



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN NİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TiO₂ Nanopartiküllerin Nohut (*Cicer arietinum*
L.) Bitkisinin *In Vitro* Çimlenmesi, Büyümesi ve
Rejenerasyonuna Etkileri**

Nazmiye Okşan OKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ / DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Ağustos-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Nazmiye Okşan Okan tarafından hazırlanan “TiO₂ Nanopartiküllerin Nohut (*Cicer arietinum* L.) Bitkisinin *In Vitro* Çimlenmesi, Büyümesi ve Rejenerasyonuna Etkileri” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

.....

Danışman

Prof. Dr. Muhammad ASIM

.....

Üye

Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAĞCI

.....

Üye

Unvanı Adı SOYADI

.....

Üye

Unvanı Adı SOYADI

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Öğrencinin Adı SOYADI

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TiO₂ Nanopartiküllerin Nohut (*Cicer arietinum* L.) Bitkisinin *In Vitro* Çimlenmesi, Büyümesi ve Rejenerasyonuna Etkileri

Nazmiye Okşan OKAN

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Muhammad ASIM

2020, 57 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Prof. Dr. Muhammad ASIM

Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Nohut (*Cicer arietinum* L.) çok eski zamanlardan beri insan ve hayvan beslenmesinde tüketilir ve Türkiye'de ekim alanı ve üretim bakımından ilk sırada yer alır. Protein, esansiyel aminoasit ve bazı mineraller bakımından bir hayli zengin yemeklik tane baklagildir. Nohut bitkisi tohum renkleri ve coğrafi dağılımları bakımından Kabuli ve Desi olmak üzere 2 ana biyotipe ayrılmaktadır. Desi tip nohutlar küçük, koyu renkli bir şekle sahipken Kabuli tip nohutlar büyük, pürüzsüz ve açık renklidir. Bu çalışmada Nohutun ER99 çeşidine ait olgun embriyoları kullanılmıştır ve rejenerasyon çalışmasında farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L) TiO₂ nano partiküller kullanılmıştır. En fazla rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. Ayrıca, en uzun sürgünler hem 200 mg/L hem de 800 mg /L TiO₂ konsantrasyonları kullanılarak elde edilmiştir. Daha yüksek oranda (1200 mg/L) TiO₂ nanopartiküllerin kullanımı eksplantlar üzerinde ölümcül etkisi olmuştur. ER99 çeşidi nohutun plumula ve embriyonik eksenini kullanarak yapılan çalışmada ise farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) TiO₂' nanopartiküllere maruz bırakılan eksplantların TiO₂ konsantrasyonu artması ile bağlı rejenerasyon yüzdesinin azaldığı gözlemlenmiştir. *In vitro* desi tip nohut çimlenme çalışmasında farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200 mg/L) TiO₂ eklenmiş besi ortamlarındaki nohut tohumlarında ~%100 çimlenme gözlemlenmiştir. Çimlenme hızı ve ortalama çimlenme zamanı parametrelerinde ise de önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Dikbaş çeşidi nohut tohumlarında ise 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda hiç bir çimlenme izlenmemiştir. Priming süresi arttıkça kök uzunluğu azalırken, priming süresi azaldıkça çimlenme zamanı artmıştır. Çimlenen her tohumunda sürgün oluşmadığı ve tüm ortamlar için sürgün çıkış hızının çimlenme hızından daha az olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Desi, Embriyo, Embriyonik eksen, Kabuli, Plumula,

ABSTRACT

MS THESIS

Efficacy of TiO₂ NPs on *In Vitro* Plant Germination, Growth and Regeneration of Chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Nazmiye Okşan OKAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY, THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Advisor: Prof. Dr. Muhammad ASIM

2020, 57 Pages

Jury

Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Prof. Dr. Muhammad ASIM

Assoc. Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Chickpea (*Cicer arietim* L.) since ancient time has been consumed as human and animal nutrition and ranks first place in terms of cultivated area and production in Turkey. It is a very rich edible legume in terms of protein, essential amino acids and some minerals. Chickpea plant is divided into 2 main biotypes as Kabuli and Desi in terms of seed color and geographical distribution. Desi type chickpeas are small, dark shape, while Kabuli type chickpeas are large, smooth and light colored. In this study, mature embryos of chickpea Cv. ER99 were used for regeneration by applying TiO₂ nanoparticles at different concentrations (100, 200, 400, 800 and 1200 mg/L) in the study. The highest regeneration percentage and number of shoots per explant were observed at 200 mg/L TiO₂ concentration. Whereas, the longest shoots were obtained using both 200 mg/L and 800 mg/L TiO₂ concentrations. The use of TiO₂ a higher concentration resulted in the death of explants. The use of plumula and embryonic axis explants of ER99 cv exposed to TiO₂ nanoparticles at different concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 mg/L) resulted in decreased regeneration percentage with the increase in TiO₂ concentration. The study on *in vitro* germination of desi chickpea cultured on medium containing different concentrations of TiO₂ (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 and 3200 mg/L) resulted in ~100% germination. No significant difference was observed in the germination rate and mean germination time parameters. No germination was observed in Dikbaş Cv. at 800 mg/L TiO₂ concentration. Root length decreased as the priming time increased and germination time increased with increase in priming time. It was observed that no shoots were formed from every germinated seed and the shoot emergence rate was lower than the germination rate for all mediums.

Keywords: Desi, Embryo, Embryonic axis, Kabuli, Plumula

ÖNSÖZ

Yüksek lisans sürecim boyunca bilgisiyle, destekleyici ve özverili tutumu ile bana destek olan danışmanım Prof. Dr. Muhammad Asım'a teşekkür ederim.

Titanyum nanopartikülün temininde yardımcı olan Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Savaş Sönmez'e ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı ve destek olan Muhammet Doğan'a teşekkür ederim.

Özellikle tezimin yorucu ve uzun laboratuvar çalışmalarında yanımda olan ve bana yardımcı olan yüksek lisans arkadaşım Kübra Mirza'ya teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailem Nurgül Okan ve Hakan Okan'a ve stresli zamanlarımda yanımda olan arkadaşlarım Esra Karakaş ve Melis Ayçiçek'e teşekkür ederim

Nazmiye Okşan OKAN
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Bitki Materyali.....	11
3.2. Deneme Yeri.....	11
3.3. Büyüme Ortamları ve Büyüme Koşulları	11
3.4. Priming Uygulamaları.....	11
3.6. Yüzey Sterilizasyonu	12
3.7. Eksplant Kültürü Alma	12
3.8. Nanopartiküllerin Uygulanması	13
3.8. <i>In vitro</i> Çimlenme	14
3.9. <i>Ex vivo</i> Çimlenme.....	14
3.9. Temel Büyüme Parametreleri.....	14
3.9. İstatiksel Değerlendirme	16
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	17
4.1. <i>In vitro</i> Koşullarda Tohum Çimlenmesi	17
4.2. <i>In vitro</i> Embriyo Rejenerasyon Çalışmaları.....	17
4.2.3. ER 99 çeşidinin Plumula ve Embriyonik Eksen Eksplantlarının <i>In vitro</i> Rejenerasyon Çalışmaları	21
4.4. <i>In vitro</i> Çimlenme Çalışmaları.....	24
4.5. <i>Ex vivo</i> Çimlenme Çalışması.....	31
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
6. KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 4.1. Farklı çeşit nohutların MS ortamındaki çimlenme yüzdeleri	17
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasına maruz bırakılan ER 99 çeşit nohutun rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi	18
Çizelge 4.3. ER99 çeşit nohuta farklı konsantrasyonlardaki TiO ₂ ile uygulamasının rejenerasyonuna etkileri	19
Çizelge 4.4. Plumula kısmı izole edilen Dikbaş çeşit nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi	22
Çizelge 4.5. . Plumula kısmı izole edilen Dikbaş çeşit nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı ortalamasına etkisi.....	22
Çizelge 4.6. Embriyonik eksen kısmı izole edilen Dikbaş çeşit nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi	23
Çizelge 4.7. Embriyonik eksen kısmı izole edilen Dikbaş çeşit nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı ortalamasına etkisi	23
Çizelge 4.8. Desi çeşit siyah nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı, ortalama çimlenme zamanı ve tohum canlılık indeksine ait varyans analizi	25

Çizelge 4.9. Desi çeşit siyah nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı, ortalama çimlenme zamanı ve tohum canlılık indeksi üzerine etkisi	25
Çizelge 4.10. Desi çeşit siyah nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğuna ait varyans analizi	28
Çizelge 4.11. Desi çeşit siyah nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu üzerine etkisi	28
Çizelge 4.12. Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve yaprak alanına ait varyans analizi	32
Çizelge 4.13. Dikbaş tip nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve yaprak alanına etkisi	32
Çizelge 4.14 Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı ve tohum canlılığına ait varyans analizi	37
Çizelge 4.15. Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı ve tohum canlılık üzerine etkisi	38
Çizelge 4.16. Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün çıkış yüzdesi, sürgün çıkış hızı ve ortalama sürgün çıkış zamanına ait varyans analizi	43
Çizelge 4.17. Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün çıkış yüzdesi, sürgün çıkış hızı ve ortalama sürgün çıkış zamanına etkisi	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Kabuli (a) ve Desi (b) tip nohutlar (Galili ve ark., 2010).....	1
Şekil 3.1. Tez kapsamında kullanılan ER99 çeşidine ait olgun tohumundan eksplantların izole edilmesi (a), her hangi muamele edilmemiş tohumu (b)1 gün distile saf suda bekletilmiş (c), pens yardımı ile ikiye ayrılmış(d) ve embriyo eksplantın izole edilmiş halleri.....	13
Şekil 3.2. Tez kapsamında kullanılan ER99 çeşidi gelişmiş nohut embriyosunun radikula e.ksen(embriyonik eksen) ve plumula kısımları	13
Şekil 4.1. <i>In vitro</i> koşullarda ER 99 çeşit nohut embriyo eksplantın 100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L TiO ₂ içeren ortamda sürgün rejenerasyonu.....	21
Şekil 4.2. konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde çimlenme hızına etkisi	26
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde ortalama çimlenme zamanına etkisi.....	26
Şekil 4.4. . Farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde tohum canlılık indeksine etkisi.....	27
Şekil 4.5. <i>In vitro</i> koşullarda farklı konsantrasyonlarda (0,25,50,100,200,400,800,1600 ve 3200 mg/L) TiO ₂ ilave edilmiş besi ortamında çimlenen desi çeşit siyah nohutlar	27
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde sürgün ve kök sayısı üzerine etkisi	29
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde sürgün ve kök uzunluğuna(cm) üzerine etkisi	29
Şekil 4.8. <i>In vitro</i> koşullarda farklı konsantrasyonlarda (0,25,50,100,200,400,800,1600 ve 3200 mg/L) TiO ₂ ilave edilmiş besi ortamında çimlenen her konsantrasyondan bir tekrara ait desi çeşit siyah nohutlar	31

Şekil 4.9. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün sayısı üzerine etkisi	33
Şekil 4.10. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün uzunluklarına etkisi	34
Şekil 4.11. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının kök uzunluğuna etkisi	35
Şekil 4.12. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının yaprak alanına etkisi	36
Şekil 4.13. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının çimlenme yüzdesine etkisi	39
Şekil 4.14. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının çimlenme hızına etkisi	40
Şekil 4.15. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının ortalama çimlenme zamanına etkisi.....	41
Şekil 4.16. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının tohum canlılık indeksine etkisi	42
Şekil 4.17 Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün çıkış yüzdesine etkisi	45
Şekil 4.18. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün çıkış hızına etkisi	46
Şekil 4.19. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının ortalama sürgün çıkış zamanına etkisi	47
Şekil 4.20. <i>Ex vivo</i> koşullarda farklı konsantrasyonlarda (0,25,50,100,200,400 mg/L) ve sürelerde (6,12,24 saat) TiO ₂ priming uygulaması ardından pelit ortamına alınarak büyütülen Dikbaş çeşit nohutlar	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% :	yüzde
Ag:	gümüş
AgNO ₃ :	gümüş nitrat
Al ₂ O ₃ :	alüminyum oksit
Au:	altın
BW:	brom su
Ca(NO ₃) ₂ :	kalsiyum nitrat
CaOCl:	kalsiyum hipoklorit
cm:	santimetre
Cu:	bakır
CuO:	bakır (II) oksit
dk:	dakika
EtOH:	etanol
Fe:	demir
Fe ₃ O ₄ :	demir oksit
FeSO ₄ :	demir (II) sülfat
H ₂ O ₂ :	hidrojen peroksit
ha:	hektar
HCl:	hidroklorik asit
HgCl ₂ :	civa klorür
KH ₂ PO ₄ :	mono potasyum fosfat
KNO ₃ :	potasyum nitrat
L:	litre
mg:	miligram
NaCl:	sodyum klorür
NaOCl:	sodyum hipoklorit
NaOH:	sodyum hidroksit
ph:	asitlik-alkalilik faktörü
TiO ₂ :	titanyum dioksit
Zn:	çinko
ZnO:	çinko oksit
ZnSO ₄ :	çinko sülfat

Kısaltmalar

BAP:	6-benzylaminopurin
IAA:	indol-3-asetik asit
IBA:	indol-3-bütirik asit
KIN:	kinetin
mg/L:	miligram/litre
MS:	Murashige ve Skoog besi ortamı
NP:	nanopartikül
PEG:	polietilen glikol
ppm:	milyonda bir
ROS:	reaktif oksijen türleri
SA:	salisalik asit
TDZ:	thidiazuron
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

Nohut, pirinç ve buğday gibi bitkilerle karşılaştırıldığında besin içeriği bakımından üstünlüğe sahiptir. Sadece protein bakımından değil, essensiyel yağlar, esansiyel aminoasit, vitaminler ve Fe, Zn, Cu gibi mineraller bakımından da zengindir. Dünyada tarımı yapılan yemeklik tane baklagiller türleri içerisinde ekim alanı ve üretim bakıldığında birinci sırada kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), ikinci sırada bezelye (*Pisum sativum* L.) ve üçüncü sırada nohut (*Cicer arietinum* L.) yer almaktadır. Nohut üretimi 50'den fazla ülkede yapılmakta olup, Türkiye 395.000 ha alanda, 120 kg/ha verim ve 470.000 ton üretimiyle dünyada nohut yetiştirici ülkeler arasında önemli bir yer tutmaktadır (TUİK 2018).

Nohut bitkisi tohum renkleri ve coğrafi dağılımları bakımından Kabuli ve Desi olmak üzere 2 ana biyotipe ayrılmıştır (Wang ve ark., 2010). Pakistan ve Güney Asya ülkelerinde Desi tip nohut yetiştirilirken Türkiye'de ağırlıklı olarak Kabuli tip nohut yetiştirilmektedir (Aydemir ve Yemencioğlu, 2013). Desi tipi nohudu Güney Doğu ve Doğu Anadolu'da hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır. Desi tip nohutlar küçük ve koyu renkli bir şekle sahipken Kabuli tip nohutlar büyük, pürüzsüz ve açık renklidir (Purushothaman ve ark., 2014). Ayrıca desi tip nohutlar antosiyanin pigmentine sahip olup, çiçekleri pembe rengindedir (Jukanti ve ark., 2012).



Şekil 1.1. Kabuli (a) ve Desi (b) tip nohutlar (Galili ve ark., 2010)

Steril ortam şartlarında hazırlanan yapay besi ortamında meristematik hücreler, kallus hücreleri, çeşitli bitki eksplantları, apikal meristem, kök gibi çeşitli bitki bölümlerinden yeni bitki, doku veya metabolitler üretilmesi bitki doku kültürü olarak adlandırılır (Babaoğlu ve ark., 2001).

Bitkinin tek bir hücresinden tüm bitki elde etme kabiliyetine rejenerasyon denir. Bitki doku kültürü çalışmalarında bitkinin rejenerasyon kabiliyetinden yararlanılır ve rejenerasyon direkt ve indirekt olarak iki çeşittir. Direkt rejenerasyonda kallus oluşumu gözlemlenmezken indirekt rejenerasyon sırasında kallus oluşmaktadır. Organize olmamış hücre topluluklarına kallus denilmektedir. İndirekt rejenerasyonda kallus aşamasında hücrelerin genetik stabiliteleri düşük olduğu için gen aktarım çalışmalarında direkt rejenerasyon tercih edilmektedir. Besi ortamına bitki hormonları ilave edilerek kallus, embriyo ve sürgün oluşturulabilir. Organogenez ve somatik embriyogenez yolları ile rejenerasyon sağlanabilir (Babaoğlu ve ark., 2001). Bitki eksplantından; direkt sürgün veya bitki oluşması (direkt organogenez), önce kallus ardından sürgün veya bitki oluşması (indirekt organogenez), önce somatik embriyo ardından sürgün veya bitki oluşması (somatik embriyogenez), ilk kallus ardından somatik embriyo en son da sürgün veya bitki oluşması (indirekt somatik embriyogenez) rejenerasyon yolları olarak adlandırılabilir.

Nanoteknoloji maddenin 1 ile 100 nanometre büyüklüğü arasındaki davranışlarını anlayıp, kontrol etme bilimi olarak tanımlanabilir. Bu şekilde bir kontrol çeşitli alanlarda kökten değişime neden olmaktadır. (Allhoff, 2009). Nanoteknoloji, üreme bilimi ve teknolojisi, gıda ve tarım atıklarının enerjiye dönüştürülmesi ve hastalık önleme gibi tarımsal çalışmalarda gelişmelere olanak sağlamaktadır (Carmen ve ark., 2003).

Nanopartikülleri diğer büyük materyallerden ayıran yalnızca boyutlarının spesifik önemi değil ayrıca nanopartiküller kimyasal reaktiviteleri, enerji emilimleri ve biyolojik mobiliteleri bakımından da büyük maddelerden farklı bir yapı göstermektedir. Metal nano toz, nano kompozit gibi nano parçacıklar barındıran nanopartiküller nano malzemenin ana parçalarıdır (Nair ve ark., 2008).

Yarı iletken olan titanyum dioksit (TiO_2) son zamanlarda çoğunlukla, fotokatalizör, güneş koruyucu, fotovoltaiik güneş pilleri, optik filtreler, yansıma

önleyici kaplamalar, kimyasal sensörler gibi alanlarda olduğu kadar katalizörler ve sterilizasyon malzemesi olarak da tercih edilmektedir (Maira ve ark., 2000; Viana ve ark., 2010). Bu materyalin diğer önemli özellikleri yüksek görünür spektrum geçirgenliği, yüksek kırılma indeksi, kimyasal stabilite ve fotokatalitik ve aynı zamanda antimikrobiyal aktivitedir (Viana ve ark., 2010).

Bu çalışmada amaç olarak nanopartiküllerin *in vitro* şartlarda bitki üzerinde kullanımın çimlenme, büyüme ve *in vitro* rejenerasyon üzerine etkilerini araştırarak, bu yeni kullanılmaya başlayan nanopartiküllerin bitki üzerinde bilinmeyen yönlerini keşfetmek ve son zamanlarda çalışılmaya başlanan bu alana kaynak sağlamaktır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Nohut (*Cicer arietinum* L.) çok eski zamanlardan beri insan ve hayvan beslenmesinde tüketilen, Türkiye'de ekim alanı ve üretim bakımından ilk sırada yer alan, protein, esansiyel aminoasit ve bazı mineraller bakımından bir hayli zengin yemeklik tane baklagildir (Akçin, 1988). Nohut, içinde bulundurduğu yüksek protein miktarı nedeniyle, beslenmede hayvansal gıdalara alternatif bitkisel bir kaynak olarak öne çıkmaktadır. Esansiyel aminoasitler açısından yüksek miktarda farklı proteinleri barındırmaktadır.

2.1. Nohut Bitkisinde *In vitro* Rejenerasyon Çalışmaları

Nohut bitkisinin farklı miktarlarda çeşitli büyüme düzenleyicilerin embriyo üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada nohutlar ilk önce sterilize edilmiş daha sonra bir gece ıslatılıp embriyonik eksen ve kotileon boğum kısımları izole edilip farklı BAP ve IBA hormonlarının bulunduğu ortamlara aktarılmıştır. 3 mg/L BAP içeren MS ortamında en yüksek sürgün başlangıcı gözlenmiş olup, embriyonik eksen eksplantları tüm koşullarda maksimum büyüme gelişme göstermiştir. 0,3 mg/L IBA içeren MS ortamında ise her iki eksplant için de kök oluşumu açısından iyi sonuçlar vermiştir. MS ortamlarında ise zayıf sonuçlar elde edilmiştir (Behere ve ark., 2017).

Giza 531 ve Giza 4 olarak anılan iki nohut çeşidinde yapılan bir çalışmada direkt organogenez embriyo ekseni, dikey olarak ikiye kesilmiş embriyo ekseni, dikey embriyo eksen kesiti, embriyo ekseni kotiledonun bitişik kısmı eksplant olarak kullanmıştır. Rejenerasyon için 1, 2, 3 mg/L BAP, TDZ ve Zeatin kullanılıp gelişen sürgünleri 0.25, 0.50, 0.75, 1 mg/L IBA ve IAA içeren ortamda köklendirilmiştir. IBA ve BAP bulunan ortamlarda sırasıyla en yüksek sürgün rejenerasyon ve kök oluşumu yüzdeleri izlenmiştir. Giza 531 çeşidi, sürgün oluşumu bakımından Giza 4 çeşidinden daha iyi sonuç vermesine rağmen kök oluşumu için daha düşük sonuç vermiştir (Amer ve ark., 2019)

2.2. Nanopartiküllerin Uygulanması

Nanopartiküller son zamanlarda bitkilerin çimlenmesi, büyümesi veya *in vitro* koşullarda bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak sterilizasyonu, kallus veya sürgün oluşumu, somatik embriyojenezi ve antioksidan enzim aktivitelerini değiştirerek kök oluşumunu, gen ekspresyonunu, etilen üretiminin inhibisyonunu ve ROS üretimini etkilemesi görülmüştür. Gümüş (Ag), alüminyum oksit (Al_2O_3), bakır (II) oksit (CuO), demir oksit (Fe_3O_4), altın (Au), magnezyum oksit (MgO), nikel (Ni), silikon (Si), silikon dioksit (SiO_2), titanyum dioksit (TiO_2) ve çinko oksit (ZnO) gibi çok çeşitli nanopartiküllerin çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu görülmüştür (Beyth ve ark., 2015).

2.3. Nanopartiküller ve Sterilizasyon Çalışmaları

In vitro kültürün başlangıcındaki en önemli adım yüzey dezenfeksiyonudur. Yüzeysel sterilizasyon aşamasında başarı elde edilmeden, ilerleyen aşamalara geçmek mümkün olmamaktadır. Brom su (BW), kalsiyum hipoklorit (CaOCl), etanol (EtOH), hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum hipoklorit (NaOCl), cıva klorür ($HgCl_2$), gümüş nitrat ($AgNO_3$), antibiyotikler ve fungusitler gibi dezenfektanların maruz kalma süresi, konsantrasyonları eksplantların kalitesini etkilemektedir. (Leifert ve ark., 1994).

In vitro çalışmalarda bakteriyel kontaminasyonu önlemek için son zamanlarda farklı yöntemler kullanılmıştır. Antibiyotikler, bitki ortamındaki istenmeyen kontaminasyonları önlemek için besiyerlerde çoğunlukla kullanılır. Lakin antibiyotikler fitotoksik etki göstererek bitki büyümesini engelleyen ve geciktiren bir etkisi olabilir. Bazı dezenfektanlar da eksplantlarda bulunan kirleticileri yok etmekte başarısız olarak fitotoksiteleri nedeniyle organojenezi olumsuz etkilemiştir. Metal ve metal oksit nanopartiküller ise çeşitli mikroorganizmaları ortadan kaldırmakta yararlı etkileri olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2017)

Bakteriyel kontaminasyonu önlemek için *Valeriana officinalis* bitkisinde Ag nanopartikül kullanılmıştır (Abdi ve ark., 2008). Serada yetiştirilen bitkilerden elde edilen tek düğüm eksplantları, önce 1 dakika boyunca %70 EtOH, sonra 1 dk boyunca %10 Clorox ve daha sonra 180 dakika 100 mg/L Ag nanopartikül ile dezenfekte edilmiş ve sonucunda %89 oranında kirlilikten uzak kültür elde edilmiştir. Ayrıca, Ag nanopartikül uygulaması filiz çoğalması ve sonraki köklenmeyi etkilememiştir.

Arabidopsis tohumlarının, patates yapraklarının ve domates kotiledonlarının Ag nanopartikül kullanımının yüzey sterilizasyona etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada eksplantlar 100 mg/L Ag ile 1 veya 5 dk muamele edilmesiyle tohumlar, yapraklar ve kotiledonlar için ideal dekontaminasyon (%100) bulunmuştur. Ayrıca, eksplant canlılığı üzerinde hiçbir yan etkisi de olmamıştır. Ancak, tohum çimlenmesi, yaprak ve kotiledon sağkalımı, daha yüksek Ag nanopartikül konsantrasyonları ile muamele edildiğinde azalmıştır (Mahna ve ark., 2013).

2.4. Nanopartiküller ve *In vitro* Çimlenme, Büyüme ve Rejenerasyon Çalışmaları

Altın (Au) nanopartiküller MS bazal ortamına eklenmesinin Arabidopsis thaliana'da tohum çimlenmesi ve fide büyümesinin yüzdesini artırdığını gözlemlenmiştir. Pod uzunluğu ve tohum sayısı 10 mg/L Au nanopartikül ile muamele edilen bitkilerde daha yüksek olduğu görülmüştür. Au nanopartikül uygulaması, antioksidan enzim aktivitesini geliştirmiş ve *A. thaliana*'da mikroRNA'ların (miR398 ve miR408) ekspresyonunda bir azalmaya yol açmıştır. Bu fizyolojik ve moleküler varyasyonlar, Au nanopartiküllerin yararlı etkilerinden olabilir (Kumar ve ark., 2013).

Tecomella undulata bitkisinin kök eksplantları ile yapılan çalışmada eksplantlar MS ortamına 10 mg/L Ag nanopartikülü, 2.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L IAA eklenerek elde edilen ortamda kültürlendiğinde filizlenme indüksiyon yüzdesi, sürgün sayısı ve kallus oluşumunun arttığı görülmüştür (Sarmast ve ark., 2015).

Yapılan bir diğerk çalışmada 50 mg/L Ag nanopartikülün MS bazal ortamına dâhil edildiğinde Brassica juncea fidelerinin büyüme özelliklerini aktive edici antioksidan enzimler yoluyla hidrojen peroksit, malondialdehid (MDA) ve prolin içeriğini azaltarak artırdığını gözlemlenmiştir. Ayrıca, daha yüksek Ag NP konsantrasyonları (100-400 mg/L) fide büyümesi üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.(Sarmast ve ark.2015).

Nohut tohum polimer kaplamasının, 10 ve 25 ppm Zn, Fe ile 100 ve 500 ppm ZnSO₄, FeSO₄ olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda nanopartiküllerin, 6 ve 12 saat olmak üzere hidropriming uygulamasının nohut tohumunun fide karakterleri üzerindeki etkisini bilmek için bir laboratuvar çalışması yapılmıştır. Sonuçta 25 ppm Fe nanaopartikül olan tohum polimer kaplamasında %87.25 olacak şekilde önemli ölçüde tohum çimlenmesi ve %86.75 kadar çimlenme hızı artışı görülürken, 19.36 cm fide kökü uzunluğu, 12.98 cm fide sürgün uzunluğu, 32.34 cm fide uzunluğu gözlemlenmiştir. Hidropriming uygulaması parametreler üzerinde ayrı ayrı olumlu etkisi varken, bu priming uygulamasının hazırlanma şekli de önemlidir. Sonuç olarak nohut tohum kalitesini yükseltmek için 25 ppm Fe ve Zn nanopartiküllerinin kullanılmasının olumlu etkisi vardır (Sumanth Krishna ve ark., 2017).

2.5. Nanopartiküller ve Bitki Büyümesi ve Rejenerasyon Çalışmaları

Bitki büyümesi ve rejenerasyon çalışmasında 0.2 mg ZnO nanopartikül, 100 ml deiyonize (DI) su içinde doğrudan dağıtılmış ve 30 dakika süreyle ultrasonik ışımlama (100 w, 40 kHz) altına yerleştirilerek nano-ZnO süspansiyonu elde edilmiştir. 1 saat boyunca DI suda ıslatılan Cicer arietinum L. tohumları daha sonra, nano-ZnO süspansiyon çözeltisinde 2 saat muamele edilmiştir. ZnO nanopartiküllerin, fito-uyarıcı faaliyetlerde rol oynayan özellikle IAA, fitohormonların reaktivitesi üzerindeki etkisi görülmüştür. Oksijen boşlukları nedeniyle, oksijenden yoksun, yani çinko bakımından zengin ZnO nanopartikülleri, köklerdeki (filiz) IAA seviyesini arttırmıştır (Pandey ve ark., 2010).

Nano-ZnO partiküllerinin maş fasulyesi (*Vigna radiata*) ve *C. arietinum* bitki fidelerinin büyümesi üzerindeki etkisini göstermek için yapılan çalışmada, *V. radiata*

için 0, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 2000 ppm ve *C. arietinum* için 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 2000 ppm ZnO agar ortamına eklenmiştir. Sonucunda optimum konsantrasyonlarda fidelerin iyi bir büyüme gösterdiği ve büyümede gecikme olduğu gözlenmiştir (Dhoke ve ark., 2011).

Nohut üzerinde bir çalışmada 1.5 mg/L ZnO nanopartikül çözeltisinin yapraktan uygulanmasının, ZnSO₄ değişmesine göre biyokütlesini arttırdığını gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 10 mg/L ZnO nanopartikül uygulaması kök biyokütleyi olumsuz etkilemiştir (Burman ve ark., 2013).

TiO₂ nanopartikül uygulaması ile soğuk stresindeki nohut bitkilerine odaklanan bir çalışmada, TiO₂ nanopartiküllerinin, soğuk strese, bitkiler üzerindeki iyileştirici etkileri, sinyal iletimi, savunma, metabolizma ve düzenleyici süreçlerde yer alan muhtemel tepki bileşenleri ile ilişkilendirilmiştir. Görünüşe göre, bu bileşenler nohutun soğuk strese toleransının arttırılmasında olumlu etkiler sağlamaktadır (Amini ve ark., 2017).

2.6. Çimlenme ve Priming Uygulamaları

Çimlenme bitki yetiştirilmesinde önemli ve hassas bir aşamasıdır. İntert durgun bir tohumun hareketli güçlü metabolizmaya dönüştüğü için çimlenme oldukça karmaşık bir süreçtir (Dow and Schwintzer 1999). Suyun emilmesi ile başlayan ve bir vakit sonra enzimatik proteinlerin sentezlenmesi ve aktive edilmesi ile devam eden çimlenme tüm tohumlar için bu şekilde başlar. Çimlenme çevresel etkiler ve hormonal etkileşimler aracılığıyla düzenlenir (Paleg, 1960; Iglesias ve Babiano, 1997) ve sadece koşullar uygun hale geldiği zaman olur. Ekzojen ve endojen birçok faktör bu süreci etkilemektedir.

Tohumda ya da bitkinin öteki organlarında gelişme görülmemesi çimlenme durgunluğu (dormansi) olarak adlandırılır. Embriyo içinde ve dış kabuk sebebiyle oluşan dormansi birbirinden farklıdır. Embriyo çevresindeki kabuğun çıkarılması dış kabuğun sebep olduğu dormansiyi kaldırır. Embriyo gelişme durumu dış kabuk sınırlamasından daha güçlü olduğu durumlarda tohumda çimlenme gözlenir.

Priming uygulamasının amaçları; çimlenme ve çıkış oranını arttırmak, ekim ve çıkış arası süreyi kısaltmak, fide çıkışını bir örnek sağlamak, bazı türlerde termal dormansinin kırılmasını ve buna bağlı olarak çimlenmenin garantilenmesini sağlamak, çimlenme esnasında tohumda bulunan besin maddelerinin en verimli şekilde kullanılmasını sağlayarak güçlü fidelerin oluşmasına katkı sağlamak ve düşük, yüksek sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık gibi çeşitli stres koşullarına dayanımı arttırmak olarak sayılabilir. Priming uygulamaları; hidropriming, halopriming, ozmopriming, hormonal priming, biyopriming, organik priming, katı matris priming ve termo priming olarak ayrılır.

Ortamdaki su ve oksijen yetersizliği, tohum geçirimsizliği gibi sebeplerle doğada ekilen her tohum çimlenmeyebilmektedir. Çimlense bile gelişmiş ve sağlıklı fide elde edilemeyebilir. Priming; tohumların ozmotik bir çözelti ya da su içerisinde su alımına izin verip kökçüğün tohum çıkışına izin vermeyen bir ekim öncesi uygulama olarak tanımlanabilir. Priming uygulamasının fizyolojik temeli; tohumların su veya ozmotik bir solüsyonla ile muamele edilerek, tohumun ozmotik potansiyelinde bir denge sağlayarak biyokimyasal aktivasyonun başlamasına izin verip, fakat kökçüğün kabuktan çıkışı sınırında uygulamanın durdurulmasına dayanır. Priming uygulaması yapılan tohumlar çimlenmenin ilk evresini tamamladıktan sonra yıkanır orijinal nem içeriklerine kadar kurutularak depolanabilir veya ekimi yapılabilir.

Şeker, polietilen glikol (PEG), gliserol, sorbitol kullanılarak hazırlanan sıvı çözeltiler ile yapılan ozmopriming uygulamasının alternatifi olarak katı matris primingde; organik veya inorganik maddeler kullanılarak tohumların su alımını kontrollü biçimde gerçekleştirilmesine olanak sağlanır (Harman, 1998).

Haloprimingde farklı konsantrasyonlarda inorganik tuzlar (NaCl, KNO₃, KH₂PO₄ Ca(NO₃)₂) kullanılır. Halopriming uygulanmış tohumların tuzlu topraklarda daha rahat yetişebilme imkânlarının olduğu görülmüştür (Ashraf ve Foolad, 2005).

Hormonal priming uygulamasında sitokinin, oksin, gibberellin, absisik asit, salisalik asit, brassinosteroid gibi bitki büyüme ve gelişmesinde önemli olan fitohormonların tohuma uygulanmasıdır. Tuz stresine toleranslı ve toleranssız iki buğday çeşidinde yapılan çalışmada buğday tohumları tuz stresine maruz kaldıktan sonra tohumlar 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L Kin ve BAP hormonları ile muamele

edilmiştir. Kin uygulamasının her iki çeşit için de büyüme ve tane verimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Tuz stresine toleranssız bitkilerde 100 mg/L Kin ve toleranslı bitkilerde 150 mg/L BAP ve Kin priming uygulamalı kültürlerde tuzlu koşullarda yaprak serbest SA miktarında artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hafif Kin priming uygulamasının her iki çeşitte de tuz stresinde büyüme ve tane verimi üzerinde tutarlı faydaları olduğu görülmüştür.(Iqbal ve Ashraf, 2006).

Biyopriming uygulaması ise biyoaktif moleküller ve yararlı mikroorganizmalar ile yapılan tekniktir. Mikroorganizmalar bitkiler ile endofitik ilişkiler kurarak fitohormon üretimine, bitki büyümesine ve stres koşullarına dayanıklılığını arttırmaktadır (Waller ve ark., 2005).

Organik priming deniz yosunu gibi çeşitli organik bitkisel ekstraktlar kullanılarak yapılan priming uygulamasıdır.

Termo priming uygulamasında ise tohumlar oksijen bakımından zengin yüksek sıcaklıktaki saf su içersinde karanlıkta bekletilir. Ekimden önce yapılan sıcaklık uygulamaları çimlenme oranına olumlu etkileri vardır (Hardegree, 1996

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak Kabuli tipi tescilli beyaz nohut ve Desi tipi siyah nohut kullanılmıştır. Kabuli tip nohutlarda Gökçe, TAEK, ER99 ve Dikbaş çeşidi tercih edilmiştir. Bitki materyalleri Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yeni Mahalle, Ankara'dan temin edilmiştir.

3.2. Deneme Yeri

Bu çalışma Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

3.3. Büyüme Ortamları ve Büyüme Koşulları

Bu tez çalışmasında MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı ile %3 süzkroz kullanarak hazırlanmış ve %6 agar ile katılaştırılmış ortam kullanılmıştır. Ortam hazırlanmasında saf su kullanılmış ve pH'sı 5,7-5,8'e ayarlamak için 1 N NaOH veya 1 N HCl kullanılmıştır. Ardından otoklavda 1,2 atmosfer basınç altında 121 °C'de 20 dk tutularak sterilizasyonu sağlanmıştır.

Tez kapsamındaki çalışmalar beyaz ve gün ışığı olmak üzere LED ışık altında 16 saatlik fotoperiyot ve 24±2 °C altındaki iklim odasında tutulmuştur. Çimlenme denemeleri için Magenta GA-7 kutuları veya cam kavanoz kullanılırken rejenerasyon denemelerinde cam petri kullanılmıştır.

3.4. Priming Uygulamaları

Tez kapsamında çimlenme denemelerinde çimlenmeyi arttırmak için tohumlar saf su kullanılarak 1 gün hidropriming uygulamasına tabi tutulmuştur.

3.5. *In vitro* rejenerasyon alışmaları

In vitro rejenerasyon denemelerinde ise tohumlar farklı konsantrasyonlarda BAP hormonu içeren MS ortamı kullanılmış, farklı sürelerde bekletilerek büyümeleri sağlanmıştır. Daha sonra, plumula ve embriyonik eksen eksplantları izole edilerek rejenerasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.6. Yüzey Sterilizasyonu

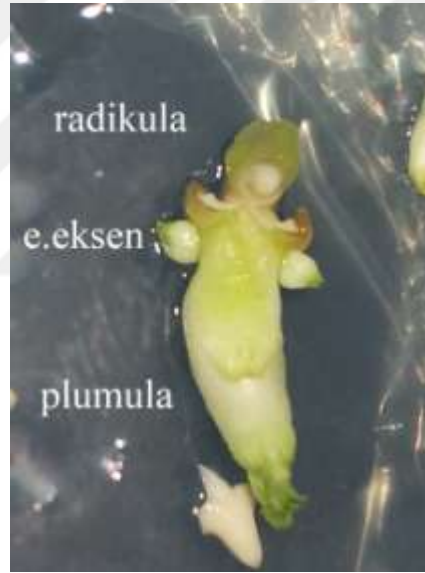
Nohut tohumların sterilizasyonu için farklı sürelerde (dk) ticari çamaşır suyu (Ace, Türkiye- %5 NaOCl) kullanılmıştır (Aasim ve ark. 2013). Kabulı tip tescilli Gökçe, TAEK, ER99 ve Dikbaş nohutların yüzey sterilizasyonunda çamaşır suyunun bekleme süresi 30 veya 10 dk iken, Desi tipi siyah nohutta 15 dk olarak optimize edilmiştir (Kirtış ve Aasim, 2019). Çamaşır suyunda bekletilen nohutlar ardından distile steril saf su ile 3 kez 5'er dk yıkanmıştır. Çamaşır suyunda bekletme ve yıkama işlemleri sırasında tohumlar manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen bir ortam oluşturulmuştur.

3.7. Eksplant Kültürü Alma

Bu tezde *in vitro* alışmalarda embriyo, plumula ve embriyonik eksen eksplantları kullanılmıştır. Embriyo kültürü için sterile edilen nohut tohumları 1 gün steril saf suda bekletilmiş ardından steril bistüri ve pens yardımı ile embriyoları izole edilmiş ve kültüre alınmıştır (şekil 3.1.). Plumula ve embriyonik eksen eksplantlar kullanılan çalışmalar iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada tohumlardan embriyolar izole edilmiştir ve 10 mg/L BAP içeren MS ortamında 10-15 gün bekletilmiştir. Daha sonra, ikinci aşamada embriyolardan embriyonik eksen ve plumula eksplantları steril pens ve bistüri ile eksplantlara zarar vermeyecek şekilde izole edilmiştir (şekil 3.2.). Bütün alışmaları yapmak için steril kabin kullanılmıştır



Şekil 3.1. Tez kapsamında kullanılan ER99 çeşidine ait olgun tohumundan eksplantların izole edilmesi (a), herhangi muamele edilmemiş tohumu (b)1 gün distile saf suda bekletilmiş (c), pens yardımı ile ikiye ayrılmış(d) ve embriyo eksplantın izole edilmiş halleri



Şekil 3.2. Tez kapsamında kullanılan ER99 çeşidi gelişmiş nohut embriyosunun radikula, e eksen (embriyonik eksen) ve plumula kısımları

3.8 Nanopartiküllerin Uygulanması

TiO₂ nanopartikülü otoklav öncesi besiyerlere çeşitli konsantrasyonlarda eklenerek kullanılmıştır.

3.8. *In vitro* Çimlenme

In vitro çimlenme çalışmalarında Desi ve Kabuli olmak üzere farklı çeşit nohutlar kullanılmıştır. Sterilize edilen Kabuli nohutlar 1 gün distile steril suda ön muameleye tabi tutulup, Desi tip nohutlar ise bir ön muamele olmaksızın direk kültür ortamına alınmıştır.

3.9. *Ex vivo* Çimlenme

Bu denemede nohutlar farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 400 mg/L) TiO_2 ortamında farklı sürelerde (6, 12, 24 saat) priming uygulanmış daha sonra 4 tekrar ve her kavanozda 10 eksplant olacak şekilde, su ile nemlendirilmiş perlit dolu kavanozlara alınmıştır. Her gün çimlenmeleri gözlenmiş ve perlit nemli kalacak şekilde sulanmıştır.

3.9. Temel Büyüme Parametreleri

TiO_2 nanopartikülün bitki rejenerasyonu üzerindeki etkileri inceleyebilmek için rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu, parametreleri ölçülmüştür. Her bir tekerrür içindeki eksplantların sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu ölçülüp toplam büyümüş eksplant sayısını bölünmüştür.

Çimlenme denemelerinde ise TiO_2 nanopartikülün etkilerini inceleyebilmek için eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, kök sayısı parametreleri ölçülmüştür. Çimlenme yüzdesi için sayım işlemi ekim işleminden 24 saat sonra başlayıp çimlenme sabitlene kadar devam etmiştir ve 2mm kök gözlemlenen tohumlar çimlenmeye başlamış kabul edilmiştir. Çimlenme denemelerinde aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

Yaprak alanı belirlenirken; her tekerrür içinde rastgele olarak 10 yaprak seçilmiş ardından düz beyaz zeminde fotoğrafları çekilerek "ImageJ" programı kullanılmıştır. Alanı ölçerken kalibrasyon sağlamak amacıyla yaprakların fotoğrafları çekilirken yanlarına cetvel konulmuştur.

- a. Çimlenme yüzdesi:** Tohumların yüzde kaç oranda çimlendiği belirlemek için bu formül kullanılmıştır.

$$\text{Çimlenme Yüzdesi (\%)} = \left(\frac{\text{Son çimlenen tohum sayısı}}{\text{Toplam tohum sayısı}} \right) \times 100$$

- b. Çimlenme indeksi (çimlenme hızı):**

Bu formül kullanılarak elde edilen yüksek değerler, bir tohumun diğerine göre daha yüksek fide gücüne sahip olduğu anlamına gelir. Çimlenme hızı olarak da adlandırılan bu formül aynı sayıda çimlenen numuneler için bile farklı değerler verebilmesi sebebiyle özellikle de ekili türlerde tohumların göreceli olarak gücünü belirlemek için kullanılır (Maguire, 1962).

$$\text{Çimlenme İndeksi} = \sum d/n$$

n: d gününde çimlenen tohum sayısı

d: deneme başından itibaren sayılan günler

- c. Ortalama Çimlenme Zamanı:** Tohumların ortalama olarak çimlendiği günü tespit edebilmek için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Ellis ve Roberts, 1981).

$$\text{Ortalama Çimlenme Zamanı} = \frac{\sum dn}{\sum n}$$

n: d gününde çimlenen tohum sayısı

d: deneme başından itibaren sayılan günler

- d. Tohum canlılık indeksi:**

Kök ve sürgün uzunluk ortalamasının çimlenme yüzdesi ile çarpılarak elde edilen bu formül sonucu yüksek indekse sahip tohum için canlılık oranının yüksek olduğu söylenebilir (Abdul-Baki ve Anderson, 1973).

Tohum Canlılığı İndeksi=(K.O.+S.O.)×Çimlenme yüzdesi

K.O: kök uzunluğu ortalaması

S.O.: sürgün uzunluk ortalaması

3.9. İstatiksel Değerlendirme

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen veriler “SPSS 20 for Windows” programıyla varyans analizine tabi tutulup, ortamları karşılaştırmak amacıyla Duncan (DMRT) testi kullanılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce arcsin değerlerine çevrilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *In vitro* Koşullarda Tohum Çimlenmesi

Bu denemede nohut embriyolarının *in vitro* koşullarda MS ortamındaki gelişme ve canlılık oranları karşılaştırılmıştır. Sterilizasyonu yapıp embriyo kültüründe alınan nohutlar MS ortamındaki 4 gün sonraki gelişmeleri karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.1’de gösterildiği üzere en yüksek canlılık oranı yani embriyo gelişimi %100 ile ER99’da gözlenirken, %73 ile ikinci sırada Gökçe gelmekte olup, üçüncü sırada ise %55 oranı ile TAEK olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak embriyo rejenerasyon denemeleri için nohudun ER99 çeşidi canlılık ve gelişme bakımından diğer nohut çeşitleri ile kıyaslanmada daha avantajlıdır. Aynı kabulü biyotip içinde dahi olsa farklı çeşit nohut tohumları birbirinden farklı büyüme ve gelişme gösterirler (Sozen ve Karadavut, 2019; Sağel ve ark., 2009). Tohum çeşitleri arasındaki canlılık oranları farkları bundan kaynaklanıyor olabilir.

Çizelge 4.1. Farklı çeşit nohutların MS ortamındaki çimlenme yüzdeleri

Nohut Çeşidi	Canlılık oranı (%)
TAEK	55
ER99	100
Gökçe	73

4.2. *In vitro* Embriyo Rejenerasyon Çalışmaları

4.2.1. Dikbaş Çeşidinde *in vitro* Rejenerasyon çalışmaları

Nohudun Dikbaş tip çeşidinde yapılan ilk çalışmada 10 dk’lık sterilizasyondan sonra 1 gün steril saf suda bekletilmesinin ardından embriyolar izole edilmiştir. Embriyolar 13 gün boyunca 10 mg/L BAP içeren MS ortamında ön muameleye tabi tutulmuş ardından 0, 25, 50, 100, 200 mg/L TiO₂ ve 1 mg/L BAP içeren MS ortamlara aktarılmıştır. Fakat iklim odasındaki yüksek sıcaklıktan dolayı petrilere fazla su birikmesi oluşmuştur. Biriken sular laminer flow kabin içinde

boşaltılmıştır. Ancak, petrilere oluşan biraz kontaminasyon ve belirgin bir büyüme rastlanmadığı için veriler alınmamıştır.

İkinci denemede besi ortamlarda 200 mg/L antibiyotik ilave edilerek önceki denemeye göre yapılmıştır. Ama yine de eksplantlarda her hangi büyüme görülmemiştir. *In vitro* koşullarda antibiyotik kullanımının bitki rejenerasyonuna olumsuz etkileri olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Padilla ve Burgos., 2010).

4.2.2. ER 99 çeşidinin Embriyo Eksplantlarının *In vitro* Rejenerasyon Çalışmaları

Bu denemede kullanılan embriyo eksplantları sterile edilmiş ER99 nohut çeşidinin 24 saat steril saf suda bekletilmesi ardından izole edilmiştir. Olgun embriyo veya zigotik embriyo, nohutun sürgün rejenerasyonunu indükleyen güçlü eksplantlardan biridir (Aasim ve ark., 2011). 100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L TiO₂ ve 1 mg/L BAP içeren MS ortamda 15 gün kültüre alınmıştır. Daha sonra elde edilen sonuçlar incelenmiştir. TiO₂ nanopartikülün otoklav sıcaklığına dayanıklılığı optimize edilmeden önce bu çalışmada TiO₂ filtre sterilizasyon ardından besi ortamına ilave edilmiştir. 15 gün sonra elde edilen verileri SPSS analizi ile varyans analizi tabi tutulmuştur (Çizelge 4.2)

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasına maruz bırakılan ER 99 çeşit nohutun rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait varyans analizi

V.K.	S.D	Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı(adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
TiO ₂	4	4306,667	20,187**	6,812	26,485**	3,305	12,174**
Hata	10	213,33	-	0,257	-	0,272	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-	-	-

** $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.2.'de ER 99 çeşidi nohutta farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna ait varyans

analizleri gösterilmiştir. Her parametre için TiO₂'in farklı uygulama sonucu elde edilen veriler arasında $p \leq 0.01$ düzeyinde önemli farklılık izlenmiştir.

Çizelge 4.3. ER99 çeşit nohuta farklı konsantrasyonlardaki TiO₂ ile uygulamasının rejenerasyonuna etkileri

TiO ₂ (mg/L)	Rejenerasyon Yüzdesi (%)**	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)**	Sürgün Uzunluğu (cm)**
100	86,67ab	3,50 a	2,21 a
200	93,33a	3,70 a	2,40 a
400	80,00ab	3,09 a	2,35 a
800	60,00 b	2,86 a	2,40 a
1200	0,00 c	0,00 b	0,00 b

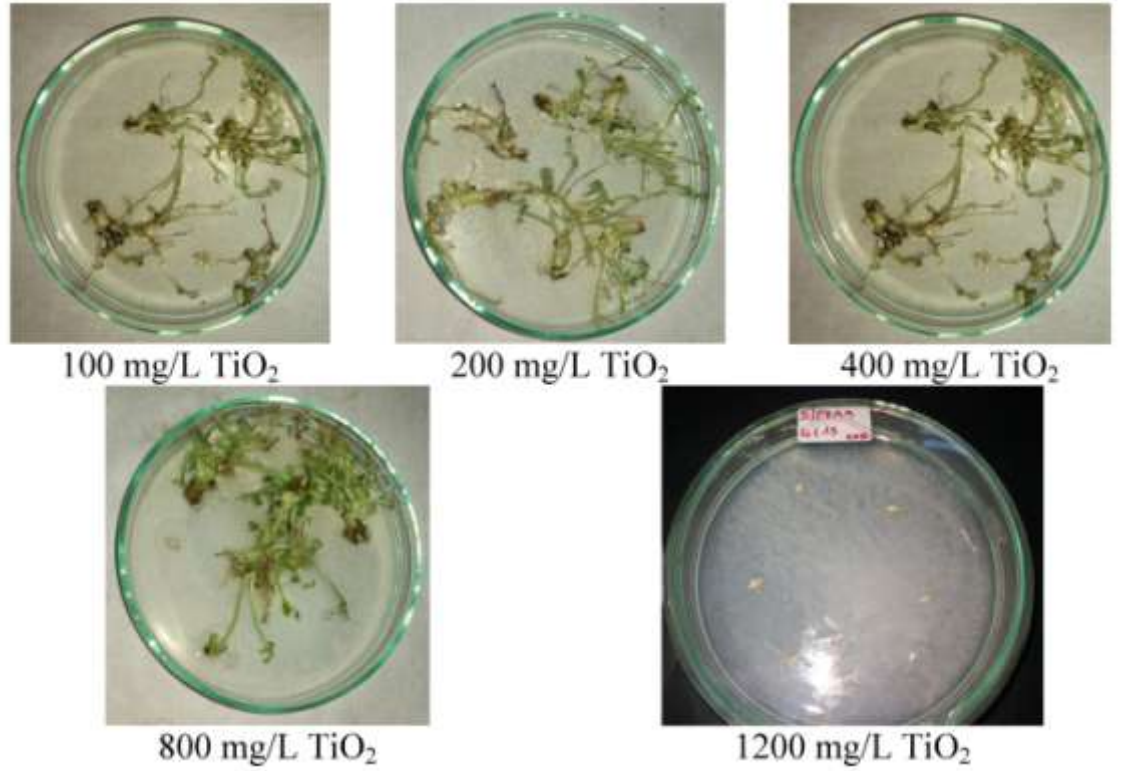
**Aynı sütun içinde farklı harfler ile gösterilen ortamlar arasındaki fark $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

Ortamların hiç birinde kontaminasyon gözlemlenmemiştir bu da TiO₂ nanopartikülün mikroplar üzerindeki toksik etkisini göstermektedir (Mandeh ve ark., 2012; Mohammed ve ark., 2015). TiO₂ nanopartikülü ilave edilmiş hiçbir ortamda kallus oluşumu gözlemlenmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda Cu (Bentarzi ve ark., 2016) ve Ag nanopartiküllerinin (Kalsaitkar ve ark., 2014) bitki üzerinde kallus oluşumunu azaltıcı veya inhibe edici etkisi olduğu rapor edilmiştir. Fakat yapılan bir çalışmada ise 60 µg/mL TiO₂ ve 20 mg/mL 2,4-D (fenil asetik asit) kullanıldığında olgun arpa embriyolarında yüksek kallus sayısı ve boyutu ile olumlu etki yaptığı belirtilmiştir (Mandeh ve ark., 2012). Her iki sonuçtaki fark, farklı genotip veya 2,4-D'nin varlığından kaynaklanabilmektedir.

En yüksek TiO₂ konsantrasyonunun (1200 mg/L) ise embriyolar için oldukça zararlı olduğu ve ölümleri ile sonuçlandığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulaması rejenerasyon yüzdesi üzerinde %60 ile %93,33 arası sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek sonuç 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda %93,33 olarak görülmüş olup TiO₂ konsantrasyonu arttıkça rejenerasyon yüzdesi de buna bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısında ise (Çizelge 4.3) rejenerasyon sonucunda olduğu gibi en iyi sonuç 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda 3,70 ile gözlemlenmiştir. Rejenerasyon yüzdesi sonuçlarında olduğu gibi eksplant başına sürgün sayısı sonuçlarında da 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonundan sonra sonuçlarda azalma gözlemlenmemiştir. Sürgün uzunluğu

kısımında (Çizelge 4.3.) 200 ve 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında 2,40 cm olarak ölçülmüştür. 100 mg/L konsantrasyonunda 2,21 cm iken 400 mg/L TiO₂ ortamında sürgün uzunluğu 2,35 olarak elde edilmiştir.

Bitki rejenerasyon parametrelerinde doğrusal bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir. Sürgün uzunluğu sonuçlarında rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısından farklı olarak 200 mg/L TiO₂'den sonra sürgün uzunluğunda azalma gözlemlenmesine rağmen 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda tekrar artış göstermiş ve 200 mg/L TiO₂ ile aynı sonuca gelmiştir. Bu deneme sonucunda 1200 mg/L TiO₂ gibi yüksek konsantrasyonun embriyo büyüme gelişmesi üzerinde negatif etkisi olup, ölüme sebep olduğu gözlemlenmiştir. 200 mg/L konsantrasyonunun rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu parametrelerinde en iyi sonucu verdiği ayrıca sürgün uzunluğunda 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunun da en yüksek sonuç verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Düşük (200 mg/L) konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının nohut için rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve uzunluğu parametreleri bakımından olumlu etkisi olduğu söylenebilir. Yapılan çalışmalarda farklı bitkilerde TiO₂ uygulamasının bitki büyümesine olumlu etkileri rapor edilmiştir (Gogos ve ark.,2016; Mahmoodzadeh ve ark., 2013; Feizi ve ark. 2013; Raliya ve ark., 2015; Rafique ve ark., 2014)



Şekil 4.1. *In vitro* koşullarda ER 99 çeşit nohut embriyo eksplantının 100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L TiO_2 içeren ortamda sürgün rejenerasyonu

4.2.3. ER 99 çeşidinin Plumula ve Embriyonik Eksen Eksplantlarının *In vitro* Rejenerasyon Çalışmaları

Dikbaş çeşidine ait izole edilen embriyolara 13 gün 10 mg/L BAP içeren MS ortamında ön muamele (priming) uygulaması yapılmıştır. Muamele edilmiş embriyolardan plumula ve embriyonik eksen eksplantları izole edilip 0, 25, 50, 100 ve 200 mg/L TiO_2 ve 1 mg/L BAP içeren MS ortamlarında, gün ışığı altında iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. Denemede sürgünler çok kısa olduğu için veriler alınmamıştır.

Çizelge 4.4. Plumula kısmı izole edilen Dikbaş çeşit nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi

V.K.	S.D	Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı(adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.
TiO ₂	4	506,667	0,950 ^{ös}	1,018	0,981 ^{ös}
Hata	10	533,333	-	1,038	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-

^{ös}Önemli fark yoktur.

Çizelge 4.5. Plumula kısmı izole edilen Dikbaş çeşit nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı ortalamasına etkisi

TiO ₂ (mg/L)	Rejenerasyon Yüzdesi (%) ^{ös}	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) ^{ös}
0	73,33	3,58
25	66,66	4,26
50	46,66	4,05
100	46,66	4,53
200	46,66	3,08

^{ös}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında önemli fark yoktur.

Çizelge 4.4. ve çizelge 4.6.'da plumula ve embriyonik eksen eksplantlarına ait farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına etkilerine ait sırasıyla varyans analizi ve Duncan testi sonuçları gösterilmiştir. Embriyonik eksen TiO₂ uygulamasında rejenerasyon yüzdesi $p \leq 0.01$ düzeyinde önemli iken diğer parametrelerde önemli farklılık görülmemiştir.

Plumula ve embriyonik eksen bitkilerde büyüme ve gelişmeyi daha iyi anlamak ve değerlendirmek için tam embriyo dışında kullanılan eksplantlardan bazılarıdır (Javadi ve Yamaguchi ark., 2004; Matilla ve ark., 2002; Sharma ve ark., 2005).Yapılan başka çalışmalarda nohut bitkisi, plumula ve embriyonik eksen izolasyonu öncesi BAP hormonu ilave edilmiş besi ortamında kültüre alınmıştır (Sadhu ve ark., 2020; Pathak ve Hamzah, 2008). Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi plumula eksplantından sürgün rejenerasyon yüzdesi %46,66-73,33 arasında değişmiştir. Denemede TiO₂ oranının artışı ile paralel olarak 50 mg/L ve daha yüksek oranlarda düşüş (%46,66) kaydedilmiştir. En yüksek rejenerasyon yüzdesi ise kontrol

grubunda elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre TiO_2 ilave edildiğinde rejenerasyon yüzdesinde azalma izlenmiştir. Ancak, TiO_2 konsantrasyonda artış ile sürgün uzunluğunda da artış izlenmiştir. Sürgün uzunluğu ise 3,58-4,53 cm arasında değişmişken en uzun sürgünler 100 mg/L TiO_2 içeren ortamında gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.6. Embriyonik eksen kısmı izole edilen Dikbaş çeşit nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO_2 uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına ait varyans analizi

V.K.	S.D	Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı(adet)	
		K.O.	F.	K.O.	F.
TiO_2	4	693,333	8,667 **	0,186	0,116 ^{ös}
Hata	10	80,000	-	1,595	-
Genel Toplam	14	-	-	-	-

** $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} Önemli fark yoktur.

Çizelge 4.7 Embriyonik eksen kısmı izole edilen Dikbaş çeşit nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO_2 uygulamasının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı ortalamasına etkisi

TiO_2 (mg/L)	Rejenerasyon Yüzdesi (%)**	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet) ^{ös}
0	73,33 a	2,86
25	60,00 ab	3,10
50	60,00 ab	2,77
100	46,66 bc	3,27
200	33,33 c	2,66

** Aynı sütun içinde farklı harfler ile gösterilen ortamlar arasındaki fark $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında önemli fark yoktur.

Çizelge 4.7.'de Dikbaş tip nohuttan izole eden embriyonik eksen eksplantının farklı konsantrasyonlarda TiO_2 maruz bırakılması sonucu rejenerasyon yüzdesi sonuçları %73.33 ile %33.33 arasındadır. En yüksek sonuç kontrol grubunda gözlemlenmiş olup TiO_2 konsantrasyonu arttıkça rejenerasyon yüzdesi azalmıştır. 25 mg/L ve 50 mg/L TiO_2 konsantrasyonlarında ise rejenerasyon yüzdesi değişmemiş %60 olarak ölçülmüştür. Eksplant başına sürgün sayısında ise sonuçlar 3,27 ile 2,66 arası ölçülmüştür. En yüksek sonuç 100 mg/L TiO_2 miktarında en düşük ise 200 mg/L TiO_2 miktarında ölçülmüştür. Doğrusal bir artış veya azalma gözlemlenmemiştir.

Plumula (Çizelge 4.6.) ve embriyonik eksen (Çizelge 4.7.) eksplantlarının rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayıları karşılaştırıldığında ise her iki eksplant için de en yüksek rejenerasyon yüzdesi kontrol grubunda gözlenmiştir. Eksplant başına sürgün sayısında ise her iki eksplantta da en yüksek sonuç 100 mg/L konsantrasyonunda ölçülürken en düşük sonuç 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda gözlemlenmemiştir. Eksplantlar bakımından çarpıcı bir fark gözlemlenmemiştir. ZnO nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarda nohut bitkisine uygulaması ile yapılan bir çalışmada optimum konsantrasyonlarda nanopartikül uygulamasının bitki büyümesine olumlu etkileri olduğu rapor edilmiştir (Dhoke ve ark., 2011).

4.4. *In vitro* Çimlenme Çalışmaları

Tez kapsamındaki bu denemede ise steril ER99 nohutları 1 gün steril saf suda bekletildikten sonra farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 mg/L) TiO₂ ve 1 mg/L BAP eklenmiş besi ortamında kültüre alınmıştır. Ortam koşulları sebebiyle çimlenme gözlenememiş ve sonuç alınmamıştır.

Bir başka denemede sterilizasyonu yapılan Gökçe tip nohutlar 1 gün steril saf suda bekletilmesinin ardından farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1000 mg/L) TiO₂ ile zenginleştirilmiş ortamlara aktarılıp 3 gün karanlıkta bekletilmesinden sonra gün ışığı altında iklim odasında bırakılmıştır. Ortamdaki fazla nem sebebi ile çimlenme gerçekleşmemiş ve sonuç alınmamıştır. Ortam koşullarındaki fazla su miktarı nohut bitkisindeki tohum verimine azaltıcı bir etkisi olduğu bilinmektedir (Behboudian ve ark., 2001).

Sterilizasyonu yapılan Desi biyotip siyah nohutlar farklı konsantrasyonlardaki (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200 mg/L) TiO₂ ve 1 mg/L BAP ilave edilmiş besi ortamına aktarılıp beyaz ışık altında iklim odasında bırakılmıştır. Çimlenme sabitlenene kadar yani 11 gün sonrası ölçümler yapılmıştır (Şekil 4.5.).

Çizelge 4.8. Desi çeşit siyah nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı, ortalama çimlenme zamanı ve tohum canlılık indeksine ait varyans analizi

V.K.	S.D.	Çimlenme yüzdesi (%)		Çimlenme Hızı		Ortalama Çimlenme Zamanı (gün)		Tohum Canlılık İndeksi	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
TiO ₂	8	10,292	1,000 ^{ös}	0,357	1,683 ^{ös}	0,035	1,427 ^{ös}	20978,509	2,951*
Hata	18	10,292	-	0,212	-	0,024	-	7108,074	-
Genel Toplam	26	-	-	-	-	-	-	-	-

* $p \leq 0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{ös}Önemli fark yoktur.

Desi tip nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasına ait varyans analizinde çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı ve ortalama çimlenme zamanı parametreleri için istatistiksel açıdan önemli olmasa da tohum canlılığı indeksi parametresi için $p \leq 0,05$ düzeyinde önemlidir (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.9. Desi çeşit siyah nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı, ortalama çimlenme zamanı ve tohum canlılık indeksi üzerine etkisi

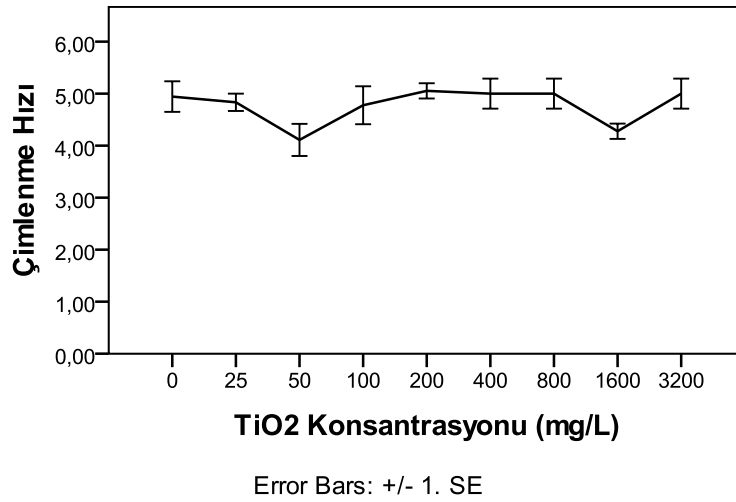
TiO ₂ (mg/L)	Çimlenme yüzdesi (%) ^{ös}	Çimlenme Hızı ^{ös}	Ortalama Çimlenme Zamanı (gün) ^{ös}	Tohum Canlılık İndeksi*
0	100,00	4,94 ab	1,39	1142,33 abcd
25	100,00	4,83 ab	1,38	1151,33 abc
50	94,44	4,11 b	1,59	1224,66 a
100	100,00	4,77 ab	1,44	1207,66 ab
200	100,00	5,05 a	1,38	1056,33 bcd
400	100,00	5,00 ab	1,33	1079,66 abcd
800	100,00	5,00 ab	1,33	1110,33 abcd
1600	100,00	4,27 ab	1,61	985,00 d
3200	100,00	5,00 ab	1,33	1004,33 cd

* Aynı sütun içinde farklı harfler ile gösterilen ortamlar arasındaki fark $p \leq 0,05$ düzeyinde önemlidir.

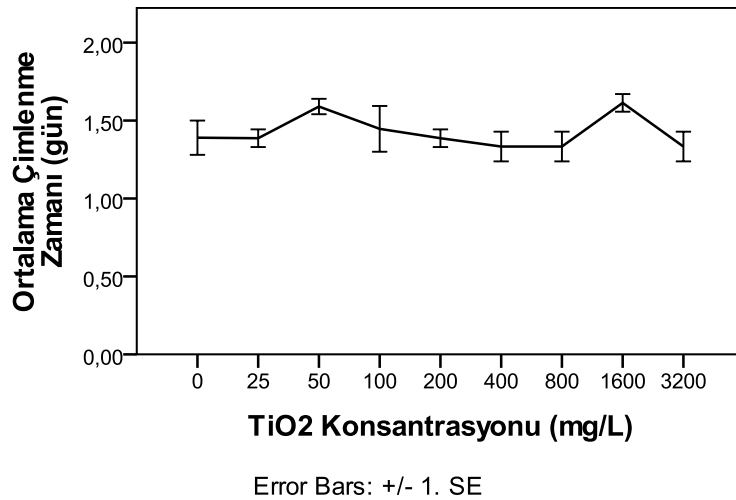
^{ös} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında önemli fark yoktur.

Çimlenme çalışmalarında desi çeşit nohutlar çoğunlukla kullanılmaktadır (Khattak ve ark. 2007.) Çizelge 4.9.'da desi çeşit siyah nohut için 50 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda %94,44 çimlenme oranını gözlemlenirken diğer konsantrasyonlarda %100 çimlenme gözlemlenmiştir. Çimlenme hızında 5,05 ile 4,11 arasında sonuçlar elde edilmiştir. Çimlenme hızlarında çarpıcı bir değişim gözlenmemiş fakat 50 ve 1600 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında en düşük sonuçlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.). En düşük sonuçlar olan 4,11 ile 50 mg/L TiO₂ ve 4,27 1600 mg/L TiO₂ konsantrasyonları iken en yüksek sonuç 5,05 ile 200 mg/L TiO₂

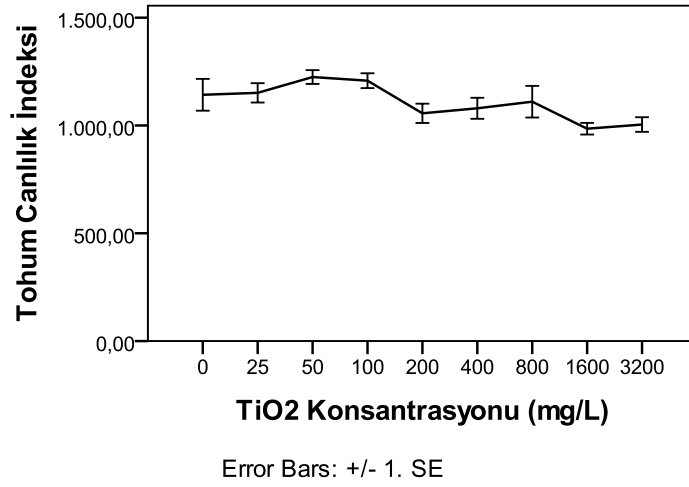
konsantrasyonundadır. Ortalama çimlenme zamanında sonuçlar 1,33 ile 1,61 arası gözlemlenmiştir. En düşük sonuç 400, 800 ve 3200 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında ölçülmüş olup, en yüksek sonuç ise 1600 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. Ortalama çimlenme zamanında doğrusal bir azalma görülmemiştir (Şekil 4.3.). Tohum canlılık indeksi bakımından en iyi sonuç 50 mg/L TiO₂ en düşük sonuç ise 1600 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda gözlemlenmiş olup, sonuçlar 1224,66 ile 985,00 arasında değişmiştir. Tohum canlılık indeksinde de doğrusal bir azalma gözlemlenmemiştir (Şekil.4.4.).



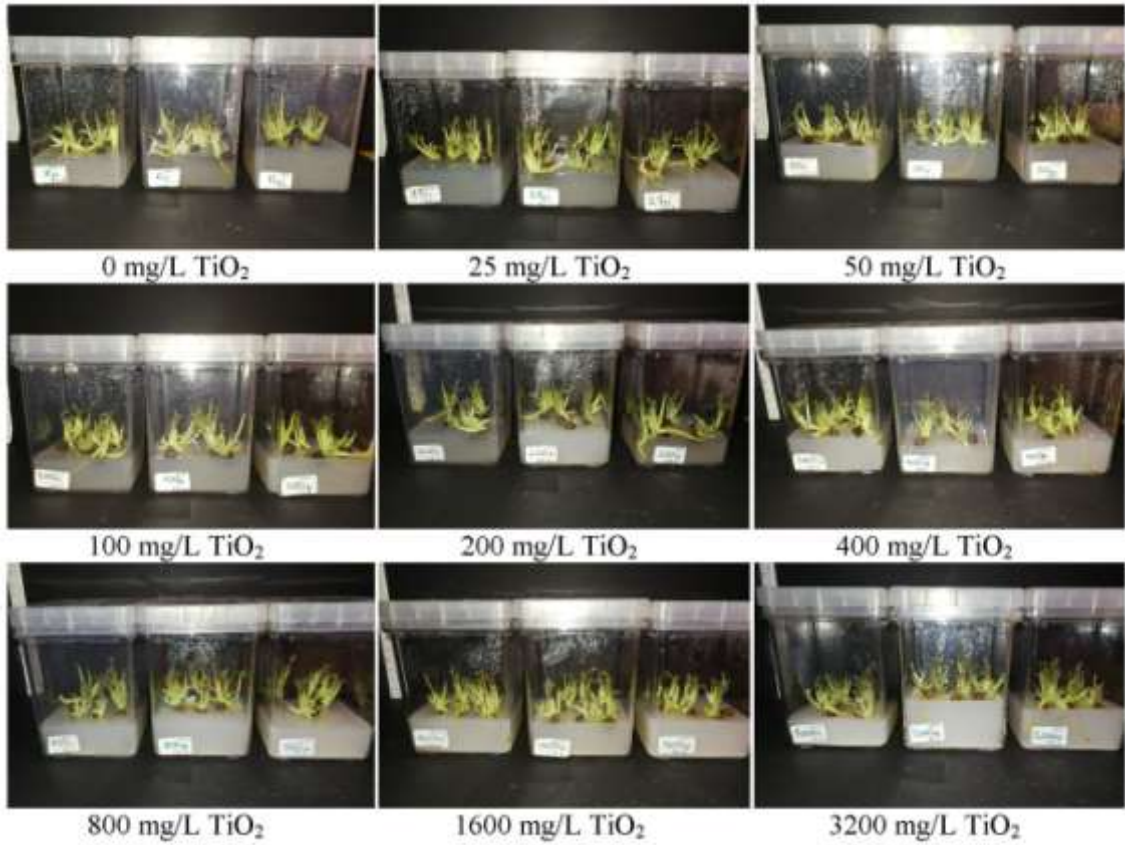
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde çimlenme hızına etkisi



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde ortalama çimlenme zamanına etkisi



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde tohum canlılık indeksine etkisi



Şekil 4.5. *In vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlarda (0,25,50,100,200,400,800,1600 ve 3200 mg/L) TiO₂ ilave edilmiş besi ortamında çimlenen desi çeşit siyah nohutlar

Çizelge 4.10. Desi çeşit siyah nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğuna ait varyans analizi

V.K.	S.D.	Sürgün Sayısı		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Sayısı		Kök Uzunluğu (cm)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
TiO ₂	8	0,227	1,438 ^{ös}	2,254	4,728**	1,270	1,562 ^{ös}	0,259	1,758 ^{ös}
Hata	18	0,158	-	0,477	-	0,813	-	0,147	-
Genel Toplam	26	-	-	-	-	-	-	-	-

** $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

^{ös}Önemli fark yoktur.

Çizelge 4.10.'da desi tip siyah nohuta farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğuna ait varyans analizi sonuçları gösterilmiştir. Diğer parametreler istatistiksel açıdan önemsiz farklılığı bulunmuştur; ancak, sürgün uzunluğu bakımından TiO₂ konsantrasyonlar arasında $p \leq 0,01$ düzeyinde önemli farklılığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.11. Desi çeşit siyah nohutun farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu üzerine etkisi

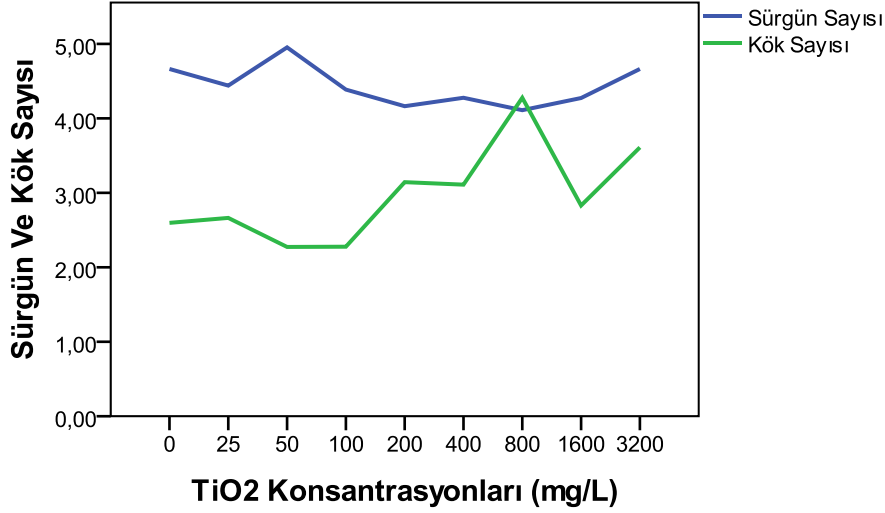
TiO ₂ (mg/L)	Sürgün Sayısı ^{ös}	Sürgün uzunluğu (cm)**	Kök sayısı ^{ös}	Kök Uzunluğu (cm) ^{ös}
0	4,66 ab	7,48 bcd	2,59 ab	3,93 ab
25	4,44 ab	8,08 abc	2,66 ab	3,42 ab
50	4,95 a	9,20 a	2,27 b	3,82 ab
100	4,38 ab	8,42 ab	2,27 b	3,65 ab
200	4,16 b	7,26 bcd	3,14 ab	3,30 b
400	4,27 ab	7,38 bcd	3,11 ab	3,41 ab
800	4,11 b	7,01 cd	4,27 a	4,09 a
1600	4,27 ab	6,49 d	2,83 ab	3,36 ab
3200	4,66 ab	6,71 d	3,61 ab	3,33 b

** Aynı sütun içinde farklı harfler ile gösterilen ortamlar arasındaki fark $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

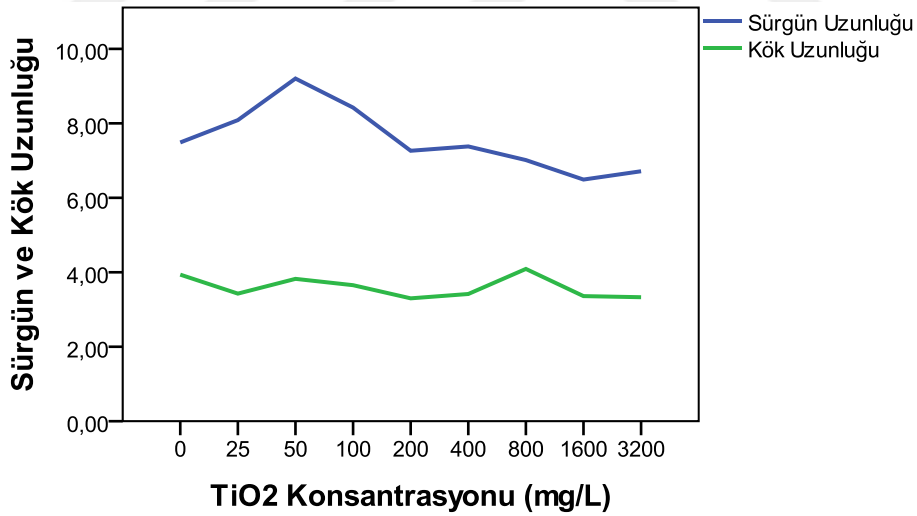
^{ös} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında önemli fark yoktur.

Çizelge 4.11.'de farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının sürgün, kök sayısı ve uzunluğuna etkisi verilmiştir (Şekil 4.8.). Sürgün sayısı sonuçları 4,95 ile 4,11 arası gözlemlenmiştir. En yüksek sonuç 50 mg/L TiO₂ en düşük sonuç ise 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda ölçülmüştür. Sürgün sayısında doğrusal bir azalma gözlemlenmemiş fakat en çarpıcı sonuç 50 mg/L TiO₂ sürgün sayısındaki artıştır (Şekil 4.6.). Kök uzunluğunda ise sonuçlar 4,27 ile 2,27 arasındadır ve en yüksek sonuç 800 mg/L TiO₂ en düşük sonuç 50 ve 100 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında

gözlemlenmiştir. Kök sayısındaki en çarpıcı değişim 800 mg/L TiO_2 uygulamasındaki artıştır.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda TiO_2 uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde sürgün ve kök sayısı üzerine etkisi

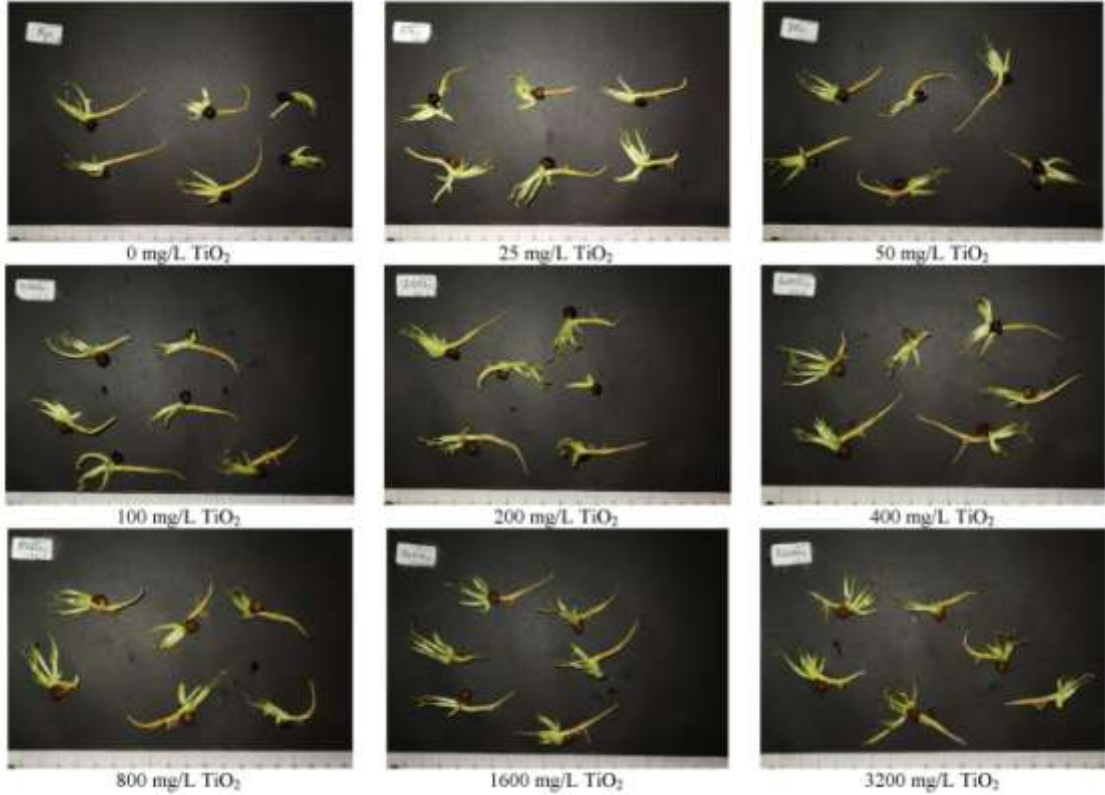


Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda TiO_2 uygulamasının Desi çeşit nohut üzerinde sürgün ve kök uzunluğuna(cm) üzerine etkisi

Farklı konsantrasyonlarda TiO_2 uygulanmasının sürgün ve kök sayısı bakımında birbiri ile ilişkili bir sonuç vermemiştir (Şekil 4.6.) Sürgün uzunluğu en yüksek 9,20 cm ile 50 mg/L TiO_2 en düşük 6,49 cm ile 1600 mg/L TiO_2 konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. Sürgün uzunluğu için en çarpıcı değişim 50

mg/L TiO₂ uygulamasındaki artıştır doğrusal bir azalma gözlenmese de 50 mg/L TiO₂ konsantrasyonundan sonra azalma gözlemlenmiştir (Şekil.4.7.). Kök uzunluğunda sonuçlar 4,09 cm ile 3,30 cm arasındadır ve en yüksek sonuç 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda iken en düşük sonuç 200 mg/L TiO₂ konsantrasyondadır. Kök uzunluğunda doğrusal bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir.

ZnO partiküllerinin maş fasulyesi (*Vigna radiata*) ve *C. arietinum* bitki fidelerinin büyümesi üzerindeki etkisini göstermek için yapılan çalışmada, *V. radiata* ve *C. arietinum* için farklı konsantrasyonlarda ZnO agar ortamına eklenmiştir. Sonucunda optimum konsantrasyonlarda fidelerin iyi bir büyüme gösterdiği ve büyümede gecikme olduğu gözlenmiştir. Sürgün ve kök uzunluğu bakımından nohut bitkisi için paralel sonuçlar gözlemlenmiştir (Dhoke ve ark., 2011). Bu tez çalışmasında ise sürgün sayısı ve uzunluğu için 50 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda en yüksek, sırasıyla 800 mg/L ve 1600 mg/L konsantrasyonlarında en düşük sonuçlar ölçülürken kök sayısı ve uzunluğu için sürgün parametrelerinin tersine 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda en yüksek 200 mg/L 100 mg/L ve 50 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında en düşük sonuçlar ölçülmüştür. Bu fark kullanılan nanopartikül farklılığından kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 4.8. *In vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlarda (0,25,50,100,200,400,800,1600 ve 3200 mg/L) TiO₂ ilave edilmiş besi ortamında çimlenen her konsantrasyondan bir tekrara ait desi çeşit siyah nohutlar

4.5. Ex vivo Çimlenme Çalışması

Dikbaş nohutları ile yapılan bu denemede farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200 ve 400 mg/L) TiO₂ kullanarak farklı sürelerde (6, 12, 24 saat) priming uygulaması yapılmıştır. Ardından nohutlar su ile nemlendirilmiş perlit ortamlarına aktarılmıştır. Kavanozdaki petripler sulanarak nemli tutulmuş ve 15 gün sonra sonuç alınmıştır. Perlit bitki çimlenmesine uygun ortam sağlaması sebebi ile besi ortamına alternatif olarak çimlenme çalışmalarında kullanılmaktadır (Samarah ve Abu-Yahya, 2008; Velez ve ark., 2017).

Çizelge 4.12.'de nohudun Dikbaş çeşidin tohumların farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde priming uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve yaprak alanına etkilerine ait varyans analizi sonuçları gösterilmiştir. Farklı TiO₂ konsantrasyonu içeren tüm parametreler üzerinde $p \leq 0.01$ önemlidir. Farklı zamanlar açısından eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu

bakımından önemli farklılığı bulunmazken kök uzunluğu ve yaprak alanı bakımından sırasıyla $p \leq 0.001$ ve $p \leq 0.05$ düzeyinde önemli farklıdır. TiO_2 ve zaman açısından yalnız kök uzunluğu bakımından $p \leq 0.01$ düzeyinde önemli farklılığı görülmüştür.

Çizelge 4.12. Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve yaprak alanına ait varyans analizi

V.K.	S.D.	Sürgün Sayısı		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)		Yaprak Alanı (cm ²)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
TiO ₂ (T)	6	8,177	10,253**	54,271	9,959**	51,457	24,140**	0,038	13,477**
Zaman(Z)	2	0,992	1,244 ^{ös}	6,037	1,108 ^{ös}	83,261	39,061**	0,010	3,568*
T×Z	12	0,927	1,163 ^{ös}	7,896	1,449 ^{ös}	6,584	3,089**	0,005	1,737 ^{ös}
Hata	63	0,798	-	5,450	-	2,132	-	0,003	-
Genel Toplam	83	-	-	-	-	-	-	-	-

** $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

* $p \leq 0,05$ düzeyinde önemlidir.

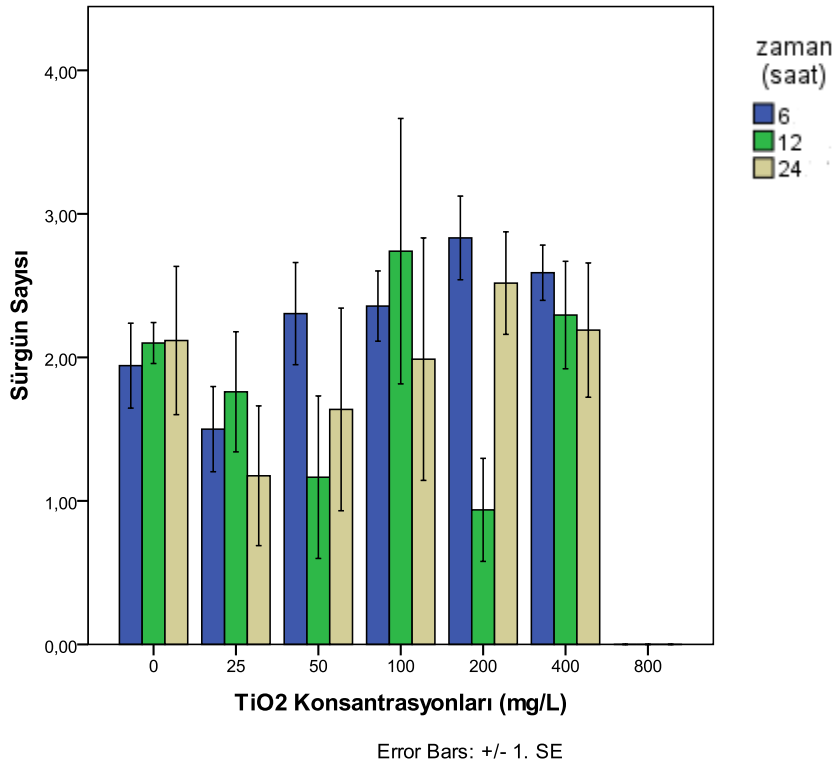
^{ös}Önemli fark yoktur.

Çizelge 4.13. Dikbaş tip nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve yaprak alanına etkisi

TiO ₂ (mg/L)	Zaman (saat)	Sürgün Sayısı ^{ös}	Sürgün Uzunluğu (cm) ^{ös}	Kök Uzunluğu (cm)**	Yaprak Alanı (cm ²) ^{ös}
0	6	1,94 abc	5,46 abc	7,19 abc	0,16 abcd
	12	2,10 abc	5,39 abc	6,46 bcd	0,14 abcde
	24	2,11 abc	5,92 abc	4,94 cde	0,10 cde
25	6	1,50 abc	4,42 abc	7,10 bc	0,11 cde
	12	1,76 abc	4,09 abc	4,51 de	0,16 abcd
	24	1,17 bcd	4,11 abc	2,79 e	0,75 ef
50	6	2,30 abc	7,05 a	7,84 ab	0,14 abcde
	12	1,16 bcd	2,54 cd	3,32 e	0,12 abcde
	24	1,63 abc	4,66 abc	3,47 e	0,14 abcde
100	6	2,35 abc	5,39 abc	8,12 ab	0,20 ab
	12	2,27 a	6,70 a	5,14 cde	0,13 abcde
	24	1,98 abc	7,05 a	3,59 e	0,07 def
200	6	2,83 a	6,53 ab	9,43 a	0,21 a
	12	0,93 cd	2,60 bcd	3,30 e	0,12 bcde
	24	2,51 ab	7,16 a	3,86 e	0,14 abcde
400	6	2,59 ab	5,14 abc	5,19 cde	0,14 abcde
	12	2,29 abc	6,85 a	4,73 de	0,18 abc
	24	2,19 abc	4,71 abc	3,05 e	0,17 abc
800	6	0,00 d	0,00 d	0,00 f	0,00 f
	12	0,00 d	0,00 d	0,00 f	0,00 f
	24	0,00 d	0,00 d	0,00 f	0,00 f

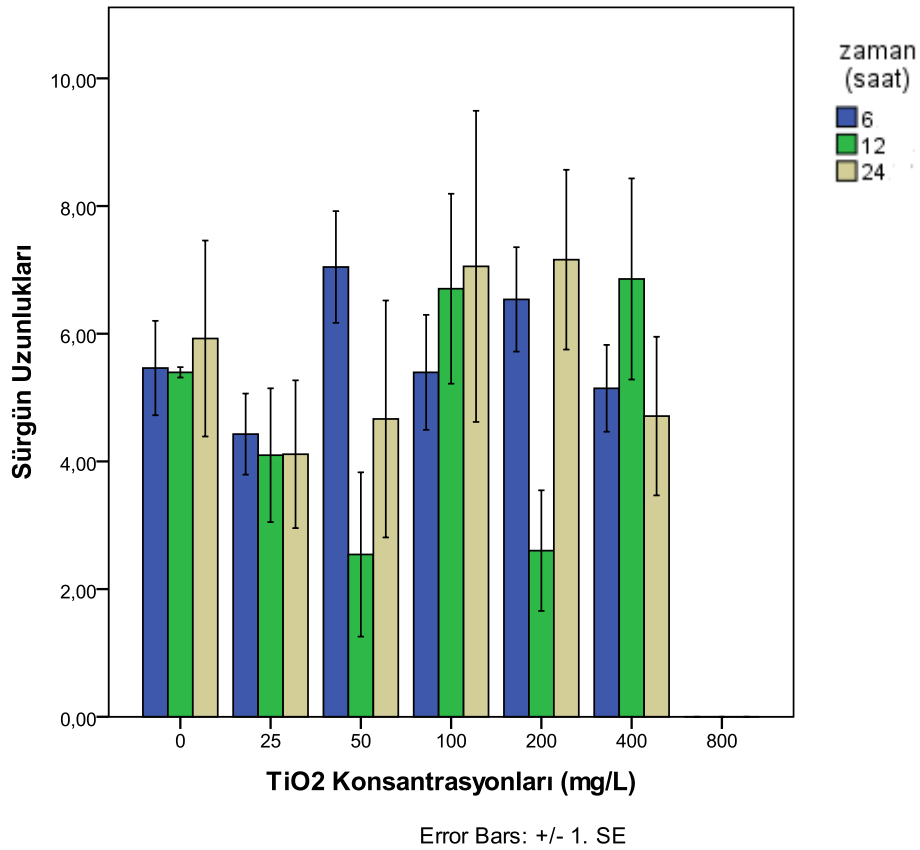
** Aynı sütun içinde farklı harfler ile gösterilen ortamlar arasındaki fark $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

^{ös} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında önemli fark yoktur.



Şekil 4.9. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün sayısı üzerine etkisi

Çizelge 4.13.'de farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde TiO₂ priming uygulaması sonucu sürgün sayısı sürgün ve kök uzunluğu sonuçları verilmiştir. 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda toksik etki sebebiyle hiç büyüme ve gelişme gözlemlenmemiştir. Sürgün sayısı sonuçları 2,83 ile 0,00 arasında ölçülmüştür. En yüksek sonuç 6 saat 200 mg/L TiO₂ uygulaması iken en düşük sonuç 800 mg/L TiO₂ uygulamasıdır. 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda büyüme gözlemlenmemiştir. 6 saat priming süresine bakıldığında doğrusal bir azalma veya artış gözlemlenmemiştir fakat en yüksek sonuç 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda ölçülmüştür ve sonrasında doğrusal bir azalma gösterip 800 mg/L TiO₂ 0'a düşmüştür. 12 saat priming süresine bakıldığında ise en yüksek sonuç 100 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. 24 saat priming süresinde ise en yüksek sonuç 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda 2,19 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.9.).

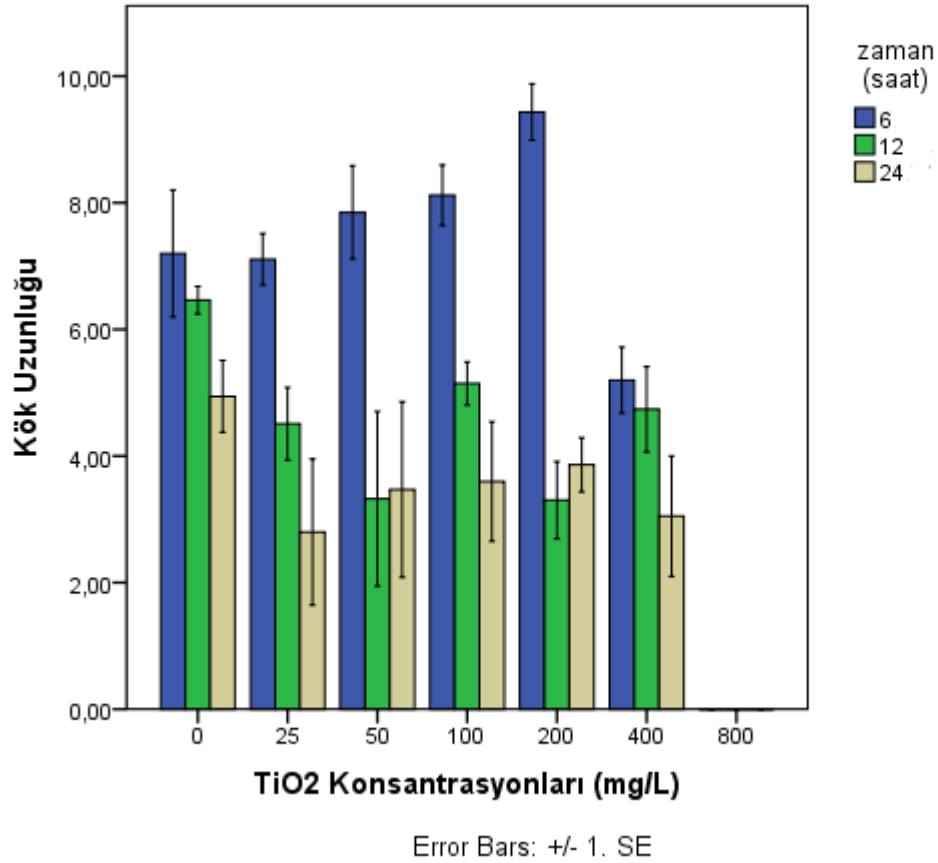


Şekil 4.10. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün uzunluklarına etkisi

Sürgün uzunluğu 0,00-7,16 cm arasındadır değişmiştir (Çizelge 4.13.). En uzun sürgünler 24 saat süre priming ve 200 mg/L TiO₂ uygulamasından elde edilirken, 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında hiç büyüme izlenmemiştir. 6, 12 ve 24 saat priming uygulamasına bakıldığında doğrusal bir artış ve azalış gözlemlenmemiştir. 6 saat priming uygulaması için en yüksek değer 50 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda 7,05 cm ile gözlemlenmiştir. 12 saat priming uygulaması için ise en yüksek değer 400 mg/L TiO₂ ortamında 6,85 cm olarak gözlemlenmiştir. 24 saat priming uygulamasında kontrol grubundan sonraki konsantrasyonlarda azalma gözlemlense de doğrusal bir ilerleme seyretmemiştir ve en yüksek değer 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda 7,16 cm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.10.).

12 ve 24 saat priming uygulamaları için yüksek konsantrasyonlarda sürgün sayısının yüksek ölçülmesinin sebebi Zheng ve ark. TiO₂ ispanak tohumlarındaki çalışmasında da rapor ettiği gibi küçük nanopartikül boyutundan kaynaklanıyor

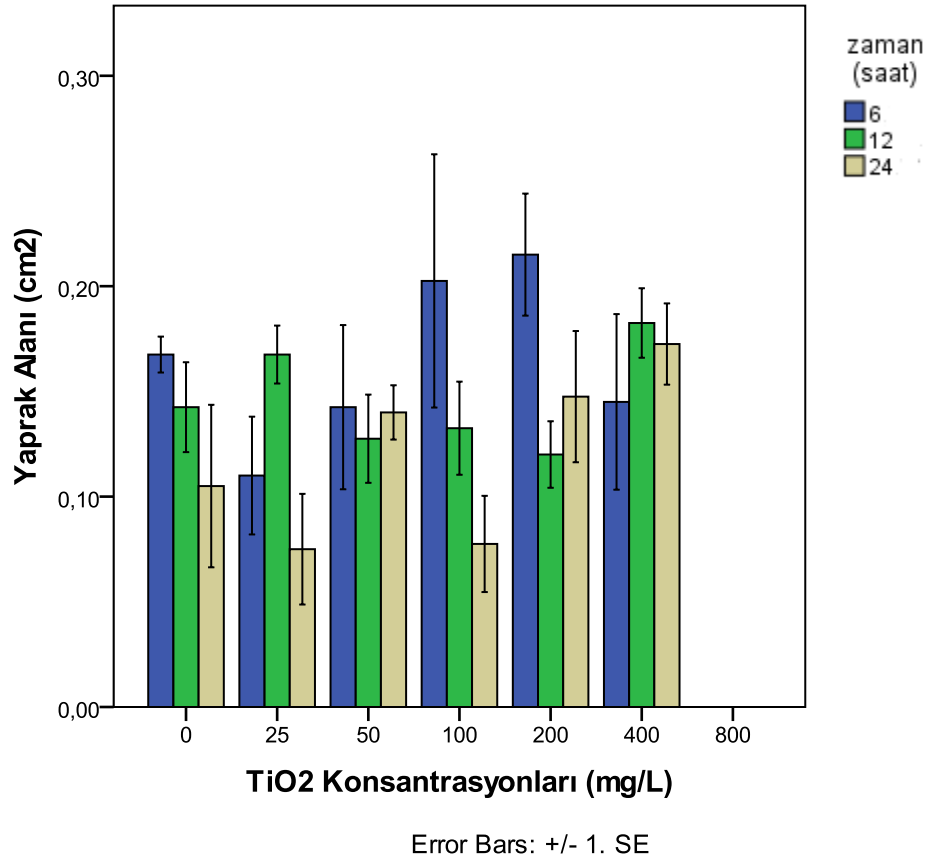
olabilir. Nanopartiküllerin bu küçük boyutu uygulama sürecinde tohuma nüfuz etmesine büyüme sırasında arttırıcı işlevi yerine getirmesine neden olabilir (Zheng ve ark., 2015).



Şekil 4.11. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının kök uzunluğuna etkisi

Kök uzunluğu sonuçları ise 0,00 cm ile 9,43 arasında ölçülmüştür (Çizelge 4.13.). En yüksek sonuç 6 saat 200 mg/L TiO₂ uygulamasında gözlemlenmiştir. 6 saat priming uygulama sonuçları kök uzunluğu için diğer 12 ve 24 saat priming uygulamasından bütün TiO₂ konsantrasyonları bakımından daha yüksek bir sonuç vermiştir. Yapılan bir çalışmada da nohut tohumları farklı konsantrasyonlarda nanopartiküllerde 6 ve 12 saat bekletilmiştir. Sonuç olarak priming süresine bağlı olarak sürgün ve kök uzunluklarında farklılıklar gözlemlenmiştir (Sumanth Krishna ve ark., 2017). 6 saat priming uygulamasında 25 mg/L TiO₂ konsantrasyonundan itibaren 200 mg/L TiO₂'e kadar doğrusal bir artış gözlemlenmiş olup 200 mg/L TiO₂

konsantrasyonundan sonra doğrusal bir azalma gözlemlenmiştir.12 saat priming uygulamasında ise en yüksek sonuç kontrol grubunda 6,46 cm olarak ölçülmüştür. 24 saat priming uygulamasında da en yüksek sonuç kontrol grubunda gözlemlenmiş olup 4,94 cm ölçülmüştür. TiO₂ konsantrasyonlarında birbirinden çarpıcı derece az sonuçlar gözlemlenmemiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.12. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının yaprak alanına etkisi

Yaprak alanı sonuçlarında doğrusal bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir. Şekil 4.12.'da en yüksek değer 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda 6 saat priming uygulamasında 0,21 cm² ölçülmüştür.800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda çimlenme ve gelişme gözlenmediği için yaprak oluşumu gerçekleşmemiş sonuçlar 0 olarak hesaplanmıştır. 12 saat priming uygulamasında en yüksek değer 400 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda 0,18 cm²,24 saat priming uygulamasında ise 400 mg/L konsantrasyonunda 0,17 cm² olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.13.).

Çizelge 4.14 Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı ve tohum canlılığına ait varyans analizi

V.K.	S.D.	Çimlenme Yüzdesi (%)		Çimlenme Hızı		Ortalama Çimlenme Zamanı (gün)		Tohum Canlılık İndeksi	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
TiO ₂ (T)	6	14102,778	298,647**	94,617	90,515**	5,835	132,768**	1705721,582	14,905*
Zaman (Z)	2	782,143	16,563**	28,120	26,901**	0,839	19,102**	555711,698	4,856*
T×Z	12	118,254	2,504**	2,399	2,295*	0,064	1,460 ^{os}	182026,610	1,591 ^{os}
Hata	63	47,222	-	1,045	-	0,044	-	114440,306	-
Genel Toplam	83	-	-	-	-	-	-	-	-

** $\leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

* $p \leq 0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{os} Önemli fark yoktur.

Çizelge 4.14.'de farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde TiO₂ uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı, ortalama çimlenme zamanı ve tohum canlılık indeksi üzerine etkilerine ait varyans analizi gösterilmiştir. TiO₂ uygulaması tüm parametreler için $p \leq 0,01$ düzeyinde önemli iken zaman uygulaması tohum canlılık indeksi için $p \leq 0,05$ diğer parametreler için $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir. TiO₂ ve zaman birlikte uygulanması ise çimlenme yüzdesi için $p \leq 0,01$ düzeyinde çimlenme hızı için $p \leq 0,05$ düzeyinde önemli diğer parametreler için istatistiksel açıdan önemsizdir.

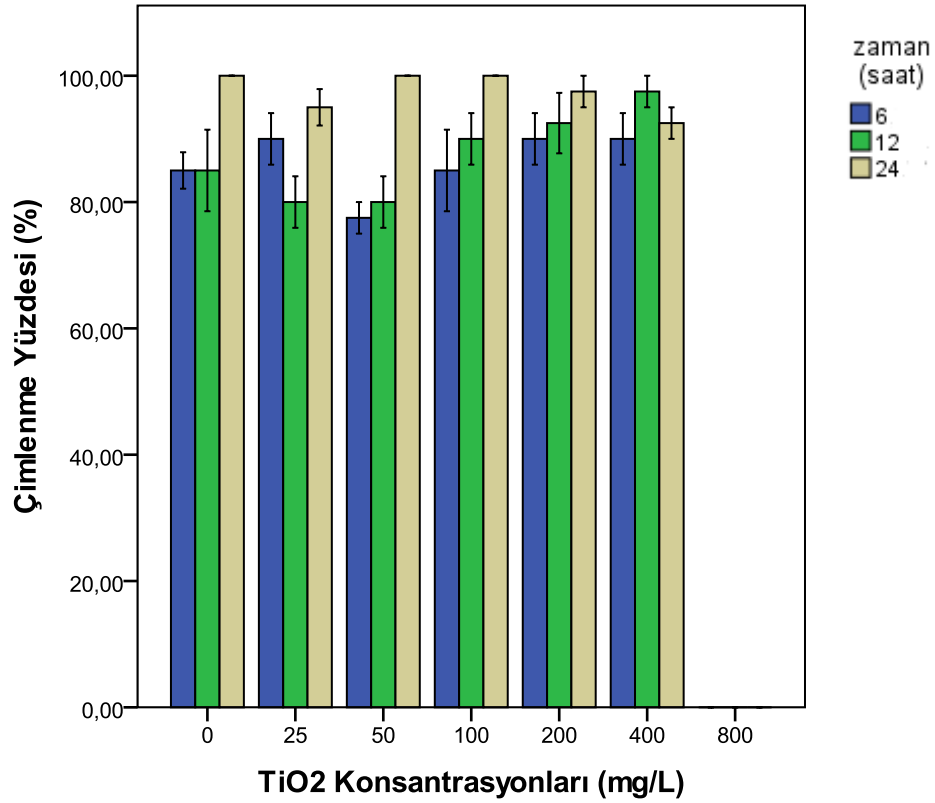
Çizelge 4.15. Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı ve tohum canlılık üzerine etkisi

TiO ₂ (mg/L)	Zaman (saat)	Çimlenme Yüzdesi (%)**	Çimlenme hızı*	Ortalama çimlenme zamanı (gün) ^{ö_s}	Tohum Canlılık indeksi ^{ö_s}
0	6	85,00 bcd	6,04 ef	2,08 ab	1083,34 abc
	12	85,00 bcd	7,25 cdef	1,76 bcde	1003,70 abcd
	24	100,00 a	9,45 a	1,52 e	1086,70 abc
25	6	90,00 abc	6,12 ef	2,13 a	1039,47 abc
	12	80,00 cd	7,00 cdef	1,75 bcde	705,13 bcd
	24	95,00 ab	8,12 abcd	1,72 cde	660,33 bcd
50	6	77,50 d	5,67 f	2,13 a	1151,44 ab
	12	80,00 cd	6,87 cdef	1,79 bcde	466,70 de
	24	100,00 a	9,04 ab	1,62 de	813,30 bcd
100	6	85,00 bcd	6,00 ef	2,13 a	1157,19 ab
	12	90,00 abc	7,70 bcde	1,76 bcde	1053,82 abc
	24	100,00 a	8,54 abc	1,72 cde	1064,73 abc
200	6	90,00 abc	7,08 cdef	1,89 abcd	1436,32 a
	12	92,50 ab	7,20 cdef	1,89 abcd	540,71 cd
	24	97,50 a	9,00 ab	1,56 de	1079,26 abc
400	6	90,00 abc	6,50 def	2,01 abc	932,40 abcd
	12	97,50 a	8,37 abc	1,74 bcde	1122,62 ab
	24	92,50 ab	7,29 cdef	1,89 abcd	707,81 bcd
800	6	0,00 e	0,00 g	0,00 f	0,00 e
	12	0,00 e	0,00 g	0,00 f	0,00 e
	24	0,00 e	0,00 g	0,00 f	0,00 e

**Aynı sütun içinde farklı harfler ile gösterilen ortamlar arasındaki fark $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

*Aynı sütun içinde farklı harfler ile gösterilen ortamlar arasındaki fark $p \leq 0,05$ düzeyinde önemlidir.

^{ö_s}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında önemli fark yoktur.

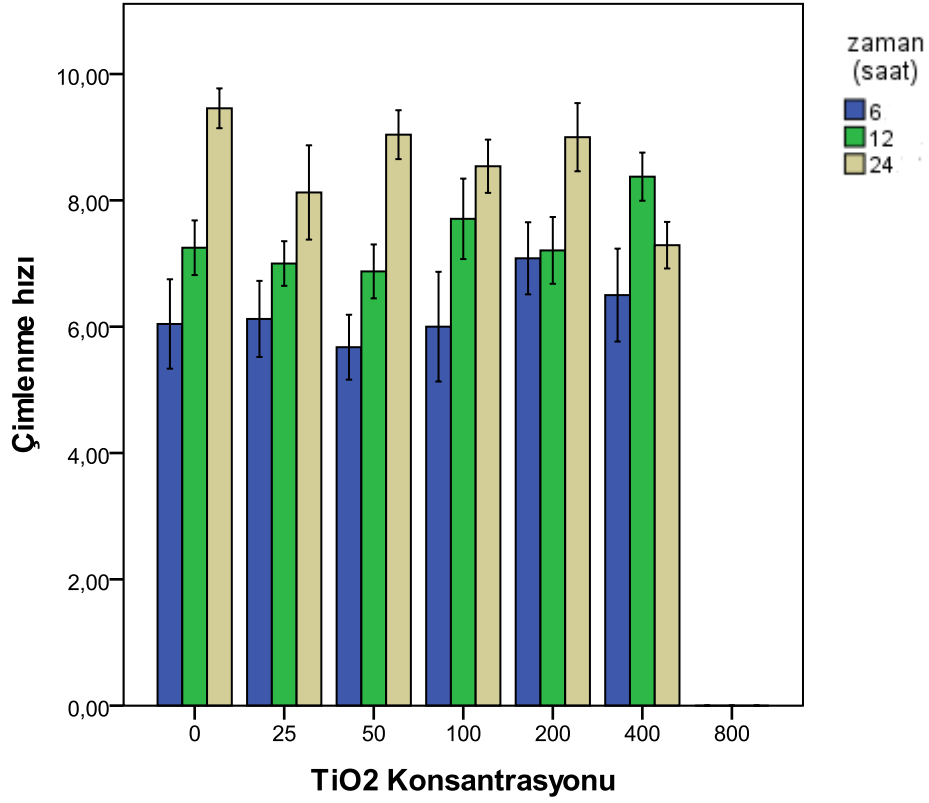


Error Bars: +/- 1. SE

Şekil 4.13. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının çimlenme yüzdesine etkisi

Çizelge 4.15.'de farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde TiO₂ priming uygulamasının çimlenme parametreleri üzerine etkileri verilmiştir. 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda titanyumun toksik etkisi sebebiyle çimlenme gözlemlenmemiştir. Çimlenme yüzdeleri 0 ile %100 arasında ölçülmüştür. En yüksek sonuçlar 0, 50 ve 100 mg/L TiO₂ 24 saat uygulamalarında ölçülmüştür. 0, 25, 50, 100 ve 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında 24 saat priming uygulamasının 6 ve 12 saat uygulamalarına kıyasla daha yüksek çimlenme yüzdesi ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir. Nohut bitkisinde yapılan bir çalışmada da priming süresi arttıkça çimlenme yüzdesinin arttığı gözlemlenmiştir (Elkoca ve ark., 2007). 6 saat priming uygulamalarında en yüksek sonuç 25, 200 ve 400 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında %90 olarak ölçülmüştür ve doğrusal bir azalma veya artış gözlemlenmemiştir. 12 saat priming uygulamasında ise 400 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda %97,5 hesaplanmıştır. 50 mg/L TiO₂ konsantrasyonundan itibaren 400 mg/L TiO₂

konsantrasyonuna kadar doğrusal bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.13.). Tohumların su veya ozmotik bir çözelti içerisinde ıslatılması tohumun kısmi hidrasyonuna izin verir ve böylece çimlenme öncesi metabolik faaliyetler devam eder (Heydecker ve Gibbins, 1978). Çimlenme yüzdesinde priming süresi arttıkça çimlenmedeki artış bundan kaynaklanıyor olabilir.

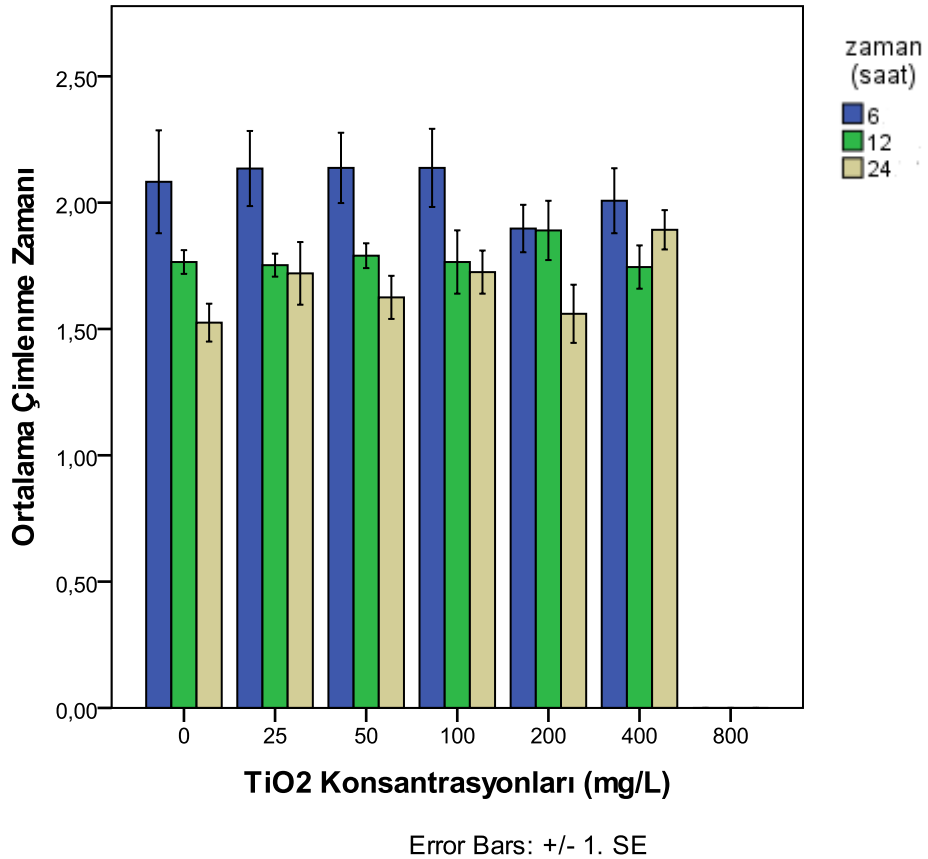


Error Bars: +/- 1. SE

Şekil 4.14. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının çimlenme hızına etkisi

Tohum çimlenme hızı bakımından 0 ile 9,45 arası sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.15.) .En yüksek çimlenme hızı kontrol grubu 24 saat priming uygulamasında ölçülmüştür. 6 saat priming uygulamasının bütün TiO₂ konsantrasyonlarında diğer 12 ve 24 saat uygulamalarına göre daha düşük çimlenme hızı gösterdiği gözlemlenmiştir.6 saat priming uygulaması için en yüksek sonuç 200 mg/L TiO₂ ortamında ölçülmüştür. 12 saat priming uygulamasında ise en yüksek

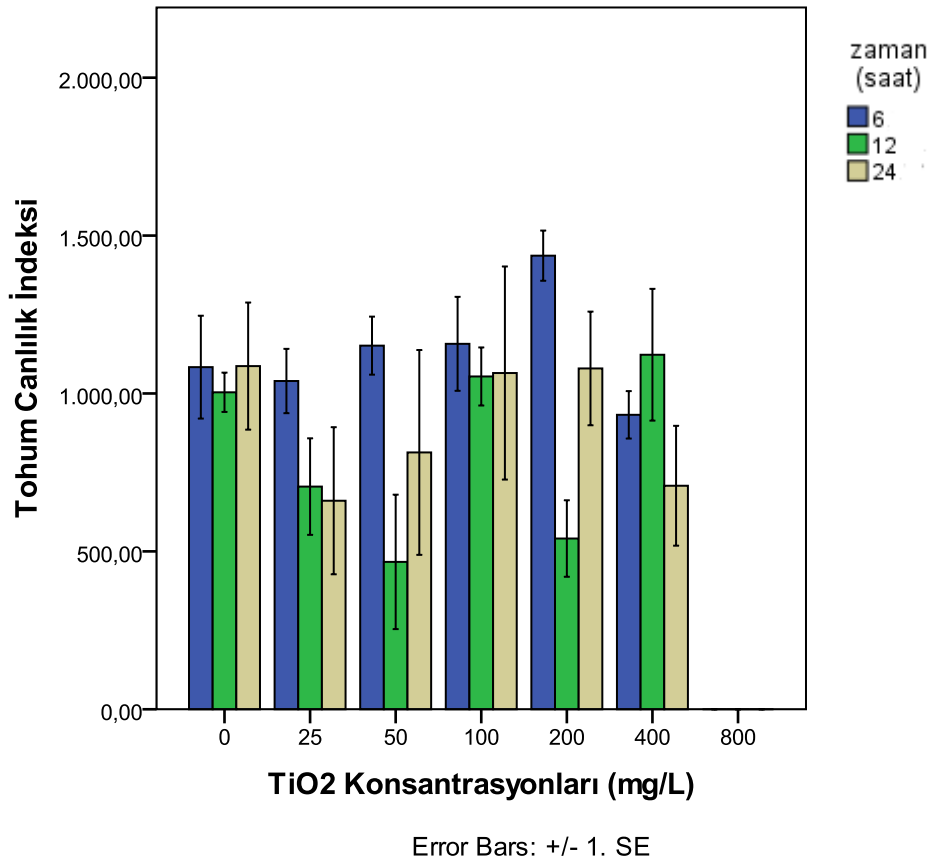
sonuç 8,37 ile 400 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda ölçülmüştür. 6 saat priming uygulamasında en yüksek sonuç 200 mg/L TiO₂ ortamında 7,08 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara bakarak farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının çimlenme hızını sonuçlarında doğrusal bir azalma veya artışa sebep olmamasına rağmen 6, 12 ve 24 saat TiO₂ priming uygulamasının sırasıyla çimlenme hızına arttırıcı etkisi olduğu söylenebilir (Şekil 4.14). Bunun sebebi suyun tohum içersine tohum kabuğu üzerindeki nanopartiküllerinin oluşturduğu yeni gözeneklerden girebilmesi veya nanopartiküllerin tohum yüzeyindeki çatlaklardan içeri girebilmesi ve enzimleri erken aşamada aktif ederek çimlenmeyi hızlandırabilmesi olabilir (Sumanth Krishna ve ark., 2017).



Şekil 4.15. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının ortalama çimlenme zamanına etkisi

Ortalama çimlenme zamanı bakımından çimlenme hızının tersine 6 saat priming uygulamasının 12 ve 24 saat priming uygulamasına göre daha iyi sonuç

verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.15.).En yüksek ortalama çimlenme zamanı 2,13 gün ile 25, 50 ve 100 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında ölçülmüştür. 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda hiç çimlenme gözlemlenmediği için sonuç alınamamıştır. 12 saat priming uygulamasında en yüksek sonuç 200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda 1,89 ölçülürken 24 saat priming için ise 400 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda da 1,89 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.15.). TiO₂ konsantrasyonu açısından bakıldığında konsantrasyonlar arasında çarpıcı bir fark gözlemlenmemiştir. Bitkiye uygulanan TiO₂ konsantrasyonu arttıkça ortalama çimlenme zamanı üzerinde artırıcı etkisi olmadığı rapor edilmiştir (Feizi ve ark., 2013).



Şekil 4.16. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının tohum canlılık indeksine etkisi

Tohum canlılık indeksinde farklı konsantrasyonlarda TiO₂ uygulamasının doğrusal olarak artıcı veya azaltıcı etkisi gözlemlenmemiştir. Fakat 6 saat priming uygulamasında 25 mg/L TiO₂ konsantrasyonundan itibaren 200 mg/L'e kadar doğrusal bir artış gözlenmiş olup, daha yüksek konsantrasyonlarda azalma gösterip

800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda 0'ulaşmıştır (Şekil 4.16.). Tohum canlılık indeksi bakımından en yüksek sonuç 6 saat 200 mg/L TiO₂ uygulamasında gözlenmiştir ve 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda çimlenme olmadığı için tohum canlılık indeksi 0 ölçülmüştür. 12 ve 24 saat priming uygulamasında sırasıyla en yüksek sonuçlar 400 mg/L

Çizelge 4.16. Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün çıkış yüzdesi, sürgün çıkış hızı ve ortalama sürgün çıkış zamanına ait varyans analizi

V.K.	S.D.	Sürgün Çıkış Yüzdesi (%)		Sürgün Çıkış Hızı		Ortalama Sürgün Çıkış Zamanı (gün)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
TiO ₂ (T)	6	8816,667	52,278**	3,967	46,205**	44,725	214,996**
Zaman (Z)	2	665,476	3,946*	0,403	4,690*	0,170	0,818 ^{ös}
T×Z	12	132,143	0,784 ^{ös}	0,086	1,001 ^{ös}	0,374	1,797 ^{ös}
Hata	63	168,651	-	0,086	-	0,208	-
Genel Toplam	83	-	-	-	-	-	-

** $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir.

* $p \leq 0,05$ düzeyinde önemlidir.

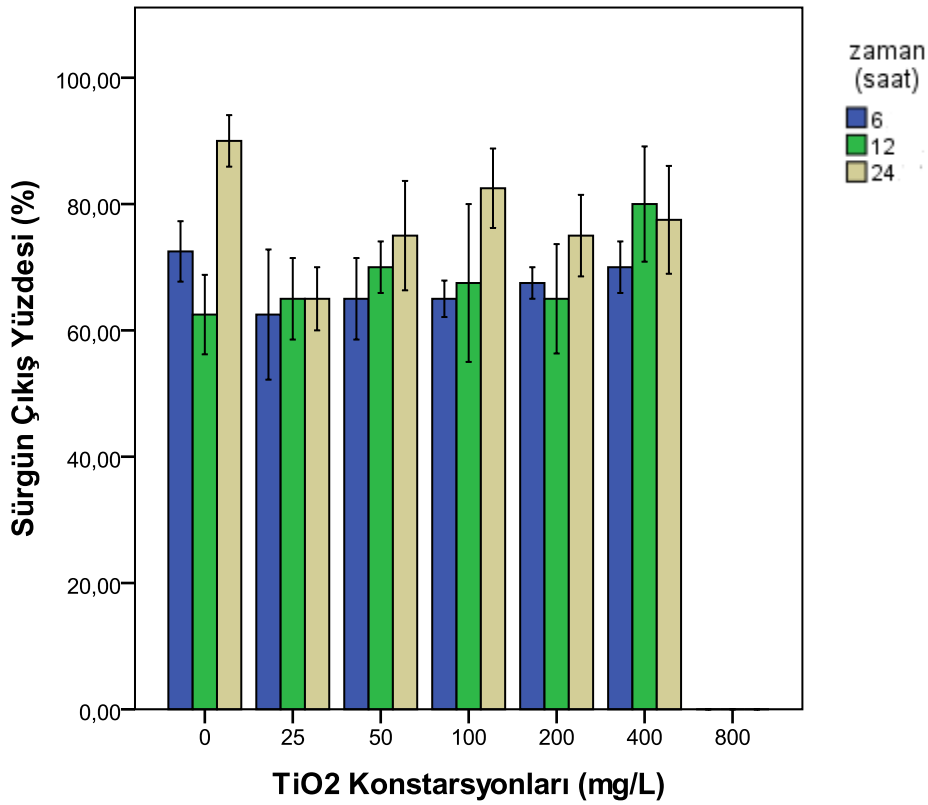
^{ös}Önemli fark yoktur.

Çizelge 4.16.'da farklı konsantrasyon ve sürelerde TiO₂ priming uygulamasının sürgün çıkış yüzdesi, sürgün çıkış hızı ve ortalama sürgün çıkış zamanına etkilerine ait varyans analizi gösterilmiştir. TiO₂ uygulaması tüm parametreler için $p \leq 0,01$ düzeyinde önemli iken zaman uygulaması sürgün çıkış hızı ve sürgün çıkış yüzdesi için $p \leq 0,05$ düzeyinde önemlidir. TiO₂ ve zamanın birlikte uygulanmasında ise ortalama çıkış zamanı için $p \leq 0,01$ düzeyinde önemlidir. Diğer parametreler istatistiksel açıdan önemli değildir.

Çizelge 4.17. Dikbaş çeşit nohuta farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün çıkış yüzdesi, sürgün çıkış hızı ve ortalama sürgün çıkış zamanına etkisi

TiO ₂ (mg/L)	Zaman (saat)	Sürgün Çıkış Yüzdesi (%) ^{ö_s}	Sürgün Çıkış Hızı ^{ö_s}	Ortalama sürgün çıkış zamanı (gün) ^{ö_s}
0	6	72,50 ab	1,76 ab	4,43 d
	12	62,50 b	1,35 bc	4,85 bcd
	24	90,00 a	1,97 a	4,77 cd
25	6	62,50 b	1,29 bc	5,08 bcd
	12	65,00 b	1,25 c	5,39 abc
	24	65,00 b	1,24 c	5,60 ab
50	6	65,00 b	1,32 bc	5,16 abcd
	12	70,00 ab	1,42 bc	5,14 abcd
	24	75,00 ab	1,65 abc	4,88 bcd
100	6	65,00 b	1,36 bc	4,91 bcd
	12	67,50 b	1,46 bc	4,94 bcd
	24	82,50 ab	1,68 abc	5,08 bcd
200	6	67,50 b	1,21 c	5,85 a
	12	65,00 b	1,23 c	5,35 abc
	24	75,00 ab	1,68 abc	4,65 cd
400	6	70,00 ab	1,51 abc	4,80 cd
	12	80,00 ab	1,57 abc	5,38 abc
	24	77,50 ab	1,59 abc	5,05 bcd
800	6	0,00 c	0,00 d	0,00 e
	12	0,00 c	0,00 d	0,00 e
	24	0,00 c	0,00 d	0,00 e

^{ö_s} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında önemli fark yoktur.

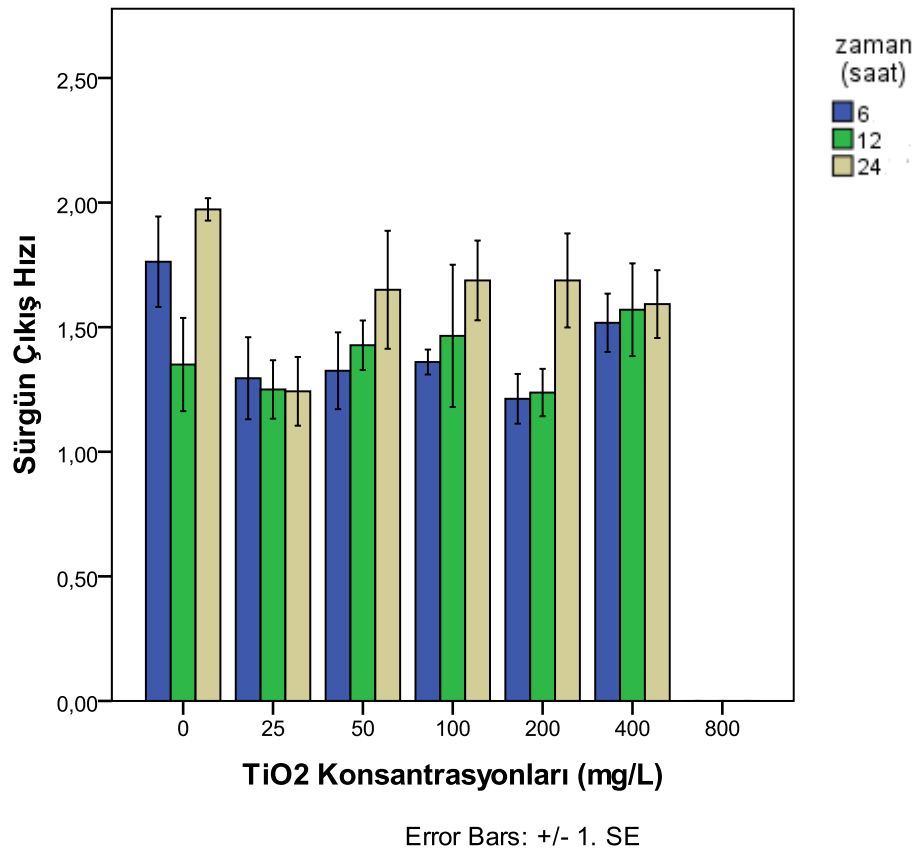


Error Bars: +/- 1. SE

Şekil 4.17. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün çıkış yüzdesine etkisi

Çizelge 4.17.'de çimlenme denemelerinde kullanılan formüller kök yerine sürgün için optimize edilerek sürgün çıkış yüzdesi, sürgün çıkış hızı ve ortalama sürgün çıkış zamanı hesaplanmıştır. 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda TiO₂'in toksik etkisi sebebiyle sürgün çıkışı gözlemlenmemiştir. Sürgün çıkış yüzdesinde en yüksek sonuç kontrol grubunda 24 saat priming uygulamasında %90 olarak ölçülmüştür. Sürgün çıkış yüzdesinde doğrusal bir artış veya azalış olmamış fakat 24 saat priming uygulamasının 0, 25, 50, 100 ve 200 TiO₂ konsantrasyonlarında sürgün çıkış yüzdesinin 12 ve 24 saate göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 6 saat priming uygulamasında en yüksek değer 0 konsantrasyonunda %72,5 ölçülmüş olup, diğer konsantrasyonların sürgün çıkış yüzdesinde çarpıcı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. 24 saat priming uygulamasında ise en yüksek değer 400 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda %77,5 ölçülmüştür ve diğer konsantrasyonlarda birbirine yakın değerler gözlemlenmiştir (Şekil 4.17.).

Çimlenme yüzdesi (şekil 4.13.) ve sürgün çıkış yüzdesi (Şekil 4.17.) karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlar ve priming süreleri için sürgün çıkış yüzdesinin çimlenme yüzdesinden daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bu fark 6 ve 24 saat priming uygulamaları için en az 0 konsantrasyonunda en düşük iken en düşük iken en yüksek 25 mg/L TiO₂ konsantrasyonundadır. Çimlenen her tohumun sürgün vermemiştir ve bu oran en düşük kontrol grubunda gözlemlenmiştir.

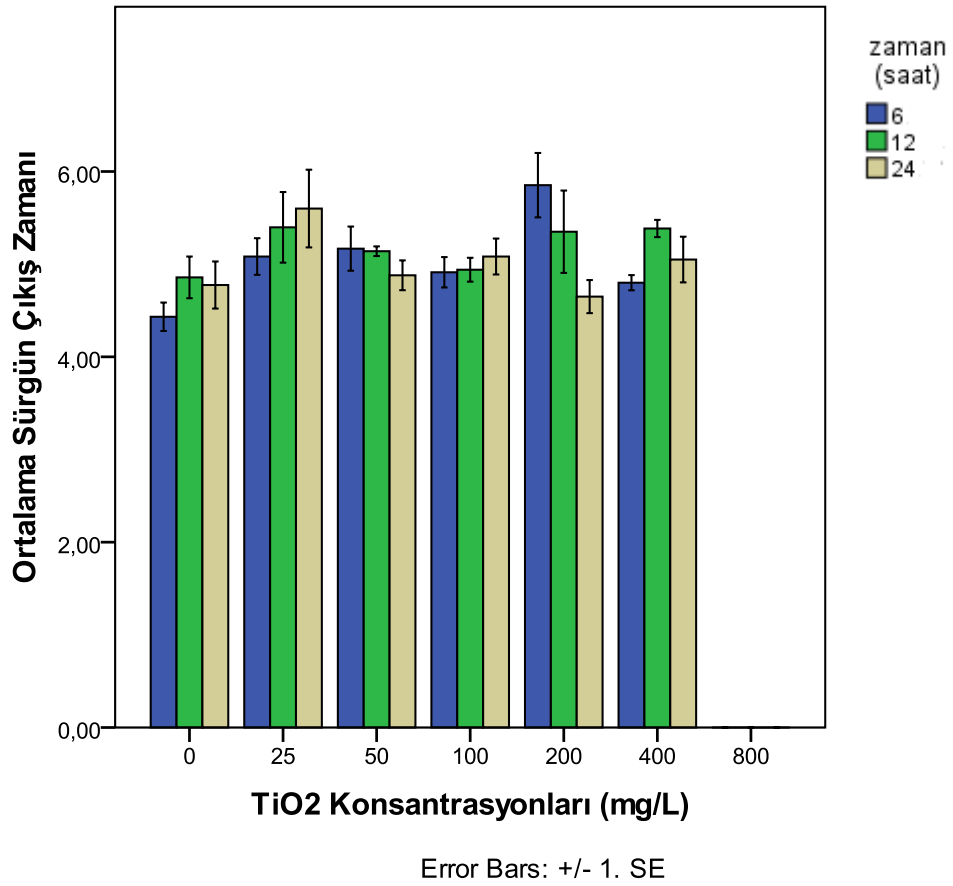


Şekil 4.18. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının sürgün çıkış hızına etkisi

Sürgün çıkış hızı bakımından en yüksek değer kontrol grubunda 24 saat priming uygulamasında 1,97 olarak ölçülmüştür. 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda sürgün çıkışı olmadığından sürgün çıkış hızı 0 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.17.). 0, 50, 100, 200 ve 400 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında 24 saat priming uygulamasının 12 ve 24 saat uygulamalarına göre sürgün çıkış hızının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 6 saat priming uygulamasında en yüksek değer kontrol grubunda 1,76 ölçülmüştür. 12 saat priming uygulamasında ise en yüksek değer 400

mg/L konsantrasyonunda 1,57, ,24 saat priming uygulamasında 25 mg/L konsantrasyonunda 1,24 olarak ölçülmüştür.

Çimlenme hızı (Şekil 4.14.) ve sürgün çıkış hızı (Şekil 4.18.) karşılaştırıldığında sürgün çıkış hızının tüm değerler için çimlenme hızından daha az olduğu gözlemlenmiştir. 6, 12 ve 24 saat priming uygulaması için sırasıyla çimlenme ve sürgün çıkış hızı arasındaki fark artmıştır. En az fark 6 saat priming de gözlemlenirken en çok fark 24 saat priming uygulanan TiO_2 konsantrasyonlarında gözlemlenmiştir. Priming uygulamasının süresi arttıkça, sürgün çıkış hızı sürgün hızına kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir.

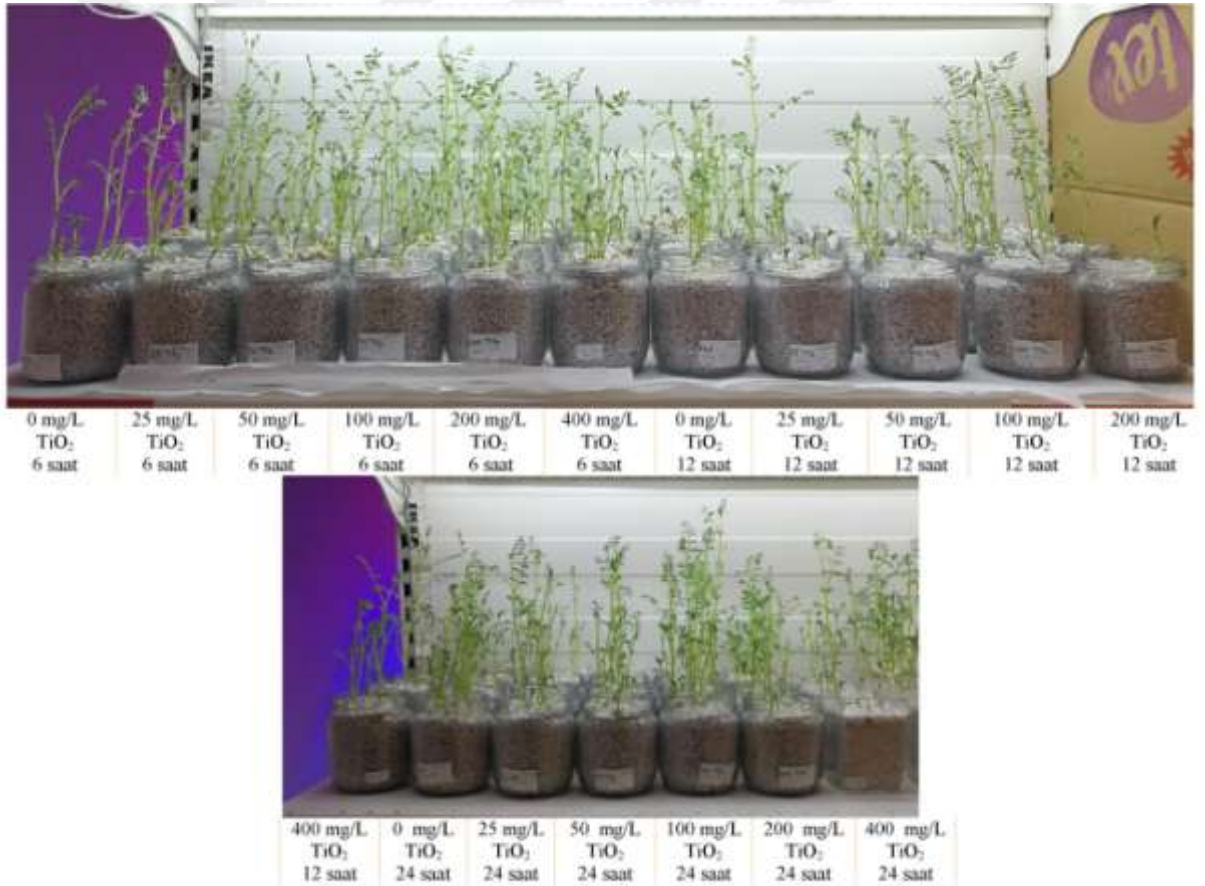


Şekil 4.19. Dikbaş çeşidine farklı konsantrasyonlarda, farklı sürelerde priming uygulamasının ortalama sürgün çıkış zamanına etkisi

Ortalama sürgün çıkış zamanında ise en yüksek değer 200 mg/L TiO_2 konsantrasyonunda 5,85 gün olarak ölçülmüştür. 800 mg/L TiO_2 konsantrasyonunda sürgün çıkışı olmadığı için sonuçlar 0 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.17). Sürgün

çıkış zamanında doğrusal bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir (Şekil 4.19.). 6 saat priming uygulamasında en yüksek değer 200 mg/L TiO_2 konsantrasyonunda 5,85 gün, 12 saat priming uygulamasında 25 mg/L konsantrasyonunda 5,39 gün, 24 saat priming uygulamasında da 25 mg/L TiO_2 konsantrasyonunda 5,60 olarak ölçülmüştür.

Ortalama çimlenme zamanı (Şekil 4.15.) ve ortalama sürgün çıkış zamanı (Şekil 4.19.) karşılaştırıldığında bütün değerler için ortalama sürgün çıkış zamanının daha yüksek olduğu ve sürgün çıkışının çimlenmenin 3.günü başladığı gözlemlenmiştir. Priming uygulamaları bakımından dikkat çekici bir sonuç gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.20. *Ex vivo* koşullarda farklı konsantrasyonlarda (0,25,50,100,200,400 mg/L) ve sürelerde (6,12,24 saat) TiO_2 priming uygulaması ardından pelit ortamına alınarak büyütülen Dikbaş çeşit nohutlar

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

TiO₂ nanopartikülünün nohut bitkisinde rejenerasyon ve çimlenme üzerine etkilerini gözlemlemek için yapılan bu tez çalışmasında Gökçe, Dikbaş, ER 99, TAEK kabuli biyotip ve desi biyotip nohutlar kullanılmıştır. TAEK, ER99 ve Gökçe tip nohutlar arasında ER 99 rejenerasyon yüzdesi %100 ile en yüksek ölçüldüğü için TAEK ve Gökçe yerine ER99 tercih edilmiştir. Dikbaş tip nohutun *in vitro* rejenerasyon çalışmasında ise iklim odasındaki yüksek sıcaklık ve kontaminasyon sebebi ile sonuç alınamamıştır. Besi ortamına 200 mg/L antibiyotik eklenerek deneme tekrarlamasına rağmen büyüme görülmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalara göre antibiyotığın bitkilerin çimlenme ve gelişimine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (Selleck ve ark., 1972).

ER 99 tip nohut tam embriyosunun farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L) TiO₂ ve 1 mg/L BAP ilave edilmiş ortamda kültüre alınması sonucu rejenerasyon yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı 200 mg/L TiO₂ en yüksek ölçülmüş ve konsantrasyon arttıkça azalma gözlemlenmiştir. Sürgün uzunluğunda ise en yüksek sonuç 200 ve 800 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarında ölçülmüştür. 1200 mg/L TiO₂ konsantrasyonunda embriyolar canlılık göstermemiştir. Tam embriyo için ölümcül TiO₂ konsantrasyonu belirlenmesine rağmen kontrol grubu ve daha küçük konsantrasyonlarda TiO₂ uygulaması ile deneme tekrarlanması titanyumun embriyo üzerindeki etkilerini daha iyi anlamaya yardımcı olacaktır.

Farklı miktarlarda (0, 25, 50, 100 ve 200 mg/L) TiO₂'in ER 99 tip nohutun plumula ve embriyonik eksenin *in vitro* rejenerasyona etkisi anlamak için yapılan çalışmada sürgünler çok kısa olduğu için ölçüm yapılamamıştır. Rejenerasyon yüzdesi plumula ve embriyonik eksen için en yüksek kontrol grubunda ölçülmüştür. Embriyonik eksen eksplantı için TiO₂ konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. Eksplant başına sürgün sayısında en yüksek sonuç ise plumula ve embriyonik eksen için 100 mg/L konsantrasyonunda ölçülmüştür. Plumula ve embriyonik eksen eksplantları karşılaştırıldığında ise plumulanın rejenerasyon yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından daha yüksek sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. TiO₂ miktarının rejenerasyon yüzdesi için azaltıcı etkisi olduğu gözlemlenmesine rağmen sürgün

sayısı için doğrusal olmasa da arttırıcı bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Eksplantlar için ölümcül konsantrasyonu bulmak ve ortam koşulları sebebi ile ölçülemeyen parametreleri ölçmek için daha yüksek konsantrasyonlarda denemenin tekrarlanması sonuçlara güvenilirliği arttıracaktır.

Çimlenme çalışmalarında ise farklı konsantrasyonlarda TiO_2 ve priming uygulamalarına rağmen kabuli tip nohutlarda *in vitro* koşullarda çimlenme gözlemlenmemiştir. Bu sebep ile desi tip siyah nohut farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200 mg/L) TiO_2 ve 1 mg/L BAP ilave edilmiş ortamlarda kültüre alınmıştır. Çok yüksek TiO_2 konsantrasyonunda bile çimlenme gözlemlenmiştir. Laboratuvar ortamındaki titanyum nanopartikülü eksikliği sebebi ile daha yüksek konsantrasyonlarda deneme tekrarlanamamıştır. Fakat siyah nohut için ölümcül TiO_2 miktarını bulmak için sonraki çalışmalarda daha yüksek konsantrasyonlar kullanılabilir. Çimlenme hızı için 50 mg/L ve 1600 mg/L konsantrasyonlarındaki düşüş hariç ortalama çimlenme zamanı için 50 mg/L ve 1600 mg/L konsantrasyonlarındaki yükseliş hariç bariz bir farklılık gözlemlenmemiştir. Tohum canlılık indeksi ise doğrusal olmasa da kontrol grubuna göre konsantrasyon arttıkça azalma gözlemlenmiştir. Sürgün uzunluğu için 50 mg/L konsantrasyonuna kadar bir artış ardından konsantrasyon arttıkça doğrusal olmasa da azalma gözlemlenmiştir.

Kabuli tip nohutlarda *in vitro* çimlenmede sonuç alınmadığı için Dikbaş tip nohuta farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 mg/L) ve sürelerde (6, 12, 24 saat) TiO_2 ile priming uygulaması yapılmış daha sonrasında çimlenmeleri için nemli perlit ortamlarına alınmıştır. 800 mg/L konsantrasyonunda hiçbir çimlenme ve canlılık gözlemlenmemiştir. Priming süresi arttıkça kök uzunluğunda azalış gözlemlenmiştir. Bütün ortamlarda yüksek çimlenme yüzdesi ve düşük konsantrasyonlarda 24 saat priming uygulamasının daha yüksek çimlenme yüzdesi verdiği gözlemlenmiştir. Ortalama çimlenme zamanında ise 6 saat priming uygulaması diğer süreler göre daha yüksek sonuçlar ölçülmüştür. Yani priming süresi azaldıkça çimlenme zamanı artmakta ve tohum daha geç çimlenmektedir. Konsantrasyonlar arasında ise bariz bir fark ölçülmemiştir. Çimlenme yüzdesi ise sürgün çıkış yüzdesi karşılaştırıldığında ise çimlenen her tohumun sürgün vermediği ve bu oranın en düşük kontrol grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Çimlenme hızı ile

sürgün çıkış hızı karşılaştırıldığında sürgün çıkış hızının tüm ortamlar için çimlenme hızından daha az olduğu ve priming süresi arttıkça sürgün çıkış hızının çimlenme hızına kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Ortalama çimlenme zamanı ile ortalama sürgün çıkış zamanı kıyaslamasında ise sürgün çıkışının çimlenmenin 3.günü başladığı ve tüm ortamlarda ortalama sürgün çıkış zamanının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda farklı desi ve kabulü tip nohutlar ile *ex vivo* çimlenmesi tekrarlanarak nohut tipleri arasında da karşılaştırma yapılabilir.

Tez kapsamındaki bütün çalışmalarda beyaz veya gün ışığı tek tip ışık kullanılmıştır. İlerde farklı renk ışıklarda da denemeler yapılması TiO₂ nanopartikülünün rejenerasyon ve çimlenme üzerine etkisini daha iyi anlamayı sağlayacaktır.

Zengin protein miktarı sebebi ile insan beslemesinde önemli olan nohut bitkisinin TiO₂ nanopartikül kullanılarak çimlenme ve rejenerasyon üzerine etkisini gözlemlemek amacı ile yapılan bu tez sonraki çalışmalarda titanyum nanopartikülünün kullanma protokollerinin hazırlanması, adaptasyon çalışmaları için katkıda bulunabilir.

6. KAYNAKLAR

- Aasim, M., Day, S., Rezaei, F. ve Hajyzadeh, M. (2013). Multiple shoot regeneration of plumular apices of chickpea. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1), 33–39. doi:10.3906/tar-1204-38
- Aasim, M., Day, S., Rezaei, F., Hajyzadeh, M., Mahmud, S. T. ve Ozcan, S. (2011). In vitro shoot regeneration from preconditioned explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Gokce. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2020–2023. doi:10.5897/AJB10.823
- Abdi, G., Salehi, H. ve Khosh-Khui, M. (2008). Nano silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 709–714. doi:10.1007/s11738-008-0169-z
- Abdul-Baki, A. A. ve Anderson, J. D. (1973). Vigor Determination in Soybean Seed by Multiple Criteria. *Crop Science*, 13(6), 630–633. doi:10.2135/cropsci1973.0011183x001300060013x
- Akçin, A. (1988). Yemeklik Dane Baklagiller. *Selçuk Üniversitesi Yayınları*, 43, 307–367.
- Allhoff, F. (2009). The coming era of nanomedicine. *American Journal of Bioethics*, 9(10), 3–11. doi:10.1080/15265160902985027
- Amer, A., Mohamed, G., Pantaleo, V., Leonetti, P. ve Hanafy, M. S. (2019). In vitro regeneration through organogenesis in Egyptian chickpea. *Plant Biosystems*, 153(6), 835–842. doi:10.1080/11263504.2018.1549616
- Amini, S., Maali-Amiri, R., Mohammadi, R. ve Kazemi- Shahandashti, S. S. (2017). cDNA-AFLP analysis of transcripts induced in chickpea plants by TiO₂ nanoparticles during cold stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 39–49. doi:10.1016/j.plaphy.2016.11.011
- Ashraf, M. ve Foolad, M. R. (2005, 1 Aralık). Pre-Sowing Seed Treatment-A Shotgun Approach to Improve Germination, Plant Growth, and Crop Yield Under Saline and Non-Saline Conditions. *Advances in Agronomy*. doi:10.1016/S0065-2113(05)88006-X
- Aydemir, L. Y. ve Yemenicioğlu, A. (2013). Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 686–694. doi:10.1016/j.lwt.2012.07.023
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve S., Ö. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Konya: Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya.
- Behboudian, M. H., Ma, Q., Turner, N. C. ve Palta, J. A. (2001). Reactions of chickpea to water stress: yield and seed composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(13), 1288–1291. doi:10.1002/jsfa.939
- Behere, P. P., Rathod, B. U., Dattagonde, N. R. ve Jadhav, M. P. (2017). Embryo excision and growth evaluation of chickpea (*Cicer arietinum*) on tissue culture medium. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 2212–2214.
- Bentarzi, Y., Benadji, S., Bennamane, N. ve Rabia, C. (2016). Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences An Efficient Heteropoly

- Acid-Catalysed Procedure for Synthesis of Quinolines. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(1), 971–979.
- Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W. ve Hazan, R. (2015). Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. doi:10.1155/2015/246012
- Buettner, K. M. ve Valentine, A. M. (2012, 14 Mart). Bioinorganic chemistry of titanium. *Chemical Reviews*. American Chemical Society. doi:10.1021/cr1002886
- Burman, U., Saini, M. ve Kumar, P. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 95(4), 605–612. doi:10.1080/02772248.2013.803796
- Dhoke, S. K., Mahajan, P. ve Khanna, A. S. (2011). Effect of nano-ZnO particle suspension on growth of mung (*Vigna radiata*) and gram (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *Journal of Nanotechnology*, 2011. doi:10.1155/2011/696535
- Dow, M. A. ve Schwintzer, C. R. (1999). Seed germination, seedling emergence, and seed bank ecology of sweet fern (*Comptonia peregrina* L.) Coult.). *Canadian Journal of Botany* içinde (C. 77, ss. 1378–1386). doi:10.1139/b99-081
- Elkoca, E., Haliloglu, K., Esitken, A. ve Ercisli, S. (2007). Hydro- and osmopriming improve chickpea germination. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 57(3), 193–200. doi:10.1080/09064710600914087
- Ellis, R. H. ve Roberts, E. H. (Reading U. (UK). D. of A. and H. (1981). The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology (Netherlands)*
- Feizi, H., Kamali, M., Jafari, L. ve Rezvani Moghaddam, P. (2013). Phytotoxicity and stimulatory impacts of nanosized and bulk titanium dioxide on fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Chemosphere*, 91(4), 506–511. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.012
- Galili, S., Ran, H., Dor, E., Hershenhorn, J., Harel, A., Amir-Segev, O., ... Achdari, G. (2019, 5 Aralık). The history of chickpea cultivation and breeding in Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*. Brill Academic Publishers. doi:10.1163/22238980-00001039
- Gogos, A., Moll, J., Klingenfuss, F., Heijden, M., Irin, F., Green, M. J., ... Bucheli, T. D. (2016). Vertical transport and plant uptake of nanoparticles in a soil mesocosm experiment. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1). doi:10.1186/s12951-016-0191-z
- Gogos, A., Moll, J., Klingenfuss, F., van der Heijden, M., Irin, F., Green, M. J., ... Bucheli, T. D. (2016). Vertical transport and plant uptake of nanoparticles in a soil mesocosm experiment. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 40. doi:10.1186/s12951-016-0191-z
- Hardegree, S. P. (1996). Optimization of seed priming treatments to increase low-temperature germination rate. *Journal of Range Management*, 49(1), 87–92. doi:10.2307/4002731
- Harman, G. E. (1988). Improved Seedling Performance by Integration of Biological Control Agents at Favorable pH Levels with Solid Matrix Priming. *Phytopathology*, 78(5), 520. doi:10.1094/phyto-78-520

- Heydecker, W. ve Gibbins, B. M. (1978). The “priming” of seeds. *Acta Horticulturae*, (83), 213–224. doi:10.17660/actahortic.1978.83.29
- Iglesias, R. G. ve Babiano, M. J. (1997). Endogenous abscisic acid during the germination of chick-pea seeds. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 500–504. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03054.x
- Iqbal, M., Ashraf, M. ve Jamil, A. (2006). Seed enhancement with cytokinins: Changes in growth and grain yield in salt stressed wheat plants. *Plant Growth Regulation*, 50(1), 29–39. doi:10.1007/s10725-006-9123-5
- Javadi, F. ve Yamaguchi, H. (2004). A note on seed coat and plumule morphological variation in the genus *Cicer L.* (Fabaceae). *Sci. Rep. Grad. Sch. Agric. & Biol. Sci., Osaka Pref. Univ.*, 56, 7–16.
- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L. ve Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum L.*): A review. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 1). doi:10.1017/S0007114512000797
- Kalefetoğlu Macar, T., Turan, Ö. ve Ekmekçi, Y. (2009). Effects of water deficit induced by PEG and NaCl on chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars and lines at early seedling stages. *Gazi University Journal of Science*, 22(1), 5–14.
- Kalefetoğlu Macar, T., Macar, O. ve İnci Mart, D. (2017). Variability in Some Biochemical and Nutritional Characteristics in Desi and Turkish Kabuli Chickpea (*Cicer arietinum L.*) Types. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 13(3), 677–680. doi:10.18466/cbayarfbe.339330
- Kalsaitkar, P., Tanna, J., Kumbhare, A., Akre, S., Warade, C. ve Gandhare, N. (2014). Silver nanoparticles induced effect on in-vitro callus production in *Bacopa monnieri*. *Asian Journal of Biological Life Sciences*, 3(3), 167–172.
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A. ve Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(6), 1–17. doi:10.1007/s11051-013-1692-4
- Khattak, A. B., Zeb, A., Bibi, N., Khalil, S. A. ve Khattak, M. S. (2007). Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum L.*) sprouts. *Food Chemistry*, 104(3), 1074–1079. doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.022
- Kirtiş, A., Aasim M. (2019). Thidiazuron (TDZ) Induced in Vitro Axillary Shoot Regeneration of Desi Chikpea (*Cicer arietinum L.*), 13(1), 17–20.
- Kumar, V., Guleria, P., Kumar, V. ve Yadav, S. K. (2013). Gold nanoparticle exposure induces, growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. *Science of the Total Environment*, 461–462, 462–468. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.05.018
- Leifert, C., Morris, C. E. ve Waites, W. M. (1994). Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems In Vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(2), 139–183. doi:10.1080/07352689409701912
- Mahmoodzadeh, H., Nabavi, M. ve Kashefi, H. (2013). Effect of Nanoscale Titanium Dioxide Particles on the Germination and Growth of Canola (*Brassica napus*), 3(1), 25–32.
- Mahna, N., Vahed, S. Z. ve Khani, S. (2013). Plant In vitro culture goes nano: Nanosilver-mediated decontamination of Ex vitro explants. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 4(2), 3. doi:10.4172/2157-7439.1000161

- Maira, A. J., Yeung, K. L., Lee, C. Y., Yue, P. L. ve Chan, C. K. (2000). Size effects in gas-phase photo-oxidation of trichloroethylene using nanometer-sized TiO₂ catalysts. *Journal of Catalysis*, 192(1), 185–196. doi:10.1006/jcat.2000.2838
- Mandeh, M., Omid, M. ve Rahaie, M. (2012). In Vitro influences of TiO₂ nanoparticles on barley (*Hordeum vulgare L.*) tissue culture. *Biological Trace Element Research*, 150(1–3), 376–380. doi:10.1007/s12011-012-9480-z
- Matilla, A. J., Garcia, S. ve Bueno, M. (2002). Diamine oxidase activity during the germinative and post-germinative growth of the embryonic axis in chickpea seeds. *Biologia Plantarum*, 45(4), 551–556. doi:10.1023/A:1022325109218
- Moraru, C. I., Panchapakesan, C. P., Huang, Q., Takhistov, P., Liu, S. ve Kokini, J. L. (2003, Aralık). Nanotechnology: A New Frontier in Food Science. *Food Technology*.
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y. ve Kumar, D. S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179(3), 154–163. doi:10.1016/j.plantsci.2010.04.012
- Padilla, I. M. G. ve Burgos, L. (2010). Aminoglycoside antibiotics: Structure, functions and effects on in vitro plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports*, 29(11), 1203–1213. doi:10.1007/s00299-010-0900-2
- Paleg, L. G. (1960). Physiological Effects of Gibberellic Acid: I. On Carbohydrate Metabolism and Amylase Activity of Barley Endosperm. *Plant Physiology*, 35(3), 293–299. doi:10.1104/pp.35.3.293
- Pandey, A. C., S. Sanjay, S. ve S. Yadav, R. (2010). Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental Nanoscience*, 5(6), 488–497. doi:10.1080/17458081003649648
- Pathak, M. ve Hamzah, R. (2008). An effective method of sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of chickpeas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 18 Eylül 2020 tarihinde <https://insights.ovid.com/plant-cell-tissue-organ-culture/pctoc/2008/93/010/effective-method-sonication-assisted-agrobacterium/7/00010481> adresinden erişildi.
- Purushothaman, R., Upadhyaya, H. D., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L. ve Krishnamurthy, L. (2014). Kabuli and desi chickpeas differ in their requirement for reproductive duration. *Field Crops Research*, 163, 24–31. doi:10.1016/j.fcr.2014.04.006
- R. Rafique, M. Arshad, M. F. Khokhar, I. A. Qazi, A. Hamza, N. V. (2014). Growth Response of Wheat to Titania Nanoparticles Application. *NUST Journal of Engineering Sciences*, 7(1), 42–46. doi:10.1007/BF03338858
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W.-N. ve Biswas, P. (2015). Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plant. *Metallomics*, 7(12), 1584–1594. doi:10.1039/C5MT00168D
- Sadhu, S. K., Jogam, P., Thampu, R. K., Abbagani, S., Penna, S. ve Peddaboina, V. (2020). High efficiency plant regeneration and genetic fidelity of regenerants by SCoT and ISSR markers in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141(3), 465–477. doi:10.1007/s11240-020-01804-7
- Sağel, Z., Tutluer, M. I., Peşkirioğlu, H., Kantoğlu, K. Y. ve Kunter, B. (2009). The Improvement of TAEK-Sağel Chickpea (*Cicer arietinum L.*) Mutant Variety

- in Turkey. *Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 319–321.
- Samarah, N. H. ve Abu-Yahya, A. (2008). Effect of maturity stages of winter- and spring-sown chickpea (*Cicer arietinum L.*) on germination and vigour of the harvested seeds. *Seed Science and Technology*, 36(1), 177–190. doi:10.15258/sst.2008.36.1.19
- Sarmast, M. K., Niazi, A., Salehi, H. ve Abolimoghadam, A. (2015). Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121(1), 227–236. doi:10.1007/s11240-014-0697-8
- Sarmast, M. K., Niazi, A., Salehi, H. ve Abolimoghadam, A. (2015). Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121(1), 227–236. doi:10.1007/s11240-014-0697-8
- Selleck, G. W. (1972). *The Antibiotic Effects of Plants in Laboratory and Field. Weed Science*. Cambridge University Press Weed Science Society of America. doi:10.2307/4042192
- Sharma, V. K., Hänsch, R., Mendel, R. R. ve Schulze, J. (2005). Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare L.*). *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1913–1922. doi:10.1093/jxb/eri186
- Sozen, O. ve Karadavut, U. (2019). Statistical Analysis of Some Characters Affecting Yield in Chickpea Varieties Which Can Be Breeded in Arid Climate Conditions. *Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences*, 7(4), 145–149. doi:10.22194/jgiass/7.877
- Sumanth Krishna, M., Kumar Rai, P., Bara, B. M. ve Prashant Kumar Rai, C. (2017). Studies on effect of polymer seed coating, nanoparticles and hydro priming on seedling characters of Chickpea (*Cicer arietinum L.*) seed. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 6(64), 489–492.
- Turgut, O., Keskin, H. L. ve Avcı, A. F. (2011). Review Nanoteknoloji Nedir ? What Is Nanotechnology ? *Türk Tıp Dergisi*, 5(1), 45–49.
- Velez, P. A., Talano, M. A., Paisio, C. E., Agostini, E. ve González, P. S. (2017). Synergistic effect of chickpea plants and Mesorhizobium as a natural system for chromium phytoremediation. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 38(17), 2164–2172. doi:10.1080/09593330.2016.1247198
- Viana, M. M., Soares, V. F. ve Mohallem, N. D. S. (2010). Synthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles. *Ceramics International*, 36(7), 2047–2053. doi:10.1016/j.ceramint.2010.04.006
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., ... Kogel, K. H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13386–13391. doi:10.1073/pnas.0504423102
- Wang, L., Hu, C. ve Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. doi:10.2147/IJN.S121956

- Wang, X., Gao, W., Zhang, J., Zhang, H., Li, J., He, X. ve Ma, H. (2010). Subunit, amino acid composition and in vitro digestibility of protein isolates from Chinese kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. *Food Research International*, 43(2), 567–572. doi:10.1016/j.foodres.2009.07.018
- Zheng, L., Hong, F., Lu, S. ve Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*, 104(1), 83–91. doi:10.1385/BTER:104:1:083



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nazmiye Okşan Okan
Uyruğu : Türk
Doğum Yeri ve Tarihi : Eskişehir 24.01.1995
Telefon : 05072200011
Faks :
e-mail : oksanokan@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Dolapoğlu Anadolu Lisesi(Almanca) , Konya	2013
Üniversite (Lisans)	: Necmettin Erbakan Üniversitesi,Moleküler Biyoloji ve Genetik, Konya	2017
Üniversite (Önlisans)	: Anadolu Üniversitesi,Açıköğretim Fakültesi,Fotoğrafçılık ve Kameramanlık	2020
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi , Konya	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2016	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	Stajyer

UZMANLIK ALANI

Bitki doku kültürü

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

1. Effect of TiO₂ Nanoparticles on in vitro Shoot Regeneration of Chickpea (Cicer arietinum L). Nazmiye Okşan Okan,Muhammad Asim,Mehmet Karatas.5th International Agriculture Congress.İstanbul,Türkiye.21-24 Ağustos 2019. (Yüksek lisans tez çalışması tezinden yapılmıştır.)