60 ve 90. günlerde de yapılması doğrultusunda kültürler yukarıda belirtildiği koşullarda bitki büyütme odasında inkübe edilmiştir.

3.2.3. Ölçüm ve Analizler

Farklı konsantrasyonlarda nZVI (12.5; 25; 50 mg/L) ile;

- 1 mg/L BAP içeren QL besi ortamına aktarılan alev ağacı alınan gövde ucu ve nodal eksplantlarından oluşan gövde proliferasyonu (%), eksplant başına oluşan gövde sayısı ve ortalama gövde boyu (mm);
- 1 mg/L BAP içeren MS besi ortamına aktarılan şeker otu bitkisinin nodal eksplantlarından oluşan gövde proliferasyonu (%), eksplant başına oluşan gövde sayısı ve ortalama gövde boyu (mm);
- 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besi ortamına aktarılan tütün bitkisinin yaprak eksplantlarından oluşan gövde proliferasyon yüzdesi, köklenme yüzdesi, gövde başına oluşan kök sayısı ve kök uzunluğu eksplant başına oluşan gövde sayısı ve ortalama gövde boyu (mm)

gibi veriler 25 ± 2 °C sıcaklık ve 16/8 saat aydınlık/karanlık döngüsü koşullar altında 30, 60 ve 90 gün kültürlenme sonrası kaydedilmiştir.

Her bir deneme en az 10 eksplant ile 2 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Bunun yanı sıra, gövde oluşturma kapasitesi (G.O.K. indeksi) Lambardi ve arkadaşlarının 1993 yılında rapor ettikleri formüle göre aşağıda verildiği gibi hesaplanmıştır.

$$\text{GOK indeksi} = \frac{\text{Çoğalan Eksplantların Prolifasyon Rejenerasyon Yüzdesi} \times \text{Eksplant Başına Oluşan Ortalama Mikrogövde Sayısı}}{100} \quad (3.2)$$

Tez kapsamında yapılan istatistiksel analizler Descriptive istatistik testi ile SPSS 25 yazılımı kullanılarak yapıldı. Farklı verilerin karşılaştırılması için varyans analizleri (ANOVA) takiben ortalamaları karşılaştırmak için $P \leq 0.05$ olacak şekilde anlamlı en az farklılık (LSD) testi kullanıldı.

4. SONUÇLAR

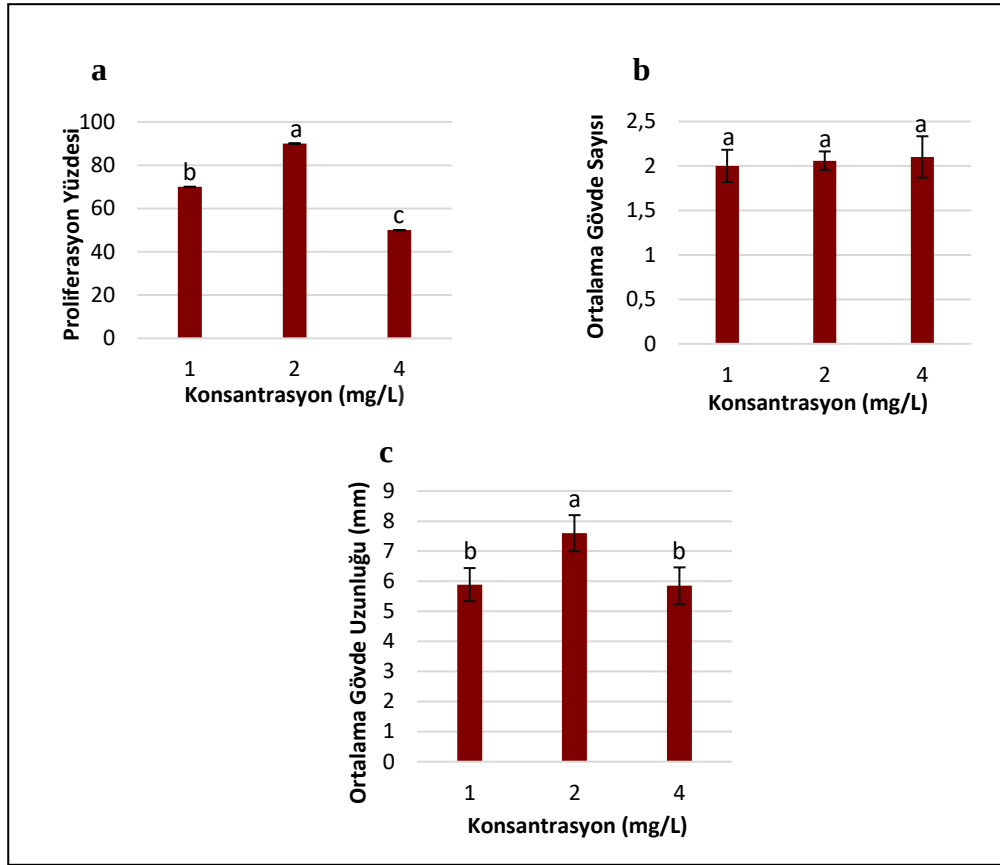
4.1. Bitki Materyallerinin nZVI Denemeleri için Hazırlanması

4.1.1. Şeker Otu Bitkisi için BAP konsantrasyon Optimasyonu

Şeker otu bitkisinin nodal eksplantlarının sterilizasyon işleminden sonra; 1 mg/L, 2 mg/L ve 4 mg/L BAP içeren MS besi ortamı bulunan her konsantrasyonda 2 tekrarlı olması şartıyla her petri kabına 10, toplamda 60 tane nodal eksplant ekildi.

30 günlük inkübasyon sonrasında nodal eksplantların proliferasyon oranı (%), oluşan gövde sayısı ve oluşan gövdenin uzunlukları hesaplanarak analiz edildi. 30 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.1 ve Tablo 4.1’de verilmiştir.

Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına ve görüntülere göre; eksplantların proliferasyon yüzdesi incelendiğinde 2 mg/L BAP içeren besi ortamının diğer konsantrasyonlara göre istatistiksel olarak daha çok proliferasyon gösterdiği görülmüştür. Buna göre 2 mg/L BAP içeren besi ortamı proliferasyona, diğer konsantrasyonlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olumlu bir etkisi olduğu diğer konsantrasyonların ise nodal eksplantların proliferasyonuna anlamlı olumsuz bir etkisi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1a). Nodal eksplantların gövde/eksplant oranı incelendiğinde sırasıyla 2; 2,05; 2,1 ortalamaya sahip olduğu görülmüştür. En yüksek ortalamaya 4 mg/L BAP içeren besi ortamı sahip olsa da istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı olumlu veya olumsuz bir fark görülmemiştir (Şekil 4.1b). Eksplantlardan oluşan gövdelerin ortalama boyları incelendiğinde en yüksek ortalama 7,6 ile 2 mg/L BAP içeren besi ortamında olduğu, diğer grupların 5,88 (1 mg/L BAP) ve 5,85 (4 mg/L BAP) ortalamaya sahip olduğu görülmüştür. Buna göre 2 mg/L BAP içeren besi ortamı diğer konsantrasyonlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olumlu bir etkisi olduğu görülmüştür (Şekil 4.1c).



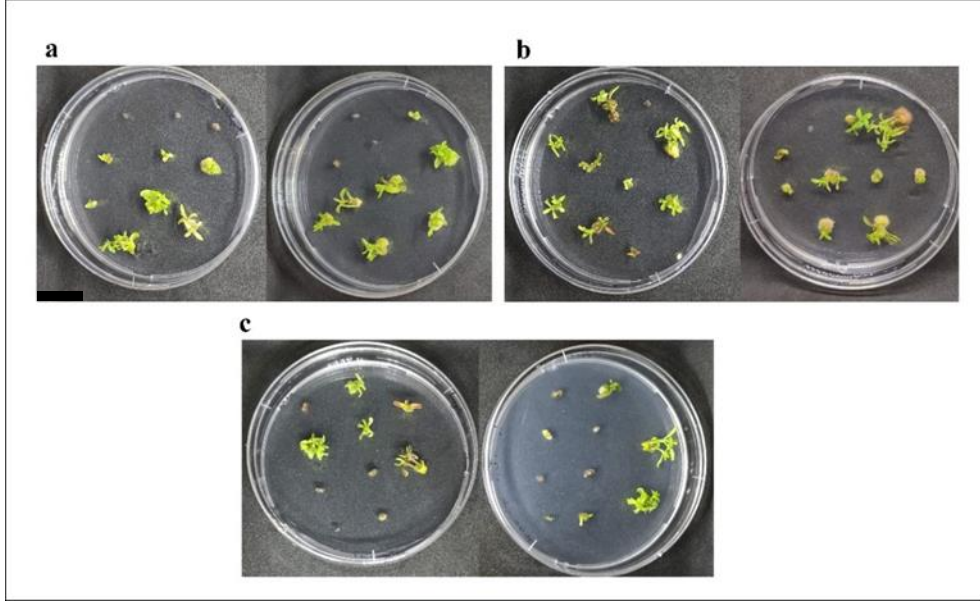
Şekil 4.1: Farklı BAP konsantrasyonların şeker otu nodal eksplantlarına 30 günlük etki grafikleri.

Tablo 4.1: Farklı BAP konsantrasyonların, 30 gün sonrası eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.

BAP Konsantrasyonu	G.O.K değeri
1 mg/L	1,4
2 mg/L	1,85
4 mg/L	1,05

Eksplantların G.O.K indekslerine bakıldığında 2 mg/L BAP içeren besi ortamında 1,85 oranla en yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. Konsantrasyon artıkça G.O.K oranı artıyor olsa da yüksek konsantrasyonda bu oranın düştüğü görülmektedir (Tablo 4.1).

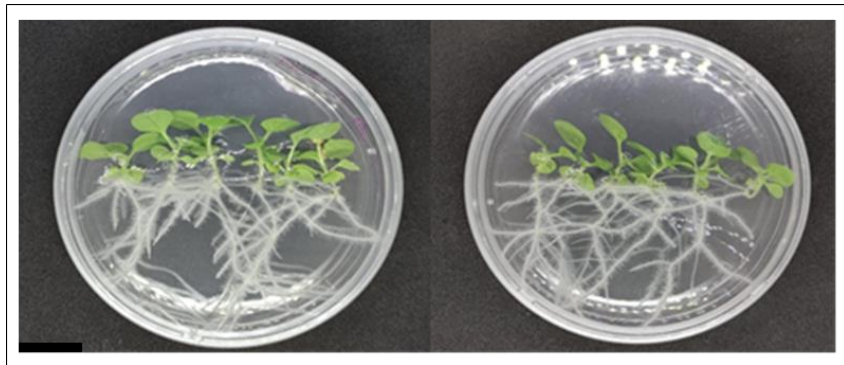
Farklı konsantrasyonda BAP içeren gruplara ait nodal eksplantların 30 gün inkübasyon sonrası proliferasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.2’de sunulmuştur.



Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlarda BAP içeren besi ortamında şeker otu nodal eksplantların 30 gün sonrası değişimi. a: 1 mg/L BAP grubu, b: 2 mg/L BAP grubu, c: 4 mg/L BAP grubu. (Bar 1 cm).

4.1.2. Tütün Bitkisinin Çimlendirilmesi

Tütün bitkisinin nZVI ile muamelesi için kullanılacak yaprak eksplantları bitkinin çimlendirilmesi sonucunda oluşan bitkiciklerden elde edildi. Tütün tohumları yöntemde anlatıldığı gibi yüzey sterilizasyonu yapıldı ve ½ MS besi ortamı içeren petri kaplarının merkezine yan yana 8'er tane yerleştirilmiştir. Petrilerin 4 °C 'te 3 gün karanlıkta bekletilmesinden sonra 25 ± 2 °C'te 15 gün aydınlıkta dikey olarak yapılan inkübasyon sonucu oluşan bitkiciklerin birkaçı Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3: Çimlendirilen tütün tohumlarının 15 gün sonrası görüntüleri. (Bar 5 cm).

4.2. nZVI'nın İlgili Bitkilerin *in vitro* Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi

4.2.1. nZVI'nın Alev Ağacı Bitkisinin *in vitro* Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında alev ağacı bitkisinin eksplant olarak gövde ucu ve nodal eksplantları kullanılmıştır. Eksplantlara 30, 60 ve 90 gün inkübasyon sonucunda aşağıda detaylandırılan parametrelere bakıp istatistiksel analiz ve fotoğraflanma yapılmıştır. Aseptik koşullarda alınan gövde ucu ve nodal eksplantlar her ikisinden de 2 tekrarlı, her petri kabına 10 tane eksplant olacak şekilde; 12,5 mg/L nZVI, 25 mg/L nZVI, 50 mg/L nZVI içeren besi ortamına ve kontrol (nZVI içermeyen) grubuna yerleştirilmiştir.

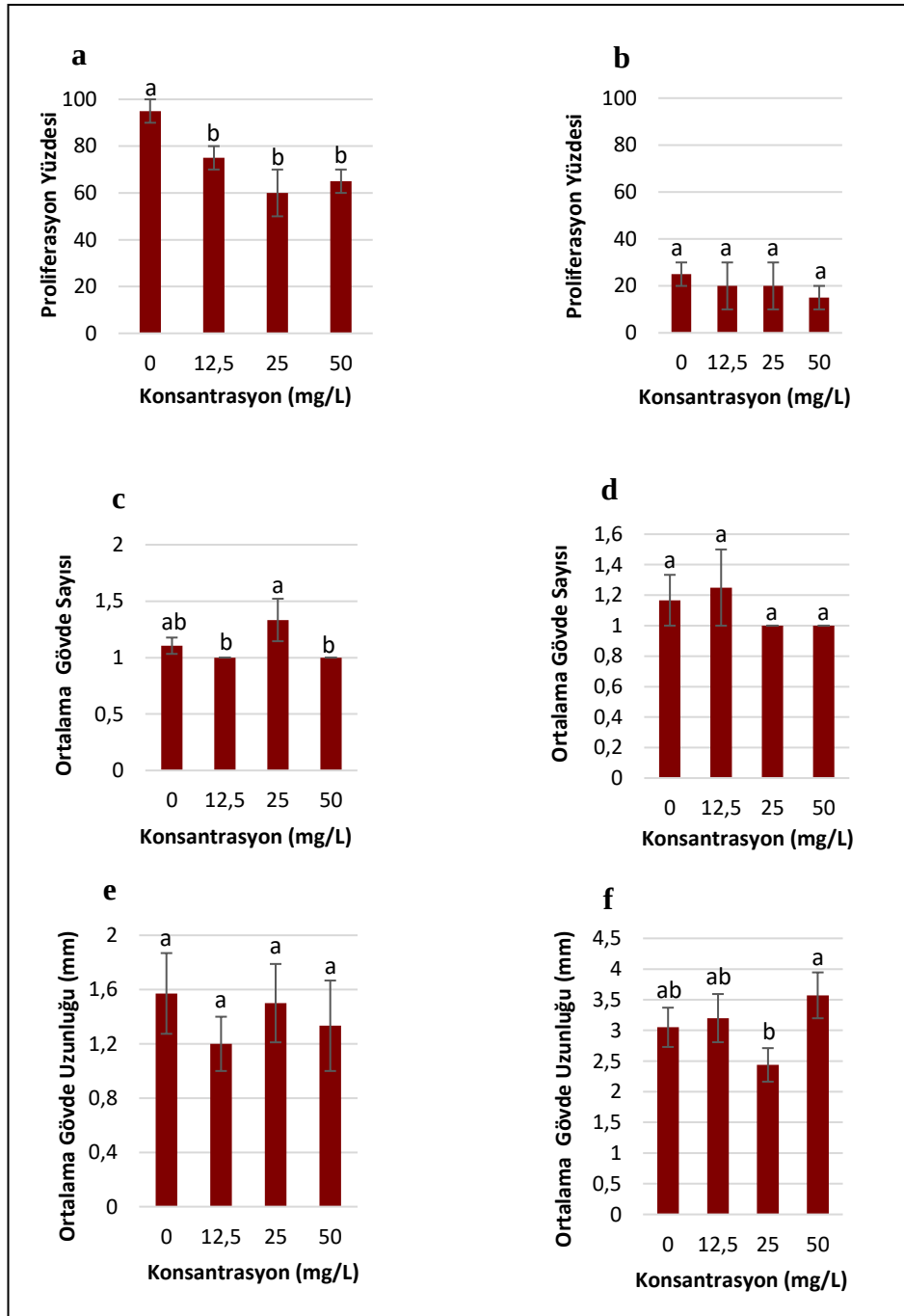
30 gün inkübasyon sonucunda gövde ucu ve nodal eksplantların proliferasyon oranı (%), oluşan gövde sayısı ve oluşan gövdenin uzunlukları hesaplandı ve fotoğraflandı. Bitkinin 30 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.2'de ve Şekil 4.4'te sunulmuştur. 30 gün sonrasında tüm gruplar nZVI'sız 1 mg/L BAP içeren QL besi ortamına aktarılarak alt kültürlenmiş ve nZVI'nın olası toksisitesinin önüne geçilmiştir. 60 ve 90. günde de 30. günde yapılan aşamalar tekrarlanmıştır.

Tablo 4.2: Farklı nZVI konsantrasyonların, 30 gün sonrası gövde ucu ve nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.

nZVI Konsantrasyonu	Gövde ucu eksplantlarının G.O.K değeri	Nodal Eksplantların G.O.K değeri
Kontrol	1,05	0,29
12,5 mg/L	0,75	0,25
25 mg/L	0,79	0,20
50 mg/L	0,65	0,15

Gövde ucu eksplantların 30 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında kontrol grubunun 1,05 oranla en yüksek değere sahip olduğu ve benzer şekilde nodal eksplantlarda da en yüksek değer 0,29 oranla kontrol grubuna ait olduğu

görülmüştür (Tablo 4.2). Konsantrasyon arttıkça nZVI'nın eksplantlara olan negatif etkisinin arttığı görülmüştür.



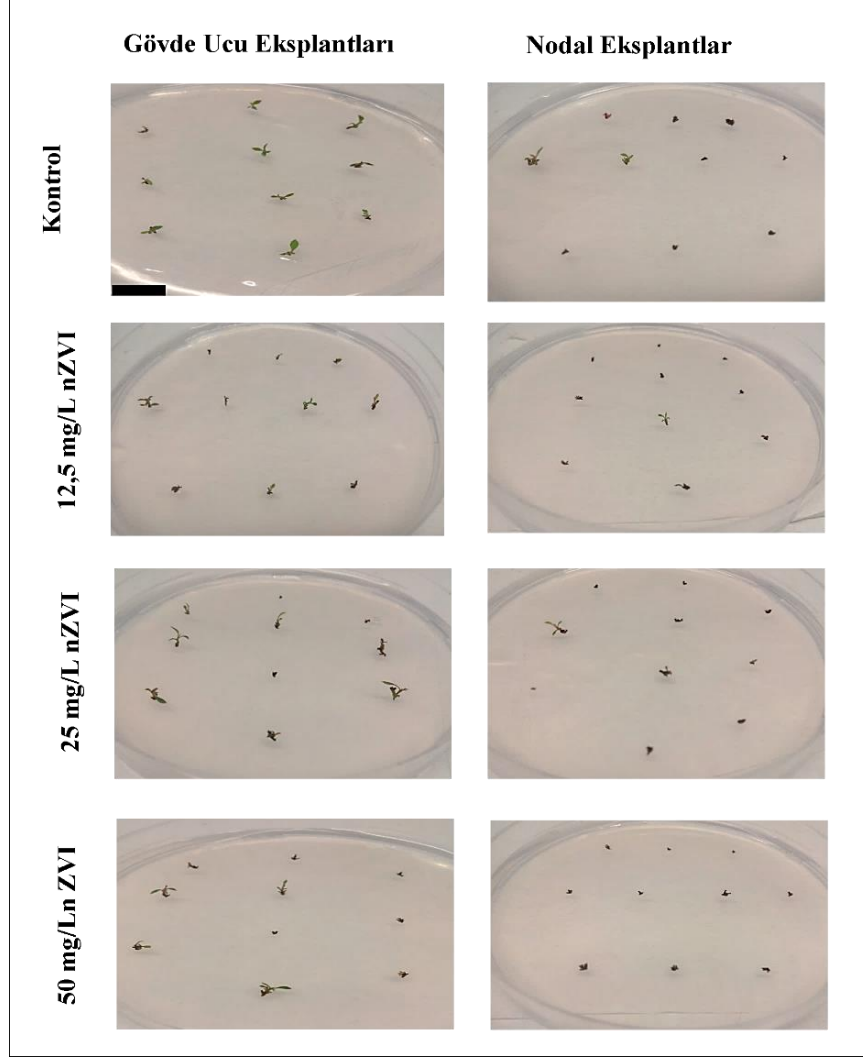
Şekil 4.4: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın alev ağacı nodal ve gövde ucu eksplantlarına olan 30 günlük etkisinin grafikleri. Gövde ucu eksplantlarına ait veriler a,c,e; nodal eksplantlarına ait veriler b,d,f.

30 günlük proliferasyon verileri incelendiğinde gövde ucu eksplantlarının en yüksek proliferasyon yüzdesi %95 ile kontrol grubunda görülmüştür. Konsantrasyon artıkça proliferasyon yüzdesinin azaldığı ve nZVI'nın gövde ucu eksplantlarına istatistiksel olarak anlamlı negatif etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.4a). Nodal eksplantlarda gövde ucuna göre daha az proliferasyon görülmüştür. Nodal eksplantların kontrol grubu %25'lik bir proliferasyon yüzdesine sahiptir. Bu oranı %20 oranla 12,5 mg/L ve 25 mg/L grubu takip etmekte ve en az proliferasyon oranı %15 ile 50 mg/L grubunda görülmüştür. Ancak konsantrasyon artıkça proliferasyon yüzdesi düşüyor olsa da nZVI'nın nodal eksplantların proliferasyonuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.4b).

30 günlük oluşan ortalama gövde/eksplant oranı incelendiğinde gövde ucu eksplantlarında en yüksek değer 1,3 ortalama ile 25 mg/L nZVI içeren gruba aittir. Konsantrasyon artıkça ortalama değer azalıyor olarak görülse de nZVI'nın gövde ucu eksplantların gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.4c). Nodal eksplantlarda ortalama gövde/eksplant oranı sırasıyla 1,16; 1,25; 1,1 şeklinde. En yüksek değer 12,5 nZVI grubunda görülmüştür ve konsantrasyon artıkça ortalama değer azalıyor olarak görülse de istatistiksel olarak nZVI'nın nodal eksplantların gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.4d).

30 günlük oluşan gövdelerin uzunluk verileri incelendiğinde gövde ucu eksplantlarının en yüksek ortalamanın 3,5 ile 50 mg/L grubunda olduğu görülmüştür. Onu 3,2 ortalama ile 12,5 mg/L; 3 ortalama ile kontrol ve 2,4 ortalama ile 25 mg/L grubu izlemektedir. En yüksek ortalamanın 50 mg/L nZVI içeren grupta olduğu görülse de istatistiksel olarak nZVI'nın gövde ucu eksplantların gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.4e). Nodal eksplantlarda ortalama gövde uzunluk verileri incelendiğinde en yüksek ortalama 1,57 ile kontrol grubunda görülmüştür. Ortalamanın konsantrasyon artıkça artışı gözlemse de yüksek konsantrasyonda ortalamanın azaldığı görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak nZVI'nın nodal eksplantların gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.4f).

İlgili gruplara ait nodal ve gövde ucu eksplantların 30 gün sonrası proliferasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.5'te sunulmuştur.



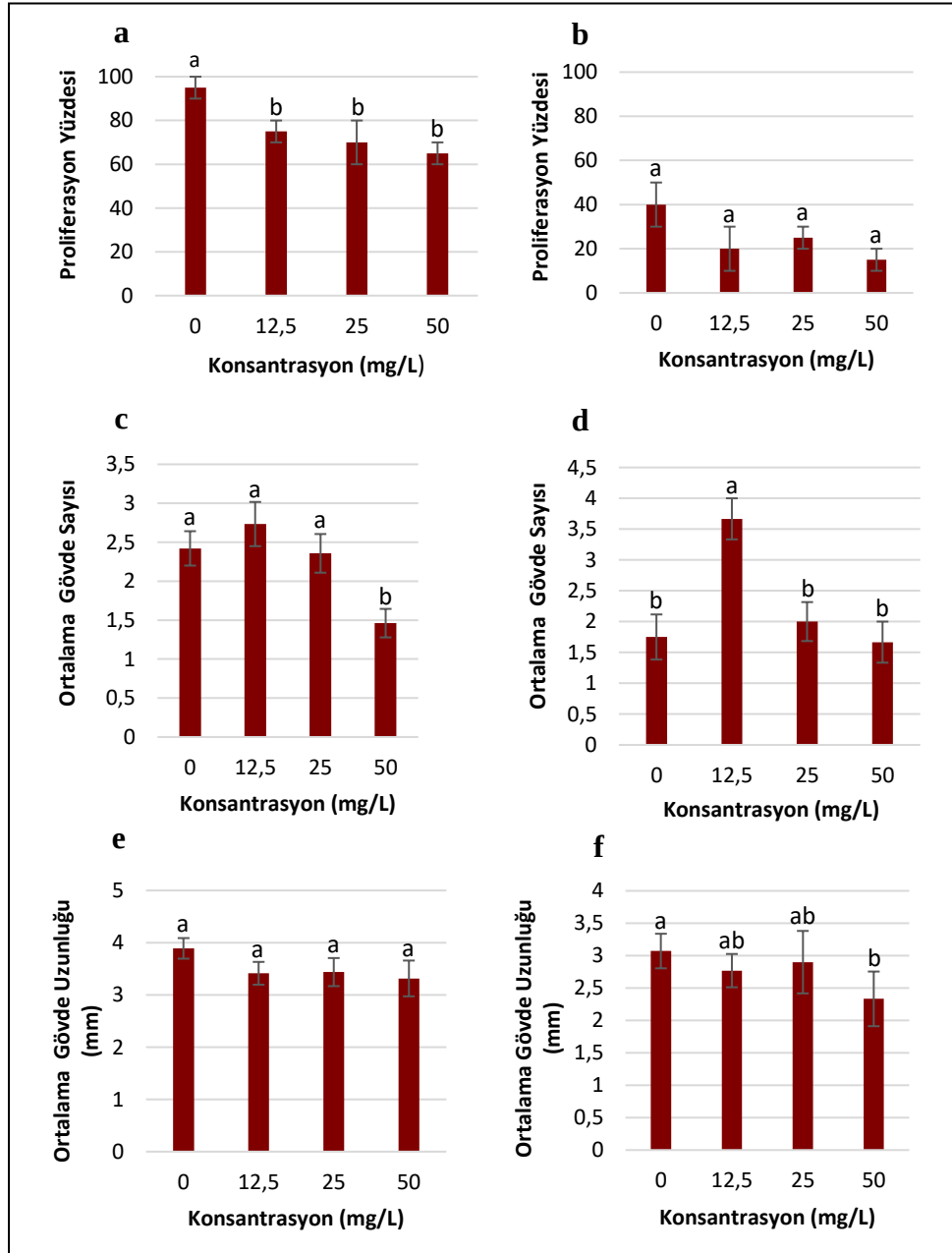
Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında alev ağacı gövde ucu ve nodal eksplantların 30 gün sonrası değişimi. (Bar 1cm).

Bitkinin 60 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.3'te ve Şekil 4.6'da sunulmuştur.

Tablo 4.3: Farklı nZVI konsantrasyonların, 60 gün sonrası gövde ucu ve nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.

nZVI Konsantrasyonu	Gövde ucu eksplantlarının G.O.K değeri	Nodal Eksplantların G.O.K değeri
Kontrol	2,3	0,70
12,5 mg/L	2,04	0,73
25 mg/L	1,64	0,5
50 mg/L	0,95	0,25

Gövde ucu eksplantların 60 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında kontrol grubunun 2,3 oranla en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. Nodal eksplantlarda en yüksek değerin 0,73 oranla 12,5 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür (Tablo 4.3). Konsantrasyon arttıkça nZVI'nın gövde ucu eksplantlarının gövde oluşturma kapasitesine negatif bir etkisi olduğu ancak nodal eksplantlarda düşük konsantrasyonlarda pozitif bir etkisinin olduğu görülmüştür.



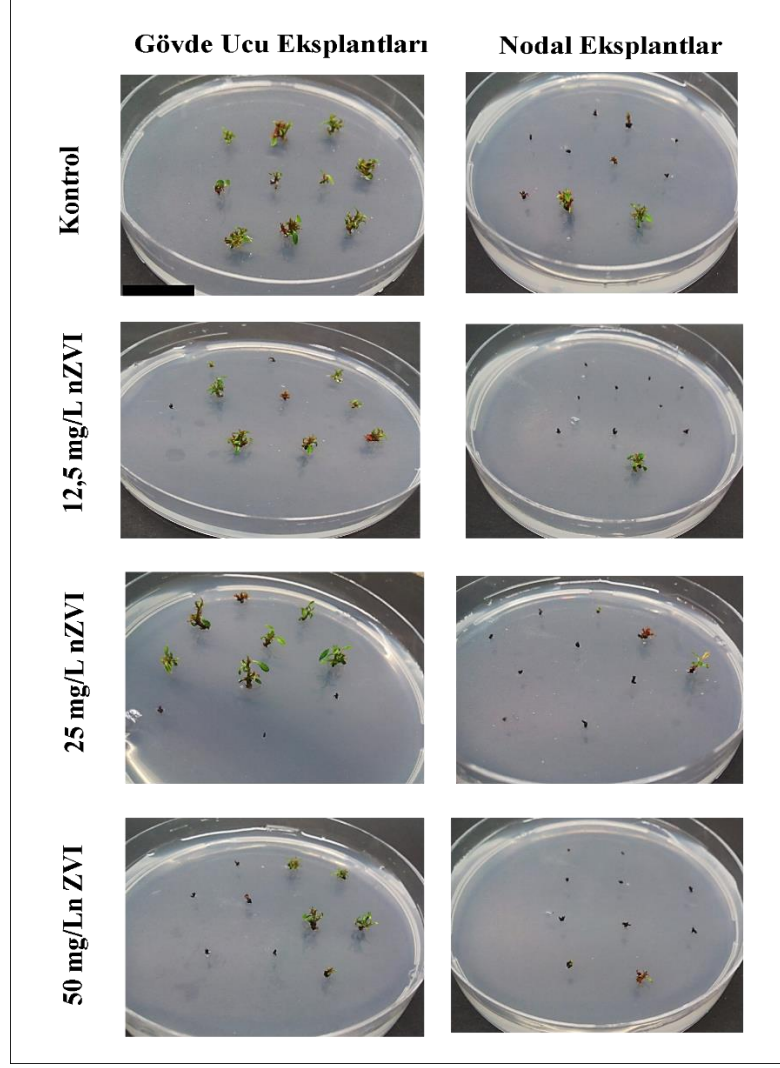
Şekil 4.6: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın alev ağacı nodal ve gövde ucu eksplantlarına olan 60 günlük etkisinin grafikleri. Gövde ucu eksplantlarına ait veriler a,c,e; nodal eksplantlarına ait veriler b,d,f.

60 günlük proliferasyon verileri incelendiğinde gövde ucu eksplantlarının proliferasyon yüzdesi en yüksek %95 ile kontrol grubunda, kontrole en yakın oran %75 ile 12.5mg/L grubunda görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça proliferasyon yüzdesinin azaldığı ve nZVI'nın gövde ucu eksplantlarının proliferasyonuna istatistiksel olarak anlamlı negatif bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.6a). Nodal eksplantların kontrol grubu %40'lık proliferasyon yüzdesine sahip iken bu oranı %25 oranla 25 mg/L ve %20 oranla 12,5 mg/L grubu takip etmekte ve en az proliferasyon oranı %15 ile 50 mg/L nZVI içeren grupta görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça proliferasyon yüzdesinin azaldığı görülse de nZVI'nın nodal eksplantların proliferasyonuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.6b).

60 günlük oluşan gövde ucu eksplantların gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek ortalama 2,7 ile 12,5 mg/L grubunda görülmüştür ve konsantrasyon arttıkça ortalamanın azaldığı görülmüştür. 50 mg/L nZVI içeren grubunun gövde ucu eksplantların gövde sayısına istatistiksel olarak anlamlı olumsuz bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.6c). Nodal eksplantlarda en yüksek ortalama gövde/eksplant oranı 3,6 ile 12,5 mg/L nZVI içeren grupta görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça ortalamanın azaldığı görülmüştür. Ancak 12,5 mg/L nZVI'nın nodal eksplantların gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak olumlu bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.6d).

60 günlük oluşan gövdelerin uzunluk verileri incelendiğinde gövde ucu eksplantlarında en yüksek ortalamanın 3,8 ile kontrol grubunda olduğu görülmüştür. Onu 3,43 ortalama ile 12,5 mg/L, 3,4 ortalamayla 25 mg/L ve 3,3 ortalamayla 50 mg/L grubu izlemektedir. Konsantrasyon arttıkça ortalamanın azaldığı görülse de nZVI'nın gövde ucu eksplantların gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.6e). Nodal eksplantlarda kontrol grubunun 3.07 oranını ile en yüksek ortalamaya sahip olduğu görülmüştür. 12,5 mg/L 2,7; 25 mg/L 2,9 ortalama ile kontrole yakın değerlere sahipken 50 mg/L 2,3 ortalamayla en düşük değere sahiptir. nZVI'nın nodal eksplantların gövde uzunluğuna yüksek konsantrasyonda (50 mg/L) istatistiksel olarak olumsuz bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.6f).

İlgili gruplara ait nodal ve gövde ucu eksplantların 60 gün sonrası proliferasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.7'de sunulmuştur.



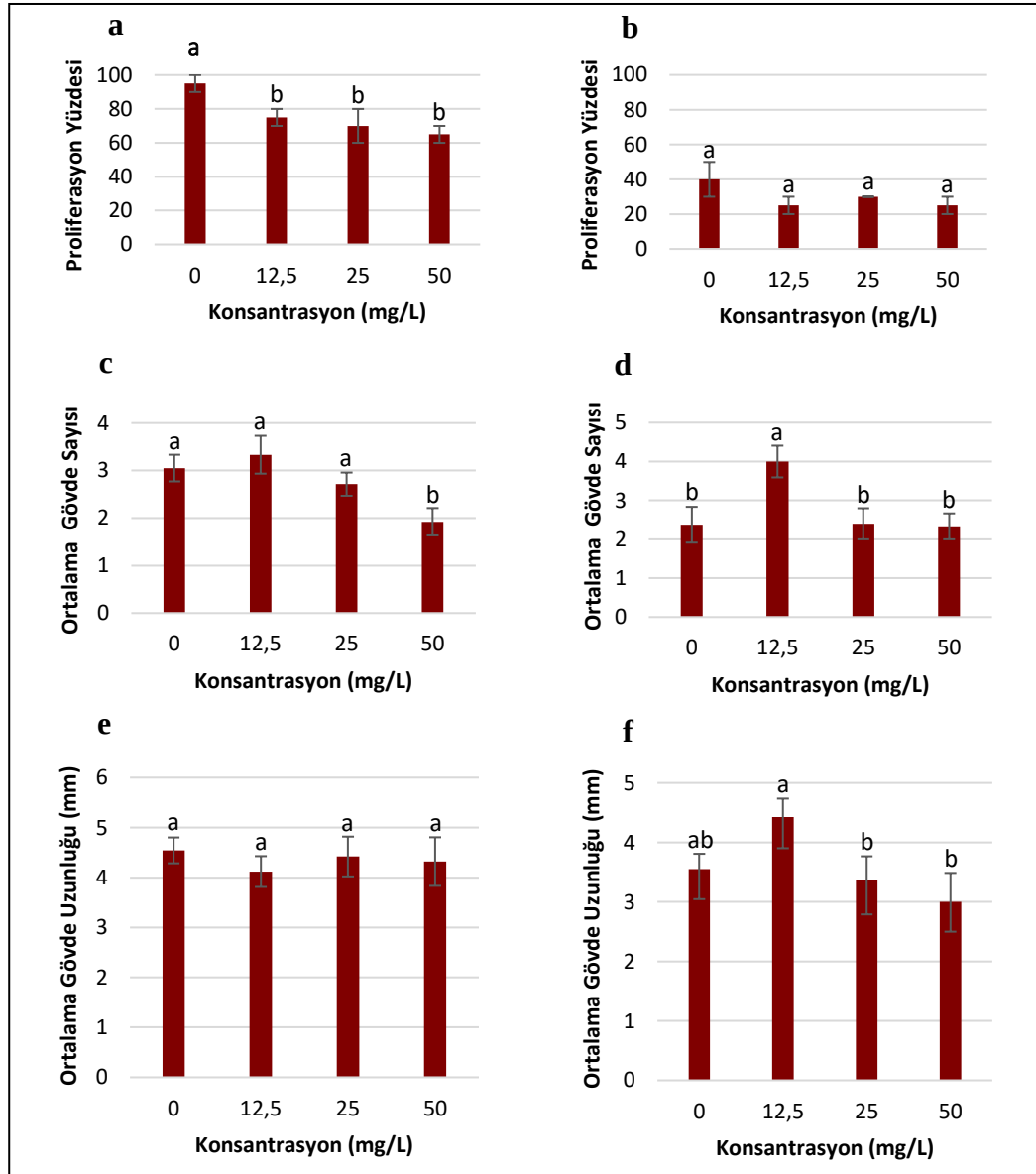
Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında alev ağacı gövde ucu ve nodal eksplantların 60 gün sonrası değişimi. (Bar 1cm).

Bitkinin 90 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.4'te ve Şekil 4.8'de sunulmuştur.

Tablo 4.4: Farklı nZVI konsantrasyonlarının, 90 gün sonrası gövde ucu ve nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.

nZVI Konsantrasyonu	Gövde ucu eksplantlarının G.O.K değeri	Nodal Eksplantların G.O.K değeri
Kontrol	2,9	0,95
12,5 mg/L	2,49	1
25 mg/L	1,89	0,72
50 mg/L	1,24	0,58

Gövde ucu eksplantların 90 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında kontrol grubunun 2,9 oranla en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. Nodal eksplantlarda en yüksek değer 1 ortalama ile 12,5 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür (Tablo 4.3). Konsantrasyon arttıkça nZVI'nın gövde ucu eksplantlarının gövde oluşturma kapasitesine negatif bir etkisi olduğu ancak nodal eksplantlarda düşük konsantrasyonda (12,5 mg/L) pozitif bir etkisinin olduğu görülmüştür.



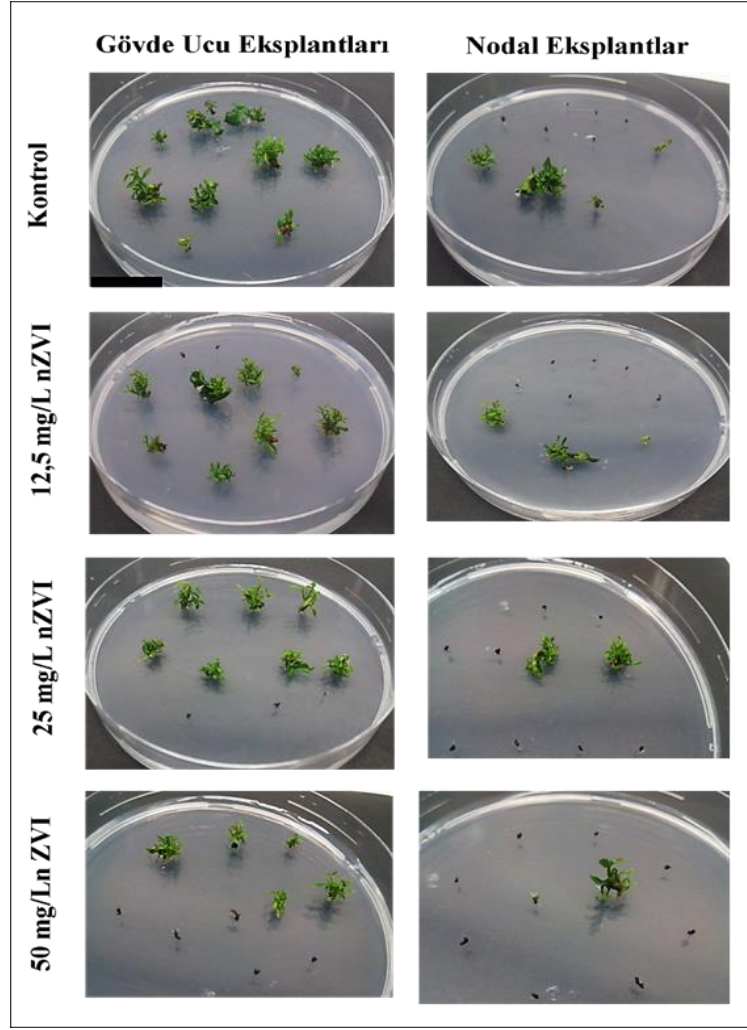
Şekil 4.8: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın alev ağacı nodal ve gövde ucu eksplantlarına olan 90 günlük etkisinin grafikleri. Gövde ucu eksplantlarına ait veriler a,c,e; nodal eksplantlarına ait veriler b,d,f.

90 günlük proliferasyon verileri incelendiğinde gövde ucu eksplantlarının proliferasyon yüzdesinin son 30 günde değişmediği ve konsantrasyon artıkça nZVI'nın oluşturduğu olumsuz etkinin aynı kaldığı görülmüştür (Şekil 4.8a). Nodal eksplantların kontrol grubu %40'lık proliferasyon yüzdesine sahip iken bu oranı %30 oranla 25 mg/L ve %25 oranla 12,5 mg/L ve ile 50 mg/L nZVI içeren grup takip ettiği görülmüştür. Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda proliferasyon yüzdesinin azaldığı görülse de nZVI'nın nodal eksplantların proliferasyonuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.8b).

90 günlük gövde ucu eksplantlarının gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oran 3,3 ile 12,5 mg/L grubuna ait olduğu görülmüştür. Kontrol grubu 3,3 orana, 25 mg/L grubu 2,6 orana sahipken en düşük ortalama 1,9 ile 50 mg/L grubunda görülmüştür. Konsantrasyon artıkça nZVI'nın, gövde ucu eksplantlarının gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumsuz bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.8c). Nodal eksplantların gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oranın 4 ortalama ile 12,5 mg/L grubunda görülmüştür. Diğer grupların oranlarının birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Nodal eksplantlarının gövde/eksplant oranına 12,5 mg/L nZVI içeren grubun istatistiksel olarak anlamlı olumlu bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.8d).

90 günlük oluşan gövdelerin ortalama uzunluk verileri incelendiğinde gövde ucu eksplantlarında en yüksek ortalamanın 4,1 ile kontrol grubunda olduğu görülmüştür. Onu 3,2 ortalama ile 12,5 mg/L, 2,9 ortalamayla 25 mg/L ve 1,6 ortalamayla 50 mg/L grubu izlemektedir. nZVI'nın gövde ucu eksplantların ortalama gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.8e). Nodal eksplantlarda ortalama gövde uzunluk verileri incelendiğinde 12,5 mg/L nZVI içeren grup dışındakidiğer grupların birbirine çok yakın ortalama uzunluğa sahip oldukları görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça ortalamanın arttığı görülse de nZVI'nın nodal eksplantların ortalama gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.8f).

İlgili gruplara ait nodal ve gövde ucu eksplantların 90 gün sonrası proliferasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.9'da sunulmuştur.



Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında alev ağacı gövde ucu ve nodal eksplantların 90 gün sonrası değişimi. (Bar 1cm).

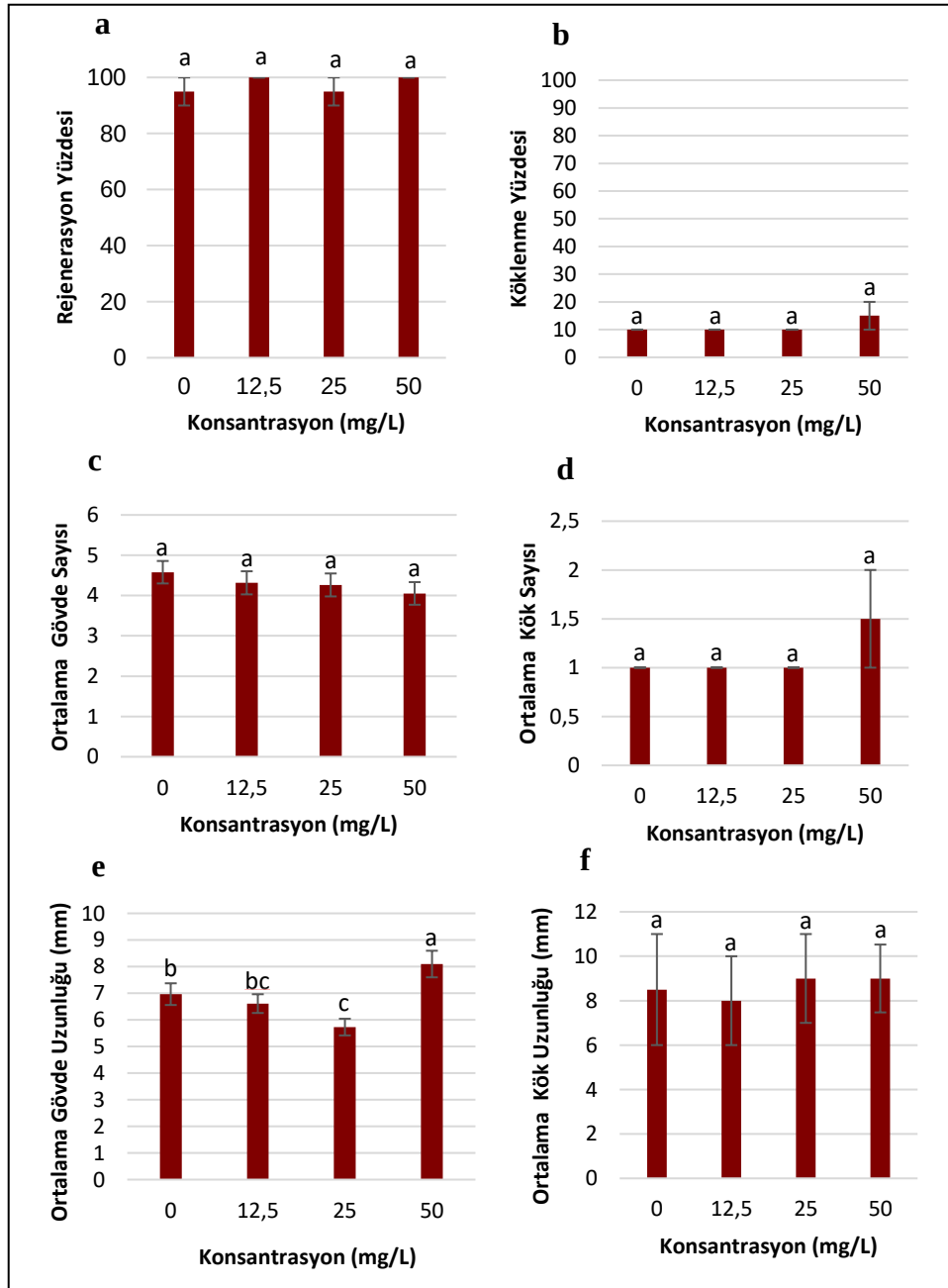
4.2.2. nZVI'nın Tütün Bitkisinin *in vitro* Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında tütün bitkisinin eksplant olarak yaprak eksplantları kullanılarak organogenez gerçekleştirilmiştir. Eksplantların 30, 60 ve 90. gün inkübasyon sonucunda aşağıda detaylandırılan parametrelere bakılarak istatistiksel analizi yapılmıştır. Aseptik koşullarda 15 günlük tütün bitkiciklerinin yaprak eksplantları küçükse 2, büyükse 4 parçaya bölünerek 2 tekrarlı, her vitrovente 10 tane eksplant şekilde; 12,5 mg/L nZVI, 25 mg/L nZVI, 50 mg/L nZVI içeren ilgili besi ortamına ve kontrol (nZVI içermeyen) deney gruplarına yerleştirilmiştir.

30 gün inkübasyon sonucunda yaprak eksplantların rejenerasyon ve köklenme oranı (%); oluşan gövde ve kök sayısı, oluşan kök ve gövdenin uzunlukları

hesaplandı. 30 gün sonrasında tüm gruplar nZVI'sız 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L NAA içeren MS besisi ortamına aktarılıp alt kültürlenmiş ve nZVI'nın olası toksisitesinin önüne geçilmiştir. 60 ve 90. günde 30.günde yapılan aşamalar tekrarlanmıştır.

Yaprak eksplantlarının 30 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.10'da sunulmuştur.



Şekil 4.10: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın bütün yaprak eksplantlarına olan 30 günlük etkisinin grafikleri. Gövde oluşumuna ait veriler a,c,e; kök oluşumuna ait veriler b,d,f.

30 günlük rejenerasyon verileri incelendiğinde gövde oluşum yüzdesinin kontrol ve 25 mg/L grubunda %95; 12,5 mg/L ve 50 mg/L gruplarında %100 olduğu görülmektedir. Rejenerasyon yüzdesinde nZVI'nın istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.10a). Kök oluşturma yüzdesine bakıldığında en yüksek yüzdenin %15 ile 50 mg/L nZVI içeren grupta görüldüğü ve diğer grupların %10 yüzdeye sahip olduğu görülmektedir. Köklenme yüzdesine nZVI'nın istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.10b).

30 günlük yaprak eksplantlarının gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oran 4,5 ortalama ile kontrol grubuna ait olduğu görülmüştür. Konsantrasyon artıkça ortalamanın azaldığı görülse de nZVI'nın, yaprak eksplantlarının gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.10c). Yaprak eksplantların kök/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oranın 1,5 ortalama ile 50 mg/L grubunda görülmüştür. Diğer grupların 1 ortalamaya sahip olduğu görülmüştür. Yaprak eksplantlarının kök/eksplant oranına nZVI'nın istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.10d).

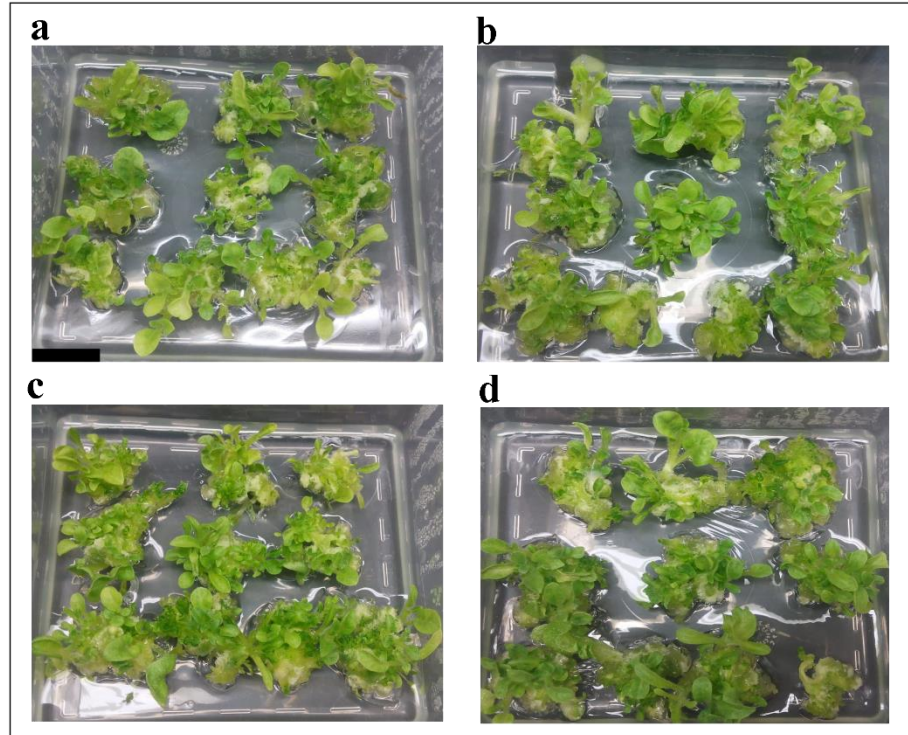
30 günlük oluşan gövdelerin ortalama uzunluk verileri incelendiğinde en yüksek ortalamanın 8 mm ile 50 mg/L grubunda olduğu, en düşük değerin ise 5,7 mm ile 25 mg/L grubunda olduğu görülmüştür. nZVI'nın yaprak eksplantların ortalama gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı yüksek konsantrasyonda olumlu, düşük konsantrasyonda olumsuz bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.10e). Ortalama kök uzunluk verileri incelendiğinde tüm grupların birbirine yakın ortalamalara sahip olduğu görülmüştür. Konsantrasyon artıkça ortalamanın arttığı görülse de nZVI'nın yaprak eksplantların ortalama kök uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.10f).

İlgili gruplara ait yaprak eksplantların 30 gün sonrası gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri Tablo 4.5'te, rejenerasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.11'de sunulmuştur.

Tablo 4.5: Farklı nZVI konsantrasyonların, 30 gün sonrası yaprak eksplantların hesaplanan gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri.

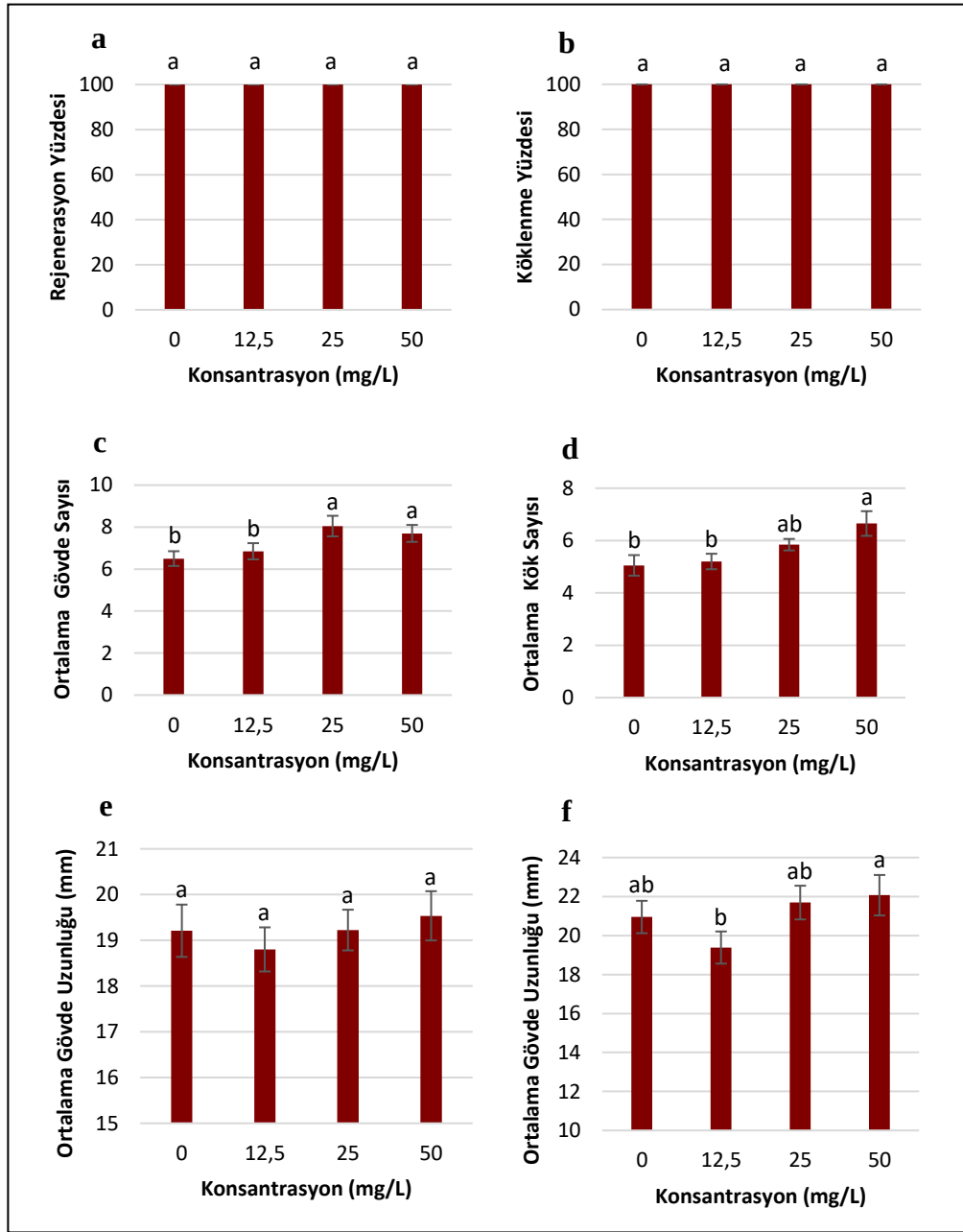
nZVI Konsantrasyonu	G.O.K değeri	K.O.K değeri
Kontrol	4,34	0,1
12,5 mg/L	4,31	0,1
25 mg/L	4,05	0,1
50 mg/L	4,05	0,22

Yaprak eksplantların 30 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında kontrol grubunun 4,34 ortalama ile en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. K.O.K. indekslerine bakıldığında en yüksek değer 0,22 ortalama ile 50 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür (Tablo 4.5). Konsantrasyon arttıkça nZVI'nın yaprak eksplantlarının gövde oluşturma kapasitesine negatif bir etkisi olduğu ancak kök oluşturma kapasitesine yüksek konsantrasyonda (50 mg/L) pozitif bir etkisinin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında tütün yaprak eksplantlarının 30 gün sonrası değişimi. a: Kontrol grubu; b: 12,5 mg/L nZVI içeren grup; c: 25mg/L nZVI içeren grup; d: 50 mg/L nZVI içeren grup. (Bar 1cm).

Yaprak eksplantlarının 60 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.12’de sunulmuştur.



Şekil 4.12: Farklı konsantrasyonlarda nZVI’nın tütün yaprak eksplantlarına olan 60 günlük etkisinin grafikleri. Gövde oluşumuna ait veriler a,c,e; kök oluşumuna ait veriler b,d,f.

60 günlük rejenerasyon verileri incelendiğinde rejenerasyon yüzdesinin tüm gruplarda %100 olduğu görülmektedir. Rejenerasyon yüzdesinde nZVI’nın istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.12a). Kök oluşturma yüzdesine bakıldığında tüm gruplarda %100 olduğu

görülmektedir. Köklenme yüzdesinde nZVI'nın istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.12b).

60 günlük yaprak eksplantlarının gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oran 8 ortalama ile 25 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür. Konsantrasyon artıkça ortalamanın arttığı ancak yüksek konsantrasyonda ortalamanın düştüğü görülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda nZVI'nın yaprak eksplantlarının gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.12c). Yaprak eksplantların kök/eksplant oranı incelendiğinde oranı incelendiğinde en yüksek oran 6,6 ortalama ile 50 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür. Konsantrasyon artıkça ortalamanın arttığı görülmektedir ancak sadece 50 mg/L nZVI içeren grubun, yaprak eksplantlarının kök/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.12d).

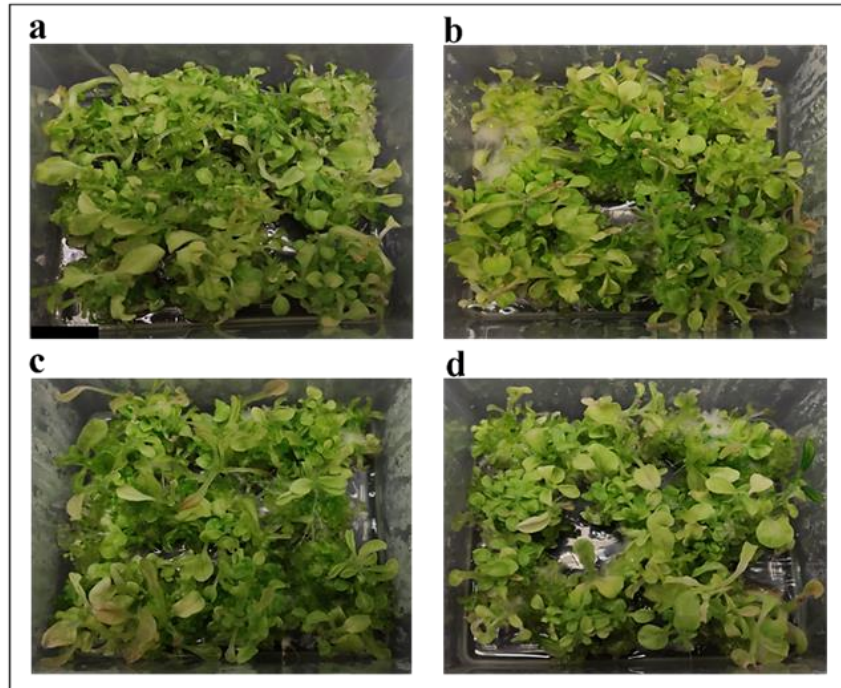
60 günlük oluşan gövdelerin ortalama uzunluk verileri incelendiğinde grupların birbirine yakın ortalamalara sahip olduğu görülmektedir. Grupların ortalamaları sırasıyla 19,2; 18,8; 19,2; 19,5 mm şeklindedir. Konsantrasyon artıkça ortalamanın arttığı görüle de nZVI'nın yaprak eksplantların ortalama gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.12e). Ortalama kök uzunluk verileri incelendiğinde en yüksek değer 22 mm ile 50 mg/L nZVI içeren grupta olduğu görülmektedir. Diğer grupların ortalamaları sırasıyla 20,9; 19,3; 21,6 mm şeklindedir. Konsantrasyon artıkça ortalamanın arttığı görüle de nZVI'nın yaprak eksplantların ortalama kök uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.12f).

İlgili gruplara ait yaprak eksplantların 60 gün sonrası gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri Tablo 4.6'da rejenerasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.13'te sunulmuştur.

Tablo 4.6: Farklı nZVI konsantrasyonların, 60 gün sonrası yaprak eksplantların hesaplanan gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri.

nZVI Konsantrasyonu	G.O.K değeri	K.O.K değeri
Kontrol	6,5	5,05
12,5 mg/L	6,85	5,2
25 mg/L	8,05	5,84
50 mg/L	7,7	6,65

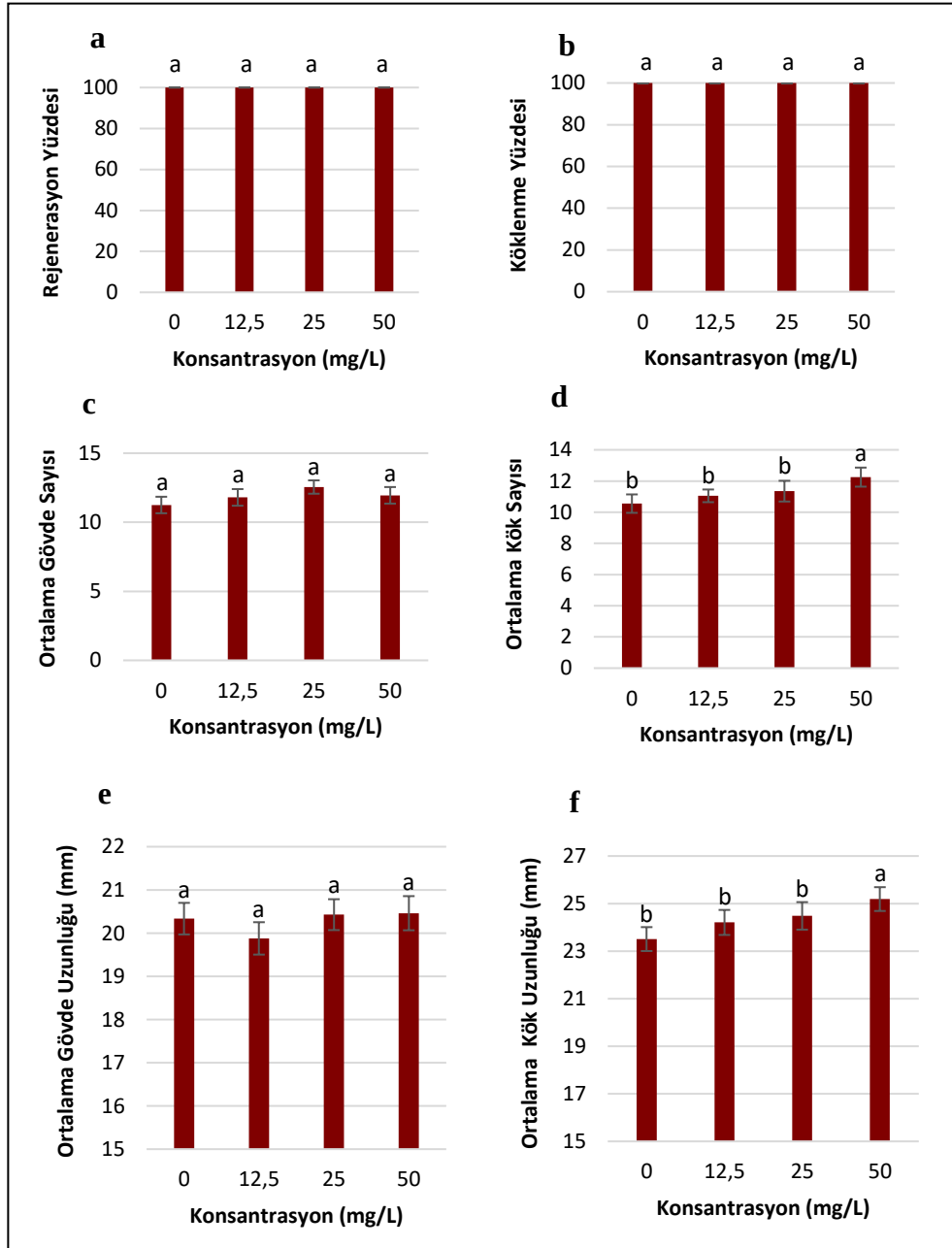
Yaprak eksplantların 60 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında 50 mg/L nZVI içeren grubun 8,05 ortalama ile en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. K.O.K. indekslerine bakıldığında en yüksek değer 6,65 ortalama ile 50 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür (Tablo 4.6). Konsantrasyon arttıkça nZVI'nın yaprak eksplantlarının kök oluşturma kapasitesine yüksek konsantrasyonda (50 mg/L) pozitif bir etkisi olduğu ancak gövde oluşturma kapasitesine yüksek konsantrasyonda pozitif etkisinin azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.13: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında tütün yaprak eksplantlarının 60 gün sonrası değişimi. a: Kontrol grubu; b: 12,5 mg/L nZVI içeren grup; c: 25 mg/L nZVI içeren grup; d: 50 mg/L nZVI içeren grup. (Bar 1cm).

Yaprak eksplantlarının 90 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.14'te sunulmuştur.

90 günlük rejenerasyon verileri incelendiğinde hem rejenerasyon yüzdesinin hem de kök oluşturma yüzdesinin tüm gruplarda %100 olduğu görülmektedir (Şekil 4.14a), (Şekil 4.14b). Rejenerasyon yüzdesinde ve köklenme yüzdesinde nZVI'nın istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.14: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın tütün yaprak eksplantlarına olan 90 günlük etkisinin grafikleri. Gövde oluşumuna ait veriler a,c,e; kök oluşumuna ait veriler b,d,f.

90 günlük yaprak eksplantlarının gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oran 12,55 ortalama ile 25 mg/L nZVI içeren gruba, en düşük oran 11,25 ile kontrol grubuna ait olduğu görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça ortalamanın arttığı ancak yüksek konsantrasyonda ortalamanın azaldığı görülmüştür. Ancak nZVI'nın yaprak eksplantlarının gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.14c). Yaprak eksplantların kök/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oran 12,25 ortalama ile 50 mg/L nZVI içeren gruba, en düşük oran 10,55 ile kontrol grubuna ait olduğu görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça ortalamanın arttığı görülmektedir. Yüksek konsantrasyonda (50 mg/L) nZVI'nın yaprak eksplantlarının kök/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu bir etkisinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.14d).

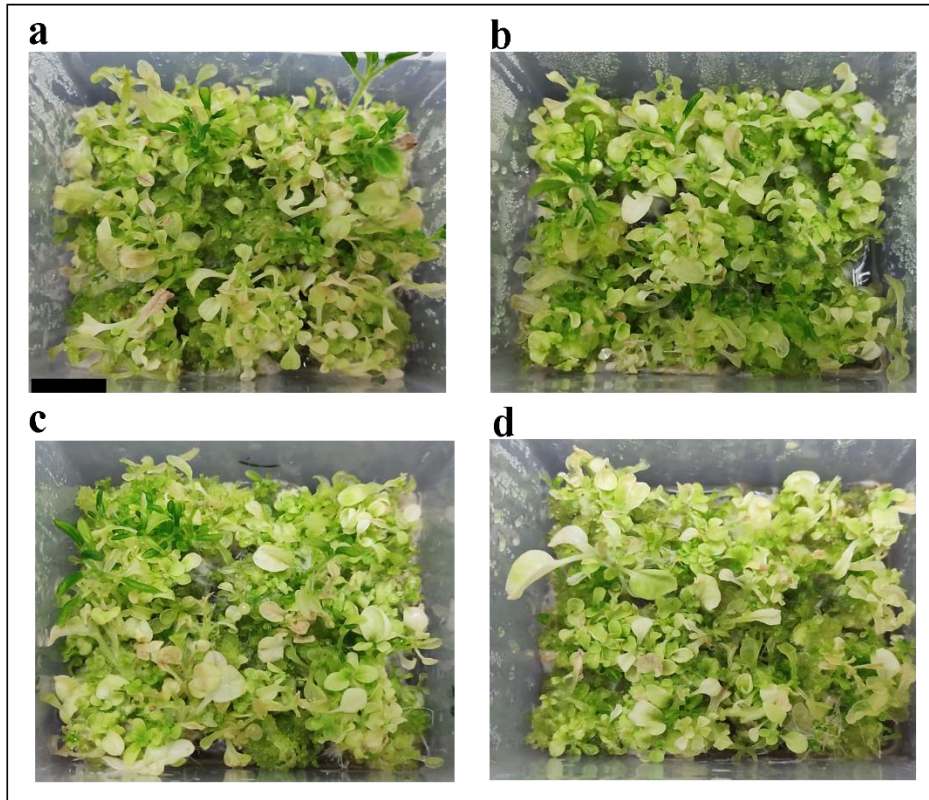
90 günlük oluşan gövdelerin ortalama uzunluk verileri incelendiğinde grupların birbirine yakın ortalamalara sahip olduğu görülmektedir. Grupların ortalamaları sırasıyla 20,3; 19,8; 20,4; 20,5 mm şeklindedir. Konsantrasyon arttıkça ortalamanın arttığı görülse de nZVI'nın yaprak eksplantların ortalama gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.14e). Ortalama kök uzunluk verileri incelendiğinde en yüksek değer 25,1 mm ile 50 mg/L nZVI içeren grupta olduğu görülmektedir. Diğer grupların ortalamaları sırasıyla 23,5; 24,2; 24,4 mm şeklindedir. Konsantrasyon arttıkça ortalamanın arttığı görülse de nZVI'nın yaprak eksplantların ortalama kök uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.14f).

İlgili gruplara ait yaprak eksplantların 90 gün sonrası gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri Tablo 4.7'de, rejenerasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.15'te sunulmuştur.

Tablo 4.7: Farklı nZVI konsantrasyonların, 90 gün sonrası yaprak eksplantların hesaplanan gövde ve kök oluşturma kapasite değerleri.

nZVI Konsantrasyonu	G.O.K değeri	K.O.K değeri
Kontrol	6,5	5,05
12,5 mg/L	6,85	5,2
25 mg/L	8,05	5,84
50 mg/L	7,7	6,65

Yaprak eksplantların 90 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında 25 mg/L nZVI içeren grubun 8,05 ortalama ile en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. K.O.K. indeksleri incelendiğinde en yüksek değer 6,65 ortalama ile 50 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür (Tablo 4.7). Konsantrasyon arttıkça nZVI'nın yaprak eksplantlarının kök oluşturma kapasitesine yüksek konsantrasyonda (50 mg/L) pozitif bir etkisi olduğu ancak gövde oluşturma kapasitesine yüksek konsantrasyonda pozitif etkisinin azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.15: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında tütün yaprak eksplantlarının 90 gün sonrası değişimi. a: Kontrol grubu; b: 12,5 mg/L nZVI içeren grup; c: 25mg/L nZVI içeren grup; d: 50 mg/L nZVI içeren grup. (Bar 1cm).

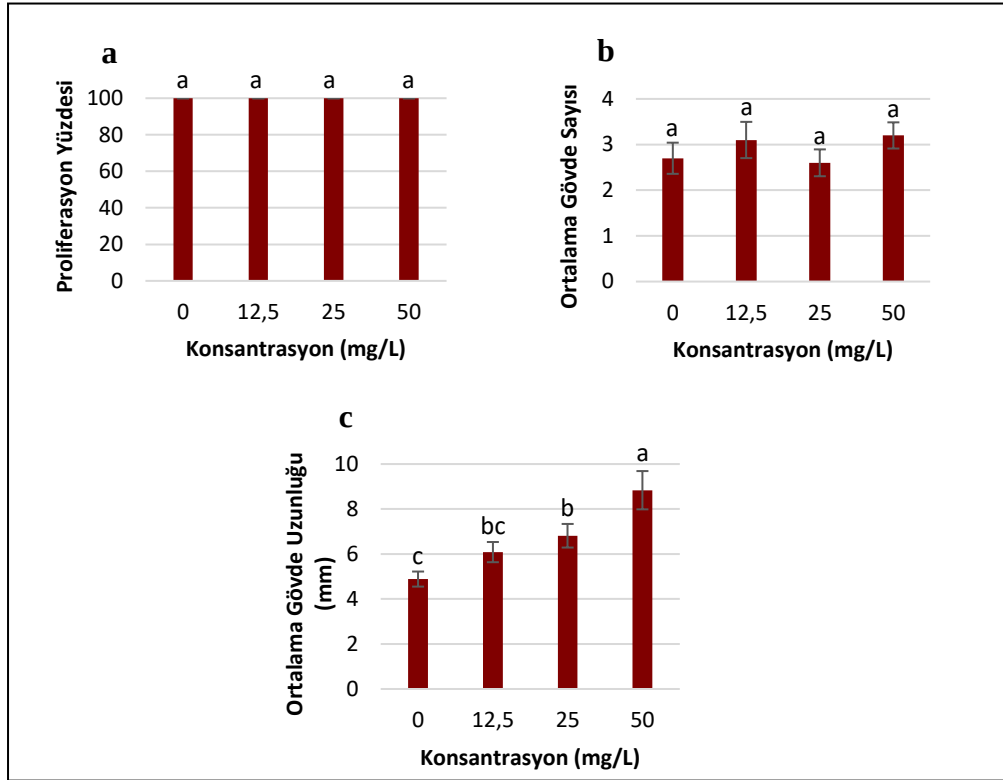
4.2.3. nZVI'nın Şeker Otu Bitkisinin *in vitro* Mikroçoğaltımına Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında şeker otu bitkisinin eksplant olarak nodal eksplantları kullanılmıştır. Eksplantların 30., 60. ve 90. gün inkübasyon sonucunda aşağıda detaylandırılan parametrelere bakılarak istatistiksel analizi yapılmıştır.

Yöntemde anlatıldığı gibi alınan nodal eksplantların sterilizasyonu yapılarak aseptik koşullarda nodal eksplantlar 2 tekrarlı, her magentaya 10 tane eksplant olacak şekilde; 12,5 mg/L nZVI, 25 mg/L nZVI, 50 mg/L nZVI içeren besi ortamına ve kontrol (nZVI içermeyen) grubuna yerleştirilmiştir.

30 gün inkübasyon sonucunda şeker otu bitkisinin nodal eksplantların proliferasyon oranı (%), oluşan gövde sayısı ve oluşan gövdenin uzunlukları hesaplandı. Daha sonra tüm gruplar nZVI'sız 2 mg/L BAP içeren MS besi ortamına aktarılarak altkültürlenmiştir. 60 ve 90. günde 30. günde yapılan aşamalar tekrarlanmıştır.

Nodal eksplantların 30 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.16'da sunulmuştur.



Şekil 4.16: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın şeker otu nodal eksplantlarına olan 30 günlük etkisinin grafikleri.

30 günlük proliferasyon verileri incelendiğinde rejenerasyon yüzdesinin tüm gruplarda %100 olduğu görülmektedir. Nodal eksplantların proliferasyonunda nZVI'nın istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.16a).

30 günlük nodal eksplantlarının gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oran 3,2 ortalama ile 50 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür. Grupların birbirine yakın ortalamalara sahip olduğu görülmektedir. Diğer grupların ortalamaları sırasıyla 2,7; 3,1; 2,6 şeklindedir. nZVI'nin nodal eksplantların gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.16b).

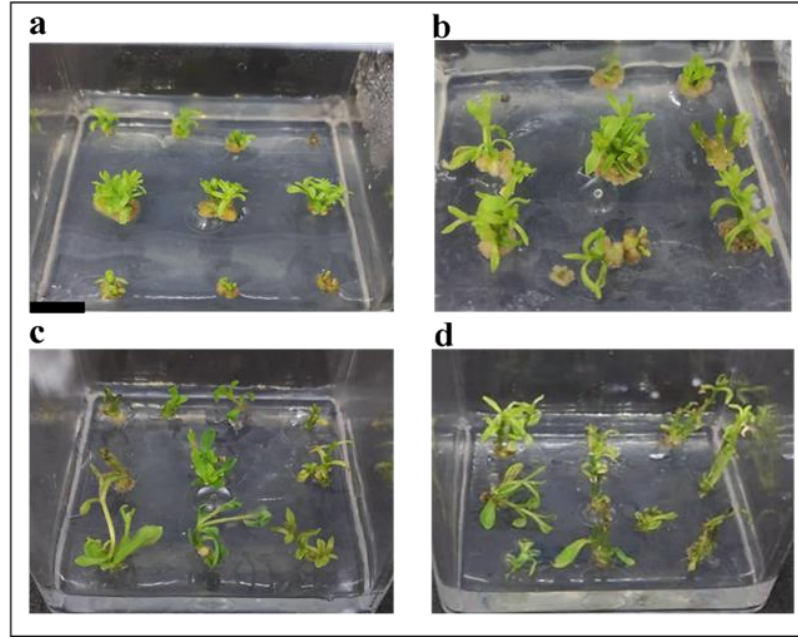
30 günlük oluşan gövdelerin ortalama uzunluk verileri incelendiğinde en yüksek ortalama 8,8 mm ile 50 mg/L nZVI içeren gruba, en düşük ortalama 4,8 mm ile kontrol grubuna ait olduğu görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça hem ortalamanın arttığı hem de nZVI'nin nodal eksplantların ortalama gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu etkisinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.16c).

İlgili gruplara ait nodal eksplantların 30 gün sonrası gövde oluşturma kapasite değerleri Tablo 4.8'de, proliferasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.17'de sunulmuştur.

Tablo 4.8: Farklı nZVI konsantrasyonların, 30 gün sonrası nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.

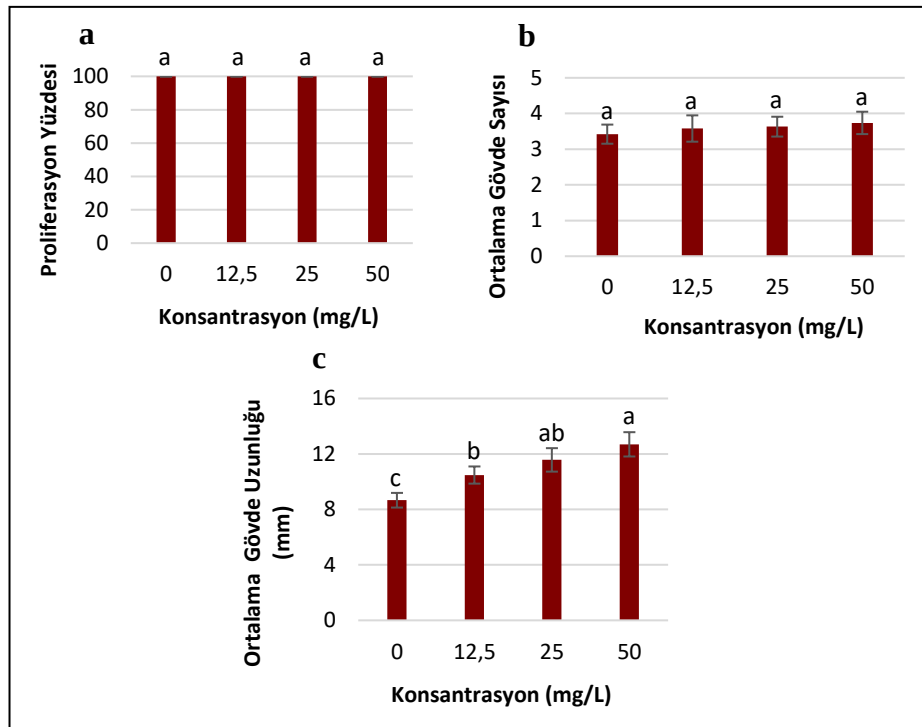
nZVI Konsantrasyonu	G.O.K değeri
Kontrol	2,7
12,5 mg/L	3,1
25 mg/L	2,6
50 mg/L	3,2

Nodal eksplantların 30 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında 50 mg/L nZVI içeren grubun 3,2 ortalama ile en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.7). Yüksek konsantrasyonda (50 mg/L) nZVI'nin nodal eksplantların gövde oluşturma kapasitesine pozitif bir etkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 4.17: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında şeker otu nodal eksplantların 30 gün sonrası değişimi. a: Kontrol grubu; b: 12,5 mg/L nZVI içeren grup; c: 25mg/L nZVI içeren grup; d: 50 mg/L nZVI içeren grup. (Bar 1cm).

Nodal eksplantların 60 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.18’de sunulmuştur.



Şekil 4.18: Farklı konsantrasyonlarda nZVI’nın şeker otu nodal eksplantlarına olan 60 günlük etkisinin grafikleri.

60 günlük proliferasyon verileri incelendiğinde rejenerasyon yüzdesinin tüm gruplarda %100 olduğu görülmektedir. Nodal eksplantların proliferasyonunda nZVI'nın istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.18a).

60 günlük nodal eksplantlarının gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oran 3,7 ortalama ile 50 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür. Grupların birbirine yakın ortalamalara sahip olduğu görülmektedir. Diğer grupların ortalamaları sırasıyla 3,4; 3,5; 3,6 şeklindedir. nZVI'nın nodal eksplantların gövde/eksplant oranına istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.18b).

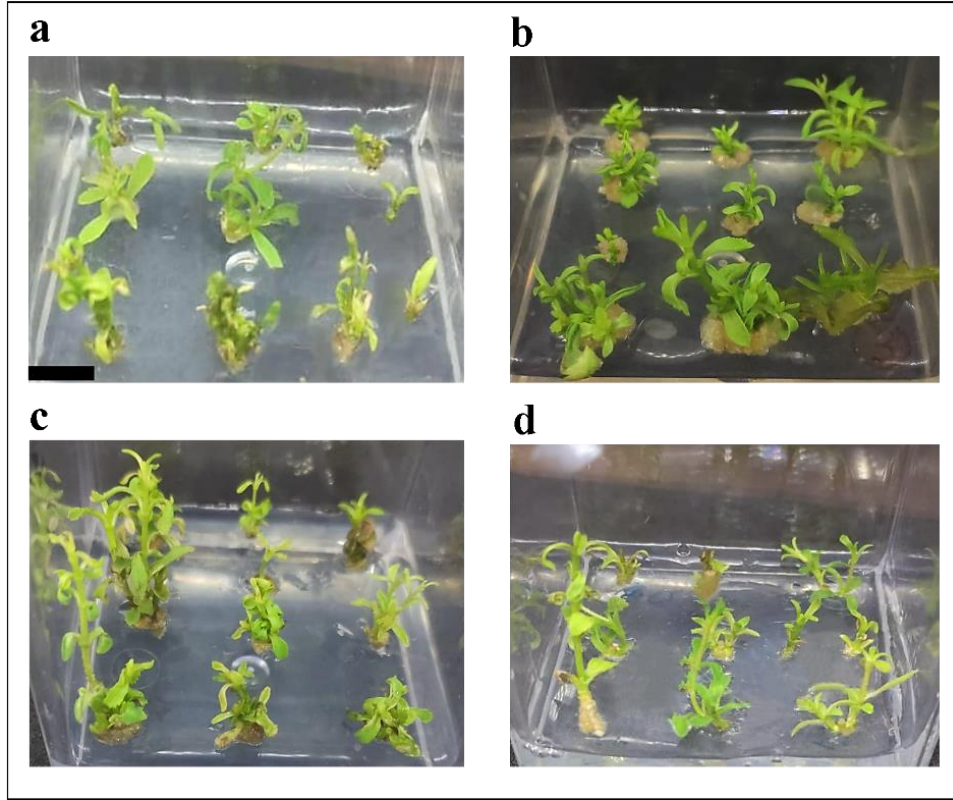
60 günlük oluşan gövdelerin ortalama uzunluk verileri incelendiğinde en yüksek ortalama 12,6 mm ile 50 mg/L nZVI içeren gruba, en düşük ortalama 8,6 mm ile kontrol grubuna ait olduğu görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça hem ortalamanın arttığı hem de nZVI'nın nodal eksplantların ortalama gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu etkisinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.18c).

İlgili gruplara ait nodal eksplantların 60 gün sonrası gövde oluşturma kapasite değerleri Tablo 4.9'da proliferasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.19'da sunulmuştur.

Tablo 4.9: Farklı nZVI konsantrasyonların, 60 gün sonrası nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.

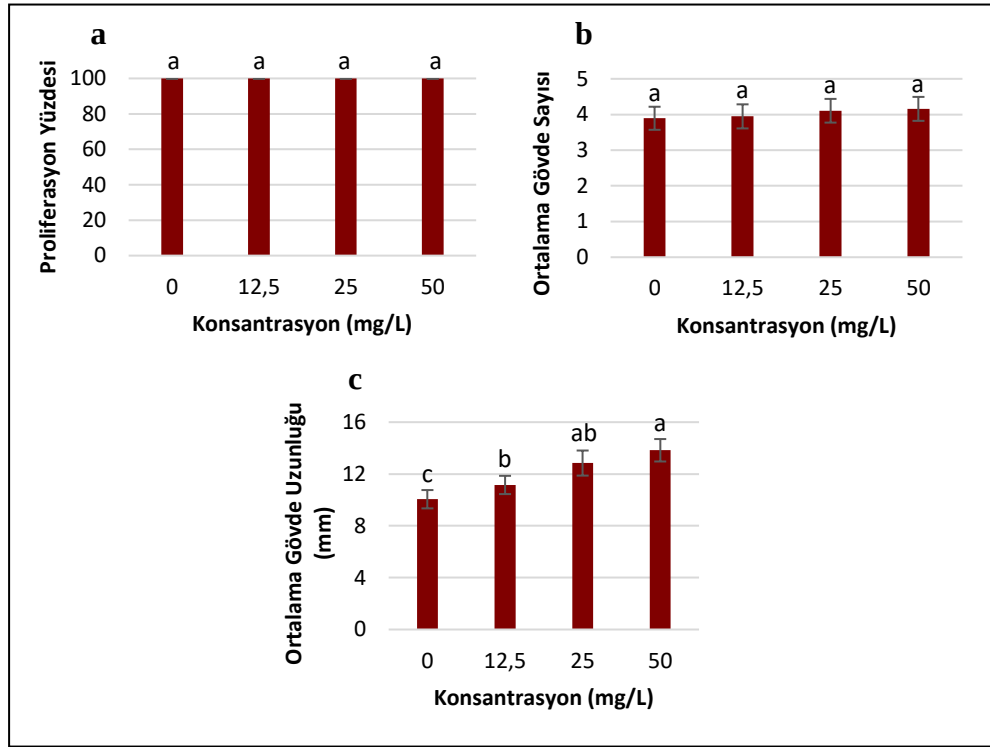
nZVI Konsantrasyonu	G.O.K değeri
Kontrol	3,42
12,5 mg/L	3,57
25 mg/L	3,63
50 mg/L	3,73

Nodal eksplantların 60 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında 50 mg/L nZVI içeren grubun 3,73 ortalama ile en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.9). Konsantrasyon arttıkça nZVI'nın nodal eksplantların gövde oluşturma kapasitesine olan pozitif etkisinin arttığı görülmüştür.



Şekil 4.19: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında şeker otu nodal eksplantların 60 gün sonrası değişimi. a: Kontrol grubu; b: 12,5 mg/L nZVI içeren grup; c: 25mg/L nZVI içeren grup; d: 50 mg/L nZVI içeren grup. (Bar 1cm).

Nodal eksplantların 90 gün sonunda yapılan istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.20’de sunulmuştur.



Şekil 4.20: Farklı konsantrasyonlarda nZVI'nın şeker otu nodal eksplantlarına olan 90 günlük etkisinin grafikleri.

90 günlük proliferasyon verileri incelendiğinde rejenerasyon yüzdesinin tüm gruplarda %100 olduğu görülmektedir. Nodal eksplantların proliferasyonunda nZVI'nın istatiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.20a).

90 günlük nodal eksplantlarının gövde/eksplant oranı incelendiğinde en yüksek oran 4,15 ortalama ile 50 mg/L nZVI içeren gruba ait olduğu görülmüştür. Grupların birbirine yakın ortalamalara sahip olduğu görülmektedir. Diğer grupların ortalamaları sırasıyla 3,89; 3,94; 4,1 şeklindedir. nZVI'nın nodal eksplantların gövde/eksplant oranına istatiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.20b).

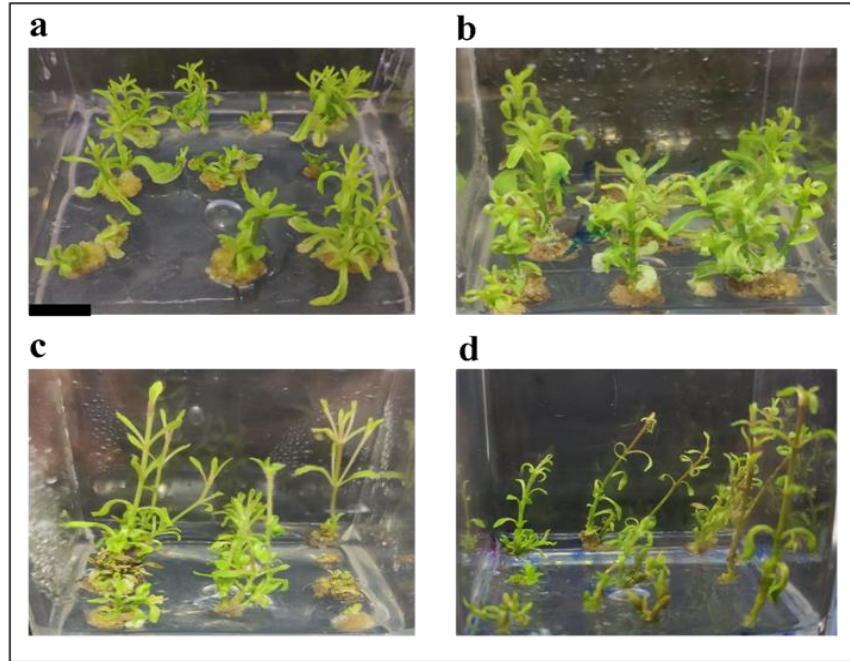
90 günlük oluşan gövdelerin ortalama uzunluk verileri incelendiğinde en yüksek ortalama 13,8 mm ile 50 mg/L nZVI içeren gruba, en düşük ortalama 10 mm ile kontrol grubuna ait olduğu görülmüştür. Konsantrasyon arttıkça hem ortalamanın arttığı hem de nZVI'nın nodal eksplantların ortalama gövde uzunluğuna istatiksel olarak anlamlı olumlu etkisinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.20c).

İlgili gruplara ait nodal eksplantların 90 gün sonrası gövde oluşturma kapasite değerleri Tablo 4.10'da proliferasyon ve gövde oluşum görüntüleri Şekil 4.21'de sunulmuştur.

Tablo 4.10: Farklı nZVI konsantrasyonların, 90 gün sonrası nodal eksplantların hesaplanan gövde oluşturma kapasite değerleri.

nZVI Konsantrasyonu	G.O.K değeri
Kontrol	3,89
12,5 mg/L	3,94
25 mg/L	4,10
50 mg/L	4,15

Nodal eksplantların 90 günlük G.O.K indekslerine bakıldığında 50 mg/L nZVI içeren grubun 4,15 ortalama ile en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.10). Konsantrasyon arttıkça nZVI'nın nodal eksplantların gövde oluşturma kapasitesine olan pozitif etkisinin arttığı görülmüştür.



Şekil 4.21: Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besi ortamında şeker otu nodal eksplantların 90 gün sonrası değişimi. a: Kontrol grubu; b: 12,5 mg/L nZVI içeren grup; c: 25mg/L nZVI içeren grup; d: 50 mg/L nZVI içeren grup. (Bar 1cm).

5. TARTIŞMA

Bu teze konu olan alev ağacı, şeker otu ve tütün bitkilerin eksplantlarının, farklı konsantrasyonlarda (12.5-25-50 mg/L) nZVI ile *in vitro* şartlarda maruz bırakılması sonucuyla bitkilerin proliferasyonlarındaki değişimler irdelenmiştir. Bu kapsamda nZVI'nın, alev ağacı bitkisinin gövde uçlarına ve nodal eksplantlarına, şeker otu bitkisinin nodal eksplantlarına, tütün bitkisinin yaprak eksplantlarına 30, 60, 90. gün sonrası etkisinin incelenmesi sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde sıralanmış ve yorumlanması yapılmıştır.

Alev ağacı bitkisi ile yapılan nZVI muamelesinin 30, 60 ve 90. gün sonuçları ele alındığında hem gövde hem de nodal eksplantların proliferasyon yüzdelerinin kontrole göre düşük olduğu görülmüştür. Gövde ucu eksplantlarında proliferasyon, nZVI konsantrasyon arttıkça istatistiksel olarak anlamlı negatif bir etki görülmüştür. Nodal eksplantlarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen konsantrasyon arttıkça negatif bir etki görülmüştür. Gövde ucu eksplantlarında gövde/eksplant oranı en yüksek 12,5 mg/L nZVI içeren grupta görülse de istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etki görülmemiştir. Nodal eksplantlarda ise en yüksek oran 12,5 mg/L nZVI içeren grupta görülmüştür ve 12,5 mg/L nZVI'nın istatistiksel olarak da olumlu bir etkisi olduğu görülmüştür. Gövde ucu eksplantlarında G.O.K oranında zaman geçtikçe nZVI'nın olumsuz etkisinin azaldığı görülmüştür. Nodal eksplantlarda ise en yüksek oran 12,5 mg/L nZVI içeren grupta ancak konsantrasyon arttıkça düşüş olduğu görülmüştür. Gövde ucu eksplantlarında nZVI'nın gövde uzunluğuna istatistiksel olarak olumlu veya olumsuz etki görülmemiştir. Nodal eksplantlarda ise 60. günde 50 mg/L nZVI içeren grupta istatistiksel olarak negatif bir etki görülse de uzun vadede istatistiksel olarak olumlu veya olumsuz etki görülmemiştir. Sonuç olarak alev ağacı ile ilgili tüm verilere bakıldığında nZVI'nın bitkinin proliferasyonu üzerinde anlamlı negatif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Literatürde alev ağacı ile yapılan çalışmaların sınırlıdır ve yapılan çalışmaların da doku kültürü ortamının kullanılmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızı destekleyecek çalışmalarla dolaylı olarak benzerlik kurularak tartışılmıştır. Mısır (*Zea mays* L.) ile yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda γ -Fe₂O₃ NP'lerin etkileri incelenmiş. 20 mg/L γ -Fe₂O₃ NP'ler, kök uzamasını %11,5 oranında önemli

ölçüde desteklediği ve canlılık indeksini sırasıyla %27,2 ve %39,6 arttırdığı görülmüştür. Ancak 50 ve 100 mg/L γ -Fe₂O₃ NP'ler, kök uzunluğunu sırasıyla %13,5 ve %12,5 oranında önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [Li et al., 2016]. Bu çalışma ile bizim alev ağacı ile yapılan çalışma benzer sonuçları elde etmektedir. Her iki çalışmada da düşük konsantrasyonlarda (20 mg/L-12,5 mg/L) pozitif bir etki görülürken yüksek konsantrasyonlarda (50mg/L- 100 mg/L) toksisitesi artmaktadır. Buna bağlı olarak demirin farklı nano şekilleri benzer etkiler gösterebileceği öngörülmektedir.

Yine benzer bir çalışmada nZVI, daha yüksek konsantrasyonlarda (>200 mg/L) kedi kuyruğu (*Typha latifolia*) üzerinde güçlü toksik etki gösterdiği, ancak daha düşük konsantrasyonlarda bitki büyümesini arttırmıştır. nZVI ayrıca daha yüksek konsantrasyonlarda hibrit kavakların (*Populus deltoids* $\times$ *Populus nigra*) terlemesini ve büyümesini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [Ma et al., 2013]. Bu çalışmalar ile bizim çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyondan (50 mg/L) daha yüksek konsantrasyonda nZVI uygulamasının da toksik bir etki göstermesi bizim çalışmamızı desteklemektedir. Ayrıca bu çalışmada bizim çalışmamızdaki gibi odunsu bir bitkinin kullanılması bizim çalışmamızın literatüre katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Tütün bitkisi ile yapılan ZVI muamelesinin 30, 60 ve 90. gün sonuçları ele alındığında nZVI'nın Yaprak eksplantlarında rejenerasyon ve köklenme yüzdesi, istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etki görülmemiştir. Yaprak eksplantlarında gövde/eksplant oranı 60. günde 25 ve 50 mg/L nZVI içeren grupta istatistiksel olarak pozitif bir etki görülse de uzun vadede istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz etki görülmemiştir. Köklenme oranı ise 30 günde istatistiksel bir fark olmasa da uzun vadede 50 mg/L nZVI içeren grupta istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir etki görülmüştür. Yaprak eksplantlarında G.O.K oranında uzun vadede 25 mg/L nZVI içeren grubun pozitif etkisi görülmüştür. K.O.K oranında ise en yüksek oran 50 mg/L nZVI içeren grubun pozitif etkisi görülmüştür. Yaprak eksplantlarında nZVI'nın gövde uzunluğuna istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz etki görülmemiştir. Kök uzunluğuna ise 90. günde 50 mg/L nZVI içeren grupta istatistiksel olarak pozitif bir etki görülmüştür. Sonuç olarak tütün ile ilgili tüm verilere bakıldığında nZVI'nın bitkinin rejenerasyonu üzerinde anlamlı pozitif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Tütün BY-2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada nZVI'nin sito-genotoksik potansiyeli araştırıldığında 5 ila 500 µg/mL nZVI konsantrasyonları denenmiş ve 5 µg/mL ile tedavi edilen hücrelerde maksimum hücre ölümü gerçekleştiği görülmüştür. Ancak konsantrasyon arttıkça DNA hasarının azaldığı tespit edilmiştir [Ghosh et al., 2019]. Bizim tütün ile çalışmamızda nZVI'nin olumlu etkinin olması ile bu çalışma zıtlık oluşturmaktadır Bunun en büyük nedeninin bizim organ kültürü kullanırken örnek çalışmada hücre süspansiyon kültürü kullanılmasından dolayı olduğu düşünebilir. Öte yandan bu örnek çalışmada kullanılan konsantrasyon miktarının bizim çalışmamızdan çok küçük olması ve konsantrasyon arttıkça toksititenin azalıyor olması bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Arabidopsis thaliana ile yapılan bir çalışmada nZVI'nin bitki kökü uzaması üzerindeki etkisini araştırılmış ve bitkilerin 0,5 g/L nZVI'ya maruz bırakılması, kontroldekine göre %150-200 oranında kök uzamasını arttırdığı belirlenmiştir [Kim et al., 2014]. Bizim tütün ile çalışmamızda 50 mg/L nZVI içeren grubun en çok gelişmeyi göstermesi ve bu çalışmada çok üstünde bir konsantrasyonla çalışmaları nZVI'nin konsantrasyon arttıkça kök oluşumunu ve gelişimini arttıracakını düşündürmektedir.

Şeker otu bitkisi ile yapılan nZVI muamelesinin 30, 60 ve 90. gün sonuçları ele alındığında tüm grupların %100 proliferasyon yüzdesine sahip olduğu görülmektedir. Nodal eksplantlarda nZVI'nin proliferasyona istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz etkisi görülmemiştir. Nodal eksplantlarda gövde/eksplant oranı 30. günde en yüksek 12,5 mg/L nZVI içeren grupta görülse de uzun vadede istatistiksel olarak anlamlı olumlu veya olumsuz bir etki görülmemiştir. Nodal eksplantlarda G.O.K oranı konsantrasyon arttıkça istatistiksel olarak anlamlı olumlu etkisinin arttığı görülmüştür. En yüksek oran tüm ölçümlerde 50 mg/L nZVI içeren grupta olmuştur. Nodal eksplantlarda nZVI'nin konsantrasyonu arttıkça gövde uzunluğu istatistiksel olarak anlamlı olumlu etkinin de arttığı görülmüştür. En yüksek oran tüm ölçümlerde 50 mg/L nZVI içeren grupta olmuştur. Bu sonuçlar neticesinde nZVI'nin bitkinin proliferasyonu üzerinde anlamlı pozitif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Kuraklık stresine maruz bırakılan çileklerin (*Fragaria × ananassa* Duch.) fidelerinden uç eksplantları alınarak *in vitro* koşullarda Fe₃O₄ NP ile maruz bırakılarak bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada Fe₃O₄ NP'in kuraklık stresinin çilek fideleri üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı ve buna ek olarak *in vitro* kültür

altında büyüme parametrelerini (kök oluşumu, gövde sayısı ve uzunluğu vb.) iyileştirdiği görülmüştür [Mozafari et al., 2018]. Bizim şeker otu ile çalışmamızda da bitki sera ortamından *in vitro* ortama alınarak demir NP ile muamele edilmiştir ve benzer olumlu etkiler görülmüştür. Bu kapsamda demir NP'lerin bitkilerin verimliklerini arttırmada benzer roller oynadığı ve bu sonuçların birbirlerini desteklediği görülmektedir.

Pirinçte (*Oryza sativa* cv. *Gobindabhog* L.) yapılan bir çimlendirme deneyinde düşük dozlarda nZVI ile muamele, artan kök ve sürgün uzunluğu, biyokütle ve fotosentetik pigment içeriği ile ifade edildiği gibi fide gücünü arttırdığı ancak yüksek konsantrasyonda (160 mg/L) nZVI oksidatif strese sebep olup kök zararı oluşturduğu görülmüştür [Guha et al., 2018]. Bu çalışma bizim çalışmamıza paralel şekilde düşük konsantrasyonlarda pozitif etki görülmektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etkinin oluşuyor olması biz de şeker otu için nZVI konsantrasyonu artırırsak toksik etki görebileceğimizi göstermektedir.

Bu tez çalışmasından elde edilen bilgiler doğrultusunda literatürde hakkında yeterince çalışma bulunmayan şeker otu ve alev ağacı bitkilerinin *in vitro* NP çalışmalarına öncü olabileceğine ve endüstriyel olarak önem arz eden bu bitkilerin üretimine yönelik sınırlı çalışmalara destek sağlayabileceği düşünülmektedir. Bunlara ek olarak bu çalışma ile nZVI'nın tütün ve şeker otu bitkilerine olan pozitif etkisinin belirlenmesi ile bu bitkilerin daha sağlıklı ve verimli ürünlerin sağlanabileceği desteklenmektedir. Ayrıca nanoparçacıkların canlı sistemler üzerindeki kesin etkisine ilişkin mevcut bilgilerimiz hala sınırlıdır ve çoğunlukla tutarsızdır. Bu çalışma nanoparçacıklara bakış açımıza önemli ölçüde katkıda bulunabilir ve nano malzemelerin kullanımı için daha verimli düzenlemeler geliştirmeye yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

Aderkas P. and Bonga J. M., (2000), Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology*, 20(14), 921-928.

Ahloowalia B. S., Prakash J., Savangikar V. A., Savangikar C., (2004), "Plant tissue culture. Low cost options for tissue culture technology in developing countries", FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture Proceedings of a Technical Meetin, 3-11, Vienna, Austria, 3-10 August.

Auffan M., Achouak W., Rose J., Roncato M. A., Chanéac C., Waite D. T., Bottero J. Y., (2008), "Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*", *Environmental Science and Technology*, 42 (17), 6730-6735.

Babaoğlu M., Gurel E., Özcan S., (2001), "Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları", Selçuk Üniversitesi Yayınları.

Barzan E., Mehrabian S., Irian S., (2014), "Antimicrobial and genotoxicity effects of zero-valent iron nanoparticles", *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7 (5), 50-54.

Beeson R. C., (2000), "Putting the speed back in quick-dip auxin application", SNA Research Conference, 298-302, Atlanta, GA, USA, 12-15 October.

Bidabadi S. S., Jain S. M., (2020), "Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration", *Plants*, 9(6), 702.

Bigot C., (1987), "In vitro manipulation of higher plants: some achievements, problems and perspectives", IAPTC French-British Meeting, Cell Culture Techniques Applied to Plant Production and Plant Breeding, IAPTC, 5-17, Angers, France, 8-9 October.

Brasili E., Bavasso I., Petruccelli V., Vilardi G., Valletta A., Dal Bosco C., Di Palma L., (2020), "Remediation of hexavalent chromium contaminated water through zero-valent iron nanoparticles and effects on tomato plant growth performance" *Scientific Reports*, 10(1), 19-20.

Callow J. A., Ford-Lloyd B. V., Newbury H. J., (1997), "Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use", CAB International, 5(1), 49-50.

Charlton A., (2004), "Medicinal uses of tobacco in histor", *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97(6), 292-296.

Debnath M., (2008), "Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*", *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(2), 45-51.

Demurtas O. C., Massa S., Illiano E., De Martinis D., Chan P. K., Di Bonito P., Franconi R., (2016), “Antigen production in plant to tackle infectious diseases flare up: the case of SARS”, *Frontiers in Plant Science*, 7(1), 54-57.

Dwivedi S., Saquib Q., Al-Khedhairy A. A., Musarrat J., (2016), “Understanding the Role of Nanomaterials in Agriculture”, In: Singh, D., Singh, H., Prabha, R., Editors, “Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity” 1st , Springer.

Fajerska HE., Ciarkowska K., (2012), “The effect of *Nicotiana tabacum* L. extracts on cultures of tobacco callus”, *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 11(4), 59-66.

Fincheira P., Tortella G., Duran N., Seabra A. B., Rubilar O., (2020), “Current applications of nanotechnology to develop plant growth inducer agents as an innovation strategy”, *Critical Reviews in Riotechnology*, 40(1), 15-30.

Gebhardt C., (2016), “The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research”, *Theoretical and Applied Genetics*, 129, 2281-2294.

George E.F., Hall M.A., Klerk GJ.D., (2008), “Micropropagation: Uses and Methods”. In: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, GJ.D., Editors, “Plant Propagation by Tissue Culture”, 1st , Springer, Dordrecht.

Ghosh I., Sadhu A., Moriyasu Y., Bandyopadhyay M., Mukherjee A., (2019), “Genotoxicity of nanoscale zerovalent iron particles in tobacco BY-2 cells”, *The Nucleus*, 62, 211-219.

Goerzen H. and Salas D., (2011), “El sorprendente legado que nos dejó el sabio Moisés Bertoni: el Ka’a he’è”, *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 9(1), 60-63.

Guha T., Ravikumar K., Mukherjee A., Mukherjee A., Kundu R., (2018), “Nanopriming with zero valent iron (nZVI) enhances germination and growth in aromatic rice cultivar (*Oryza sativa* cv. Gobindabhog L.)”, *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 127, 403-413.

Habibi P., Daniell H., Soccol C. R., Grossi-de-Sa M. F., (2019), “The potential of plant systems to break the HIV-TB link”, *Plant Biotechnology Journal*, 17(10), 1868-1891.

Hazarika B. N., (2006), “Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants”, *Scientia Horticulturae*, 108(2), 105-120.

Idowu P. E., Ibitoye D. O., Ademoyegun O. T., (2009), “Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops”, *African Journal of Biotechnology*, 8(16), 50-55.

İçigen H. Ö., (2019), “Bitki doku kültürü yöntemi ile elde edilen bazı bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi”, *Lisansüstü Tezi, Kütahya dumlupınar üniversitesi*.

Kadar E., Tarran G. A., Jha A. N., Al-Subiai S. N., (2011), “Stabilization of engineered zero-valent nanoiron with Na-acrylic copolymer enhances spermioxicity”, *Environmental Science and Technology*, 45(8), 3245-3251.

Kalia A., Sharma S. P., Kaur H., (2020), “Novel nanocomposite-based controlled-release fertilizer and pesticide formulations: Prospects and challenges”, *Multifunctional Hybrid Nanomaterials for Sustainable Agri-Food and Ecosystems*, 5(1), 99-134.

Kamle M., Mahato D. K., Devi S., Soni R., Tripathi V., Mishra A. K., Kumar P., (2020), “Nanotechnological interventions for plant health improvement and sustainable agriculture”, *3 Biotech*, 10, 1-11.

Kane M. E., Sheehan T. J., Philman N. L., (1988), “A micropropagation protocol using fraser Photinia for mutation induction and new cultivar selection”, *In Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 100, 334-337.

Karthik K., Dhanuskodi S., Gobinath C., Prabukumar S., Sivaramakrishnan S., (2018), “Multifunctional properties of microwave assisted CdO–NiO–ZnO mixed metal oxide nanocomposite: enhanced photocatalytic and antibacterial activities”, *Journal of Materials Science*, 29, 5459-5471.

Kaya Y., Yilmaz S., Gozukirmizi N., Huyop F., (2013), “Evaluation of transgenic *Nicotiana tabacum* with *dehE* gene using transposon based IRAP markers”, *American Journal of Plant Sciences*, 4, 41-44.

Khan Z. U. H., Khan A., Chen Y., ullah Khan A., Shah N. S., Muhammad N., Wan P., (2017), “Photo catalytic applications of gold nanoparticles synthesized by green route and electrochemical degradation of phenolic Azo dyes using AuNPs/GC as modified paste electrode”, *Journal of Alloys and Compounds*, 725, 869-876.

Khatami M., Alijani H. Q., Fakheri B., Mobasser M. M., Heydarpour M., Farahani Z. K., Khan A. U., (2019), “Super-paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Greener synthesis using *Stevia* plant and evaluation of its antioxidant properties”, *Journal of Cleaner Production*, 208, 1171-1177.

Khatami M., Alijani H. Q., Sharifi, I., (2018), “Biosynthesis of bimetallic and core–shell nanoparticles: their biomedical applications – a review”, *The Institution of Engineering and Technology Nanobiotechnology*, 12(7), 879-887.

Kim J. H., Lee Y., Kim E. J., Gu S., Sohn E. J., Seo Y. S., Chang Y. S., (2014), “Exposure of iron nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* enhances root elongation by triggering cell wall loosening”, *Environmental Science and Technology*, 48(6), 3477-3485.

Leifert C., Pryce S., Lumsden P. J., Waites W. M., (1992), “Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30, 171-179.

Li J., Hu J., Ma C., Wang Y., Wu C., Huang J., Xing B., (2016), "Uptake, translocation and physiological effects of magnetic iron oxide (γ -Fe₂O₃) nanoparticles in corn (*Zea mays* L.)", *Chemosphere*, 159, 326-334.

Li X., Yang Y., Gao B., Zhang M., (2015), "Stimulation of peanut seedling development and growth by zero-valent iron nanoparticles at low concentrations", *Plos One*, 10(4), 82-84.

Llorente B. E., Larraburu E. E., (2013), "In vitro propagation of fraser photinia using *Azospirillum*-mediated root development. In: Lambardi, M., Ozudogru, E., Jain, S., Editors, "Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants", 1St, Humana Press.

Loyola-Vargas V. M., Ochoa-Alejo N., (2018), "An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives", *Plant Cell Culture Protocols*, 1, 3-13.

Ma J. K. C., Drossard J., Lewis D., Altmann F., Boyle J., Christou P., Fischer R., (2015), "Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants", *Plant Biotechnology Journal*, 13(8), 1106-1120.

Ma X., Gurung A., Deng Y., (2013), "Phytotoxicity and uptake of nanoscale zero-valent iron (nZVI) by two plant species", *Science of the Total Environment*, 443, 844-849.

Maeda E., Thorpe T. A., (1979), "Shoot histogenesis in tobacco callus cultures" *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 15, 415-424.

Marsalek B., Jancula D., Marsalkova E., Mashlan M., Safarova K., Tucek J., Zboril R., (2012), "Multimodal action and selective toxicity of zerovalent iron nanoparticles against cyanobacteria" *Environmental Science and Technology*, 46, 2316–2323.

Merkle S. A., Dean J. F., (2000), "Forest tree biotechnology", *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3), 298-302.

Miri A., Darroudi M., Entezari R., Sarani M., (2018), "Biosynthesis of gold nanoparticles using *Prosopis farcta* extract and its in vitro toxicity on colon cancer cells", *Research on Chemical Intermediates*, 44, 3169-3177.

Mizutani K. and Tanaka O., (2002), "Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan". In: Kinghorn, A.D., Editor, "Stevia, the genus *Stevia*", 1St, Taylor and Francis, CRC Press.

Mozafari A. A., Havas F., Ghaderi N., (2018), "Application of iron nanoparticles and salicylic acid in in vitro culture of strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) to cope with drought stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132, 511-523.

Murashige T., Skoog F., (1962), "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures" *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

- Ngo Q. B., Dao T. H., Nguyen H. C., Tran X. T., Van Nguyen T., Khuu T. D., Huynh T. H., (2014), "Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of soybean (Vietnamese species DT-51)", *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5(1), 15-16.
- Nielsen M.T., (1987), "Tobacco", *Outlook on Agriculture*, 16(2), 77–81.
- Nikova V., Zagorzka N., (1984), "Variability of regeneration obtained in tissue cultures from the hybrid *Nicotiana velutiana* wheeler", *Nicotiana tabacum*, 1, 191-194.
- Olmstead R. G., Bohs L., Migid H. A., Santiago-Valentin E., Garcia V. F., Collier S. M., (2008), "A molecular phylogeny of the Solanaceae". *Taxon*, 57(4), 1159-1181.
- Özcan İ., Arabacı O., (2012), "Aspartama karşı doğal tatlandırıcı: stevia (şeker otu)", *I. Anadolu Şeker Pancarı Sempozyumu*, 235-240, Kayseri, 2-22 Eylül.
- Phillips G. C., Garda M., (2019), "Plant tissue culture media and practices: an overview" *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 55, 242-257.
- Pierik R. L. M., (1997), "In vitro culture of higher plants", *Kluwer Academic Publishers*, 1(1), 21-26.
- Popova V., Ivanova T., Stoyanova A., Nikolova V., Hristeva T., Zheljazkov V. D., (2020), "GC-MS composition and olfactory profile of concretes from the flowers of four *Nicotiana* species", *Molecules*, 25(11), 2617.
- Rodríguez H. (2018), "Nanotechnology and risk governance in the european union: the constitution of safety in highly promoted and contested innovation areas", *Nanoethics*, 12(1), 5–26.
- Sanger R. B. S., Chandr R., Khuranc S. M. P., (1986), "Regeneration of TMV-free tobacco plantlets through callus", *Indian Journal of Plant Pathology*, 4(1), 80-82.
- Shinde S. S., Sanap S. B., Akshay M. P., Nalini A. S., Abhijin A. D., Dipak K. S., (2021), "In vitro regeneration of *Nicotiana tabacum* L. from callus culture", *The Pharma Innovation Journal*, 10, 12.
- Singh S. D., Rao G. P., (2005), "Stevia: The herbal sugar of 21st century", *Sugar Technology*, 7(1), 17-24.
- Skoog F., (1957), "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro", *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-131.
- Solanki P., Bhargava A., Chhipa H., Jain N., Panwar J., (2015), "Nano-fertilizers and their smart delivery system", *Nanotechnologies in Food and Agriculture*, 54, 81-101.
- Soliman M. D. E., (1997), "Stevia plant, natural concentrated sweeteners", *Egyptian Society of Sugar Technology*, 2, 4.

- Song W., Zhao Y. Y., Ren Y. J., Liu L. L., Wei S. D., Yang H. B., (2021), "Proanthocyanidins isolated from the leaves of *Photinia× fraseri* block the cell cycle and induce apoptosis by inhibiting tyrosinase activity in melanoma cells", *Food & Function*, 12(9), 3978-3991.
- Suman Chandra S. C., Hemant Lata H. L., Khan I. A., ElSohly M. A., (2010), "Propagation of Elite *Cannabis sativa* L. for the Production of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) Using Biotechnological Tools". In: Arora, R., Editor, "Medicinal Plant Biotechnology", 1st, CAB International.
- Sumon M. H., Mostofa M., Jahan M. S., Kayes M. E. H., Haque M. A., (2008), "Comparative efficacy of powdered form of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves and glimepiride in induced diabetic rats", *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 6(2), 211-215.
- Taalat K., Javed M. A., Huyop F. Z., Yilmaz K., (2021), Plant tissue culture of *Nicotiana tabacum* cv. TAPM 26 and its minimum inhibition against herbicide-Dalapon", *MANAS Journal of Engineering*, 9(1), 35-42.
- Thorpe T. A., (2007), "History of plant tissue culture", *Molecular Biotechnology*, 37, 169-180.
- Timoteo C. D. O., Paiva R., Dos Reis M. V., Claro P. I. C., Ferraz L. M., Marconcini J. M., de Oliveira J. E., (2019), "In vitro growth of *Physalis peruviana* L. affected by silver nanoparticles", 3 *Biotech*, 9, 1-9.
- Toledo L. D. A. S., Rosseto H. C., Bruschi M. L., (2018), "Iron oxide magnetic nanoparticles as antimicrobials for therapeutics", *Pharmaceutical Development and Technology*, 23(4), 316-323.
- Turgut K., Ucar E., Tutuncu B., Özyigit Y., (2015), "*Stevia rebaudiana* Bertoni could be an alternative crop in the Mediterranean region of Turkey", 8th EUSTAS *Stevia Symposium*, 43-45, Bonn, Germany, 27-28 January.
- Uddin M. S., Chowdhury M. S. H., Khan M. M. H., Uddin M. B., Ahmed R., Baten M., (2006), "In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh", *African Journal of Biotechnology*, 5(13), 1238-1240.
- Vasil V., Hildebrandt A. C., (1965), "Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures", *Science*, 150(3698), 889-892.
- Vilardi G., Sebastiani D., Miliziano S., Verdone N., Di Palma L., (2018), "Heterogeneous nZVI-induced Fenton oxidation process to enhance biodegradability of excavation by-products", *Chemical Engineering Journal*, 335, 309-320.
- Wang J., Fang Z., Cheng W., Yan X., Tsang P. E., Zhao D., (2016), "Higher concentrations of nanoscale zero-valent iron (nZVI) in soil induced rice chlorosis due to inhibited active iron transportation", *Environmental Pollution*, 210, 338-345.

Web 1, (2022), <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/ST/ST44700.pdf>, (Eriřim Tarihi: 14/06/2022).

Yang X., Tang D., Xu D., Wang X., Pan G., (2004), “Characters of greening tree species in heavy metal pollution protection in Shanghai”, Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology, 15(4), 687-690.

Yıldırım K., (2017), “Stevia rebaudiana Bertoni bitkisinin in vitro üretim potansiyeli ve Tokat şartlarına adaptasyonu”, Gaziosmanpařa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 34(1), 238-251.

Yücesan B., Büyükgöçmen R., Mohammed A., Sameeullah M., Altuğ C., Gürel S., Gürel E., (2016), “An efficient regeneration system and steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a source of natural high-intensity sweetener”, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 52, 330-337.

Zhiqi Z., Yin Z., Yuhua Z., Weijin Z., Jianjun Z., Liqing Y., (1998), “Induction of adventitious buds and regenerated plants from cotyledons of Chinese cabbage”, Shanghai Nongye Xuebao = Acta Agriculturae Shanghai, 14(2), 25-28.

Zhong X., Qi G., Yang J., Xing G., Liu J., Yang X., (2014), “High-efficiency expression of a receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein in tobacco chloroplasts”, Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao= Chinese Journal of Biotechnology, 30(6), 920-930.

ÖZGEÇMİŞ

Gülcan AKKÖK, 2014 yılında Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2018 yılında tamamladıktan sonra 2019 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.2023 yılında mezun oldu.