

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ELMADA MİKRO ÇELİKLERİN *IN VITRO* KÖKLENMESİ ÜZERİNE
IAA VE IBA İLE STABİLİZE EDİLMİŞ ÇİNKO OKSİT
NANOPARÇACIKLARIN ETKİLERİ

Shabnam ALIZADEH

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2020

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ELMADA MİKRO ÇELİKLERİN *IN VITRO* KÖKLENMESİ ÜZERİNE IAA VE IBA İLE STABİLİZE EDİLMİŞ ÇİNKO OKSİT NANOPARÇACIKLARIN ETKİLERİ

Shabnam ALIZADEH

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU

Bu çalışmada, IAA ve IBA ile yüklenmiş çinko oksit nanoparçacıkların elma mikro çeliklerinde *in vitro* köklenme üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışma, ateş yanıklığı hastalığına yüksek düzeyde dayanıklı, zor köklenen 67 nolu yerel elma çeşidinde gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında üretilen IAA-nZnO ve IBA-nZnO, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR), zeta potansiyeli, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX), Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ve Diferansiyel Termal Analiz (DTA) ile karakterize edilmiştir. Çalışmada, oksinler, nZnO'ye başarıyla yüklenerek stabil yapıda nanoparçacıklar üretilmiştir. Oksinleri yükleme verimi %87 ve %89'dur. SEM ve TEM analizleri nanoparçacıkların küp, dikdörtgen ve küresel şekilli olduğunu göstermiştir. nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO parçacıkların hidrodinamik boyutu sırasıyla 245 ± 1.199 nm, 992 ± 0.1647 nm ve 318 ± 0.1251 nm olarak belirlenmiştir.

Köklendirme denemelerinde IAA-nZnO, IBA-ZnO ve nZnO 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L, IAA ve IBA 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L dozlarında kullanılmıştır. Ayrıca, 3.0 mg/L IAA+1.0 g/L polivinil alkol+25 mg/L kazein hidrolizat uygulaması ve kontrol de denemelerde yer almıştır. Tüm maddeler ½ kuvvetindeki MS besin ortamına otoklavdan önce ilave edilmiştir. Ortamlara %2 sakaroz eklenmiş, pH 5.8'e ayarlanmış ve %0.7 agar ile katılaştırılmıştır. Kültürler ilk 5 günü karanlıkta olmak üzere $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullarda 6 hafta inkübe edilmiştir.

Çalışmada, kontrol ve nZnO uygulamalarında köklenme meydana gelmemiştir. Özellikle, 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L IBA-nZnO nanoparçacık uygulamaları (0.5 mg/L ve 0.9 mg/L IBA içermekte) sırasıyla %40.3 ve %70.4 köklenme oranları, 2.0 ± 0.4 ve 2.3 ± 0.4 köklenme düzeyleri, 2.6 ± 0.7 ve 2.5 ± 0.6 adet ortalama kök sayıları ve 20.4 ± 1.6 mm ve 20.2 ± 3.4 mm ortalama kök uzunlukları ile etkin uygulamalar olarak öne çıkmıştır.

Haziran 2020, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Malus*, mikro çoğaltım, nanoteknoloji, *in vitro* köklenme, çinko oksit nanoparçacıkları, oksin, IAA, IBA

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECTS OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES STABILIZED WITH IAA AND IBA ON *IN VITRO* ROOTING OF APPLE MICRO CUTTINGS

Shabnam ALIZADEH

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU

In this research, the effects of zinc oxide nanoparticles loaded with IAA and IBA on *in vitro* rooting in apple micro cuttings were investigated. The study was conducted in local apple cultivar 67, which is highly resistant to fire blight disease and a difficult-to-root genotype.

IAA-nZnO and IBA-nZnO nanoparticles which is produced within the thesis is characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR), zeta potential, Scanning Electron Microscope (SEM), Energy Distribution X-ray Spectroscopy (EDX), Transmission Electron Microscope (TEM) and Thermal Analysis (DTA).

In the study, a stable structure of nanoparticles was produced successfully by loading auxins to nZnO. The loading efficiency of auxins is 87% and 89%. SEM and TEM analysis showed that nanoparticles are cube, rectangular and spherical in shape. The hydrodynamic size of nZnO, IAA-nZnO and IBA-nZnO particles was determined as 245 ± 1.199 nm, 992 ± 0.1647 nm and 318 ± 0.1251 nm, respectively.

In rooting trials, IAA-nZnO, IBA-nZnO and nZnO 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L, IAA and IBA were used at 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L. In addition, 3.0 mg/L IAA+1.0 g/L polyvinyl alcohol+25 mg/L casein hydrolyzate application and control were also included in the trials. All substances were added to MS basal medium with ½ strength before autoclaving. Sucrose (2%) was added to the media, the pH was adjusted to 5.8 and solidified with 0.7% agar. The cultures were incubated for the first 5 days in the dark and then for 6 weeks at $25\pm1^{\circ}\text{C}$ under 16-h photoperiod conditions.

In the study, no rooting occurred in control and nZnO applications. Especially, 1.0 mg/L and 2.0 mg/L IBA-nZnO nanoparticle applications (containing 0.5 mg/L and 0.9 mg/L IBA), respectively with rooting rates of 40.3% and 70.4%, rooting levels of 2.0 ± 0.4 and 2.3 ± 0.4 , 2.6 ± 0.7 and 2.5 ± 0.6 average root numbers and 20.4 ± 1.6 mm and 20.2 ± 3.4 mm average root lengths put forward as effective applications.

June 2020, 83 pages

Key Words: *Malus*, micropropagation, nanotechnology, *in vitro* rooting, zinc oxide nanoparticles, auxin, IAA, IBA

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, aynı zamanda Doktora eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerinden faydalandığım değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda geliştirmemi sağlayan Tez İzleme Komitesi Hocalarım Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU ve Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye tüm içtenliğim ile teşekkür ederim. Kimya Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'ndaki çalışmalarım ve denemelerim boyunca deneyimlerinden faydalandığım Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ Hocama ayrıca çok teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim boyunca gösterdiği sabır ve özveriden ötürü eşim Jesper Nicolaisen ve kızım Victoria'ya ve daima yanımda olan, sevgi ve desteklerini her an hissettiğim değerli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Shabnam ALIZADEH

Ankara, Haziran 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Elma Genotiplerinde Mikro Çeliklerde Köklendirme Çalışmaları	6
2.2 Bitkilerde Çinko Oksit Nanoparçacık Uygulamaları	28
2.3 Çeliklerin Köklenmesi Üzerine Nanoparçacıkların Etkileri	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM	42
3.1 Materyal	42
3.1.1 Bitkisel materyal	42
3.1.2 Oksinler ve çinko oksit nanoparçacıkları	44
3.2 Yöntem	44
3.2.1 Oksinler ile yüklü çinko oksit nanoparçacıkların hazırlanması	44
3.2.2 <i>In vitro</i> köklendirme çalışmaları	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	50
4.1 ZnO Nanoparçacıklarına IAA ve IBA Yükleme Verimi	50
4.2 IAA ve IBA Yüklü ZnO Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	51
4.3 Mikro Çeliklerde <i>In Vitro</i> Köklendirme Bulguları	61
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	67
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER DİZİNİ

Ag	Gümüş
B	Bor
CuO	Bakır oksit
°C	Santigrat derece
Fe	Demir
HCl	Hidroklorik asit
K	Potasyum
M	Mol
M9	East Malling 9
MM111	Malling Merton 111
mg	Milligram
Mg	Magnezyum
ml	Mililitre
mM	Milimol
mm	Millimetre
Mn	Mangan
Mo	Molibden
mV	Milivolt
μM	Mikromol
μl	Mikrolitre
nAl ₂ O ₃	Alüminyum oksit nanoparçacıkları
NaOH	Sodyumhidroksit
nFe ₃ O ₄	Demir oksit nanoparçacıkları
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NPs	Nanoparçacıklar
nSiO ₂	Silikon dioksit nanoparçacıkları
nZnO	Çinko oksit nanoparçacıkları
P	Fosfor
ppm	Milyonda bir kısım
rpm	Dakikada devir
S	Kükürt
TiO ₂	Titanium dioxide
UV	Ultraviyole
Zn	Çinko
ZnCl ₂	Çinko klorür
ZnSO ₄	Çinko sülfat

Kısaltmalar

ABA	Absizik asit
ABTS	2,2'azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	Analysis of variance
ASTM	American Society for Testing and Materials
BA	Benzil adenin
BAP	Benzil amino purin
CAT	Katalaz
DIECA	Sodium salt trihydrate
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTA	Diferansiyel termal analiz
EDX	X-ışını spektroskopisi
FAO	Food and Agriculture Organization
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
FTIR	Fourier transform infrared
GA ₃	Gibberellik asit
GH	Glutathione reduced
IAA	İndol asetik asit
IBA	İndol bütirik asit
IC50	The half maximal inhibitory concentration
KIN	Kinetin
LS	Linsmaier ve Skoog
MDA	Malondialdehit
MES	2-[-morpholino] ethanesulfonic acid
MS	Murashige ve Skoog
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
2-Me	2-mercaptoethanol
NAA	Naftalen asetik asit
PDI	Polidispersite indeksi
PG	Phloroglucinol
pH	Potential hydrogen
POX	Peroksidaz
PP 333	Paclobutrazol
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polyvinylpyrrolidone-40
QL	Quoirin ve Lepoivre
ROS	Reaktif oksijen türevi
SD	Standart ayrılma
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SOD	Superoksit dismutaz
TEM	Geçirimli (transmisyon) elektron mikroskopu
TGA	Termogravimetrik
TOP	Topolin
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
WPM	Woody Plant Medium
XRD	X-ray diffraction

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	IAA ve IBA. IBA'nın indol halkası üzerindeki 3 pozisyonundaki yan zincir, IAA'nın iki karbonlu yan zincirinin aksine dört karbona sahiptir ...	6
Şekil 3.1	Ordu ili Gülyalı ilçesinden selekte edilmiş olan 67 nolu genotipin meyvesinin görünümü	42
Şekil 3.2	Ateş yanıklığı hastalığına yüksek derecede dayanıklılık gösteren 67 nolu elma genotipi ve hassas standart elma çeşidi Royal Gala fidanlarının inokülasyondan sonra görünümü	43
Şekil 4.1	IAA, IBA, IAA-nZnO ve IBA-nZnO yapılarına ait FTIR-ATR spektrumları	50
Şekil 4.2	EDX analizi sonuçları a) nZnO, b) IAA-nZnO, c) IBA-nZnO	52
Şekil 4.3	Nanoparçacıkların ortalama zeta potansiyel değeri a) nZnO, b) IAA-nZnO, c) IBA-nZnO	54
Şekil 4.4	Nanoparçacık boyutu ve PDI değerleri a) nZnO, b) IAA-nZnO, c) IBA-nZnO	55
Şekil 4.5	nZnO parçacıkların SEM görüntüleri (a) 10000x, (b) 100000x, (c) 400000x	56
Şekil 4.6	IAA-nZnO parçacıkların SEM görüntüleri (a) 10000x, (b) 100000x, (c) 400000x	57
Şekil 4.7	IBA-nZnO parçacıkların SEM görüntüleri (a) 10000x, (b) 100000x, (c) 400000x	58
Şekil 4.8	Nanoparçacıkların TEM görüntüleri (a) nZnO, (b) IAA-nZnO, (c) IBA-nZnO	59
Şekil 4.9	Termogravimetrik analiz bulguları (a) nZnO, (b) IAA-nZnO, (c) IBA-nZnO	60
Şekil 4.10	Nanoparçacıkların hidrodinamik boyutu (DLS sonuçları)	61
Şekil 4.11	67 nolu elma genotipinde mikro çeliklerin köklenme oranı üzerine oksinlerin ve oksinler ile yüklenmiş ZnO nanoparçacıkların etkisi	63
Şekil 4.12	67 nolu elma genotipinde IBA-nZnO parçacıkları ilave edilmiş besin ortamında köklendirilmiş mikro çelikler	64
Şekil 4.13	67 nolu elma genotipinde IBA ilave edilmiş besin ortamında köklendirilmiş mikro çelikler	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Dünya elma üretimi	2
Çizelge 3.1	Modifiye edilmiş MS (Murashige ve Skoog) temel ortamının bileşimi .	47
Çizelge 4.1	Farklı karıştırma zamanlarında ZnO nanoparçacıklarına IAA ve IBA yükleme verimi	50
Çizelge 4.2	nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO parçacıklarında SEM, TEM, zeta potansiyel değerleri ve parçacık boyutları	53
Çizelge 4.3	67 nolu elma genotipinde mikro çeliklerin <i>in vitro</i> köklenmesi üzerine IAA ve IBA ile yüklenmiş çinko oksit nanoparçacıkların etkileri	62



1. GİRİŞ

Kültür elmasının (*Malus domestica* Borkh.) atası Orta Asya dağlarında yayılmış olan *Malus sieversii* türüdür. *Malus* cinsinin dünyanın farklı yerlerinde birçok türü bulunmaktadır. *M. domestica*, türler arası hibritleşmelerin sonucunda ortaya çıkmış ve binlerce yıldır gerçekleştirilen seleksiyonlar ile geliştirilmiştir. Tarihçiler, Anadolu'da ve Ürdün Vadisi'ndeki Jericho'daki kazılarda buldukları kalıntılardan elmanın dünyadaki varlığının M.Ö. 6500'lü yılların öncesine dayandığını belirtmektedir (Luby 2003, Collett 2011). Tarih boyunca 10.000'den fazla elma çeşidi geliştirilmiş olmakla birlikte günümüzde dünyada ticari olarak yetiştirilen yaklaşık 100 çeşit bulunmaktadır (Collett 2011).

Bitkiler aleminde Rosales takımı, Rosaceae familyası, Maloideae (Pomoideae) alt familyası, *Malus* cinsine dahil olan kültür elması (*M. domestica* Borkh.) esas olarak bir ılıman iklim meyve türüdür. Bu kuşakta yer alan Türkiye'nin hemen her bölgesinde başarıyla yetiştirilmektedir. Ayrıca Türkiye, *M. sylvestris* ve *M. orientalis* elma türlerinin gen merkezlerinden birisi üzerinde yer almaktadır (Luby 2003, Ercisli 2004).

FAO'nun 2018 yılı verilerine göre Dünya üretimi 86.1 milyon ton olan elmanın bu bakımdan önemli olduğu başlıca ülkeler Çin (%45.5), A.B.D. (%5.4), Polonya (%4.6), Türkiye (%4.2), İran (%2.9), İtalya (%2.8) ve Hindistan'dır (%2.7) (Çizelge 1.1) (Anonymous 2018).

Elma yabancı tozlanan bir meyve türüdür ve tohumla çoğaltımında yüksek genetik açılım meydana gelmektedir. Bu nedenle bir örnek bitki üretimi için vejetatif çoğaltım yöntemleri kullanılmaktadır. Kültür elma çeşitleri, köklenmedeki başarısızlıktan dolayı yine elma türlerine (*Malus* spp.) dahil çöğür ve tercihen klon anaçlar üzerine aşılanarak çoğaltılmaktadır. Klon anaçlar, üzerine aşılanan çeşitleri bir örnek geliştirmenin ötesinde onların gelişme kuvveti, verimlilik, meyve kalitesi, stres unsurlarına dayanıklılık gibi birçok özelliğini etkileyebilmektedir (Wertheim ve Webster 2003).

Çizelge 1.1 Dünya elma üretimi (Anonymous 2018)

Ülkeler	Üretim (Ton)
Çin	39 233 400
ABD	4 652 500
Polonya	3 999 523
Türkiye	3 625 960
İran	2 519 249
İtalya	2 414 921
Hindistan	2 327 000
DÜNYA	86 142 197

Elma klon anaçları vejetatif olarak daldırma, çelik ya da mikro çoğaltım teknikleriyle çoğaltılabilmektedir. Daldırma ve çelikle çoğaltım gibi geleneksel tekniklerde bitki üretim katsayısı düşüktür. Bunun en önemli nedeni her iki tekniğin de yılın belirli zamanlarında yapılabilmesi ve köklenmede ortaya çıkabilen sorunlardır. Oysa mikro çoğaltım tekniği ile zamana bağlı kalınmadan tüm yıl boyunca kitlesel bitki çoğaltımı yapılabilmekte ve köklenme sorunu kontrollü koşullarda başarıyla çözülebilmektedir (Wertheim ve Webster 2003, Hartmann vd. 2011).

Dünyada, 20. yüzyılın sonlarından itibaren hızla gelişmekte olan mikro çoğaltım tekniği ile köklenmede elde edilen başarılı sonuçlar sayesinde tüm meyve türlerinde anaç ıslah çalışmaları çok büyük ivme kazanmıştır. Günümüzde farklı meyve türlerinde klon anaçların sayısı çok yüksek düzeylere ulaşmış ve fidancılık sektöründe bu anaçların kullanımı yine mikro çoğaltım sayesinde ticari boyutta giderek artan bir eğilim içerisine girmiştir. *In vitro* ve *ex vitro* çalışmaların bütünü olan mikro çoğaltım, bitki doku kültürleri kapsamında sürgün ucu, tomurcuk, boğum, meristem, kök, yumru, soğan, hücre süspansiyon, embriyo ve tohum kültürleri, mikro aşılama ve somatik embriyogenesis gibi tekniklerin esas alındığı, kullanılan başlangıç materyaline göre vejetatif ya da generatif bir çoğaltım yöntemidir. Mikro çoğaltımın esas olarak 4 aşaması bulunmaktadır. Bunlar; 1) başlangıç, 2) sürgün çoğaltma, 3) köklendirme ve 4) dış koşullara alıştırmadır (Hartmann vd. 2011).

Köklendirme, özellikle zor köklenen bitkilerde mikro çoğaltımın en kritik aşamalarından birisi olup başarısızlık ya da düşük başarı durumlarında çok yüksek ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Mikro çoğaltımda köklenme başarısı üzerine en etkili faktör genotiptir. Ayrıca, mikro çeliklerin fizyolojik durumu, köklendirme ortamlarının tipi, yapısı ve içeriği, köklenmeyi uyarıcı maddeler ve uygulamalar, ışık, sıcaklık, nem, hava bileşimi gibi çevresel unsurlar başarılı bir köklenme için üzerinde durulması gereken diğer önemli konulardır (Hartmann vd. 2011).

Mikro çoğaltımda köklenme sorunu, genotipler için uygun protokollerin geliştirilmesi ile çözüme kavuşturulabilmektedir. Bu kapsamda yıllardır uygulanmakta olan geleneksel çözüm yolları yerine, günümüzde olduğu kadar gelecekte de önemli bir alan olmayı sürdürecektir. Nanoteknolojiden yararlanma olanaklarının araştırılması, meyve anaçlarında köklenme ve böylece çoğaltım başarısının artırılması açısından önemlidir (Thangavelu vd. 2018).

Nanoteknoloji, metrenin milyarda biri ($1 \text{ nanometre (nm)=10}^{-9} \text{ m}$) ölçekteki maddeler ile ilgilenen bilim dalıdır. Metalik nanoparçacıklar, bulk metallere farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Daha düşük erime noktaları, daha yüksek özgül yüzey alanları, spesifik optik özellikleri, mekanik güçlülük ve spesifik mıknatıslanmalar gibi özellikler bu maddeleri çeşitli endüstriyel uygulamalarda çekici kılmaktadır (Horikoshi ve Serpone 2013).

Nanoparçacıkların bitkiler üzerine etkisi, bitki genotipi kadar nanoparçacıkların bileşimi, konsantrasyonu, boyutu, fiziksel ve kimyasal özelliklerine de bağlıdır. Etkisi bitkiden bitkiye değişmekle birlikte nanoparçacıkların tohum çimlenmesi, köklenme, bitki gelişimi ve fotosentez üzerine olası etkileri konularında çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Siddiqui vd. 2015).

Nanoteknolojinin bitki bilimlerine ve bitki üretim sistemlerine uygulanması olarak tanımlanan fitonanoteknoloji, gübreler ve tarımsal mücadele ilaçları gibi kimyasal maddelerin doğrudan hedefe yönelik, kontrollü salımını ve yeni bir vektör olarak

nükleotidler, proteinler, aktivatörler gibi biomoleküllerin hedefe özel taşınımlarını sağlayarak geleneksel bitki üretim sistemlerini değiştirebilecektir (Wang vd. 2016).

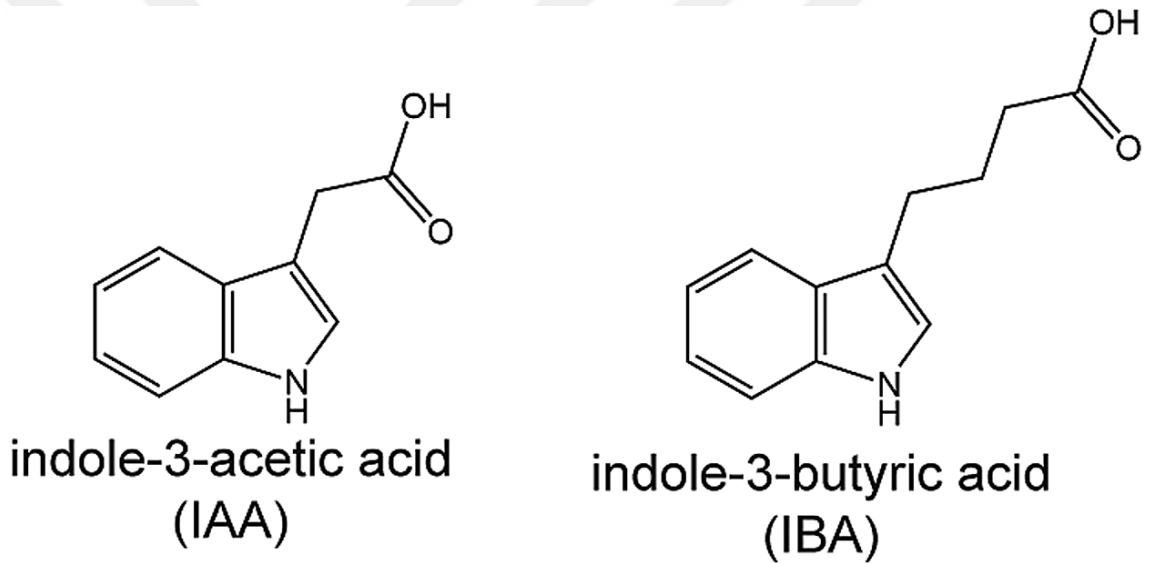
Nanoparçacıklar,   z nm ş, hapsedilmiş veya adsorbe haldeki etkin maddeyi kontrollü olarak açığa çıkaran kolloidal polimerik partiküler sistemlerdir (şengel-Türk ve Haş  ek 2009). Köklenme yeteneği düşük olan genotiplerde oksinler ile stabilize edilmiş nanoparçacıklar eşsiz fizikokimyasal özellikleri ile köklenme başarısını artırma yönünde önemli bir potansiyeldir (Thangavelu vd. 2018).

Bu tezin amacı, elmanın mikro çoğaltımında anahtar rol oynayan köklenme başarısının artırılmasında mikro çeliklerin *in vitro* köklenmesi üzerine indol asetik asit (IAA) ve indol bütirik asit (IBA) ile yüklenmiş çinko oksit nanoparçacıkların (nZnO) etkilerini araştırmaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Birçok odunsu bitki türünde oksinlerin adventif köklerin oluşumu için etkili indükleyiciler oldukları gösterilmiştir (Selby vd. 1992, Diaz-Sala vd. 1996, Goldfarb vd. 1998, De Klerk vd. 1999). Köklendirme çalışmalarında oksin ve etilen genellikle aktivatörler olarak tanımlanırken, sitokininler ve gibberellinler adventif kök oluşumunun inhibitörleri olarak ifade edilmektedir (Pop vd. 2011). Sauer vd. (2013) tarafından bildirildiğine göre oksin, Yunanca'da büyümek-genişlemek anlamına gelen 'auxein' kelimesinden orijinini almış ve ilk olarak bir fermentasyon ortamından izole edilmiş (Salkowski 1885) ve indol-3-asetik asit (IAA) olarak isimlendirilmiştir (Kögl vd. 1934). Doğal ve sentetik oksinler düşük molekül ağırlıklı ve bir karboksil grubu bulunan indol ya da aromatik bir halka içeren organik maddelerdir. Bu büyümeyi düzenleyiciler kristal şeklinde ve suda çok az çözünen maddeler olup organik çözücülerde (etanol, metanol, aseton, dietil eter ve dimetil sülfoksit) veya zayıf asitler olarak alkalın sulu çözeltilerde kolayca çözünebilmektedir. IAA haricindeki diğer oksinler, doku kültürü ortamlarında stabil yapıdadır ve bu stabilitesini koruyabilmektedir. IAA ise daha az stabildir. Bu oksin özellikle ışığa (özellikle UV) ve oksidanlara karşı duyarlıdır. Doğal olarak meydana gelen indolik oksinler ve bunların sentetikleri farklı yapılarına rağmen benzer fizyolojik etkilere sahiptir. Tüm aktif oksinler zayıf organik asitler olarak tanımlanmaktadır (Machakova vd. 2008). Farklı büyüme süreçlerinde oksinlerin nispi etkinliği çok değişkendir. Bu durum sadece bitkiden bitkiye değil, aynı zamanda organdan organa, dokudan dokuya, hücreden hücreye ve ayrıca bitki dokusunun yaş ve fizyolojik durumunda da ortaya çıkmaktadır (Davies 2004). Dıştan uygulandığında birçok küçük molekül oksin etkisi meydana getirmektedir. Bu bileşikler, IAA, 4-chloroindole-3-acetic acid ve phenylacetic acid gibi doğal olarak oluşan aktif oksinler; indole-3-pyruvic acid, indoleacetamine, indole-3-acetaldoxime, indole-3-acetonitrile ve indole-3-acetaldehyde gibi doğal olarak oluşan ancak aktif olmayan oksin öncüleri ve doğal olarak oluşan oksin depolama formlarıdır (IBA, methyl-IAA ve amino asitlere veya şekerlere bağlı oksinler). İlave olarak 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit), NAA (naftalen asetik asit), 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid ve 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid gibi sentetik bileşikler de oksin etkisi meydana getirmektedir (Korasick vd. 2013).

Pop vd. (2011) tarafından bildirildiğine göre oksinlerin bitkilerde köklenme üzerine olan etkisi ilk kez çeliklere yapılan uygulamalar ile gösterilmiş (Hitchcock ve Zimmerman 1936) ve oksinlerin bu etkisi doku kültüründe kallustan kök oluşumunun gerçekleşmesi ile de tespit edilmiştir (Skoog ve Miller 1957). Oksinler bitkilerde yapraklar, tepe tomurcukları ve çiçekler gibi meristematik dokularda sentezlenmekte ve taşınması yukarıdan aşağıya doğru olmaktadır. Bitkilerde doğal olarak sentezlenebilen IAA (Şekil 2.1), çeliklerin köklendirilmesinde ilk kullanılan oksindir. Bununla birlikte daha sonra köklenmeyi teşvik eden bir başka oksin IBA (Şekil 2.1) keşfedilmiş ve bu oksinin köklenme üzerine daha etkili olduğu belirtilmiştir (Pop vd. 2011).



Şekil 2.1 IAA ve IBA. IBA'nın indol halkası üzerindeki 3 pozisyonundaki yan zincir, IAA'nın iki karbonlu yan zincirinin aksine dört karbona sahiptir (Frick ve Strader 2018)

2.1 Elma Genotiplerinde Mikro Çeliklerde Köklendirme Çalışmaları

Werner ve Boe (1980), M7 (East Malling 7) elma anacının *in vitro* çoğaltımı kapsamında köklendirme aşamasında 1.0, 2.0 ya da 3.0 mg/L IBA ilave edilmiş 1/3 kuvvetindeki Murashige ve Skoog (MS) besin ortamını (Murashige ve Skoog 1962) esas almışlardır. Bu çalışmada köklenme, 2.0 mg/L IBA içeren ortamda 28 gün içerisinde gerçekleşmiştir.

Lane ve McDougald (1982), M27, M9, M26, MM111 (Malling Merton 111) klon elma anaçları ve McIntosh çeşidinin doğal bir mutanı olan Macspur elma çeşidinin *in vitro* koşullarda mikro çeliklerinde köklenme oranlarının genotiplere ve uygulamalara göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, NAA'nın 0.1, 0.33, 1.0, 3.3, 10 ve 33 μM (0.02, 0.06, 0.19, 0.61, 1.86 ve 6.14 mg/L) dozlarını $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS besin ortamına ilave etmişlerdir. Üç hafta sonra mikro çeliklerde en yüksek köklenme oranı M27, M26 ve Macspur'da 1 μM (0.19 mg/L) NAA uygulamasında sırasıyla %85, %85 ve %58, , MM111'de 3.3 μM (0.61 mg/L) NAA uygulamasında %84 olarak kaydedilmiştir. M9 anacında köklenme ise aseptik koşullarda mikro çeliklerin 0.54 mM (100 mg/L) ve 1.61 mM (300 mg/L) NAA solusyonlarına 2 dakika süreyle daldırıldıktan sonra büyümeyi düzenleyici madde içermeyen $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS temel besin ortamına dikilmesiyle sırasıyla %45 ve %52.5 oranlarında sağlanmıştır.

Sriskandarajah vd. (1982) zor köklenen Jonathan ve Delicious elma çeşitlerinin mikro sürgünlerinden hazırladıkları 50 mm uzunluğundaki mikro çelikleri 10 μM (1.86 mg/L) NAA içeren besin ortamına dikmişler ya da mikro çeliklerin dip kısımlarına 750 μM (150 mg/L) IBA uygulaması yapmışlardır. Bu uygulamaların *in vitro* koşullarda adventif kök oluşumu üzerine etkilerini belirlemişlerdir. Diğer bir denemede 5 haftalık dönemler halinde mikro sürgünleri art arda alt kültüre almanın köklenme başarısı üzerine etkilerini incelenmişlerdir. Çalışmanın sonucunda yeni kültüre alınmış materyalde kökler oluşmazken alt kültür sayısının çoğalması ile birlikte mikro çeliklerde köklenmenin arttığı bildirilmiştir. Jonathan çeşidinin mikro çeliklerinde 9 alt kültürden sonra köklenme oranı %95 olurken, Delicious çeşidinde 4 alt kültürden sonra bu oran %21 ve 31 alt kültürden sonra %79 olarak kaydedilmiştir.

James (1983), M9 ve M26 elma anaçlarında *in vitro* adventif kök oluşumu kapsamında köklenme başlangıcının oksine duyarlı fazı süresince IAA'nın sürgünlere alınımı ve dağılımını incelemiştir. Çalışmada, M9 anacının mikro sürgünlerinin 1 cm'lik dip kısmında ^{14}C ile etiketlenmiş IAA oranları, sıvı ya da agar ile katılaştırılmış besin ortamlarında 10^{-3} M phloroglucinol (PG) varlığında etkilenmemiştir. Bununla birlikte sıvı ortam kullanımı, oksin uygulamasının 10 günlük periyodunda alım oranlarını azaltmıştır. Sürgünün 1 cm'lik dip kısmı ile kalan kısmı arasında etiketlenmiş IAA'nın

dağılımı PG ile etkilenmemiştir. Zor köklenen M9 ve kolay köklenen M26 sürgünlerinin etiketlenmiş IAA'lı 2.8×10^{-5} M (4.9 mg/L) IAA'ya maruz kalması, dip kısımdan alınan etiketlenmiş IAA miktarı ve köklenme performansı arasında pozitif bir korrelasyon ortaya çıkarmamıştır. Uygulamadan 9 gün sonra M9 sürgünlerinin dip kısmında absorbe edilmiş IAA miktarı, M26 sürgünlerinin 2 katına yakın ölçülürken köklenme oranı M26'nın sadece 1/3'ü kadar belirlenmiştir. Sürgünün 1 cm'lik dip kısım ile kalan kısmı arasında etiketlenmiş IAA dağılımı ölçümleri, oksin uygulamasının 6 günlük periyodu boyunca, etiketlenmiş IAA'nın %10'undan daha az bir kısmının sürgünün kalan kısmına taşındığını göstermiştir. 1×10^{-5} M (2 mg/L) ve 3×10^{-3} M (600 mg/L) aralığında köklenme ve IAA'nın doz-tepki eğrileri, M9'da kök sayısının 6 gün sonra 1×10^{-3} M (200 mg/L), M26'da ise sadece 1×10^{-4} M (20 mg/L) dozunda en uygun olduğunu göstermiştir. Bu verilerin, iki anacın köklenmesindeki farklılıkların IAA'nın sürgünlere alınma ve dağılma oranlarındaki farklılıkları değil, dışsal IAA'nın içsel metabolizmasındaki farklılıkları yansıttığı hipotezini desteklediği bildirilmiştir.

Pua ve Chong (1985), *in vitro* koşullarda Macspur elma çeşidinde sürgün ve kök gelişimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında mikro çeliklerde en yüksek köklenme oranını 15 μ M (3 mg/L) IBA ve 30 g/L sakaroz içeren 1/2 kuvvetindeki MS besin ortamı üzerinde %100 olarak belirlemişlerdir.

Zimmerman ve Fordham (1985), Delicious, Gala, Golden Delicious, McIntosh, Mutsu, Paladino Spur McIntosh, Red Spur Delicious, Redchief Delicious, Spartan, Royal Red Delicious, Vermont Spur Delicious ve York Imperial elma çeşitlerinin mikro çeliklerinde *in vitro* koşullarda kök oluşumunu 43.8 mM (15 g/L) sakaroz, 1.5 μ M (0.3 mg/L) IBA içeren sıvı ortam üzerinde ilk 3-7 gün karanlık uygulamasıyla başlatmışlardır. Karanlık koşullarda sıcaklığın 25°C'den 30°C'ye yükselmesi bazı çeşitlerde köklenme başarısını artırmıştır. MS mineral maddelerinin yarı kuvvette kullanılması ya da besin ortamına phloroglucinol (100 mg/L) ilave edilmesi köklenmeyi iyileştirmemiştir. Araştırmacılar köklenme için IBA'nın en etkili oksin olduğunu, IAA'nın ise en az etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, Mutsu ve McIntosh çeşitlerinde köklenme oranının %90'ın üzerine çıkması için 4 alt kültürün yeterli olduğunu ancak diğer çeşitlerde daha fazla alt kültürden sonra dahi köklenmede

iyileşme sağlanamadığını ve Redspur Delicious çeşidinde 38 alt kültürden sonra en yüksek köklenme oranının %74'e ulaşabildiğini bildirmişlerdir.

Welander (1985), Akerö İsveç elma çeşidinin 200 yaşındaki bir ağacının mikro çoğaltımında köklendirme denemelerini 8., 9. ve 11. alt kültürlerden alınmış mikro sürgünler ile kurmuştur. Köklendirme aşamasında, makro elementleri ½ kuvvetinde ve mikro elementleri 1/1 kuvvetindeki Lepoivre besin ortamı (Quoirin vd. 1977), vitaminleri ise Walkey'e (1972) göre olan karma bir köklendirme ortamı kullanılmıştır. Bu ortama, 0, 0.5, 1.2, 2.5, 5.0, 10 µM (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) IBA, %2 sakaroz ve %0.6 agar eklenmiştir. IBA içeren ortamlarda kültürler ilk 5 gün karanlıkta ya da 16 saat aydınlık koşullarda ve ilave 2 gün daha 16 saat aydınlık koşullarda tutulmuş ve daha sonra tüm kültürler IBA içermeyen aynı besin ortamına taşınmıştır. Gözlemler 8 ve 16 gün sonra yapılmıştır. Araştırmanın sonunda alt kültür sayısının artması ile birlikte mikro sürgünlerde köklenme yeteneğinin arttığı saptanmıştır. Çalışmada aydınlık koşullarda 16 gün sonra en yüksek köklenme oranı 11. alt kültürden alınmış sürgünlerde 2.5 µM IBA (%90<), 9. ve 8. alt kültürlerden alınmış sürgünlerde 5 µM IBA (~%60 ve %50) dozlarında belirlenmiştir. Karanlık uygulaması özellikle düşük IBA dozlarında köklenme değerlerini iyileştirmiş, köklenme oranı 11. alt kültürden alınmış sürgünlerde yine yüksek olurken, 9. ve 8. alt kültürden alınmış sürgünlerde yaklaşık %85 ve %70'e ulaşmıştır. Karanlık uygulaması yapılmış 11., 9. ve 8. kültürlerde yaklaşık kök sayısı sırasıyla 8 adet (2.5 µM IBA), 7 adet (2.5 µM IBA) ve 4 adet (5 µM IBA) olarak kaydedilmiştir.

Alvarez vd. (1989), M26 ve M9 elma klon anaçlarının mikro çeliklerini *in vitro* koşullarda köklendirmek üzere Lepoivre besin ortamına (Quoirin vd. 1977) 0.0, 0.1, 1.0, 4.0, 12.0 ya da 15.0 µM (0.0, 0.02, 0.2, 0.8, 2.4 ya da 3.0 mg/L) dozlarında IBA ve 1.3 mM PG ilave etmişlerdir. Kültürler 5 gün karanlık ortamda tutulmuş ve daha sonra mikro çelikler büyümeyi düzenleyici madde içermeyen besin ortamına taşınmıştır. Çalışmada en yüksek köklenme oranları M26 anacında %100 olarak 4 µM (0.8 mg/L) ve M9 anacında %80 olarak 12 µM (2.4 mg/L) IBA uygulamalarından elde edilmiştir. Bu araştırmada köklendirme uygulamalarından önce mikro sürgünlerin dip ve uç kısımlarındaki serbest ve bağlı IAA kapsamları ölçülmüştür. Sürgünlerin dip

kısımlarındaki serbest IAA miktarı M26 anacında, M9 anacına göre 2.5 kat daha yüksek bulunmuştur. Sürgünlerin uç kısımlarındaki IAA miktarları ise her iki anaçta da benzer olmuştur. Bununla birlikte sürgünlerin dip kısmında bağlı IAA miktarı M9 anacında önemli düzeyde daha yüksek belirlenmiştir. Araştırmacılar, M26 anacında yüksek köklenme oranlarını, sürgünlerin dip kısmında yüksek seviye ölçülmüş serbest IAA miktarı ile açıklamışlardır.

Webster ve Jones (1989), M9 elma anacı üzerinde yürüttükleri çalışmada bir aylık dönemlerle sürgünleri 21 ay, 5 ya da 9 yıl boyunca alt kültüre aldıklarında sürgünlerde köklenme yeteneğinin alt kültür sayısı arttıkça yükseldiğini ve köklenme oranlarının %90-100'e ulaştığını bildirmektedirler. Araştırmacılar sürgünleri oksin tozuna batırdıktan sonra kum içerisine doğrudan dikimini de *in vitro* köklenme kadar etkin bulmuşlardır. Çalışmada besin ortamına PG ilavesi, 11-15 aylık alt kültürden gelen sürgünlerde köklenmeyi iyileştirmiş, ancak 21 aydan sonra etkisiz olmuştur.

Standardi ve Romani (1990), Delicious ve Starkspur Red elma çeşitlerinde mikro sürgünlerin *in vitro* köklenmesi üzerine antioksidanların etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, ilk aşamada köklenmeyi uyarmak için mikro sürgünleri 1.5 μ M (0.3 mg/L) IBA, 43.4 mM (15 g/L) sakaroz ve farklı antioksidanlar ilave edilmiş olan sıvı Lepoivre besin ortamı üzerinde 1 hafta karanlık koşullarda inkübe etmişlerdir. Çalışmada bu aşamada antioksidan olarak 0.25 mM polyvinylpyrrolidone-40 (PVP); 1.61 mM glutathione reduced (GH); 6.25 mM 2-mercaptoethanol (2-Me); 83.33 mM diethyldithiocarbamic acid, sodium salt trihydrate (DIECA) kullanılmıştır. Daha sonra köklenmenin başlatılması-uzatılması aşamasında mikro sürgünler sıvı kültürlerden alınarak mineral maddeleri ½ kuvvetinde olan Lepoivre besin ortamı ile ıslatılmış olan 25 μ M PVP, 1.30 mM GH, 1.05 mM citric acid ya da 1.11 mM ascorbic acid ilave edilmiş Milcap tüplere aseptik koşullarda dikilmiştir. Antioksidanların sadece köklenmenin uyarılması aşamasında sıvı kültürlerde kullanımı ile köklenme oranları mikro sürgünlerde önemli düzeyde azalmıştır. Oysa, köklenmenin başlatılması-uzatılması aşamasında Milcap tüplerde özellikle GH ve Citric acid uygulamalarında Delicious çeşidinde köklenme sırasıyla %62.5 ve %69.3, Starkspur Red çeşidinde %76.6 ve %75.4 oranlarına ulaşmıştır. Kontrol uygulamasında ise köklenme oranları bu

çeşitlerde %49.4 ve %54.6 olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçların, köklenmeyi uyarma aşamasında peroksidaz aktivitesini azaltmak için antioksidanların kullanılmasının köklenmeyi olumsuz etkilediğini, köklenmenin başlatılması-uzatılması aşamasında peroksidaz aktivitesini azaltmak için antioksidanların uygulanmasının ise köklenmeyi teşvik ettiğini gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacıların bu bulgusu, köklenme ile peroksidaz aktivitesi arasındaki ilişkileri ortaya koymuştur. Köklenmeyi uyarma aşamasında peroksidaz aktivitesinin antioksidan kullanılarak azaltılmaması, aksine bu aktivitede hızlı bir artışın olması gerektiği, ancak ardından köklenmenin başlatılması-uzatılması aşamasında bu kez antioksidanlar ile peroksidaz aktivitesinin düşürülmesinin köklenme oranlarının artırılması bakımından önemli olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar, köklenmenin her iki aşamasında da antioksidan uygulamalarının köklerin sayısı ve uzunluğunu etkilemediğini öne sürmüşlerdir.

Sriskandarajah vd. (1990), Gala, Royal Gala ve Jonagold elma çeşitlerinin mikro çeliklerinin köklenmesi üzerine MS besin ortamına 1/1, 1/4, 1/2 kuvvetinde ilave edilen ya da ilave edilmeyen amonyum nitratın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında potasyum nitratın tam kuvvette olması koşuluyla amonyum nitrat içermeyen ortamlarda köklenme başarısını %100 civarında belirlemişlerdir. Köklenmiş çeliklerde ortalama kök sayısı ise çeşitlere göre sırasıyla 8.48, 6.72 ve 5.68 adet olarak kaydedilmiştir.

Webster ve Jones (1991), soğuğa dayanıklı B9, Ottawa 3, P2 ve P22 bodur elma anaçları arasından P22 ve Ottawa 3 anaçlarında 6-9 ay boyunca çok sayıda alt kültür yapmanın köklenme oranlarını artırdığını (%85-100) belirlemişlerdir. Bununla birlikte mikro çoğaltımın daha güç olduğu B9 ve P2 anaçlarından P2'de 38 ay boyunca alt kültür yapılmasına rağmen köklenme düşük bulunmuştur. Ancak, besin ortamına 162 mg/L PG ilavesi ile köklenme oranı %80-90'a ulaşmıştır. B9 anacında da 39 ay boyunca alt kültüre alındığı halde köklenme zayıf olmuş (%50), 4 yıl boyunca kültüre almanın ardından PG bulunan ortamda köklenme oranı %73'e ulaşmıştır. Bu anaçta mikro sürgünleri IBA tozuna batırdıktan sonra kum içerisine doğrudan dikme yöntemiyle köklenme değeri %96 olarak kaydedilmiştir.

Baraldi vd. (1991), Golden Delicious elma çeşidinde mineral maddeleri ½ kuvvetinde olan MS temel besin ortamına IBA varlığında (0.06 mg/L ve 0.3 mg/L) veya yokluğunda 0, 50, 250 ve 500 mg/L dozlarında ilave ettikleri potasyum humatın köklenme başarısı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Oksin benzeri etkiye sahip olan potasyum humatın 50 mg/L dozunun, 0.3 mg/L IBA ile kombinasyonunun köklenme ve köklenmiş bitkilerin dış koşullara alıştırılmasında başarılı olduğu bildirilmiştir. Bu kombinasyonda köklenme oranı %87, ortalama kök sayısı 4.7 adet, ortalama kök uzunluğu 26 mm ve toplam kök uzunluğu ile ifade edilen kök sistemi 118 mm olarak belirtilmiştir.

Moncousin vd. (1992), Jork 9 elma anacında sürgün çoğaltımı ve mikro çeliklerin köklenmesi üzerine besin ortamına ilave edilen karbonhidrat tipinin etkisini inceledikleri çalışmalarında sürgün çoğaltma ortamında farklı dozlarda sakaroz, sorbitol, fruktoz, glikoz, fruktoz+glikoz ve hidrolize sakarozun oluşturduğu 12 uygulamayı esas almışlardır. Köklendirme aşamasında mikro çelikler, alındıkları çoğaltma ortamının karbonhidrat uygulaması ile aynı (1), 0.088 M sakaroz (30 g/L) (2) veya 0.176 M glikoz (30 g/L) (3) içeren besin ortamlarına dikilmiştir. Dikimden önce mikro çeliklerin dip kısımları agar ile katılaştırılmış 2 mM IAA (350 mg/L) solüsyonuna 2 saat süreyle daldırılmıştır. Dikimden sonra kültürler 6 gün karanlık koşullarda tutulmuştur. En iyi köklenme sonuçları, %83 köklenme oranı ve 4.3 adet kök sayısı ile sürgün çoğaltma ortamında 30 g sakaroz (0.088 M) ve köklendirme ortamında 30 g glikozun (0.088 M) kullanılması ile elde edilmiştir. Bununla birlikte bu bulgular, istatistiksel olarak hem sürgün çoğaltma ve hem de köklendirme aşamalarında sorbitol uygulamalarından (0.176 M) farklı olmamıştır. Bu uygulama ile köklenme oranı %79 ve kök sayısı 3.86 olarak kaydedilmiştir.

Orlikowska (1992), P60 ve P2 bodur elma anaçlarının *in vitro* köklenmesi üzerine Woody Plant Medium (WPM), ½ WPM, MS, ½ MS temel besin ortamlarının, 20 g/L ve 30 g/L sakaroz düzeylerinin, 6 g/L Difco Bacto ve Oxoid No. 1, 3-10 g/L Japanese commercial fibre ve Japanese commercial powder agarlarının ve WPM ortamında pH 4-6 düzeylerinin etkilerini araştırmıştır. Denemelerde köklendirme ortamlarına 1 mg/L IBA, anaçlara göre sırasıyla 40 g/L veya 80 g/L PG ilave edilmiş ve kültürler ilk 5 gün

karanlıkta tutulmuştur. Çalışmanın sonunda araştırmacı 30 g/L sakaroz ve 4 g/L Japanese commercial powder agar içeren pH düzeyi 5.0'a ayarlanmış WPM temel besin ortamının köklenmeyi olumlu etkilediğini bildirmiştir. Çalışmada P60 elma anacında en yüksek köklenme oranları aynı istatistik grupta yer alan WPM+30 g/L sakaroz (%90), WPM+20 g/L sakaroz (%82.5) ve 1/2MS+30 g/L sakaroz (%77.5) uygulamalarında elde edilmiştir.

Noiton vd. (1992), Jonathan elma mikro çeliklerinde içsel IAA ve ABA (absizik asit) seviyeleri ve köklenme yeteneği üzerine *in vitro* alt kültür sayısının etkisini araştırdıkları çalışmalarında 26 alt kültür yapmışlardır. Araştırmacılar *in vitro* köklendirme denemelerinde 15 g/L sakaroz ve 8 g/L agar ilave ettikleri ½ kuvvetinde MS temel besin ortamını kullanmışlardır. Mikro çeliklerde köklenme, 10 µM (2 g/L) IBA katılmış besin ortamında 48 saat inkübasyonun ardından oksinsiz ortama transfer ile sağlanmıştır. Çalışmada alt kültür sayısının artışı ile birlikte köklenme oranlarının arttığı, sürgünlerde zor köklenme durumundan kolay köklenmeye geçişin 4. alt kültürden sonra gerçekleştiği bildirilmiştir. İlk 1, 2, 3 ve 4. alt kültürlerde köklenme oranları sırasıyla %0, %32, %62, %72, mikro çelik başına kök sayısı 1.6, 2.2, 4.7 adet, 9. ve 26. alt kültürlerde köklenme oranı %100, kök sayısı da 8.5 ve 10.6 adet olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, serada gelişen ana bitkiler ve bu bitkilerden oluşturulmuş *in vitro* kültürlerdeki sürgünlerin dokularındaki içsel IAA ve ABA seviyeleri karşılaştırılmış, seradaki bitkilerin IAA ve ABA miktarlarının *in vitro* sürgünlerden daha fazla olduğu, ancak 4. alt kültürden sonra *in vitro* sürgünlerde IAA seviyesi değişmezken, ABA seviyesinin azaldığı belirlenmiştir. Başlangıçta, kuru ağırlık cinsinden 1328.6 ng/g olan ABA miktarı 4. alt kültürde 186.7 ng/g, 26. alt kültürde 94.2 ng/g; başlangıçta 0.2 olan IAA/ABA oranı ise 4. alt kültürde 0.6 ve 26. alt kültürde 0.7 olarak kaydedilmiştir.

Harbage vd. (1993) çalışmalarında Gala elma çeşidinde adventif kök oluşumunun anatomisini incelemişlerdir. Mikro çelikler kök uyarımı için su, 1.5 µM (0.3 mg/L) IBA, 44 mM (15 g/L) sakaroz ya da 1.5 µM IBA + 44 mM sakaroz sıvı ortamlarında 4 ya da 8 gün süreyle tutulmuştur. Bu ortamlarda 4 gün sonra sırasıyla 0, 0.2, 2.2 ve 11.9 adet/mikro çelik meristemoid belirlenmiştir. Araştırmacılar, Gala mikro çeliklerinde kök primordiumlarının floem parankimasından meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Stimart ve Harbage (1993), Gala elma çeşidinde *in vitro* koşullarda köklendirdikleri mikro çeliklerde adventif kök sayısının, ileri aşamalarda dış koşullarda mikro çeliklerde kök ve sürgün gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada ilk olarak mikro çeliklerin 4 mm'lik alt kısımları kök uyarımı için 10 mM 2-[-morpholino] ethanesulfonic acid (MES) içerisinde 0, 0.15, 1.5, 15 ve 150 µM (0, 0.03, 0.3, 3, 30 mg/L) IBA ve 43.8 mM (15 g/L) sakarozun birlikte bulunduğu ve pH düzeyleri 5.5, 6.3 ve 7.0 olarak ayarlanmış sıvı kültürler yerleştirilmiş ve bu kültürler 4 gün süreyle 30°C'de karanlıkta tutulmuştur. Daha sonra mikro çelikler kök gelişimi için 21.9 mM (7.5 g/L) sakaroz ilave edilmiş mineral maddeleri ½ kuvvetindeki sıvı MS ortamına transfer edilmiş ve bu ortam üzerinde 14 gün süreyle 23°C'de 16 saat aydınlık koşullarda geliştirilmiştir. Mikro çeliklerde 18 gün sonra adventif kök sayıları 1.5 µM (0.3 mg/L), 15 µM (3 mg/L) ve 150 µM (30 mg/L) IBA dozlarında sırasıyla 12.4, 19.6 ve 15.8 adet/mikro çelik ile diğer dozlardan daha yüksek bulunmuştur. Kök sayısı üzerine pH'nın belirgin bir etkisi olmamıştır. Dış koşullarda 149 gün sonra kök sayısı ise başlangıçta 0 ve 0.15 µM IBA uygulanmış mikro çeliklerde benzer kalırken, 1.5, 15 ve 150 µM dozlarında %45, %141 ve %159 oranlarında artmıştır. Canlılık oranları 149 gün sonra %96.3 ile en yüksek 1.5 µM IBA uygulamasından gelen mikro çeliklerde belirlenmiştir. Yüksek canlılık oranları ve kök sayısından dolayı araştırmacılar kök uyarımı aşamasında 1.5 µM (0.3 mg/L) IBA uygulamasını önermişlerdir.

Karhu ve Zimmerman (1993), Golden Delicious, Triple Red Delicious ve Oregon Spur Delicious elma çeşitlerinin mikro çeliklerinde kök uyarımı için başlangıç aşamasında karanlık ve kumarin uygulamalarının köklenme üzerine etkisini araştırmışlardır. Onaltı saat ışık periyodu ile karşılaştırıldığında 7 günlük karanlık uygulamasıyla köklenme oranı bu çeşitlerde sırasıyla %40, %15 ve %36'dan %66, %54 ve %64'e yükselmiştir. Bir monofenol olan kumarin ise 1.5 µM (0.3 mg/L) IBA ile birlikte uygulandığında özellikle Gala elma çeşidinin mikro çeliklerinde köklenme oranlarını %100 seviyesine çıkarmıştır. Bu çeşitte kumarin ve IBA yokluğunda köklenme oranı %80, sadece IBA varlığında %60 olarak saptanmıştır.

Yepes ve Aldwinckle (1994), 13 elma çeşidinin mikro çoğaltımında köklenme aşamasında MS temel besin ortamının mikro ve makro besin elementlerini ½ kuvvetinde kullanmışlardır. Bu ortama 0-1 mg/L arasında değişen dozlarda IBA ya da NAA, %15 sakaroz ilave etmişlerdir. Köklenme denemelerini sıvı ya da 7 g/L agar ile katılaştırılmış ortam üzerinde yapmışlardır. Oksin içeren sıvı ortamda kültürleri 1 hafta süreyle çalkalamışlar ve daha sonra oksin içermeyen besin ortamına taşımışlardır. Karanlık uygulamasının yapıldığı çalışmada en yüksek köklenme değerleri 0.1-1 mg/L IBA bulunan ortamlarda genotiplere göre %71-%100 arasında sağlanmıştır. Araştırmada düşük IBA dozlarında sıvı kültürlerde daha yüksek köklenme değerlerinin elde edildiği bildirilmiştir.

Pawlicki ve Welander (1995), karbonhidrat kaynağı, IBA konsantrasyonu ve uygulama süresinin Jork 9 elma anacının mikro sürgünlerinden 1 mm kalınlıkta hazırlanan disklerin köklenmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada temel besin ortamı olarak ½ MS makro elementleri, Lepoivre mikro elementleri, Walkey vitaminleri, 100 mg/L proline içeren ortam kullanılmıştır. Kök uyarımı için başlangıç aşamasında diskler 24.6 µM (5 mg/L) IBA içeren temel besin ortamı üzerinde 24 saat karanlık koşullarda inkübe edilmiş ve daha sonra IBA içermeyen temel besin ortamına aktararak 16 saat aydınlık koşullarda tutulmuştur. İlk olarak köklenme ortamına farklı dozlarda katılan sakaroz, glukoz, fruktoz, sorbitol ve bunların bazı kombinasyonlarının köklenme ve kallus gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Sadece sakaroz uygulamalarında (29-59 mM) (10-20 g/L) köklenme yanında kallus gelişimi de uyarılmıştır. Sorbitol optimum köklenme için yüksek dozlara ihtiyaç göstermiştir. Bu karbonhidrat kaynağı ile kallus gelişimi azalmıştır. Glukoz (117 mM)+sorbitol (59 mM) ve sakaroz (59 mM)+manitol (29 mM) kombinasyonlarında disklerde %100 köklenme ve disk başına 6 adedin üzerinde kök saptanmıştır. Bununla birlikte optimum köklenme için ihtiyaç duyulan süre sakaroz+manitol uygulamasında en düşük bulunmuştur. İyi sonuç veren 59 mM (20 g/L) sakaroz+29 mM (5.3 g/L) manitol kombinasyonu esas alınarak çalışmada farklı dozlarda IBA içeren kök başlangıç ortamı üzerinde karanlık koşullarda inkübasyon sürelerinin köklenme üzerine etkileri de incelenmiştir. Bu denemelerin sonucunda sakaroz+manitol kombinasyonunda 540 dakika (9 saat) süreyle 49.2 µM (10 mg/L) IBA

uygulamasında %100 köklenme oranı, disk başına 6.55 adet kök sayısı ve %4.40 ile en düşük kallus oluşum oranı kaydedilmiştir.

Auderset vd. (1996), tiol bileşikler glutathione ve dithiothreitolün tek ya da oksin şoku ile birlikte köklenme üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında oksin şokunu aseptik koşullarda Jork elma anacının mikro çeliklerinin dip kısımlarını agar ile katılaştırılmış 1 mM IAA içerisine 1 saat süreyle daldırarak uygulamışlardır. Daha sonra mikro çelikler tiol bileşiklerinin ilave edildiği MS besin ortamına dikilmiş ve kültürler ilk 6 gün karanlıkta tutulmuştur. Ondört gün sonra yapılan gözlemlerde özellikle oksin şokundan sonra 0.075 mM redükte glutathione içeren ortamlarda %87 köklenme başarısı elde edilmiştir. Kontrol uygulamasında bu oran %55 olarak bildirilmiştir. Oksin şoku ile birlikte 0.025 mM dithiothreitol uygulamasının da köklenmeyi artırdığı belirtilmiştir.

Harbage ve Stimart (1996), bazı elma çeşitlerinde (Gala, Golden Delicious, Jonathan, McIntosh, Vermont Spur Delicious ve Triple Red Delicious) pH tamponlama ve IBA'nın mikro çeliklerde adventif kök oluşumuna etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada kök başlangıç ve kök geliştirme ortamları kullanılmıştır. Kök başlangıç ortamında 43.8 mM (15 g/L) sakaroz ve 1.5 μ M (0.3 mg/L) IBA bulunmaktadır. Bu aşamada tamponlama yapılmamış olan besin ortamının pH değerleri 5.5-5.6 olarak ayarlanmıştır. Kültürler 30°C'de karanlık koşullarda 4 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra mikro çelikler kök geliştirme ortamına taşınmıştır. Bu ortam, 21.9 mM (7.5 g/L) sakaroz ilave edilmiş, Fe-EDTA içermeyen $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS ortamıdır. Denemelerde, mikro çeliklerin 4 mm'lik dip kısımlarının batırıldığı sıvı formdaki 3'er ml başlangıç ve gelişme ortamlarının bulunduğu küçük tüpler bir plastik desteğe yerleştirilmiştir. Çalışmada kök başlangıç ortamının pH'sı 10 mM MES ile tamponlanmış ya da tamponlanmamıştır. Kök başlangıç ortamında IBA'nın 0, 0.15, 1.5, 15.0, 150.0 μ M (0, 0.03, 0.3, 3.0, 30.0 mg/L) dozları kullanılmıştır. Kök sayımları, kök geliştirme ortamına transferden 14 gün sonra yapılmıştır. Tamponlama yapılmamış kök başlangıç ortamının pH değeri 2 günde 5.6'dan 7'ye yükselmiştir. MES ile tamponlanmış ortamda ise pH değişimleri önlenmiş ve tamponlama yapılmamış durum (7.6 adet kök sayısı) ya da pH 7 (7.1 adet kök sayısı) ile

karşılaştırıldığında, pH 5.5 düzeyinde kök sayısı (14.2 adet) 2 kat artmıştır. Kök sayısının artırılması için pH düzeyinin azalması ile birlikte IBA'nın daha düşük dozlarına gerek olmuştur. Tamponlanmış kök başlangıç ortamında IBA'nın kolorimetrik ölçümü, daha yüksek IBA kaybının ve daha fazla kök sayısının tüm çeşitlerde daha düşük pH seviyeleri ile ilişkilendirildiğini göstermiştir. Buna göre kök başlangıç ortamından IBA kaybı ortamın pH'sına bağlıdır ve bu kök sayısını etkilemektedir. Kolay ve zor köklenen çeşitler arasındaki kök sayısı farklılıkları, kök başlangıç ortamında IBA kaybının miktarı ile bağıntılı değildir. Kök sayısı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar sadece kök başlangıç ortamından IBA kaybı ile açıklanamamıştır.

Druart (1997), zor köklenen bir genotip olan Compact Spartan elma çeşidinde *in vitro* köklenmenin optimizasyonu için farklı denemeler yapmıştır. İlk olarak optimum oksin uygulama süresini belirlemek üzere mikro sürgünleri 3, 5, 7, 10, 15 ve 30 gün süreyle ilk 5 günü karanlık ve daha sonra 16 saat aydınlık koşullarda IAA (0.1 mg/L), IBA (1 mg/L) ve 20 g/L sakaroz içeren besin ortamı üzerinde inkübe etmiştir. Oksin uygulamalarından sonra kök gelişimi için mikro sürgünleri oksin içermeyen %2 sakaroz ve 5 g/L agar içeren katılaştırılmış temel besin ortamı ya da distile su ile ıslatılmış vermikulit (100 cm³ distile su/250 cm³ vermikulit) üzerine taşımıştır. Temel besin ortamı olarak makro elementleri ½ kuvvetinde ve mikro elementleri tam kuvvette olan Lepoive besin ortamı kullanılmıştır. Bu besin ortamına thiamine-HCL (0.4 mg/L) ve myo inositol (100 mg/L) ilave edilmiştir. Bu denemenin sonunda köklenme başlangıcı için karanlık koşullarda 5 gün oksin uygulamasının yeterli olacağı belirlenmiştir. Kök gelişimi için temel besin ortamı yerine vermikulit kullanılmış kültürlerde %100 köklenme sağlanmıştır. Kök gelişmesinin vermikulit üzerinde denendiği koşullarda 30 gün oksin uygulamasında dahi %90-100 köklenme meydana gelmiştir. Sakarozun, vermikulit için gerekli olmadığı, temel besin ortamı için ise gerekli olduğu bildirilmiştir. Araştırmacı, diğer bir denemede makro elementlerin köklenme üzerine etkilerini belirlemiştir. Mikro elementlerin köklenme için gerekli olduğu bildirilen çalışmada, kök gelişiminin amonyum nitrat ile engellendiği, kalsiyum nitratın ise köklenmeyi teşvik ettiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, başlangıçta uzun oksin uygulama süresinin, kök

gelişimi için amonyum nitrat varlığının ve yetersiz havalanma koşullarının köklenmeyi engelleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

De Klerk vd. (1997), Jork 9 elma anacının *in vitro* köklenmesi üzerine IAA, IBA ve NAA'nın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında NAA düşük (8 adet kök/mikro çelik), IAA ve IBA yüksek (15 adet kök/mikro çelik) köklenme sağlamıştır. En yüksek kök sayısı IAA'de 10-100 μM (1.9-18.6 mg/L), IBA'de ise 10 μM (2.0 mg/L) dozlarında belirlenmiştir. Araştırmacılar, NAA ve IBA kök ve sürgün gelişimini engellediği için IAA'in Jork 9 elma anacının *in vitro* köklenmesi için daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Isutsa vd. (1998), G65, G30 ve G11 elma anaçlarında ilk olarak mikro sürgünleri, uç kısmı yukarı yönde düzgün olarak ya da ters çevirerek aşağı yönde dikmenin ve 4 hafta süreyle farklı IBA dozlarının köklenme üzerine etkilerini incelemişlerdir. Köklenme oranları G65 anacında 2 mg/L IBA içeren ortamlarda ters çevrilerek dikilmiş sürgünlerde en yüksek %30; G30 anacında 3 mg/L IBA içeren ortamlarda düzgün olarak dikilmiş sürgünlerde %100; G11 anacında 1 ya da 2 mg/L IBA içeren ortamlarda ters çevrilerek dikilmiş sürgünlerde %100 olarak kaydedilmiştir. İkinci denemede mikro sürgünler *ex vitro* koşullarda fog sistem kullanılarak 450 ya da 1350 $\mu\text{mol/mol}$ karbondioksit seviyesinde ve 3 ışık yoğunluğunda (30, 50 or 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) köklendirilmiş ve dış koşullara alıştırılmıştır. *Ex vitro* koşullarda anaçların tamamı başarıyla köklendirilmiş ancak yaşama oranları değişmiştir. Orta ve düşük ışık yoğunlukları ile karşılaştırıldığında yüksek ışık koşullarında bitkicikler en yüksek kuru madde, yaprak alanı ve gelişme oranlarına sahip olmuştur. Karbondioksitin etkisi süreklilik göstermemiştir. Yüksek ışık yoğunluğunda fog sistemin bulunduğu tünel ve seralarda köklenme başarıyla gerçekleştirilmiş ve bitkiciklerin yaşama oranı %100 olarak kaydedilmiştir. Üçüncü denemede yeni köklendirilmiş elma mikro sürgünlerinde sıkça karşılaşılan köklenme sonrası dinlenme üzerine 3.3°C'de 4 hafta soğuklatma ya da GA₃ (gibberellik asit) püskürtmenin etkileri araştırılmıştır. Soğuklatılmış bitkiler kontrol veya GA₃ püskürtülmüş olanlara göre daha yüksek kuru maddeye sahip olmuştur. GA₃'ün etkisi kısa sürmüştür. *Ex vitro* denemelerin sonucunda anaçların mikro çoğaltımı için gereken zamanın 6 aya kadar azaltılabileceği bildirilmiştir.

Dobranszki vd. (2000), Husveti rozmarin Macar elma çeşidinde mikro sürgünleri köklendirme öncesinde ön uygulama olarak farklı sitokininlerin bulunduğu besin ortamlarında 4 hafta boyunca yatay ya da dikey pozisyonda kültüre almışlardır. Dört haftalık yatay pozisyon ön uygulamaları P1 (1.0 mg/L BA (benzil adenin) + 1.5 mg/L KIN (kinetin)) ve P4 (1.0 mg/L TOP (meta-topolin)); dikey pozisyon ön uygulamaları P2 (1.0 mg/L BA + 1.5 mg/L KIN), P3 (1.0 mg/L BA + 1.5 mg/L KIN ve 3 hafta dikey + 1.0 mg/L TOP ve 1 hafta dikey), P5 (1.0 mg/L TOP)'dir. Ön uygulamalardan gelen sürgünlerden hazırlanan mikro çelikler 1.0 mg/L IBA, 20 g/L sakaroz, 7 g/L agar-agar ilave edilmiş mineral maddeleri ½ kuvvetindeki MS kök başlangıç ortamına dikilmiştir. Bu ortam üzerinde karanlık koşullarda 1 hafta tutulan mikro çelikler daha sonra 30 g/L sakaroz, 2 ml/L Wuxal ve 7 g/L agar-agar katılan ½ MS kök uzama ortamına transfer edilerek 3 hafta 16 saat aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. Araştırmanın sonucunda yatay sürgün pozisyonunun kullanıldığı P1 ve P4 ön uygulamalarından gelen mikro çeliklerde köklenme oranı %88.6, dikey pozisyonun esas alındığı P2, P3 ve P5 ön uygulamalarından gelen mikro sürgünlerde sırasıyla %0, %2 ve %6'dır. P1 ve P4 uygulamalarında kök sayısı (6.4 ve 4.5 adet) ve uzunluğu (15.3 mm ve 22.0 mm) değerleri dikey pozisyonlu diğer uygulamalardan (0-1 adet ve 0-8 mm) daha yüksek bulunmuştur. Ön uygulamada BA kullanılmış ortamlardan hazırlanan mikro çeliklerde kök sayısı, TOP kullanılmış ortamlardan gelen mikro çeliklerde kök uzunluğu değerleri daha yüksek belirlenmiştir. P1 ön uygulamasından gelen bitkiciklerin dış koşullarda yaşama oranı yüksek olmuştur.

Sharma vd. (2000), MM106 elma anacının *in vitro* köklendirilmesi kapsamında mikro sürgünleri 30, 50, 70 ve 100 mg/L IBA içerisine 1-3 saat süreyle daldırmışlar ve daha sonra oksin bulunmayan %0.1 aktif kömür ilave edilmiş agar ile katılaştırılmış MS besin ortamına transfer etmişlerdir. En yüksek köklenme oranı (%80.25), 30 mg/L IBA'ya 3 saat süreyle daldırma uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamada sürgün başına ortalama kök sayısı 7 adet, ortalama kök uzunluğu 3.95 cm olarak kaydedilmiştir. Köklenme ortamına PG ilavesi köklenme oranını artırmamış, ancak çoğaltma ortamında bu maddeyi içeren kültürlerden gelen mikro sürgünlerde köklenme oranı yüksek oranlarda belirlenmiştir.

Litwinczuk (2000), M26, MM106 ve P14 yarı kuvvetli elma anaçlarının mikro çoğaltımında çift fazlı ortamın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında bu ortam üzerinde çoğaltılan sürgünlerde köklenme oranlarını 1.0 mg/L IBA ilave edilmiş ortamlarda P14 ve MM106 anaçlarında sırasıyla %98.5 ve %89.9, M26 anacında ise sadece %66.4 olarak belirlemişlerdir.

Magyar-Tabori vd. (2002), JTE-H, M26 ve MM106 elma anaçlarının *in vitro* sürgünlerinin köklenmesi üzerine 1.0, 2.0, 3.0 mg/L IBA dozlarının ve aktif kömürün etkilerini araştırdıkları çalışmalarında temel besin ortamı olarak mineral maddeleri ½ kuvvetinde olan MS ortamını esas almışlardır. Kök başlangıç ortamına IBA dozları ve %2 sakaroz ilave edilmiş ve sürgünler bu ortam üzerinde 1 hafta karanlıkta tutulmuştur. Daha sonra sürgünler IBA içermeyen, %3 sakaroz ve 2.5 g/L aktif kömür ilave edilmiş ya da aktif kömür ilave edilmemiş mineral maddeleri ½ kuvvetinde olan MS kök geliştirme ortamına transfer edilmiştir. Çalışmada başlangıç ortamına ilave edilmiş tüm IBA dozlarında ve kök geliştirme aşamasında aktif kömür içeren ve içermeyen ortamlar üzerinde JTE-H anacında yüksek köklenme oranları (%91.4-100) elde edilirken yine uygulamalar arasında önemli bir farklılık olmadan MM106 anacında bu koşullarda köklenme oranı %33-46 arasında belirlenmiştir. Oysa M26 anacında en yüksek köklenme oranı 1.0 mg/L IBA ve aktif kömürsüz uygulamada %94.3 oranında belirlenmiştir. Bu anaçta aktif kömür uygulandığında köklenme oranı en yüksek %65.7 ile yine 1.0 mg/L IBA dozunda saptanmıştır. Çalışmada aktif kömür uygulamasında kök uzunluğu artmış ancak en yüksek kök sayıları aktif kömürsüz ortamda belirlenmiştir. JTE-H anacında kök uzunluğu 1.0 ve 2.0 mg/L IBA uygulanmış aktif kömür ilave edilmiş ortamlarda 28-30 mm, M26 anacında 17-13 mm, kök sayısı ise aktif kömür içermeyen ortamlarda 1.0 ve 2.0 mg/L IBA dozlarında JTE-H anacında sırasıyla 11.5 ve 12.3 adet, M26 anacında 4.5 ve 6.0 adet olarak kaydedilmiştir. Bu değerler, aktif kömürlü ortamlarda anaçlara ve IBA dozlarına göre sırasıyla 6.1-8.3 adet ve 2.0-4.9 adettir.

Nagy ve Sule (2006), *Agrobacterium* ile gen transferi yapılmış elma sürgünlerinde köklenmenin oldukça zor olduğunu öne sürerek Pinova elma çeşidinin transgenik sürgünlerinde *in vitro* köklenme için farklı ortamları denemişlerdir. Mikro çelikler önce

0.0, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L IBA ilave edilmiş, ½ kuvvetindeki MS mikro ve makro elementleri ile Gamborg vitaminlerinden oluşan 20 g/L sakaroz katılmış 5 ml sıvı ya da agar ile katılaştırılmış (7 g/L) besin ortamında 4 gün süreyle karanlık koşullarda ön uygulamaya tabi tutulmuştur. Daha sonra sürgünler agar ile katılaştırılmış veya vermikulit ile desteklenmiş büyümeyi düzenleyici madde içermeyen ½ kuvvetindeki MS mikro ve makro elementleri ile Gamborg vitaminlerinden oluşan 20 g/L sakaroz katılmış besin ortamına dikilmiştir. Çalışmada en yüksek köklenme etkinliği, herhangi bir büyümeyi düzenleyici madde içermeyen sıvı ortam üzerinde ön uygulamaya tabi tutulmuş sürgünlerde belirlenmiştir. Ön uygulamada 0.0 mg/L IBA dozu uygulanmış sürgünlerde vermikulit ortamda köklenme oranı %73, agar ile katılaştırılmış ortamda %46.7 olarak kaydedilmiştir. Ön uygulamada 1.0 mg/L IBA uygulanmış sürgünlerde vermikulit ortamda köklenme başarısı %53.3'e düşerken, agar ile katılaştırılmış ortamda %67'ye yükselmiştir. Araştırmacılar elmada transgenik sürgünler için büyümeyi düzenleyici maddesiz ön uygulamayı takiben vermikulit ortamda köklendirmeyi önermişlerdir.

Sharma vd. (2007), M7 ve MM106 elma anaçlarında *in vitro* kök uyarımı ve gelişimi amacıyla beş farklı deneme kurmuşlardır. 1. denemede, %0.02 aktif kömür ile birlikte ya da aktif kömür olmadan kök başlangıç ortamına 1.0-3.5 mg/L arasındaki dozlarda IBA ilave etmişlerdir. İki hafta sonra aktif kömürsüz ortamdaki mikro sürgünleri IBA bulunmayan ortama transfer etmişlerdir. 2. denemede kök uyarımı için mikro sürgünler ilk olarak yüksek konsantrasyonlarda IBA çözeltisine (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000 mg/L) farklı periyotlarda (10, 20, 30 dakika ya da 1, 2, 3, 4, 5 saat) daldırılmış ve daha sonra oksinsiz ortama aktarılmıştır. 3. denemede mikro sürgünler 0.5 mg/L IBA içeren sıvı kök başlangıç ortamında 6 ila 13 gün boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu sürgünler daha sonra IBA içermeyen katı besin ortamına aktarılmış ve kültürler ışık altında tutulmuştur. 4. denemede birinci, ikinci ve üçüncü denemeler sürekli ışık altında gerçekleştirilmiştir. 5. denemede, üçüncü ve beşinci denemelerde kök uyarımından sonra sürgünler tuz konsantrasyonu azaltılmış (1/3, 1/4) ve farklı sakaroz dozlarının (10 ve 15 g/L) kullanıldığı kök gelişme ortamına aktarılmıştır. 1. denemenin sonucunda maksimum köklenme oranı aktif karbon katılmamış ortamlarda IBA'nın M7'de 2.0 mg/L (%86.63) ve 2.5 mg/L (%89.63),

MM106'da 1.0 mg/L (%62.0) uygulamalarında sağlanmıştır. Köklendirme ortamındaki aktif kömürünün varlığı köklenme kalitesini iyileştirmiş, ancak her iki anaçta da köklenme oranını düşürmüştür. Yüksek dozlarda IBA solusyonlarına daldırma denemesinde aktif kömür varlığında en yüksek köklenme oranları M7 anacında 70 mg/L, 2 saat uygulamasında %76, 80 mg/L, 2 saat uygulamasında %80 ve 90 mg/L, 1 saat uygulamasında %86.0 olarak belirlenmiştir. Çalışmada kök uyarımı için IBA içeren sıvı ortamda birkaç gün karanlıkta bekletme ve kök uzaması için IBA içermeyen ortamlarda ışıktaki inkübasyon en etkili sonuçları vermiştir. Bununla birlikte sürekli ışık uygulamasında köklenmenin azaldığı görülmüştür. Kök uzatma ortamında MS tuzlarının ve sakarozun azaltılması köklenmede düşüşe neden olmuştur.

De Klerk vd. (2008), Jork elma anacında mikro sürgünlerin gövdesinden 1 mm kalınlıkta hazırladıkları disklerden adventif kök oluşumu üzerine ortam pH'sının ve pH tamponlayıcı MES'in etkilerini araştırmışlardır. Denemeler, 10 μ M (2 mg/L) etiketli IAA [$1-^{14}$ C] içeren 20 ml katılaştırılmış köklenme ortamının bulunduğu 2 cm yüksekliğindeki 9 cm çapındaki petrilere yapılmış olup otoklavdan önce besin ortamlarının pH'sı 4.5-8.0 arasında ayarlanmıştır. Otoklavdan sonra ve 3 haftalık kültür sonrasında ortamların pH'sı 5.2-6.0, 10 mM MES ilave edilmiş ortamlarda stabil olarak 5.0-6.5 aralığında ölçülmüştür. Elma disklerinde en yüksek köklenme, otoklavdan sonra pH değeri ~5.3 olan MES bulunan veya bulunmayan ortamlarda elde edilmiştir. Bu sonucun oksin alımı ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. MES, meristemoidlerin oluşmaya başladığı başlangıç aşamasında adventif kök oluşumunu %30 oranında azaltmıştır. Bununla birlikte meristemoidlerin köklere dönüştüğü aşamada köklenmede %30 oranında artış meydana getirmiştir. MES'in engelleyici ve uyarıcı etkisi tüm pH değerlerinde gözlemlendiğinden dolayı bu etkinin MES'in tamponlama etkisi ile ilgili olmadığı bildirilmiştir.

Ciccotti vd. (2008), elma çoklu sürgün fitoplazmasına dayanıklı apomiktik *Malus sieboldii* elma genotiplerinin oldukça zor olan mikro çoğaltımı kapsamında köklenme için farklı uygulamalar denemişlerdir. Bu denemelerde mikro sürgünler 10 μ M (2 mg/L) IBA ya da IAA, 58.6 mM (20 g/L) sakaroz, %0.6 agar katılmış pH'sı 5.6 olan ½ kuvvetindeki MS kök uyarı ortamı üzerinde karanlıkta 7 gün veya 25 μ M (5 mg/L)

IBA ya da IAA, 88 mM (30 g/L) sakaroz ilave edilmiş pH'sı 6.59-6.60 olan sıvı ya da agarla (%0.6) katılaştırılmış su solusyonunda 4 gün süreyle karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda mikro sürgünler oksin içermeyen 29.3 mM (10 mg/L) sakaroz ve %0.5 agar bulunan vitaminsiz ½ kuvvetindeki MS ortama taşınmış ve aydınlık koşullarda 25 gün tutulmuştur. En iyi köklenme değerleri genel olarak kök uyarımı için 25 µM IBA'nın kullanıldığı uygulamadan elde edilmiştir. Bu uygulamada en yüksek köklenme oranları genotiplere göre %34-100, mikro sürgün başına kök sayısı 2.8-11.4 adet ve kök uzunluğu 1.4-7.0 cm arasında belirlenmiştir.

Naija vd. (2009) çalışmalarında MM106 elma anacında mikro sürgünlerin köklenmesi üzerine poliaminlerin etkilerini araştırmışlardır. Poliaminlerin ve poliamin metabolizmasının inhibitörlerinin kullanılmadığı, 1.0 mg/L IBA ilave edilmiş ½ kuvvetindeki MS ortamı üzerinde 5 gün karanlık koşullarda tutulduktan sonra 25 gün süreyle oksin içermeyen besin ortamı üzerinde 16 saat aydınlık koşullarda inkübe edilen mikro sürgünlerde köklenme oranı %96.7 olarak kaydedilen denemede, IBA bulunmayan ortamlarda köklenme meydana gelmemiştir. IBA'sız ortama 10 µM putrescine, spermidine, cyclohexylamine veya aminoguanidine ilavesi ise köklenmeyi uyarmış (%26.7-%53.3), IBA ile birlikte de yüksek köklenme oranları (%84.4-%94.4) belirlenmiştir. Bununla birlikte IBA bulunmayan α-difluoromethylornithine ilave edilmiş ortamlarda köklenmenin meydana gelmediği, IBA ile birlikte ise köklenme oranının düşük seviyelerde (%63.3) gerçekleştiği bildirilmiştir.

Dumanoglu vd. (2009), Golden Delicious elma çeşidi ve MM106 elma anacında mikro çeliklerin *in vitro* köklenmesi üzerine besin ortamına 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 ve 3.0 mg/L IBA veya 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L NAA ilave edilmesinin ya da aseptik koşullarda mikro çeliklerin 1000 ya da 4000 ppm IBA solusyonuna 15 saniye süreyle hızlı daldırma uygulamasından sonra oksinsiz ortama dikilmesinin etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada temel besin ortamı olarak makro element düzeyi ½ olan MS besin ortamı kullanılmıştır. Tüm ortamlara %2 sakaroz katılmış ve %0.6 agar ile katılaştırılmıştır. Kültürler ilk 1 hafta karanlıkta inkübe edilmiştir. Sekizinci haftanın sonunda Golden Delicious çeşidinde en yüksek köklenme oranı %50 ile 1000 ppm IBA solusyonuna hızlı daldırma uygulaması ile elde edilmiştir. MM106 anacında tüm

uygulamalarda istatistiksel bir farklılık olmadan köklenme oranları yüksek bulunmuştur (%88.9-%100). Mikro çelik başına kök sayısı, ortalama kök uzunluğu, en uzun kök uzunluğu ve köklenme düzeyleri bakımından uygulamalar arasında önemli bir farklılığın kaydedilmediği çalışmada bu değerler Golden Delicious çeşidinde sırasıyla 1.0-3.1 adet, 1.3-4.7 cm, 1.5-5.6 cm ve 0.2-2.5; MM106 anacında 2.6-9.8 adet, 1.3-3.2 cm, 2.4-5.2 cm ve 0.8-1.8 arasında belirlenmiştir.

Yaseen vd. (2009), M9 ve M26 elma anaçlarının *in vitro* köklenme potansiyeli üzerine farklı karbon kaynaklarının etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, 4 farklı karbon kaynağından (sakaroz, sorbitol, manitol ve glukoz) 5'er doz (0, 5, 15, 25, 35 ve 45 g/L) kullanılarak denemeler kurulmuştur. Çalışmada temel besin ortamı olarak MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortama, 1.0 mg/L IBA ve bir karbon kaynağı ilave edilmiş, ortamlar 6.5 g/L agar ile katılaştırılmıştır. Dikimden dört hafta sonra yapılan incelemelerde en yüksek köklenme oranı (%96.67) M26 anacında 45 g/L sorbitol uygulamasından elde edilmiştir. M9 anacında ise en yüksek köklenme %86.67 ile 35 g/L sorbitol uygulamasında belirlenmiştir. Karbon kaynakları arasında 35 g/L sorbitol ile en yüksek ortalama kök sayısı (5.0) ve kök uzunluğuna (3.84) ulaşılmıştır. Sakaroz ve glikoz, sorbitol kadar olmasa da her iki genotipte de köklenmeyi uyarmıştır. Manitol uygulamalarında ise köklenme sağlanamamıştır.

Boudabous vd. (2010), Douce de Djerba elma çeşidinin mikro çoğaltımı için *in vitro* köklendirme denemelerinde tam ya da ½ kuvvetinde MS temel besin ortamının, 3.0 mg/L dozunda IBA, NAA ve IBA+NAA oksin uygulamalarının ve aktif kömür (2 g/L) kullanımının etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar 30 günlük inkübasyon süresinin ilk 5 gününde kültürlere karanlık uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda en yüksek köklenme değerleri ½ kuvvetinde MS ortamında, 2 g/L aktif kömür varlığında, 3.0 mg/L IBA uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamada köklenme oranı %66.7, sürgün başına kök sayısı 5.9 adet ve ortalama kök uzunluğu 4.1 cm olarak belirlenmiştir. Aynı oksin ve aktif kömürün uygulandığı tam kuvvetteki MS ortamında ise bu değerler sırasıyla %40, 3.3 adet ve 2.8 cm'dir. NAA ve IBA+NAA uygulamalarında köklenme değerlerinde önemli düzeyde düşüş meydana gelmiş ve en yüksek köklenme oranları sırasıyla %15.2 ve %5 olarak kaydedilmiştir.

Kepenek ve Karoğlu (2011), Starking Delicious, Amasya elma çeşitlerinin ve M9 elma anacının *in vitro* köklendirilmesinde 0.0, 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 ppm paclobutrazol (PP 333) ve daminozide'in (Alar-85) etkilerini belirledikleri çalışmalarında %2 sakaroz, %1 aktif kömür, 0.5 ppm IAA ve belirtilen büyümeyi engelleyici maddeleri içeren ½ kuvvetinde sıvı MS besin ortamını kullanmışlardır. Kùltürler denemede farklı aşamalarda 10 gün ya da 2 hafta süreyle karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Çalışmanın sonucunda 1.0 ppm PP 333 uygulamasında köklenme oranları Starking Delicious, Amasya ve M9'da sırasıyla %59.2, %48.6 ve %32.5; 2.5 ppm Alar 85 uygulamasında ise %50.4, %41.3 ve %35.7 olarak belirlenmiştir. Köklenme oranları kontrolde genotiplere göre %47.7-56.4 (Starking Delicious), %42.6-47.5 (Amasya) ve %30.7-34.7 (M9) arasında değişmiştir. Bulgular büyümeyi engelleyici bu maddelerin köklenme oranlarında belirgin bir artışa neden olmadığını göstermiştir.

Keresa vd. (2012), karaleke hastalığına dayanıklı olduğu için Avrupa'da organik elma yetiştiriciliğinde tercih edilen Çek elma çeşidi Topaz'ın *in vitro* çoğaltımında mikro sürgünleri köklendirmede QL (Quoirin ve Lepoivre) ortamının makro elementleri, MS ortamının mikro elementleri ve vitaminlerinden oluşan, 0.1 g/L myo-inositol, %2 sakaroz, %0.8 agar ilave edilmiş temel besin ortamını kullanmışlardır. Köklendirme denemelerinde temel besin ortamına 1.0 mg/L veya 2.0 mg/L IBA ya da IAA katılmıştır. Kùltürler ilk 4 gün karanlık ve daha sonra 16 saat aydınlık koşullarda tutulmuştur. Diğer bir denemede mikro sürgünler 20 saat süreyle MS ortamının vitaminleri ve 80 mg/L IBA ya da 70 mg/L IAA üzerinde aydınlık koşullarda inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda oksin içermeyen temel besin ortamına transfer edilmiştir. Çalışmada yüksek köklenme etkinliği (%68.7), sürgün başına yüksek kök sayısı (6.6 adet) ve en iyi sürgün kalitesi 2.0 mg/L IBA uygulamasıyla elde edilmiştir.

Ghanbari (2014), Azayesh-Esfahan, Morabbaee Mashhad ve M9 elma anaçlarının mikro çoğaltımında kök oluşumu üzerine 1/1 ve ½ kuvvetindeki MS, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg/L IBA dozlarının etkisini araştırmıştır. Besin ortamlarına 30 g/L sakaroz ilave edilmiş ve %0.7 agar ile katılaştırılmıştır. Kùltürler ilk 2 gün karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Çalışmada tüm anaçlar, 1.5 mg/L IBA içeren ½ MS ortamında başarıyla

köklendirilmiştir. Azayesh-Esfahan, tüm anaçlar arasında en yüksek köklenme oranına (%48.33) sahip anaç olmuştur.

Papstein ve Sedlak (2015), Çek Cumhuriyeti'nde ıslah edilmiş olan Jarka ve Mivibe çeşitlerinin mikro çoğaltımında mikro sürgünleri köklendirmek üzere 1.0 mg/L IBA, IAA ya da NAA ilave edilmiş MS ortamını kullanmışlardır. Araştırmacılar çalışmanın sonucunda köklenme oranının %0-44 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Dumanoğlu vd. (2016), elma (*Malus spp.*) gen kaynakları bakımından önemli olan Doğu Karadeniz Bölgesi'nin sahil kuşağındaki elma genotiplerinin mikro çoğaltımı çalışmasında mikro çelikleri 3.0 mg/L IAA, 1.0 g/L PVA (polivinil alkol) ve 25 mg/L kazein hidrolizat katılmış makro element düzeyi ½ kuvvetindeki MS ortamı üzerinde ve ilk 1 hafta karanlık uygulaması ile köklendirmişlerdir. Çalışmada çeşitlere göre köklenme oranı %5.0 ile %95.9 ve ortalama kök sayısı 1.0-6.7 adet arasında değişmiştir.

Modgil ve Thakur (2017), elma klon anaçlarının (MM106, M7, MM111, M793 ve M26) *in vitro* çoğaltımında köklenmeyi iki aşamalı uygulamalar ile başarıya ulaştırmışlardır. İki aşamalı uygulamada mikro sürgünler kök uyarımı için farklı oksin ve 20 g/L sakaroz içeren ½ MS ortamına daldırılmıştır. Bu aşamada oksinler, 1) 10-50 mg/L IBA ya da NAA'ya 0.5-3 saat süreyle, 2) aynı oksinlerin 0.5-1.0 mg/L dozlarına 7-10 gün boyunca uygulanmıştır. Sürgünler daha sonra oksin içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Bazı anaçlar için tek aşamalı olarak 0.5-1.0 mg/L IBA ya da NAA uygulanmıştır. Bu durumda, köklenme ortamına 100 mg/L phloroglucinol ilavesinin ve bir hafta karanlık uygulamasının etkileri de değerlendirilmiştir. En iyi köklenme oranları ve kök kalitesi iki aşamalı olarak 0.3-1.0 mg/L IBA ve 0.2-0.5 mg/L NAA uygulamalarından elde edilmiştir. İki aşamalı uygulamalar ile köklenme başarısı anaçlara göre %60 ile %100 arasında değişmiştir. En yüksek köklenme oranı (%90-100) M26 anacında 0.3 mg/L NAA uygulamasında kaydedilmiştir. Tek aşamalı uygulamalarda karanlıkta inkübasyonun köklenme üzerine etkisi olmamıştır.

Meneguzzi vd. (2017), Geneva® serisi yeni elma anacı G.814'ün mikro çoğaltım protokolü kapsamında köklenme aşamasında 0, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 ve 2.5 mg/L IBA'nın

köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve kallus gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Temel besin ortamı olarak QL besin ortamının esas alındığı çalışmada, bu besin ortamına 100 mg/L inositol, 30 g/L sakaroz ve 6 g/L agar katılmıştır. Çalışmada en iyi köklenme 1.5 mg/L IBA uygulamasında elde edilmiştir. Bu uygulama ile köklenme oranı yaklaşık %100, sürgün başına kök sayısı 2 adet ve kök uzunluğu 6 mm, kallus gelişme oranı %60 olarak kaydedilmiştir.

Li vd. (2018), çalışmalarında Gala elma çeşidinin mikro sürgünlerinde kök oluşumu ve gelişimi üzerine yeni tip bir nanoparçacık olan graphene oxide'in etkilerini incelemişlerdir. Araştırmada, bu nano materyal 30 dakika ultrases uygulamasından sonra 0.0 (kontrol), 0.1, 1.0 veya 10.0 mg/L dozlarında otoklavlanmış besin ortamına ilave edilmiştir. Besin ortamı 1.0 mg/L IAA, 0.5 mg/L IBA ve farklı dozlarda graphene oxide içeren ½ kuvvetindeki MS ortamıdır. Dikimden 40 gün sonra yapılan gözlemlerde 0.1-10.0 mg/L graphene oxide uygulamalarının mikro sürgünlerde adventif kök uzunluğu, nem kapsamı ve lateral köklerin sayısını olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte 0.1 ve 1.0 mg/L graphene oxide uygulamasında köklenme oranı ve adventif köklerin sayısı, graphene oxide bulunmayan ortamlara ve 10.0 mg/L graphene oxide uygulamasına göre önemli düzeyde artış göstermiştir. Köklenme oranı, 0.0 ve 10.0 mg/L graphene oxide uygulamalarında yaklaşık %50, 0.1 ve 1.0 mg/L graphene oxide uygulamalarında %80-85 olarak kaydedilmiştir. Çalışmada, graphene oxide uygulamaları ile kontrole göre katalaz, peroksidaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitelerinde artış kaydedildiği, malondialdehid seviyesinde ise 10.0 mg/L graphene oxide uygulaması ile düşüş meydana geldiği belirtilmiştir. Ayrıca, 0.1 mg/L graphene oxide uygulamasının, oksin dışaakış taşıyıcı (auxin efflux carrier) genlerin (PIN7, ABCB1) ve oksin içeakış taşıyıcı (auxin influx carrier) genlerin (LAX2, LAX3) transkriptini artırdığı, sitokinin biyosentezinde rol oynayan ARR3 geninin transkript seviyelerini engellediği, adventif köklerin, lateral köklerin ve kök tüylerinin oluşumunda rol oynayan ARRO1, ARF19 ve TTG1 genlerinin transkript seviyelerinin ise 1.0 ve 10.0 mg/L graphene oxide uygulamalarına yanıt olarak düşüş gösterdiği öne sürülmüştür. Bulgulara göre 0.1 mg/L graphene oxide uygulamasının Gala elma sürgünlerinde kök oluşumu üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu, ancak kök

gelişimini olumsuz etkilediği, bu tepkinin, hücresel yapı ve işlev üzerine graphene oxide'in olumsuz etkileri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

Podwyszynska ve Cieslinska (2018), zor köklenen bazı diploit ve yeni tetraploit elma çeşitlerinin *in vitro* köklenmesinde 5 μ M (0.88 mg/L) IAA ve 50 μ M putrescine ile kombine edilmiş 2.5 μ M IBA (0.5 mg/L) ya da 1.3 μ M NAA (0.24 mg/L) uygulamasıyla iki aşamalı köklendirme ile köklenme oranlarının %60-%80 seviyelerine ulaştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, iki aşamalı köklendirmede mikro çelikleri önce büyümeyi düzenleyici madde ve putrescine ilave edilmiş, adenin sülfat ve amonyum nitrat içermeyen MS ortamında 7 gün süreyle karanlık koşullarda 26 °C'de ve daha sonra büyümeyi düzenleyici madde ve putrescine bulunmayan 4 g/L aktif karbon katılmış aynı MS ortamında 18 gün süreyle 16 saat aydınlık koşullarda inkübe etmişlerdir.

Amirchakhmaghi vd. (2019), *Malus orientalis* elma türünde bir mikro çoğaltım protokolü geliştirme çalışmaları kapsamında 0.9 mg/L IBA ile kombine ettikleri yarı kuvvette Linsmaier ve Skoog (LS) besin ortamında köklenme oranını %77.8, kök sayısı 2.04 olarak bildirmişlerdir. Bununla birlikte aynı temel besin ortamında alt kültürü de yapılan mikro sürgünlerde köklenme oranı %96 kök sayısı 7.18 olarak belirtilmektedir.

2.2 Bitkilerde Çinko Oksit Nanoparçacık Uygulamaları

Nanoteknoloji kavramı ilk kez 1959 yılında Nobel Fizik Ödülü sahibi Richard Feynman tarafından bilim felsefesiyle ilgili bir sohbet sırasında gündeme gelmiştir. Drexler, 1986 yılında moleküler yapıdaki nanoteknolojinin dikkat çekici olanaklarını tartışmaya açmıştır. Zamanla nanoteknolojideki hızlı gelişmeler, diğer teknolojik alanlarda olduğu gibi bu teknolojinin insan ve ekosistem için büyük yararları olduğu kadar önemli zararları olabileceği konusunu da gündeme getirmiştir. Nanoteknolojinin temel bileşeni atomik ve moleküler düzeyde manipüle edilmiş nanoparçacıklardır. "American Society for Testing and Materials (ASTM)"e göre nanoparçacıklar, iki ya da üç boyutlu olarak 1-100 nm büyüklüğündeki parçacıklar olarak tanımlanmaktadır (Berk ve Akkurt 2012).

Çinko, insan, hayvan ve bitkilerde metabolik aktiviteler için gerekli olan bir mikro besin elementidir. Bu element bilindiği üzere IAA'nın triptofandan sentezinde önemli işlevlere sahiptir. Çeşitli çalışmalarda çinkonun bitki büyümesi, çoğaltılması ve veriminde önemli rol oynadığını gösterilmiştir. Yetersizliği durumunda bitki bünyesinde fizyolojik dengesizlikler yaratmakta ve enzim aktivitelerini ve diğer metabolik süreçleri etkilemektedir. Çinko oksit ise eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri ile çok fonksiyonlu bir maddedir. Bu özelliklerinden dolayı tarımın da içerisinde yer aldığı birçok alanda kullanılmaktadır (Kolodziejczak-Radzimska ve Jesionowski 2014). Son yıllarda araştırmacılar nanoteknolojiden yararlanarak çinko oksit nanoparçacıklar üzerinde çalışmalara başlamışlardır (Laware ve Raskar 2014). Nanoteknoloji, ileri tarım uygulamaları ve ürün olasılıkları ile tarım sektörünün gelişmesi için zengin vizyonlar sunmakta ve gelecekte dünya nüfusunu beslemek için küresel mahsullerin üretim hacmini artırmada nano bitki besin maddeleri ile etkin bir gübreleme, ürün verimliliğini artırma, bitki koruma ürünleri, nano paketlenme ve nano sensörler alanlarında umut verici sonuçlar ve uygulamaları mümkün kılmaktadır (Abobatta 2018). Bitki büyüme ve gelişimi üzerine çinko oksit nanoparçacıkların olumlu ve olumsuz etkileri konusunda yapılmış çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Lin ve Xing (2007), nanoparçacıkların fitotoksitesisi konusunda yaptıkları çalışmada çinko ve çinko oksit nanoparçacıklarının da aralarında bulunduğu 5 tip nanoparçacığın (çok duvarlı karbon nanotüp, alüminyum, alümina, çinko ve çinko oksit), altı bitki türünde (turp, kanola, çok yıllık çim, marul, mısır ve hıyar) tohum çimlenmesi ve kök gelişimi üzerine engelleyici etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, tohum çimlenmesi, mısırdaki nano-ZnO ve çok yıllık çimde (*Lolium perenne*) nano-Zn'nun 2000 mg/L dozunun dışında engellenmemiştir. Kök gelişiminin engellenmesi durumu nanoparçacıklar ve bitkilere göre büyük ölçüde değişmiştir. Nano-Zn ve nano-ZnO'nun 2000 mg/L'lik suspansiyonları, test edilen türlerde kök uzamasını pratik anlamda sonlandırmıştır. Nano-Zn ve nano-ZnO'nun %50'lik engelleyici konsantrasyonları (IC50), turp için 50 mg/L, kanola ve çok yıllık çim için yaklaşık 20 mg/L olarak tahmin edilmiştir. Engelleme durumu, tohum ıslatma aşamasından ziyade tohum inkübasyonu boyunca meydana gelmiştir.

Lee vd. (2010), *Arabidopsis thaliana* (farekulağı teresi) bitkisinin gelişimi üzerine alüminyum oksit ($n\text{Al}_2\text{O}_3$), silikon dioksit ($n\text{SiO}_2$), manyetit ($n\text{Fe}_3\text{O}_4$) ve çinko oksit ($n\text{ZnO}$) nanoparçacıkların etkilerini incelemişlerdir. Nanoparçacıkların 400, 2000 ve 4000 mg/L konsantrasyonlarına maruz kalmasının ardından üç toksisite indikatörü (tohum çimlenmesi, kök uzaması ve yaprak sayısı) ölçülmüştür. Test edilen nanoparçacıklar arasında, $n\text{Al}_2\text{O}_3$ 'in tüm konsantrasyonları ve 400 mg/L $n\text{SiO}_2$ nanoparçacıkları, kök uzamasını önemli düzeyde pozitif yönde etkilemiştir. Diğer taraftan, $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ ve $n\text{ZnO}$ tüm dozlarda, $n\text{SiO}_2$ ise 2000 mg/L ve 4000 mg/L dozlarda engelleyici etkiye sahip olmuştur. Bu nanoparçacıklar arasında $n\text{ZnO}$ yüksek düzeyde fitotoksik bulunmuş, bunu $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ ve $n\text{SiO}_2$ izlemiştir. $n\text{Al}_2\text{O}_3$ toksik bulunmamıştır. Sonuç olarak, toksite belirleyicileri olarak çinko çözünürlüğü ve parçacık büyüklüğünün önemini anlamak üzere $n\text{ZnO}$ ileri düzeyde çalışılmıştır. Nanoparçacık süspansiyonlarındaki çözünabilir çinko konsantrasyonları, çözülmüş çinko tuzunun (ZnCl_2) minimum inhibitör konsantrasyonundan 33 kat daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu, çinko çözünmesinin tek başına toksiteyi açıklayamayacağını göstermiştir. $n\text{ZnO}$ 'in tohum çimlenmesini engellenmesi, eşit konsantrasyonlarda daha büyük parçacıklara (mikron boyutunda) göre daha yüksek toksite meydana getirmesinden dolayı parçacık büyüklüğüne bağlanmıştır.

Shaymurat vd. (2012) sarımsak (*Allium sativum* L.) üzerine ZnO nanoparçacıkların (ZnO NPs) kök gelişimi, kök apikal meristeminde mitoz ve mitotik anomaliler üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar sarımsak başlarını deiyonize su içerisinde köklendirmişlerdir. Kökler 2 cm uzunluğa ulaştığında fideleri doğrudan ZnO NPs süspansiyonları (10, 20, 30, 40, 50 mg/L) ya da kontrol amacıyla Zn^{2+} solusyonları (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) içerisine 24 saat süreyle yerleştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda ZnO NPs konsantrasyonuna bağlı olarak kök uzunluğu üzerine engelleyici etkiye sahip olmuştur. ZnO NPs'nin 50 mg/L dozunun 24 saat süreyle uygulanması ile sarımsağın kök gelişimi tamamen durmuştur. Çalışmada, %50 engelleyici doz 15 mg/L olarak tahmin edilmiştir. Araştırmacılar mitoz indeksinin de konsantrasyona ve zamana bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. ZnO nanoparçacıklar, kromozom yapışması, köprüler ve kırılmalar gibi mitotik anomalileri de uyarmıştır. ZnO NPs

konsantrasyonlarının yükselmesi ve uygulama süresinin uzaması, anormal hücrelerin toplam oranını artırmıştır.

Prasad vd. (2012), çalışmalarında yerfıstığı tohumlarının çimlenmesi, fide gelişimi, çiçeklenme, klorofil kapsamı, meyve verimi ve kök gelişimi üzerine farklı konsantrasyonlarda (400, 1000, 2000 ppm) çinko oksit nanoparçacıkların ve şelatlanmış bulk çinko sülfatın ($ZnSO_4$) etkilerini araştırmışlardır. Ortalama 25 nm boyutundaki çinko oksit nanoparçacıkların 1000 ppm dozu, tohum çimlenmesini ve fide gelişimini uyarmıştır. Meyve verimi bulk materyal ile karşılaştırıldığında %34 artmıştır. Daha sonra tarla denemelerinde şelatlanmış $ZnSO_4$ (30 g/15 L) ile karşılaştırıldığında çinko oksit nanoparçacıklarla 15 kat daha düşük dozda (2 g/15 L) gerçekleştirilen yaprak uygulamaları sonucunda meyve verimi iki vejetasyon döneminde %29.5 ve %26.3 oranlarında artmıştır. Sonuç olarak, daha yüksek nanoparçacık konsantrasyonunun (2000 ppm) engelleyici etkisinin, bu nanoparçacıkların bu gibi uygulamalarda dikkatli kullanılması gerekliliğini ortaya koyduğu bildirilmiştir.

Burman vd. (2013), nohut fidelerinin gelişimi ve antioksidan sistemi üzerine çinko oksit nanoparçacıklarının etkisini araştırdıkları çalışmalarında 10 günlük fidelere 1.5 ppm ya da 10 ppm dozlarındaki çinko oksit nanoparçacık solüsyonlarını yapraktan püskürtme yoluyla uygulamışlardır. Ayrıca, normal boyutta çinko oksit ve çinko sülfat solüsyonları da kullanılmıştır. Araştırmada sürgün kuru ağırlığı üzerine en yüksek etki 1.5 ppm ZnO nanoparçacık uygulamasından elde edilirken 10 ppm nanoparçacık uygulaması kök gelişimini olumsuz etkilemiştir. Bununla birlikte fidelerde toplam ağırlık genel olarak çinko oksit nanoparçacık uygulamaları ile artmıştır. Bu etkinin, düşük malondialdehit (MDA) içeriğinden de anlaşılabileceği gibi daha az lipid peroksidasyonuyla sonuçlanan düşük reaktif oksijen türevi (ROS) seviyelerine bağlanabileceği belirtilmiştir. Bu durum, kontrol ile karşılaştırıldığında çinko oksit nanoparçacık uygulanmış fidelerdeki superoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz gibi belirgin antioksidan enzimlerin düşük aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Antioksidan sistem, bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) fotosentez ve fotorespirasyon üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletmede önemli bir rol oynamaktadır. Çinko, superoksit dismutaz (SOD) içerisindeki varlığından dolayı ROS üretimini dengelemede ve temizlemede yardımcı

olduğundan, biyomembranlar ve proteinin stabilitesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Araştırmacılar, topraklarının %50'sinden fazlası çinko eksikliği gösteren ve çinko gübrelere uygulanan yapraklardan uygulanmasının önerildiği Hindistan gibi yerlerde bu sonuçların daha fazla önem taşıdığını öne sürmüşlerdir.

Helaly vd. (2014), çalışmalarında muzun *in vitro* kültürlerinde biyolojik kontaminasyon ve organogenik rejenerasyon üzerine nanoparçacıkların etkilerini araştırmışlardır. Nanoparçacıkların bulunmadığı muz kültürlerinde 9 bakteriyel (*Cellulomonas uda*, *Cellulomonas flarigena*, *Corynebacterium panrometabolum*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Erwinia cyprapedii*, *Pseudomonas* spp. ve *Proteus* spp.) ve 4 fungal (*Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. ve *Candida* spp.) kontaminant tanımlanmıştır. Muzda, Zn ve ZnO nanoparçacıkların kullanımı ile kontaminantlardan arı kültürler elde edilmiştir. Nanoparçacıkların rejenerasyon üzerine olumsuz bir etkisi belirlenmemiştir. Denemelerde 0, 50, 100 ve 200 mg/L dozlarında kullanılan nanoparçacıkların dozlarının artması ile birlikte toplam prolin, SOD (superoksit dismutaz) CAT (katalaz) ve POX (peroksidaz) aktiviteleri önemli düzeyde artmış, kallus gelişimi azalmıştır. En yüksek somatik embriyogenesis oranı 100 mg/L nano çinko ile desteklenmiş MS ortamında belirlenirken bunu, nano ZnO izlemiştir.

Laware ve Raskar (2014), soğanda bitki gelişimi, çiçeklenme ve tohum verimliliği üzerine çinko oksit nanoparçacıkların (ZnO NPs) etkisini araştırdıkları çalışmalarında bitkilere 15 gün arayla üç kez 0, 10, 20, 30 ya da 40 µg/ml konsantrasyonlarında ZnO NPs püskürtmüşlerdir. Çalışmada, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarında ZnO NPs uygulamalarında kontrole göre 12-14 gün erken çiçeklenme ve daha iyi bir gelişme görülmüştür. ZnO NPs uygulanmış bitkilerde tohum verimi ve ağırlığı kontrolün üzerinde tespit edilmiştir. Araştırmacılar göre ZnO NPs uygulamaları soğanda çiçeklenme periyodunu kısaltmış ve sağlıklı tohum üretimini mümkün kılmıştır.

Das vd. (2015), domateste çimlenme ve fide gelişimi üzerine farklı nanoparçacıkların etkilerini araştırdıkları çalışmalarında çinko oksit nanoparçacıkları 0, 2, 4, 8, 10 ve 14 ppm dozlarında uygulamışlardır. Kontrol ile karşılaştırıldığında nanoparçacık

uygulamaları tohum çimlenmesi ve fide gelişimini iyileştirmiştir. Genel olarak yüksek dozlar toksik etki yapmıştır.

Maithreyee ve Gowda (2015), çalışmalarında yaşlandırılmış hibrit mısır tohumlarının kalite parametreleri üzerine gümüş, demir oksit, çinko oksit ve bakır oksit nanoparçacıkların etkilerini araştırmışlardır. Çimlenme oranı %79 olan tohumların kullanıldığı araştırmada gümüş ve demir oksit nanoparçacıkları 1250 mg/kg, bakır oksit ve gümüş oksit nanoparçacıkları 1500 mg/kg dozda uygulanmıştır. Tohumlar başlangıçta 3 saat süreyle suda ıslatılmış ve daha sonra 3 saat nanoparçacık solusyonları içerisinde tutulmuştur. Uygulama yapılmış tohumlar başlangıç nem düzeyine (%12) kadar gölgede kurutulmuştur. Çimlenme oranı, sürgün ve kök uzunluğu, fide boyu ve kuru madde miktarı kontrolde sırasıyla %79, 10.7 cm, 15.0 cm, 25.6 cm ve 4.6 mg olurken çinko oksit nanoparçacık uygulamasında %89, 15.7 cm, 19.5 cm, 35. 2 cm ve 6.7 mg olarak kaydedilmiştir. Nanoparçacıkların etkisi, uygulama süresince tohumlara maddelerin ulaşmasını kolaylaştıran küçük parçacık boyutlarına bağlanmıştır.

Raliya vd. (2015), domates bitkilerine (*Solanum lycopersicum* L.) çinko oksit ve titanyum dioksit nanoparçacıkların translokasyon ve fizyolojik etkilerinin mekanik değerlendirmesi konusunda yaptıkları çalışmada 0-1000 mg/kg arasında değişen konsantrasyonları kullanmışlardır. Çalışmada, nanoparçacıkların bitkiler tarafından alımı bakımından püskürtme yoluyla uygulamanın, topraktan uygulamaya göre çok daha etkili olduğu belirlenmiştir. Nanoparçacık tipinden bağımsız olarak TiO_2 ve ZnO nanoparçacıkların 250mg/kg konsantrasyonu en yüksek bitki boyu, kök uzunluğu ve biyokitlenin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Likopen kapsamı ve meyve verimi 100 mg/kg, klorofil içeriği ise 750 mg/kg dozunda en yüksek bulunmuştur. TiO_2 nanoparçacıklar, bitkilerde ışık absorpsiyonunu ve klorofil kapsamını artırmıştır. Çalışmada, ZnO nanoparçacıkların, temel bir besin maddesi ve besinleri mobilize eden enzimlerin ko-faktörü olarak ikili rolüne dikkat çekilmiştir.

Chutipaijit (2015), aromatik çeltikte (*Oryza sativa*) bitki rejenerasyonu üzerine nanoparçacıkların etkilerini araştırdığı çalışmasında 24 nm boyutundaki titanyum dioksit (TiO_2) nanoparçacıklarının 25 mg/L dozunun bitki rejenerasyonunu (%56.46),

kontrole (%55.46) göre önemli düzeyde artırdığını belirlerken, 30.4 nm boyutundaki ZnO nanoparçacıklarının 5, 25, 50 mg/L dozlarının rejenerasyon üzerine (%48.27-51.73), kontrole (%55.46) göre önemli bir etkiye sahip olmadığını belirlemiştir.

Amiri vd. (2016), hurmada (*Phoenix dactylifera* L. cv. Estamran) *in vitro* kallus oluşumu üzerine gümüş oksit nanoparçacıklarının etkisini araştırdıkları çalışmalarında 6-12 nm boyutundaki ZnO nanoparçacıklarını 2.43, 4.86 ya da 7.29 mg/L dozlarında farklı kuvvetlerdeki MS besin ortamında denemişlerdir. Araştırmacılar, 2.43 mg/L ZnO nanoparçacık uygulamasının diğer ZnO nanoparçacık ve bulk çinko uygulamalarına göre hurmada kallus oluşumu üzerine oldukça etkili bulmuşlardır. Çinkonun, bitki beslenmesinde önemli bir mikro element olmasından dolayı toksik etkilerden kaçınmak için özellikle düşük dozlarda ZnO nanoparçacıkların bitkilerde gelişme üzerine etkili olduğu bildirilmiştir.

Dastjerdi vd. (2016), çalışmalarında yerfıstığı tohumlarının çimlenmesi üzerine MS besin ortamına farklı dozlarda (10, 30, 50, 100, 200, 400, 1000 ve 2000 mg/L) ilave ettikleri çinko oksit nanoparçacıkların etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada kökçük uzunluğunun 50 mg/L ve üzerindeki dozlarda önemli düzeyde azaldığını, en kısa sürgün uzunluğunun 2000 mg/L dozunda belirlendiğini, kökçük ve sürgün yaş ağırlığının yüksek dozlarda azaldığını, kökçük kuru ağırlığının 10 mg/L uygulamasında, 200 mg/L ve üzerindeki uygulamalara göre önemli düzeyde yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Zafar vd. (2016), *in vitro* koşullarda hardal (*Brassica nigra*) tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine ZnO nanoparçacıkların etkisini araştırdıkları çalışmalarında nanoparçacıkları MS besin ortamına 500-1500 mg/L arasında değişen dozlarda ilave etmişlerdir. Nanoparçacıkların bulunduğu ortamlarda tohumların çimlenme oranı (%19-%14), kontrolün (%20) gerisinde kalmıştır. Fidelerde sürgün uzunluğu kontrol ile karşılaştırıldığında 500 mg/L ZnO nanoparçacık uygulamasında %64 oranında artış gösterirken kök uzunluğu %61 oranında azalmıştır. Araştırmacılar gövde segmentlerinden sürgün ve kök oluşumu amacıyla ZnO nanoparçacıkları 0, 1, 5, 10 ve 20 mg/L düşük dozlarda besin ortamına ilave etmişlerdir. ZnO NPs'nin 1-20 mg/L düşük dozlarında eksplantlarda sık kök tüyleri ile birlikte ince kök oluşumları gözlenmiştir. Ayrıca, 10

mg/L dozunda sürgün oluşumu da gözlenmiştir. Nanoparçacıkların varlığı toplam antioksidan ve indirgeme kapasitesi üzerine önemli bir etkiye sahip olmuştur. Enzimatik olmayan antioksidatif moleküller, fenolikler ve flavonoidler nanoparçacık konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir. Araştırmacılar, ZnO nanoparçacıkların eksplantlardan kök oluşumunu uyarıcı etkisinin değerli sekonder metabolitlerin üretimi için kullanışlılığına dikkat çekmiştir.

Goodarzi vd. (2017), çalışmalarında mahlep (*Prunus mahaleb*) tohumlarına titanyum dioksit ve çinko oksit nanoparçacık uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. Katlamadan çıkarılmış mahlep tohumları bu nanoparçacıkların %0.5, %1.0, %2.0 ve %3.0'lık konsantrasyonlarında 10, 20 ve 30 dakika süreyle tutulmuştur. Daha sonra fideler 7 ay süreyle %1.0, %5.0 ve %10.0'lık nanoparçacık solusyonları ile tarla kapasitesine ulaşılan kadar sulanmıştır. En yüksek çimlenme oranı (%65) tohumların 20 dakika süreyle %1.0 titanyum dioksit nanoparçacık solusyonuna daldırıldığı uygulamadan elde edilmiştir. En düşük çimlenme oranı (%13) ise yine bu nanoparçacığın 30 dakika süreyle %3.0 uygulamasında belirlenmiştir. En yüksek çöğür boyu (32.6 cm) 10 dakika %0.5 titanyum dioksit nanoparçacık uygulamasında saptanmıştır. Çinko oksit nanoparçacıkların 10 dakika süreyle %2.0 uygulamasında tohum çimlenme oranı %61, çöğür boyu da 27.1 cm olarak ölçülmüştür. Çöğürlerde bitki boyu, yaşama oranı ve toplam kuru madde artışı için %1.0 titanyum dioksit solusyonu ile sulama uygun bulunmuştur. Bu parametrelerdeki artış çinko oksit nanoparçacık uygulamalarında düşük seviyelerde kalmıştır. Çalışmada yüksek seviyelerde nanoparçacık uygulamalarına bir tepki olarak bitkilerde oransal su içeriğinde azalma ve prolinde artış gözlenmiştir.

Vankova vd. (2017), *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin sürgün ucu, yaprak ve köklerinde sitokininler, oksinler, absizik asit, salisilik asit ve jasmonik asit kapsamları üzerine ZnO nanoparçacıkların (ortalama 30 nm büyüklüğünde 0.16-100 mg/L konsantrasyonlarında) etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada nanoparçacık konsantrasyonundaki artış, sürgün apikal meristemlerinde aşamalı olarak oksin ve sitokininlerin biyosentezini baskı altına almıştır. Bunun aksine, stres tepkisi ile ilişkili bir sitokinin olan cis-zeatin 20 ve 100 mg/L nanoparçacık konsantrasyonlarında köklerde sırasıyla %280 ve %590 oranlarında

artış göstermiştir. Daha yüksek dozlarda ZnO nanoparçacıkları özellikle sürgün ucu ve yapraklarda bir stres hormonu olan absizik asitte artışa neden olmuştur. Diğer bir stres hormonu olan jasmonik asit nanoparçacıkların varlığında baskılanmıştır. Oksinler ve sitokininler gibi sürgün uçlarında gelişmedeki azalış, nanoparçacıklara karşı ilk tepkiler olarak gözlenmiştir. Yüksek nanoparçacık dozlarında absizik asitin ve diğer bir stres hormonu salisilik asitin artış göstermesi, bitkilerin nanoparçacıkları şiddetli bir stres unsuru olarak algıladığını ortaya koymuştur.

Mousavi Kouhi ve Lahout (2018), kolzada (*Brassica napus* L.) doku kültürü yoluyla hipokotil eksplanlardan kallus oluşumu üzerine ZnO nanoparçacık uygulamasının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ZnO nanoparçacıklar (ZnO NPs) ile birlikte denemelerinde ZnO bulk parçacıkları ve Zn^{2+} metal iyonlarına da yer vermişlerdir. ZnO NPs, ZnO bulk parçacıkları ya da Zn^{2+} MS temel besin ortamına 10, 25, 50, 100 mg/L dozlarda ilave edilmiştir. Çalışmada, 10 mg/L ZnO NPs, kallus ve sürgün oluşumunu uyarmış, ancak aynı dozdaki diğer madde uygulamalarında bir oluşum meydana gelmemiştir. Kallus gelişimi tüm uygulamaların 25, 50 ve 100 mg/L dozlarında önemli düzeyde yavaşlamıştır. ZnO NPs'nin en yüksek dozunda kallus oluşumu meydana gelmemiştir.

Faizan vd. (2018), domates bitkilerinin antioksidan sistemi ve fotosentetik etkinliğinde çinko oksit nanoparçacıklara bağlı değişimlerini inceledikleri çalışmalarında 20 günlük domates bitkilerinin köklerini 0, 2, 4, 8 ve 16 mg/L çinko oksit nanoparçacık solusyonuna 15, 30 ve 45 dakika süreyle daldırmışlar ve daha sonra büyüme ortamlarına taşınmışlardır. Gelişmenin 45. gününde çinko oksit nanoparçacıkları büyüme, antioksidan sistem, karbonik anhidraz aktivitesi ile birlikte fotosentetik etkinliği önemli düzeyde artırmıştır. Özellikle 30 dakika süreyle 8 mg/L çinko oksit nanoparçacık uygulaması en yüksek etkiye sahip olmuştur. Bu uygulamanın sonucunda fotosentetik oran, prolin birikimi ve antioksidan enzim aktivitesi en üst noktaya ulaşmıştır. Araştırmacılar, çinko oksit nanoparçacıkların varlığının, antioksidan sistemi iyileştirdiğini, bitkiler için stabilite sağlayan prolin birikimini hızlandığını ve fotosentetik etkinliği iyileştirdiğini öne sürmüşlerdir.

Kavianifar vd. (2018) çalışmalarında ketenden (*Linum usitatissimum*) doku kültürü yoluyla sekonder metabolit olarak mukilaj üretimi üzerine nanoparçacıkların etkilerini araştırmışlardır. Mukilaj, tıbbi ilaç olarak değerlendirilen yüksek moleküllü bir polisakarittir. Çalışmada, keten tohumları aseptik koşullarda çimlendirildikten sonra genç bitkilerin yaprak, gövde ve kök dokuları kallus kültürü için kullanılmıştır. Elisitör olarak nano-ZnO, nano-SiO₂ ve nano-Al₂O₃, 5, 10 ve 20 mg/L dozlarında kallusların alt kültürlerine alındığı MS besin ortamına ilave edilmiştir. İki hafta sonra kültürlerde kallus taze ağırlığı, mukilaj oranı ve mukilaj verimi kaydedilmiştir. Sonuçlar, düşük dozlarda nano elisitörlerin kallus oluşumu ve mukilaj üretimi üzerine pozitif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. En yüksek mukilaj üretimi 5 mg/L nanoparçacık dozunda sırasıyla nano-ZnO (%2.8 oranında 22.3 mg), nano-Al₂O₃ (%2.6 oranında 19.8 mg) ve nano-SiO₂ (%2.2 oranında 17.1 mg) ile elde edilmiştir.

Chutipaijit vd. (2018), *indica* çeltik fidelerinde (*Oryza sativa*) ZnO nanoparçacıkların *in vitro* bitki gelişimini üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında fideleri 0-1000 mg/L nano-ZnO dozlarında yetiştirmişlerdir. Uygulamadan 5, 7, 10 ve 14 gün sonra fidelerde yapılan gözlem ve ölçümlerde kontrol ile karşılaştırıldığında 100 mg/L dozunda biyokitlenin, gelişme tolerans indeksinin, klorofil kapsamının ve antioksidan enzim aktivitelerinin önemli düzeyde arttığı, ancak 300-1000 mg/L uygulamalarında nanoparçacık dozunun yükselmesi ile birlikte bu parametrelerde düşüşler meydana geldiği bildirilmiştir. Araştırmacılar bitkilere nano-ZnO'nun düşük dozları uygulandığında biyokitle, gelişme tolerans indeksi ve klorofil kapsamında görülen artışların, bitki hücrelerinde antioksidan enzimlerin (katalaz ve peroksidaz) üretimleri ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Maity vd. (2018), yulaf (*Avena sativa*) ve İskenderiye üçgülü (*Trifolium alexandrinum*) tohumlarının çimlenmesi, gücü ve yemlik ürünün verimi üzerine çinko oksit (ZnO), titanyum oksit (TiO₂), bakır oksit (CuO) ve gümüş (Ag) nanoparçacıkların etkilerini incelemişlerdir. Tohum uygulamaları için nanoparçacıklar 750, 1000 ve 1250 mg/kg dozlarında uygulanmıştır. Yulafta tüm nanoparçacıkların ve İskenderiye üçgölünde sadece Ag nanoparçacığının 750 mg/kg dozunda çimlenme oranı %100 olarak kaydedilmiştir. Yüksek dozlarda, kök ve sürgün uzunluğunda azalmalar meydana

gelmiştir. TiO₂ uygulaması en yüksek dozda en yüksek tohum verimini sağlamıştır. Tarla çalışmalarında nanoparçacıkların toprak mikrobiyal popülasyonu üzerine önemli bir etkisi belirlenmemiştir.

Medina-Velo vd. (2018), fasulye bitkilerinde (*Phaseolus vulgaris*), 0-500 mg/kg dozunda iyonik çinko (ZnCl₂), bulk ZnO, kaplanmış nano-ZnO (Z-COTE HP1) ve kaplanmamış nano-ZnO (Z-COTE)'in, ikinci nesil tohumların (S2) fizyolojisi ve besin profili üzerine etkilerini incelemiştir. Analiz sonucunda kontrol ile karşılaştırıldığında uygulamaların S2 tohumlarda verim, olgunlaşma zamanı, Zn birikimi, şeker, nişasta ya da protein kapsamını etkilemediği saptanmıştır. S2 tohumlarda K, P, S, Mg, Fe, Mn, B, Mo ve Cu birikimi de etkilenmemiştir. Bununla birlikte kontrol ile karşılaştırıldığında Ni miktarı, 500 mg/kg Z-COTE, 125 mg/kg ve 500 mg/kg ZCOTE HP1 uygulamalarında sırasıyla %60, %41 ve %74 oranlarında azalmıştır. Çinko nanomateriyaller askorbat peroksidaz, katalaz ve superoksit dismutaz (SOD) aktivitelerini ise etkilememiştir. Ancak, 500 mg/l ZnCl₂, S2 tohumlarda SOD değerini %28 artırmıştır.

Das vd. (2019), tahıllarda bir depo zararlısı olan *Sitophilus oryzae* (L.)'ya karşı alüminyum oksit, titanyum dioksit ve çinko oksit nanoparçacıkların entomotoksik etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada 1 g/kg alüminyum oksit nanoparçacıklarının uygulamasından 4 gün sonra zararlının %90'dan fazlası ölmüştür. Bu sonuca, çinko oksit ve titanyum dioksit nanoparçacıklarının 2 g/kg dozu ile uygulamadan 14 gün sonra ulaşılmıştır. Alüminyum oksit nanoparçacıklarının tarım sektöründe bilinen olumsuz etkilerinden dolayı çinko oksit ve titanyum dioksit nanoparçacıklarının kullanımının önerildiği çalışmada, bu maddelerin antimikrobiyal özelliği nedeniyle tarımsal ürünleri sadece böceklerin zararlarına karşı değil mikrobiyal enfeksiyonlardan da koruyacağı bildirilmiştir.

Garcia-Lopez vd. (2019), çinko oksit nanoparçacık ve çinko sülfatın 1000 ve 2000 mg/L dozlarında yaprak uygulamalarının Habenero biberlerinde (*Capsicum chinense* Jacq.) biyoaktif bileşiklerin kapsamı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sera koşullarında yürütülen denemede kontrol ve çinko sülfat ile karşılaştırıldığında 1000 mg/L çinko

oksit nanoparçacık uygulaması bitki boyu, gövde çapı ve klorofil kapsamını pozitif yönde etkilemiş, ürün miktarını ve biyokitle birikimini artırmıştır. Her ne kadar 2000 mg/l çinko oksit nanoparçacık uygulaması bitki gelişimini negatif yönde etkilemiş ise de meyve kalitesini, capsaicin (%19.3) ve dihydrocapsaicin (%10.9) kapsamalarını, Scoville Heat Units (Acılık Ölçü Birimi) değerini (%16.4), meyvelerde toplam flavonoidleri (%26.9) ve toplam fenoller (%14.5) artırmıştır. Bunun sonucunda ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ve FRAP (ferric reducing antioxidant power)'da sırasıyla %15.4, %31.8 ve %20.5 oranlarında daha yüksek antioksidan kapasitesi ortaya çıkmıştır.

Rossi vd. (2019), kahve bitkilerine (*Coffea arabica* L.) çinko sülfat ($ZnSO_4$) ve çinko nano-gübrelerin (ZnO NPs) yaprak uygulamalarının gübre alımı ve bitki fizyolojisi üzerine etkilerini kontrol ile karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Sera koşullarında bir yaşlı bitkilere çinko sülfat monohidrat ($ZnSO_4 \cdot H_2O$) ya da çinko oksit nanoparçacıkları (ZnO NPs %20 w/t) 10 mg/L Zn düzeyinde 14 gün aralıkla iki kez uygulanmıştır. İlk uygulamadan 45 gün sonra yapılan değerlendirmelerde ZnO nanoparçacık uygulamalarında, kontrol ile karşılaştırıldığında, kök yaş ağırlığının %37 ve yaprak yaş ağırlığının %95 oranında arttığı saptanmıştır. Kuru ağırlık ise kök, gövde ve yapraklarda sırasıyla %28, %85 ve %20 daha yüksek olmuştur. Denemenin sonunda fotosentetik oranda %55'lik bir artış kaydedilmiştir. Zn kapsamı, ZnO nanoparçacık uygulanmış yapraklarda (1267.1 ± 367.2 mg/kg kuru ağırlık), $ZnSO_4$ uygulanmasından (344.1 ± 106.2 mg/kg kuru ağırlık) ve kontrolden (53.6 ± 18.9 mg/kg kuru ağırlık) elde edilen değerlerden önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. X-ray mikro analiz görüntüleri kahve yaprak dokusuna ZnO NPs penetrasyonundaki artışı ortaya koymuştur. Araştırmacılar, bu sonuçların, özellikle çinko noksanlığı yüksek olan alanlarda ZnO NPs uygulamalarının meyve tutumu ve kalitesini iyileştirmek amacıyla kahve plantasyonlarında düşünülebileceğine dikkat çekmektedir.

Ogunyemi vd. (2019), farklı bitki ekstraktları kullanılarak çinko oksit nanoparçacıklarının ($ZnONPs$) yeşil sentezini ve *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*'ye karşı antibakteriyel etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar bitki ekstraktları kullanılarak metal oksit nanoparçacık sentezinin, kimyasal metodlara alternatif ümitverici bir yöntem olduğunu

bildirmektedir. Çalışmada, Mayıs papatyası çiçeği (*Matricaria chamomilla*), zeytin yaprağı (*Olea europaea*) ve kırmızı domates meyvesinin (*Lycopersicon esculentum*) bitki ekstraktları kullanılarak çinko oksit nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Sentezlenen ZnONP'ler EDS profili ile SEM, UV-görünür spektroskopi (UV-Visible spectroscopy), FTIR, XRD (X-ray diffraction) ve TEM ile karakterize edilmiştir. Genel olarak, çinko oksit nanoparçacıkların, çeltikte bakteriyel yaprak yanıklığı hastalığına karşı kullanılabilecek umut verici biyolojik kontrol ajanları olduğu bildirilmiştir.

2.3 Çeliklerin Köklenmesi Üzerine Nanoparçacıkların Etkileri

Çeliklerde köklenme üzerine nanoparçacıkların etkileri konusunda literatürde üç kaynak bulunmaktadır.

Helaly vd. (2014), muzun *in vitro* kültürlerinde Zn ve ZnO nanoparçacıkların köklenme üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada kontrol uygulamasında köklenme meydana gelmezken 100 mg/L nano Zn uygulamasında %89.0 ile en yüksek köklenme oranı, 6.57 ile sürgün başına en yüksek ortalama kök sayısı ve 2.93 cm ile en yüksek ortalama kök uzunluğu belirlenmiştir. Bu uygulama ile 200 mg/L nano Zn, 100 ve 200 mg/L nano ZnO uygulamaları aynı istatistik grup içerisinde yer almıştır.

Thangavelu vd. (2018), IAA ve IBA ile kaplanmış gümüş nanoparçacıkların sentezini ve karakterizasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmalarında model bitki olarak tütünde (*Nicotiana tabacum*) *in vitro* koşullarda mikro çeliklerin ve Çin gülünde (*Hibiscus rosa sinensis*) *ex vitro* koşullarda odun çeliklerinin dip kısımlarını IAA ya da IBA ile stabilize edilmiş nanoparçacık solusyonuna (yaklaşık olarak 0.02 mg/mL konsantrasyonda) 30 dakika süreyle daldırmışlardır. Nanoparçacıkların hem köklenmeyi engelleyen fitopatojenleri bertaraf etme ve hem de köklenmeyi uyarma özellikleri sayesinde kontrole göre köklenme oranlarını 3 kata kadar artırdığı belirlenmiştir.

Karakeçili vd. (2019) ise IAA ve IBA için nanotaşıyıcı olarak çinko oksit nanoparçacıkların (nZnO) sentezi, karakterizasyonu ve farklı *Pyrus* türlerinde mikro çeliklerde kök oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Oksin yüklenmiş

nanoparçacıklar (IAA-nZnO ve IBA-nZnO), parçacık boyutu, morfolojisi, termal davranış ve kimyasal yapısı bakımlarından karakterize edilmiştir. Çalışmada her iki oksin için de yüksek bir yükleme kapasitesi (~%90) gözlenmiştir. Denemelerde çelikleri zor (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) ve kolay (*Pyrus communis* L.) köklenen iki genotipin mikro çeliklerine nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO (20, 40, 80, 200 ve 400 mg/L), IAA (12.3, 24.5, 49.0, 112.6 ve 245.3 mg/L) ve IBA (16.3, 32.5, 65.0, 162.6 ve 325.2 mg/L), aseptik koşullarda yavaş daldırma yöntemiyle (1 saat) uygulanmıştır. Çelikleri zor köklenen genotipte kontrol ve nZnO uygulanmış mikro çeliklerde köklenme meydana gelmezken, 400 mg/L IBA-nZnO ve IAA-nZnO uygulanmış çeliklerde sırasıyla %50.0 ve %41.7 oranlarında en yüksek köklenme düzeyine ulaşılmıştır. Bu uygulamalar ile belirtilen genotipte köklenme başarısının, normal IAA ve IBA uygulamalarına göre en az iki kat arttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar oksin ile yüklenmiş ZnO nanoparçacıkların tarımsal uygulamalarda etkili bir nanotaşıyıcı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji II Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda 2016-2018 yılları arasında yürütülmüştür.

3.1 Materyal

3.1.1 Bitkisel materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak TÜBİTAK 109O197 nolu proje kapsamında Dumanoglu vd. (2013) tarafından Doğu Karadeniz Bölgesi sahil kesiminden selekte edilmiş olan 67 nolu yerel elma çeşidinin mikro çelikleri kullanılmıştır. Bu yerel elma çeşidi meyve ve anaçlık özellikleri yönüyle dikkat çeken bir genotiptir. Orijini Ordu ilinin Gülyalı ilçesi olan bu yerel çeşidin yöresel adı “Kırmızı Ekşi Elma”dır. Meyveleri orta irilikte, yassı küresel şekilde, albenisi iyi, kabuk zemin rengi yeşilimtırak sarı, kabuk üst rengi kırmızı, kabuk üst renginin tipi çizgilidir (Şekil 3.1). Kışlık bir çeşit olup yöresinde hasat zamanı Ekim ayının sonudur (Dumanoglu vd. 2013).



Şekil 3.1 Ordu ili Gülyalı ilçesinden selekte edilmiş olan 67 nolu genotipin meyvesinin görünümü (Dumanoglu vd. 2013)

Bu genotip, ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow vd.) hastalığına yüksek düzeyde dayanıklı (Şekil 3.2), sürgün ucu kültürü ile mikro çoğaltımda *in vitro* kültürlerde canlılık ve sürgün proliferasyon oranları %100, sürgün çoğaltım katsayısı 5.3'dür (Dumanoglu vd. 2013 ve 2016).



Şekil 3.2 Ateş yanıklığı hastalığına yüksek derecede dayanıklılık gösteren 67 nolu elma genotipi ve hassas standart elma çeşidi Royal Gala fidanlarının inokülasyondan sonra görünümü (Dumanoglu vd. 2013)

Tez çalışmasının bitkisel materyali olan mikro çeliklerin kaynağı, Doğu Karadeniz Bölgesi sahil kesiminden selekte edilen tüm elma genetik materyalinin Ankara'da bir araya toplandığı koleksiyon parselindeki 67 nolu yerel elma çeşidinin ağaçlarıdır. Bu parsel, M9 klon elma anacı üzerine aşılı fidanlarla Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bahçesi'nde 2010 yılında kurulmuştur.

Tezin *in vitro* çalışmaları, 67 nolu yerel elma çeşidinin alt kültürleri ile başlamıştır. Bu yerel elma çeşidinin bahçe koşullarından *in vitro* koşullarda kültüre alındığı tarih, tez çalışmasından hemen önce 2016 yılı ilkbahar gelişme periyodudur. Kültürler, Doğu Karadeniz elma genotipleri için geliştirilmiş olan sürgün ucu kültürü protokolüne göre 6

yaşlı ağaçların taze sürgünlerinden toplanan sürgün uçları ile başlatılmıştır (Dumanoglu vd. 2013 ve 2016).

3.1.2 Oksinler ve çinko oksit nanoparçacıkları

Tezde mikro çeliklerin köklendirilmesi denemelerinde çinko oksit nanoparçacıkları (n-ZnO), IAA ve IBA ile yüklü çinko oksit nanoparçacıkları (IAA-nZnO ve IBA-nZnO), IAA ve IBA oksinleri kullanılmıştır. IAA, IBA ve çinko oksit nanoparçacıkları Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Tezde, IAA ve IBA ile yüklü çinko oksit nanoparçacıkların sentezinde de kullanılan çinko oksit nanoparçacıkları nanotoz formunda, <50 nm parçacık büyüklüğünde, >%97 saflıktadır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Oksinler ile yüklü çinko oksit nanoparçacıkların hazırlanması

Çinko oksit nanoparçacıklara IAA ve IBA'nın yüklenmesi: Önce, 30 mg IAA veya IBA mutlak etanol (150 µl) veya 1N NaOH (150 µl) içinde çözülmüş ve daha sonra oda sıcaklığında 10 ml etanol/su (50/50, v/v) karışımı içinde seyreltilmiştir. Hazırlanan oksin çözeltisine 30 mg nZnO eklenmiş ve 30, 60, 120, 180 ve 240 dakika boyunca 700 rpm'de manyetik karıştırıcı kullanılarak oksin yüklemesi için oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Tanımlanan karıştırma sürelerinin sonunda çözelti 24 saat boyunca beklemeye bırakılmıştır. Süspansiyon, nanoparçacıkları (IAA-nZnO ve IBA-nZnO) çökeltmek üzere 10000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjden elde edilen sıvı, ağzı geniş jam şişelere alınmış ve ağız kısmı polietilen streç ile kapatıldıktan sonra 2 gün boyunca -20°C'de derin dondurucuda tutulmuştur. Daha sonra örnekler liyofilizatörde 4 gün boyunca dondurularak kurutulmuştur. Liyofilizatörde örneklerin kurutulması tamamlandıktan sonra nanoparçacıkların kazınma aşaması gerçekleştirilmiştir.

Çinko oksit nanoparçacıklara IAA ve IBA yükleme verimi: IAA veya IBA'nın nZnO üzerine yükleme verimi, spektrofotometrik ölçümler kullanılarak belirlenmiştir.

Oksin yüklemesinden önce ve sonra yükleme çözeltisi içindeki IAA veya IBA konsantrasyonları, 229 nm’de UV spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile ölçülmüştür. Her bir oksin için oksin yükleme yüzdesi, aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Oksin yükleme (\%)} = \left[\frac{C_{\text{ini}} - C_{\text{fin}}}{C_{\text{ini}}} \right] \times 100$$

Eşitlikte C_{ini} ve C_{fin} , nanoparçacıklar ile etkileşimden önce ve sonra çözeltilerdeki oksin derişimlerini göstermektedir.

Nanoparçacıkların karakterizasyonu:

Nanoparçacıkların FTIR-ATR (Fourier dönüşümlü kızılötesi-zayıflatılmış toplam yansıtma spektroskopisi) ile analizi: nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO örnekleri, 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında doğrudan ATR modunda analiz edilmiştir ve bir FTIR-ATR (Thermo Scientific Nicolet iS10, USA) kullanılarak örnek başına 32 tarama ile 4 cm^{-1} ’lik bir çözünürlük elde edilmiştir.

Parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyelinin ölçümü: Zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI) ve hidrodinamik çap ölçümleri (DLS, dinamik ışık saçılımı) nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO’nun sulu süspansiyonu ile 25 °C’de parçacık analiz cihazı (Delsa Nano C, Malvern Instruments, Malvern, UK) kullanılarak ölçülmüştür. Numunelerin seyreltilmesi, üçlü damıtılmış su ile uygun şekilde yapılmıştır. Ölçümler üç kopya halinde yapılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) / Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) analizi: nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO’nun morfolojik ve elementel karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (QUANTA 400F Field Emission SEM, ABD) ile belirlenmiştir. Ayrıca Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) ölçümleri de yapılmıştır. Nanopartiküller liyofilize edilerek ve bir çift yapışkanlı karbon bant kullanılarak bir alüminyum saplama üzerine monte edilmiştir. Nanoparçacıkların fotomikrografileri farklı büyütmelerde kaydedilmiştir.

Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ile analiz: Nanoparçacıkların topografya ve boyut dağılımını belirlemek için geçirimli elektron mikroskobu (FEI 120kV CTEM, ABD) kullanılmıştır. Numune hazırlama için, nanoparçacıkların sulu çözeltisi, prob sonikatörü ile ilk olarak 1 dakika süreyle sonike edilmiştir. Dağılmış nanoparçacık çözeltisi bir bakır ızgara üzerine yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında kurutmak için bırakılmıştır.

Diferansiyel Termal Analiz (DTA): Termogravimetrik (TGA) ve diferansiyel termal analizler (DTA), bir Setys 1750 SETARAM aletinde oda sıcaklığından 1000 °C'ye kadar 10 °C/dakika ısıtma hızına sahip bir nitrojen akışı altında gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel Analizler: Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, iki taraflı t-testi ve ANOVA kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneyler birçok kez tekrar edilmiş ve veriler $\pm$ standart ayırılma (SD) cihazı olarak sunulmuştur.

3.2.2 *İn vitro* köklendirme çalışmaları

Mikro çeliklerin hazırlanması: Mikro çelikleri hazırlamak için kullanılan mikro sürgünler alt kültürler ile çoğaltılmıştır. Alt kültürlerde besin ortamı olarak 1.0 mg/L BAP (benzil amino purin), 0.25 mg/L GA₃ (gibberellik asit), %3 sakaroz içeren pH'sı 5.8'e ayarlanmış, %0.7 agar katılmış, modifiye edilmiş Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamı (Dodds ve Roberts 1993) (Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Besin ortamları, otoklavdan önce 250 ml'lik erlenlere 50'şer ml olarak dağıtılmış ve sterilizasyon, 121°C ve 1 atmosfer basınç altındaki otoklavda 20 dakika sürede gerçekleştirilmiştir. Alt kültürler, taze besin ortamlarına mikro sürgünlerin her erlene 8'er adet dikimiyle yapılmış ve kültürler, floresans ışık ile 16 saat süreyle aydınlatılan ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), $25\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki iklim odasında 4-5 hafta süreyle inkübe edilmiştir (Dumanoglu vd. 2013 ve 2016).

Çizelge 3.1 Modifiye edilmiş MS (Murashige ve Skoog) temel ortamının bileşimi (Dodds and Roberts 1993)

(A) MAKRO ELEMENTLER	g/mol	MS Ortamı
		mg/L
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	80.04	1650
Potasyum nitrat (KNO_3)	101.11	1900
Kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	147.02	440
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	136.09	170
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	246.48	370
(B) DEMİR		
Sodyum-demir EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{FeNa}$)	367.1	36.7
(C) MİKRO ELEMENTLER		
Mangan sülfat monohidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	169.02	16
Çinko sülfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	287.54	8.6
Borik asit (H_3BO_3)	61.83	6.2
Potasyum iyodür (KI)	166.01	0.83
Sodyum molibdat dihidrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	241.95	0.25
Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	249.68	0.025
Kobalt klorür heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	237.9	0.025
(D) VİTAMİNLER		
Myo-Inositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	180.16	100
Glisin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	75.07	2
Thiamin klorid hidroklorid ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	337.27	0.1
Nikotinik asid ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	123.11	0.5
Pridoksol hidroklorid ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	205.64	0.5

Alt kültürler ile köklendirme denemeleri için yeterli mikro sürgün sayısına ulaşıldıktan sonra aseptik koşullarda alt kültürlerden alınan sürgünlerden yaklaşık 2 cm uzunlukta hazırlanan mikro çelikler önce büyümeyi düzenleyici madde içermeyen MS temel besin ortamında ve aynı inkübasyon koşullarında 10 gün süreyle tutulmuştur. Bu uygulama ile sürgün çoğaltım ortamlarında kullanılan BAP ve GA₃'ün köklenme üzerine olabilecek

olumsuz etkileri bertaraf edilmiştir (Moshkov vd. 2008, Van Staden vd. 2008). Bu aşamada besin ortamları, 250 ml'lik cam kavanozlara (kapak çapı 80 mm) 50'şer ml olarak dağıtılmıştır. Her kavanoza 100'er mikro çelik dikilmiştir.

Köklendirme denemeleri: Bu denemelerde nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mg/L dozlarında, IAA ve IBA 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L dozlarında kullanılmıştır. Tezde ayrıca Dumanoglu vd. (2013 ve 2016) tarafından daha önce bu genotipin *in vitro* köklendirilmesinde kullanılmış olan 3.0 mg/L IAA, 1.0 g/L PVA (polivinil alkol) ve 25 mg/L kazein hidrolizat uygulamasına ve herhangi bir büyümeyi düzenleyici maddenin bulunmadığı kontrole de yer verilmiştir. Köklendirme denemelerinde besin ortamı olarak %2 sakaroz ilave edilmiş, pH'sı 5.8'e ayarlanmış ve %0.7 agar içeren ½ kuvvetindeki MS temel besin ortamı esas alınmıştır. Köklendirme çalışmalarında deneme konusu olan tüm maddeler pH ayarlamasından önce bu besin ortamına ilave edilmiştir. Besin ortamları 250 ml hacmindeki kavanozlara 50'şer ml dağıtılmış ve 20 dakika süreyle 121°C'de 1 atmosfer basınç altında otoklavlanmıştır. Dikimden sonra kültürler ilk 5 günü tamamen karanlıkta olmak üzere 25±1°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 µmol·m⁻²·s⁻¹) koşullara sahip iklim odasında toplam 6 hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde mikro çeliklerde köklenme oranı (%), köklenen mikro çeliklerde köklenme düzeyi (1-4) (1= zayıf, 2= orta, 3=iyi, 4= çok iyi), kök sayısı (adet/mikro çelik), ortalama kök uzunluğu (cm) ve kallus çapı (mm) belirlenmiştir.

Köklenme oranı (%): Köklenme ortamına dikilen mikro çeliklerden köklenenlerin, dikilen mikro çelik sayısına oranlanması ile % olarak hesaplanmıştır.

Kök sayısı (adet/köklenen çelik): Köklenen her bir mikro çelikten oluşan köklerin sayılmasıyla belirlenmiştir.

Ortalama kök uzunluğu (mm): Köklenen çeliklerde bir cetvel yardımıyla her bir kökün uzunluğunun ölçülmesi ve kök sayısına bölünmesiyle saptanmıştır.

Köklenme düzeyi (1-4): Köklenmiş her bir çelik görsel olarak 1-4 skalasına (1=zayıf, 2=orta, 3=iyi, 4=çok iyi) göre değerlendirilmiştir.

Kallus çapı (mm): Köklenen çeliklerin dip kısmında oluşan kallusun çapının bir cetvel ile ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Deneme planı ve verilerin analizi: Köklendirme denemeleri, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Her tekerrürdeki mikro çelik sayısı 7 adettir. Denemeler 2 kez yinelenmiştir. Veriler, yinelemelerin ortalaması olarak varyans analizi yöntemi ile Minitab Paket Programı (MINITAB Inc.814-238-3280 WS 112102553) ile F testine ($p=0.05$) göre kontrol edilmiş, ortaya çıkan önemli farklılıklar Duncan testi ile %5 hata sınırı esas alınarak saptanmış ve farklılıklar harfler yardımıyla belirlenmiştir. Analizlerde yüzde oranların açısı değeri karşılıkları kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 ZnO Nanoparçacıklarına IAA ve IBA Yükleme Verimi

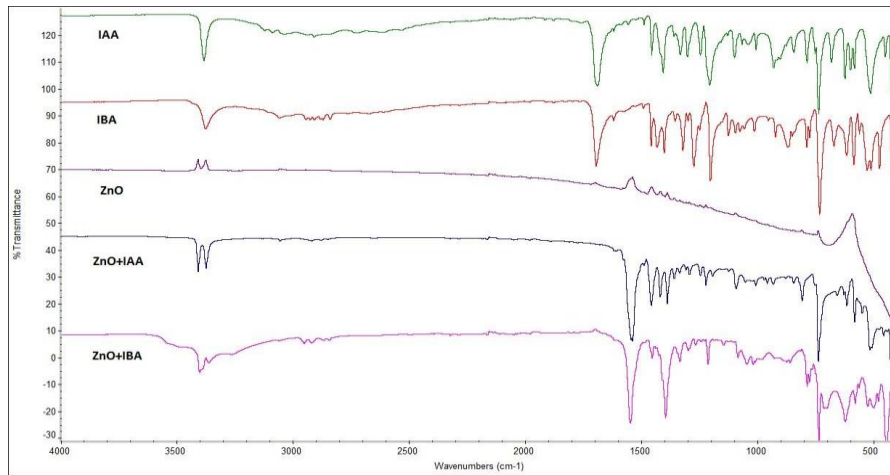
Bu çalışmada ZnO nanoparçacıklarına IAA ve IBA yükleme verimi, çözücü olarak mutlak etanolün kullanılması ve ayrıca nanoparçacıkların oksin çözeltilerinde karıştırma süresindeki artış ile birlikte yükseldiği görülmüştür (Çizelge 4.1). Mutlak etanolde çözünmüş IAA ve IBA'nın yükleme verimi 180 dakikalık karıştırma süresinde dengeye ulaşmıştır. IAA ve IBA için bu değerler sırasıyla %88 ve %86 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Farklı karıştırma zamanlarında ZnO nanoparçacıklarına IAA ve IBA yükleme verimi

Oksin	nZnO konsantrasyonu (mg/ml)	Oksin konsantrasyonu (mg/ml)	Karıştırma süresi (dakika)	Yükleme verimi (%)
Çözücü: Mutlak etanol				
IAA	3.0	3.0	30	21
			60	37
			120	55
			180	88
			240	89
IBA	3.0	3.0	30	20
			60	33
			120	57
			180	86
			240	87
Çözücü: 1N NaOH				
IAA	3.0	3.0	240	22
IBA	3.0	3.0	240	20

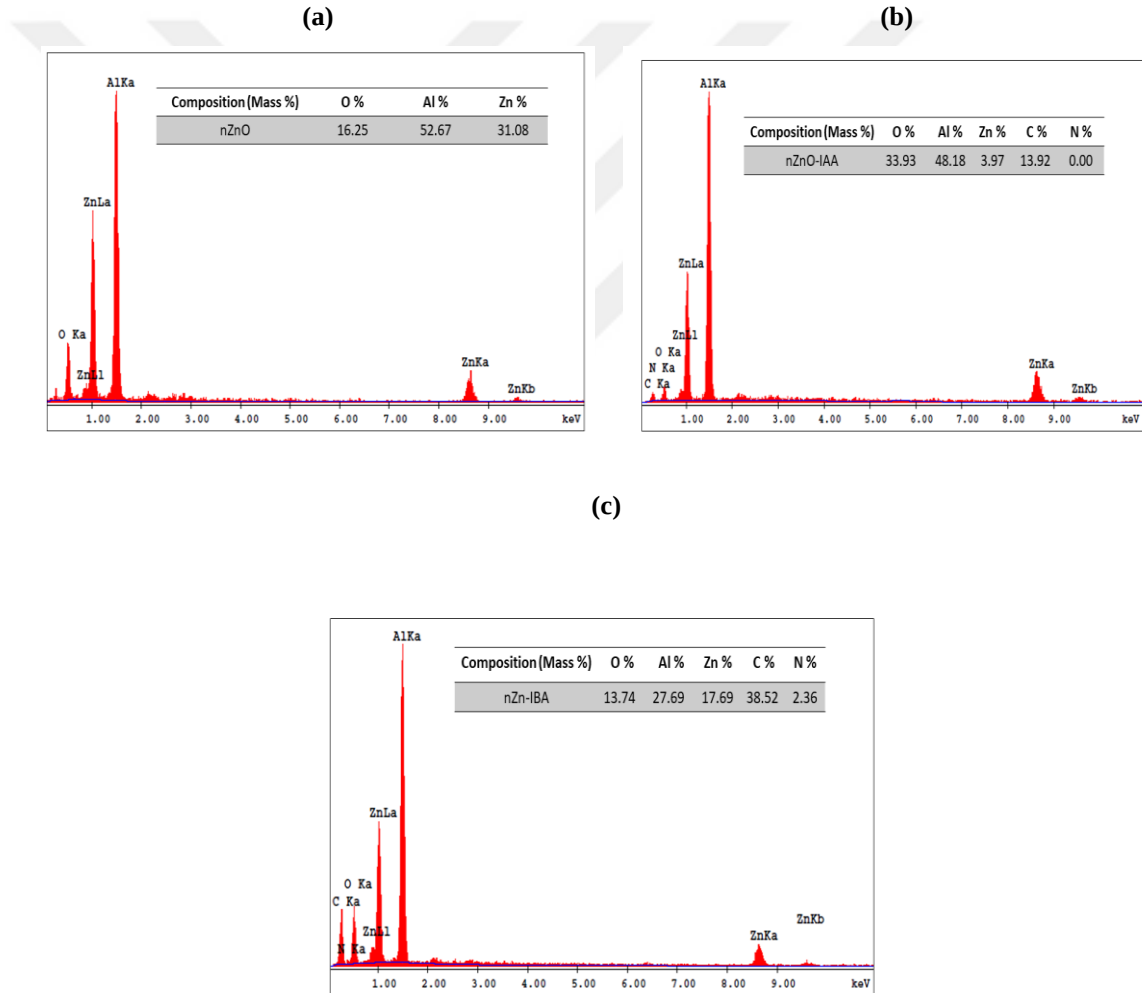
4.2 IAA ve IBA Yüklü ZnO Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

IAA ve IBA yüklü ZnO nanoparçacıkların FTIR spektroskopi analizinde IAA ve IBA için karakteristik pikler spektrumda gözlenmiştir (Şekil 4.1). IAA için 3384 cm^{-1} 'deki pik, birincil amin gruplarına, 2910 cm^{-1} ve 1688 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla asidik alkol grubuna ve karbonil grubuna ve 1406 cm^{-1} ve 1040 cm^{-1} 'deki pikler ise aromatik halkanın $\text{HC} = \text{CH}$ ve $\text{HC}-\text{CH}$ gerilme titreşimlerine karşılık gelmiştir. IBA spektrumu, birincil amin gruplarını 3376 cm^{-1} 'de gösterirken 2871 cm^{-1} 'deki pik, asitli alkol grubuna aittir. Karbonil grubu 1695 cm^{-1} 'e, 1402 cm^{-1} ve 1095 cm^{-1} 'deki pikler, aromatik halkanın $\text{HC} = \text{CH}$ ve $\text{HC}-\text{CH}$ germe titreşimlerine karşılık gelmektedir. ZnO nanoparçacıkların yüzeyindeki hidrojen bağlanmış $-\text{OH}$ gruplarına ait zayıf bir pik $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir. Zn-O deformasyon titreşimi için 673 cm^{-1} 'de daha yoğun bir pik gözlenmiştir. Tüm nZnO/oksin örnekleri için nZnO, IAA ve IBA'nın karakteristik piklerinin IAA-nZnO ve IBA-nZnO yapılarında bulunduğu görülmektedir. IAA-nZnO için $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik, ZnO nanoparçacıklarına aittir ve 3375 cm^{-1} 'deki pik, birincil amin gruplarına tahsis edilmektedir. Karbonil bandının, daha düşük bir dalga boyuna (1688 ile 1538 cm^{-1}) değişikliği, nanoparçacığın hidroksil kısımlarıyla hidrojen bağı etkileşimini göstermektedir. Aynı değişim IBA-nZnO spektrumunda da gözlenmiştir. Sonuç olarak, FTIR-ATR çalışmaları IAA ve IBA moleküllerinin nZnO parçacıklarına başarıyla yüklendiğini göstermektedir.



Şekil 4.1 IAA, IBA, IAA-nZnO ve IBA-nZnO yapılarına ait FTIR-ATR spektrumları

Diğer bir analiz olan IAA ve IBA yüklü ZnO nanoparçacıkların enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ölçümleri ile nZnO parçacıklarının yapısında bulunan çinko (%31.08) ve oksijen (%16.25) ile ilişkili pikler, nZnO'nun EDX spektrumunda açıkça görülmüştür (Şekil 4.2.a). IAA yüklü nZnO'nun ardından çinkodan kaynaklanan tepe yoğunluğu (%3.97) azalmış ve oksijen tepe noktası (%33.93) artmıştır. Ayrıca, IAA'dan gelen karbon piki (%13.92) gözlenmiştir (Şekil 4.2.b). IBA yüklü nZnO'nun ardından çinko (%17.69) ve oksijen (%13.74) piki azalmıştır. Ayrıca, karbon piki (%38.52) ve azot piki (%2.36) gözlenmiştir (Şekil 4.2.c). Bu sonuçlar IAA ve IBA oksinlerinin nZnO'ya başarıyla yüklendiğini göstermektedir.

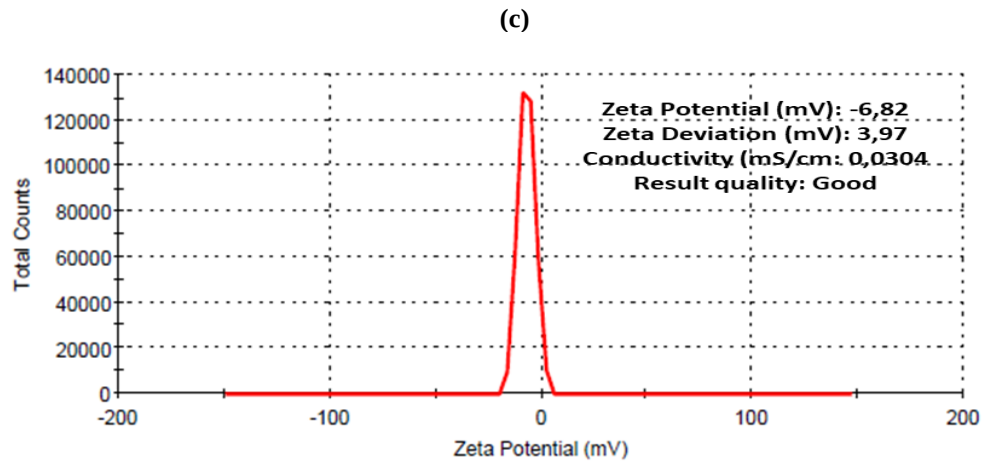
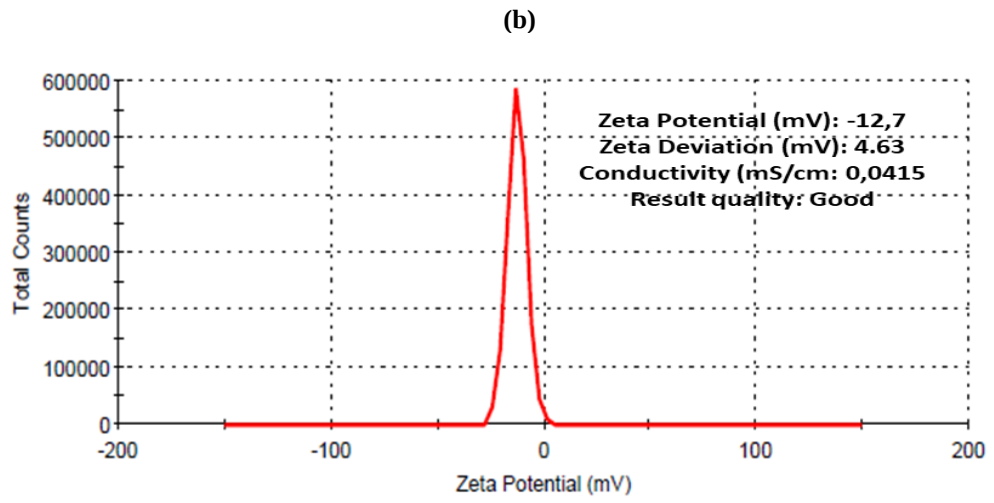
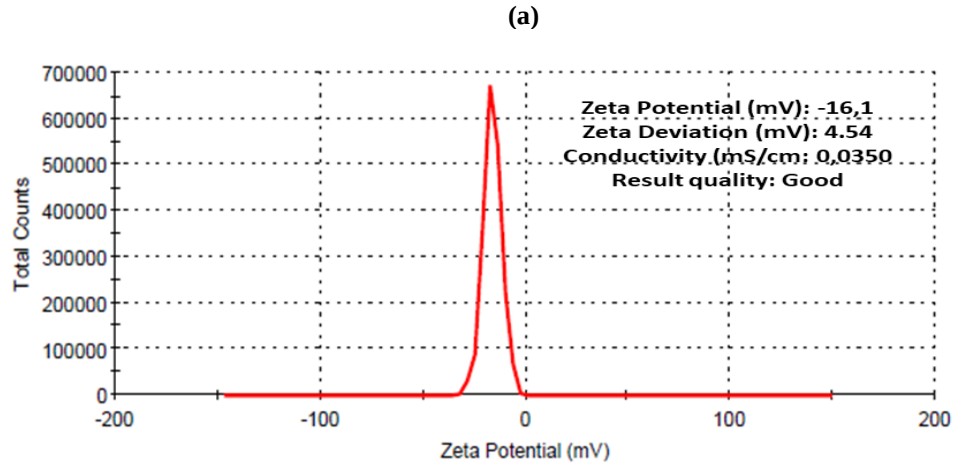


Şekil 4.2 EDX analizi sonuçları a) nZnO, b) IAA-nZnO, c) IBA-nZnO

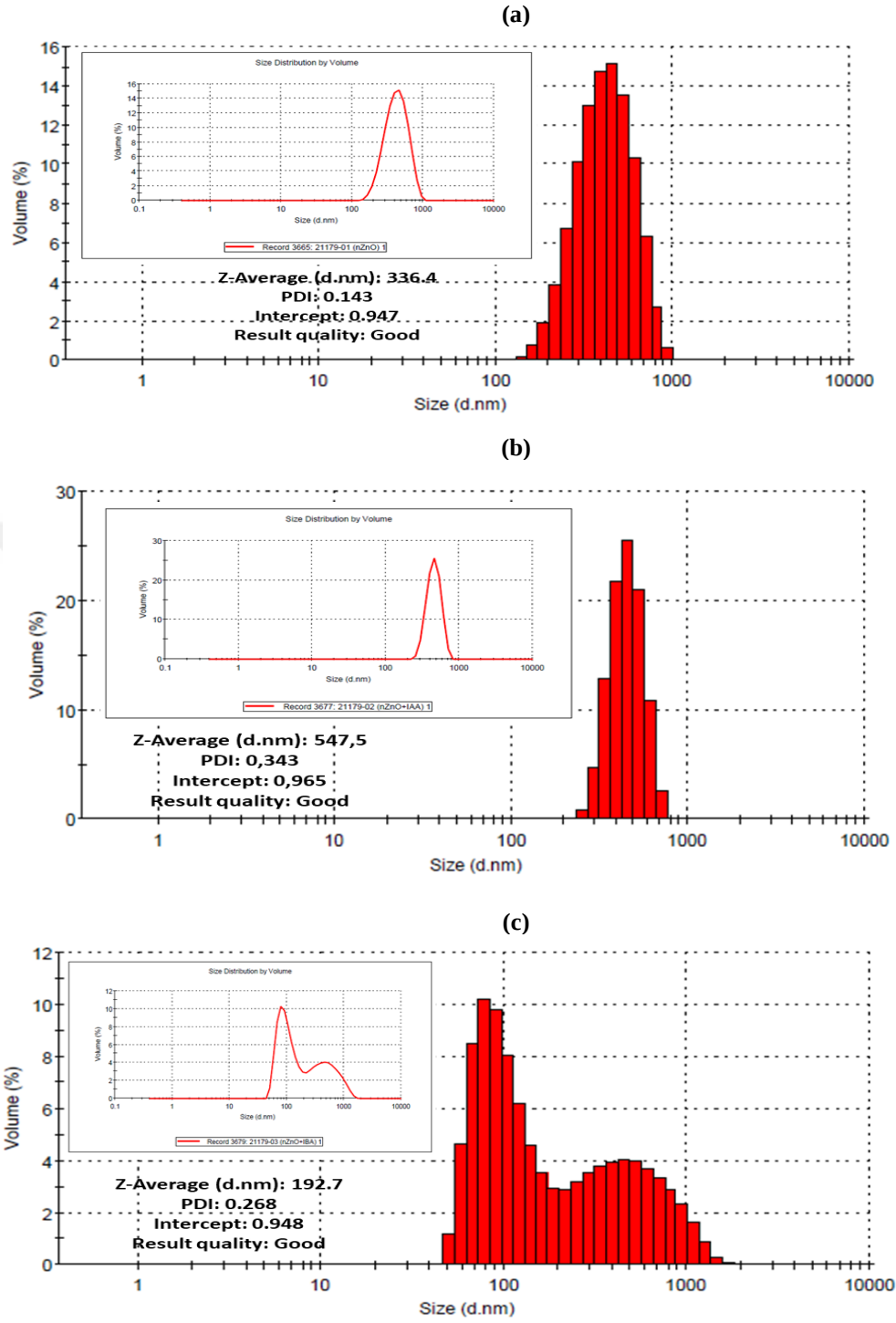
Parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyelinin ölçümü kapsamında nZnO'ların ortalama zeta potansiyel değeri -16.1 ± 4.54 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.3.a). Ayrıca, nZnO 336.4 nm'lik parçacık boyutuna ve 0.143 PDI değerine sahiptir (Şekil 4.4.a) ve dar bir parçacık boyutu dağılımını temsil etmektedir. IAA-nZnO parçacıklarının ortalama zeta potansiyel değeri -12.7 ± 4.63 (Şekil 4.3.b), parçacık boyutu 547.5 nm ve PDI değeri 0.343'dür (Şekil 4.4.b). Ayrıca, dar bir parçacık boyutu dağılımını temsil etmektedir. IBA-nZnO parçacıklarının ortalama zeta potansiyel değeri, -6.82 ± 3.97 (Şekil 4.3.c), parçacık büyüklüğü 192.7 ve PDI değeri 0.268'dir (Şekil 4.4.c) ve geniş bir parçacık boyutu dağılımını sergilemektedir. Sonuç olarak, nZnO parçacıklarının fiziksel özelliklerinin IAA ve IBA yüklenmesinden sonra hafif olarak değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.2). nZnO ve IAA/IBA yüklü nZnO arasındaki farklar, IAA ve IBA'nın nZnO'ya yüklendiğini göstermektedir.

Çizelge 4.2 nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO parçacıklarında SEM, TEM, zeta potansiyel değerleri ve parçacık boyutları

Nanoparçacık	SEM (nm)	TEM (nm)	Zeta potansiyel (mV)	Parçacık boyutu (nm)	PDI
nZnO	66.15±55.79	15±3.6	-16.1±4.54	336.4	0.143
IAA-nZnO	68.75±36.76	131±58	-12.7±4.63	547.5	0.343
IBA-nZnO	174.25±50.51	71±18	-6.82±3.97	192.7	0.268

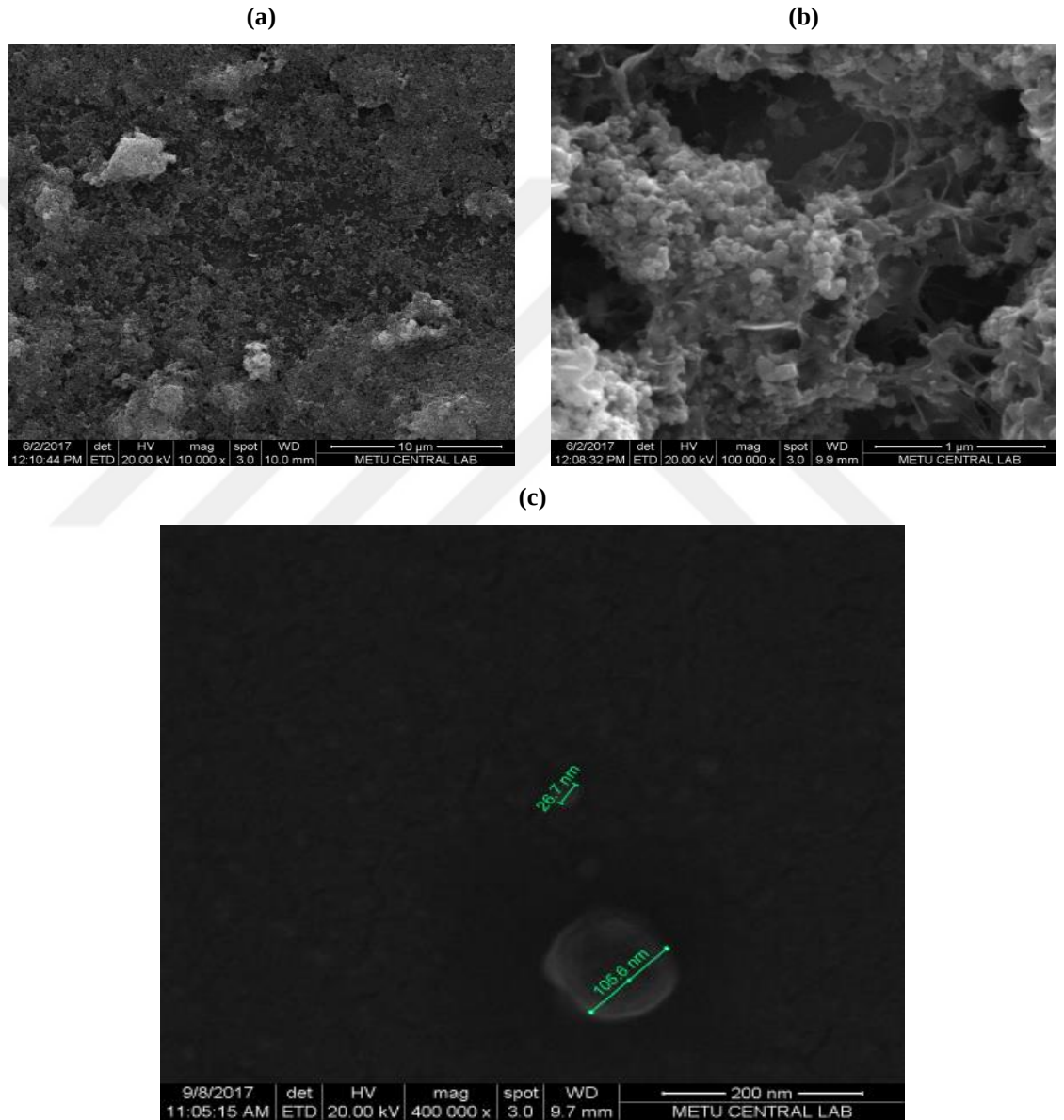


Şekil 4.3 Nanoparçacıkların ortalama zeta potansiyel değeri a) nZnO, b) IAA-nZnO, c) IBA-nZnO

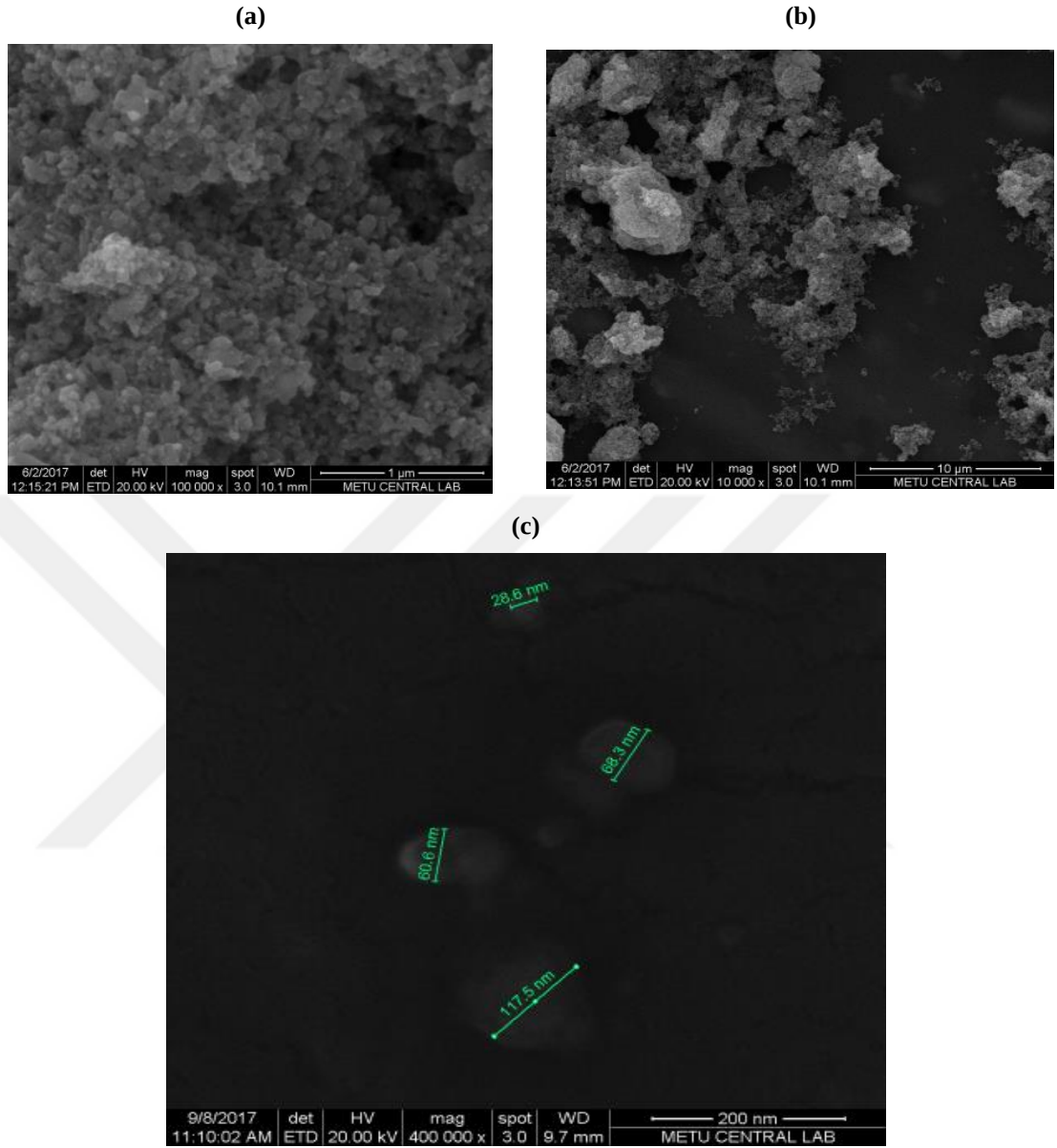


Şekil 4.4 Nanoparçacık boyutu ve PDI değerleri a) nZnO, b) IAA-nZnO, c) IBA-nZnO

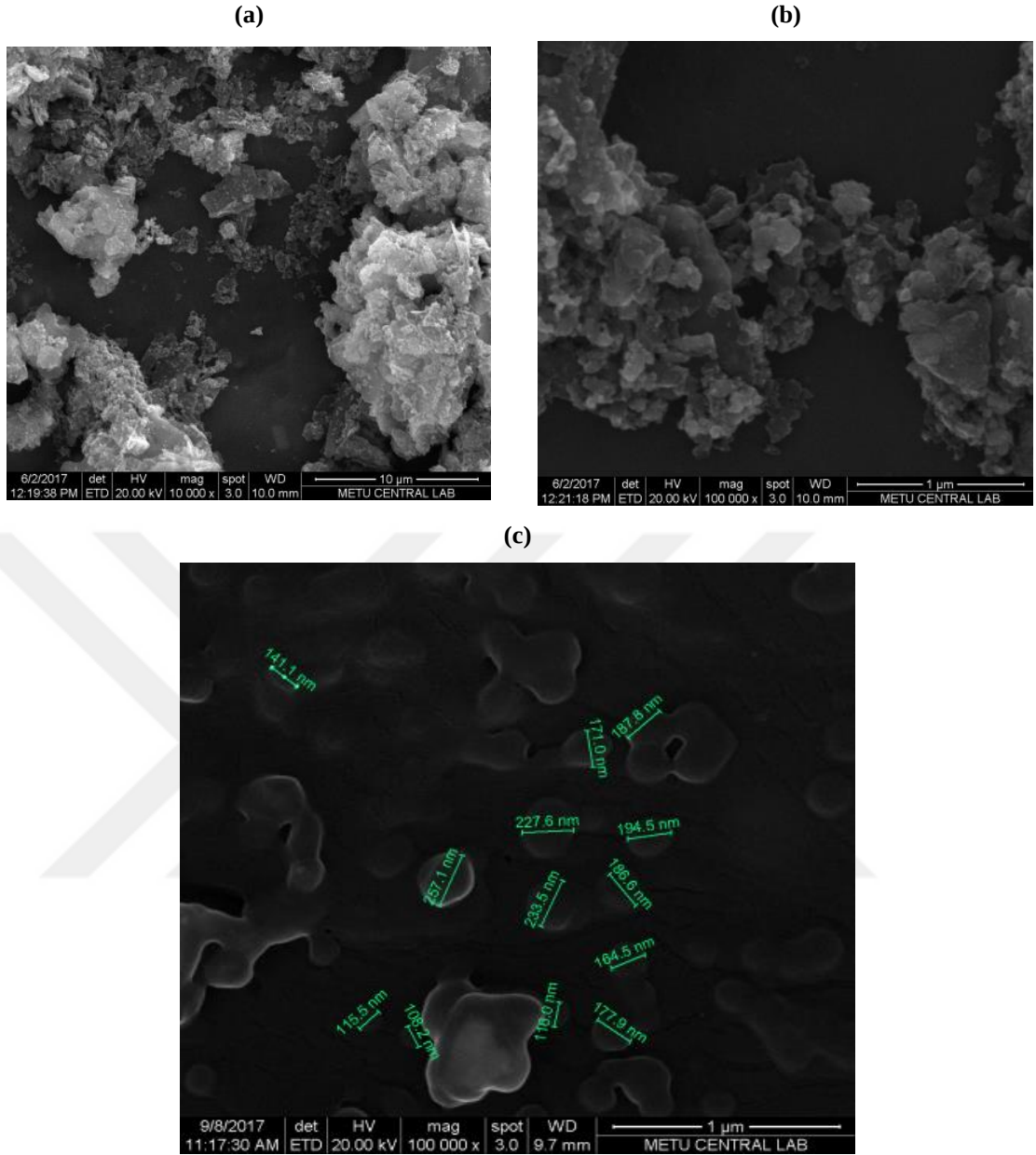
Tez çalışması kapsamında nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO parçacıklarının SEM analizi ile karakterize edilmiş morfolojileri incelendiğinde tüm nanoparçacıkların dikdörtgen, küresel ve altıgen şekiller vb. düzensiz şekilli olduğu görülmüştür. SEM görüntülerinden elde edilen nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO parçacıklarının hesaplanan ortalama büyüklükleri sırasıyla 66.15 ± 55.79 nm, 68.75 ± 36.76 nm ve 174.25 ± 50.51 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5, 4.6, 4.7).



Şekil 4.5 nZnO parçacıklarının SEM görüntüleri (a) 10000x, (b) 100000x , (c) 400000x



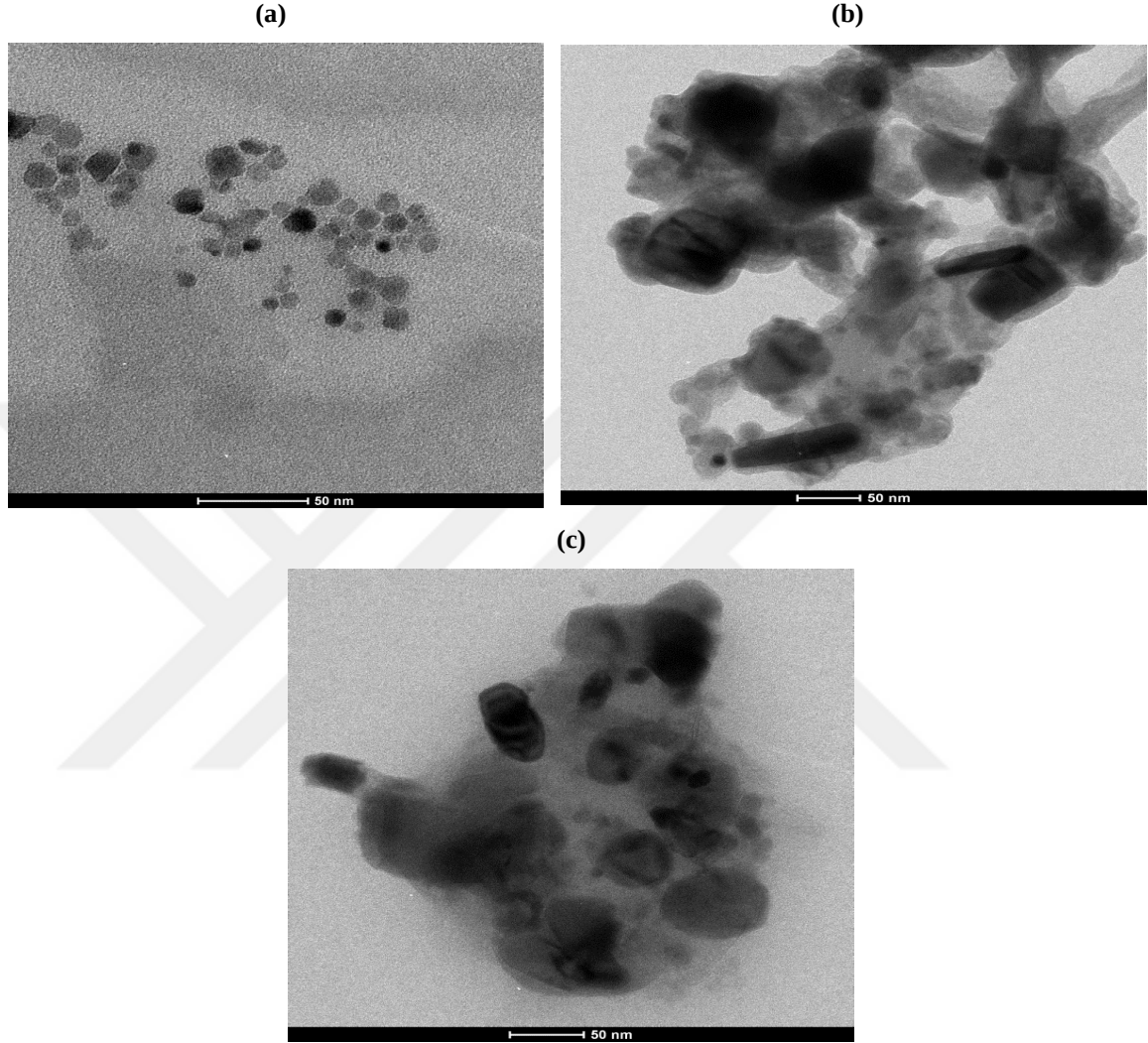
Şekil 4.6 IAA-nZnO parçacıklarının SEM görüntüleri (a) 10000x, (b) 100000x, (c) 400000x



Şekil 4.7 IBA-nZnO parçacıklarının SEM görüntüleri (a) 10000x, (b) 100000x, (c) 400000x

Çalışmada nZnO ve oksin yüklü nZnO parçacıklarının boyut dağılımı ve morfolojisi TEM görüntülerinde de incelenmiştir. TEM görüntüleri nanopartiküllerin küresel şeklini doğrulamıştır (Şekil 4.8). Nanoparçacıkların çoğu küp, dikdörtgen ve küresel şekillidir. Her iki oksinin nZnO'daki homojen moleküler dağılımı ve partikül formunda dağılmamış olduğu görülebilmektedir (Şekil 4.8). Oksinler yüklendikten sonra IAA ve IBA moleküllerinin kapsamı, IAA-nZnO ve IBA-nZnO için elde edilen TEM

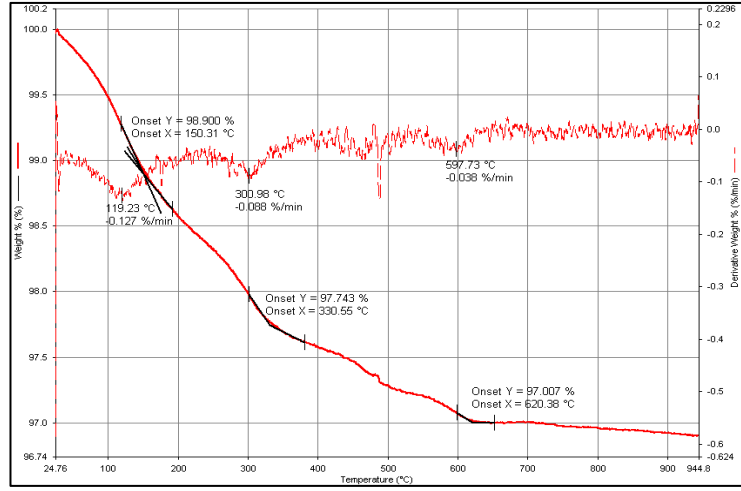
görüntülerinden kolayca ayırt edilebilmektedir (Şekil 4.8). Oksin moleküllerine atfedilen organik faz, nZnO parçacıklarını örten bir kabuk olarak açıkça görülmektedir.



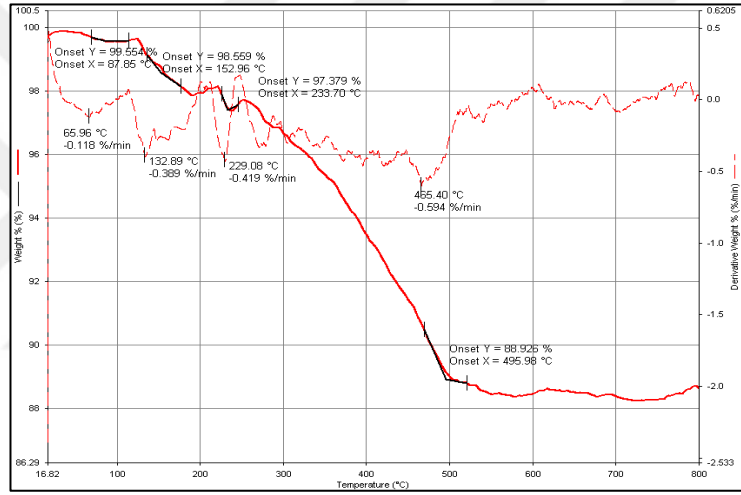
Şekil 4.8 Nanoparçacıkların TEM görüntüleri (a) nZnO, (b) IAA-nZnO, (c) IBA-nZnO

Bu çalışmada nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO parçacıklarına ait termogravimetrik analiz bulguları şekil 4.9’da sunulmuştur. nZnO parçacıklarına ait olan termogramda, yüzeyde adsorbe edilmiş su moleküllerinin buharlaşması ve hidroksil gruplarından kaynaklanan bağlı su moleküllerinin salınması nedeniyle tüm sıcaklık aralığında yaklaşık sadece %3'lük bir ağırlık kaybı görülmektedir. IAA-nZnO için 220-465°C arasındaki ağırlık kaybı IAA'nın termal bozunmasından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde, IBA'nın termal bozunması, birkaç adımda 360-521°C aralığında görülmektedir.

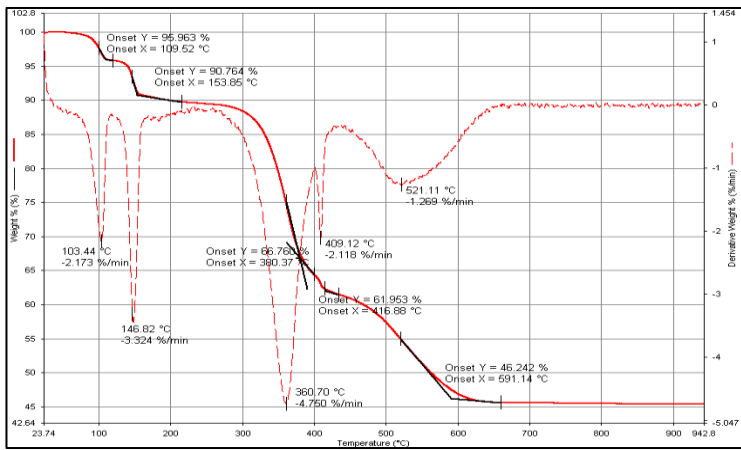
(a)



(b)

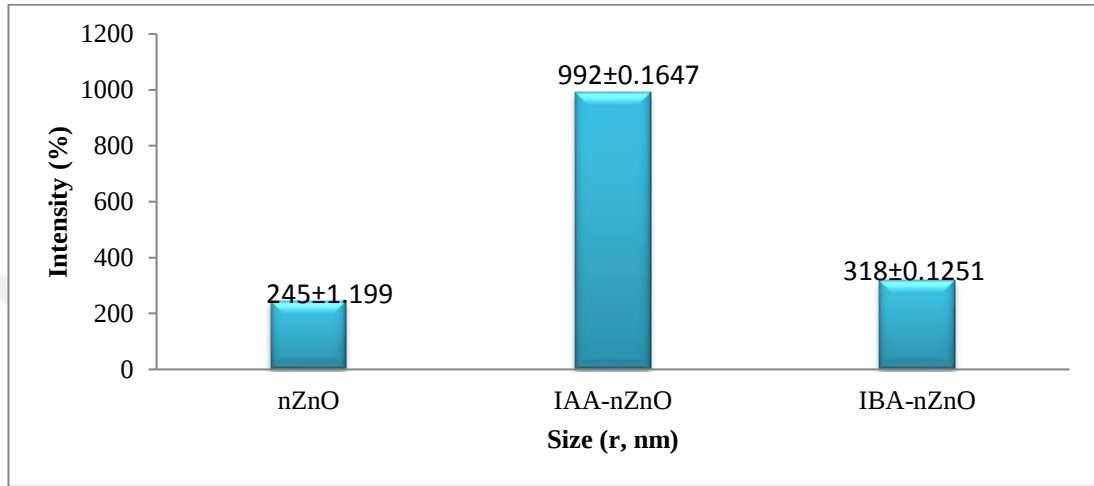


(c)



Şekil 4.9 Termogravimetrik analiz bulguları (a) nZnO, (b) IAA-nZnO, (c) IBA-nZnO

DLS sonuçları, solüsyonlardaki nZnO parçacıkların hidrodinamik boyutunun, IAA ve IBA yüklemesinden sonra arttığını göstermektedir. nZnO, IAA-nZnO ve IBA-nZnO'nun ortalama parçacık büyüklükleri sırasıyla 245 ± 1.199 nm, 992 ± 0.1647 nm ve 318 ± 0.1251 nm'dir (Şekil 4.10). Ayrıca parçacık büyüklüğü ölçümü ile pozitif korrelasyon göstermektedir.



Şekil 4.10 Nanoparçacıkların hidrodinamik boyutu (DLS sonuçları)

4.3 Mikro Çeliklerde *In Vitro* Köklendirme Bulguları

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi sahil kesimi yerel elma çeşitlerinden 67 nolu genotipin mikro çeliklerinin *in vitro* köklenmesi kapsamında köklenme oranı ($P=0.000$), köklenmiş mikro çeliklerde ortalama kök uzunluğu ($P=0.000$) ve kallus çapı ($P=0.012$) özellikleri bakımından uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Köklenme düzeyi ve ortalama kök sayısı özelliklerinde ise uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir (Çizelge 4.3).

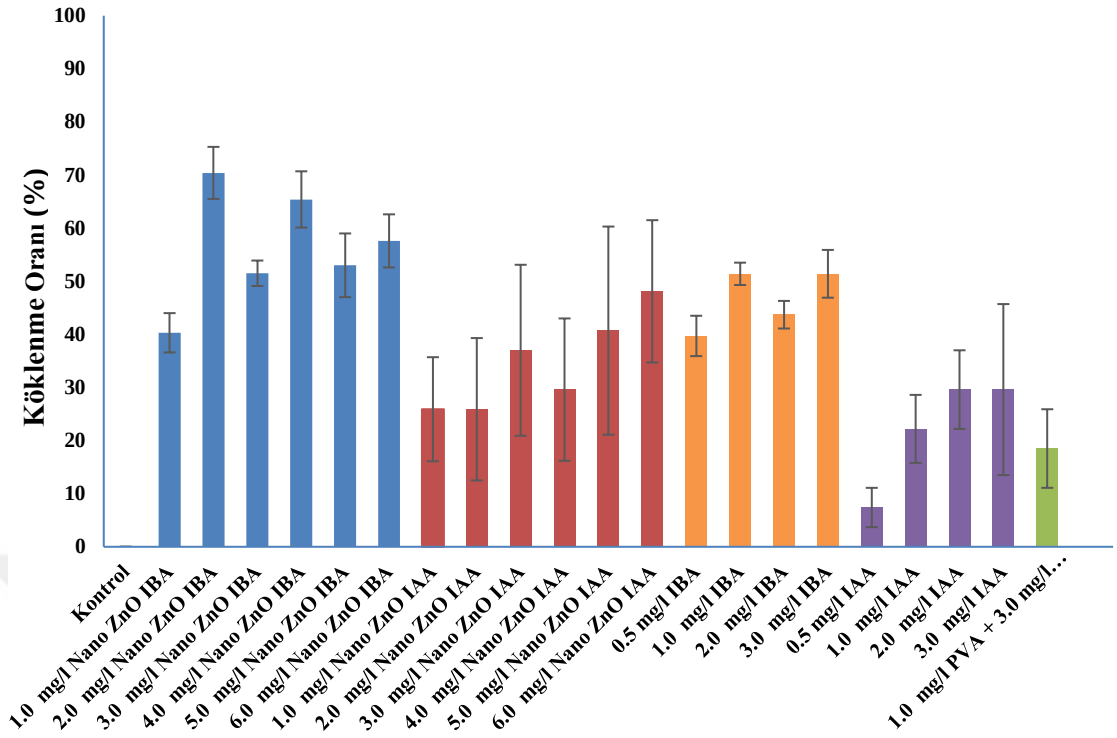
Çalışmada, kontrol ve nZnO'nun 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ve 6.0 mg/L dozlarında mikro çeliklerde köklenme meydana gelmemiştir. En yüksek köklenme oranı %70.4 ile 2.0 mg/L IBA-nZnO (0.9 mg/L IBA içermekte) uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.11 ve 4.12).

Çizelge 4.3 67 nolu elma genotipinde mikro çeliklerin *in vitro* köklenmesi üzerine IAA ve IBA ile yüklenmiş çinko oksit nanoparçacıkların etkileri

Uygulama	Miktar (mg/L)	Oksin Dozu (mg/L)	Köklenme Oranı (%)	Köklenme Düzeyi (1-4)	Kök Sayısı (adet/mikro çelik)	Kök Uzunluğu (mm)	Kallus Çapı (mm)
Kontrol	-	-	0.0±0.0 H	-	-	-	-
nZnO	1.0	-	0.0±0.0 H	-	-	-	-
	2.0	-	0.0±0.0 H	-	-	-	-
	3.0	-	0.0±0.0 H	-	-	-	-
	4.0	-	0.0±0.0 H	-	-	-	-
	5.0	-	0.0±0.0 H	-	-	-	-
	6.0	-	0.0±0.0 H	-	-	-	-
IBA-nZnO	1.0	0.5	40.3±3.7 A-F	2.0±0.4	2.6±0.7	20.4±1.6 A-E	5.1±0.3 A-D
	2.0	0.9	70.4±4.9 A	2.3±0.4	2.5±0.6	20.2±3.4 A-E	5.2±0.3 A-D
	3.0	1.4	51.5±2.4 A-E	2.2±0.7	3.5±1.4	7.2±1.7 E	6.1±0.3 A-C
	4.0	1.9	65.4±5.3 AB	1.7±0.2	2.4±0.2	7.7±1.3 E	5.7±0.3 A-C
	5.0	2.3	53.0±6.0 A-D	2.0±0.3	3.2±0.7	8.9±2.1 DE	5.9±0.2 A-C
	6.0	2.8	57.6±5.0 A-C	1.6±0.4	1.9±0.5	7.9±1.9 E	5.8±1.0 A-C
IAA-nZnO	1.0	0.5	25.9±9.8 C-G	1.9±0.5	2.4±0.8	32.4±10.9 A	4.3±0.6 B-D
	2.0	1.0	25.9±13.4 E-G	1.8±0.3	2.0±0.4	23.5±7.2 A-C	3.7±0.0 CD
	3.0	1.4	37.0±16.1 B-F	1.4±0.4	1.6±0.6	29.2±2.0 AB	3.7±0.9 CD
	4.0	1.9	29.6±13.4 C-G	1.6±0.3	2.4±0.2	22.1±5.1 A-D	4.0±1.7 CD
	5.0	2.4	40.7±19.6 A-F	2.8±0.6	2.4±0.2	10.6±3.3 C-E	4.5±0.3 A-D
	6.0	2.8	48.1±13.4 A-F	2.3±0.4	3.4±0.5	6.5±1.8 E	4.9±0.5 A-D
IBA	0.5	0.5	39.7±3.8 A-F	2.2±0.2	3.1±0.5	12.9±4.9 C-E	4.4±0.9 A-D
	1.0	1.0	51.4±2.1 A-E	1.8±0.3	2.0±0.3	12.8±5.9 C-E	5.4±0.3 A-D
	2.0	2.0	43.7±2.6 A-F	2.1±0.1	2.5±0.4	11.9±5.1 C-E	6.6±0.7 AB
	3.0	3.0	51.4±4.5 A-E	2.5±0.5	2.6±0.5	6.8±1.4 E	6.8±0.4 A
IAA	0.5	0.5	7.4±3.7 GH	1.5±0.3	1.5±0.3	17.0±8.0 B-E	3.0±1.1 D
	1.0	1.0	22.2±6.4 D-G	1.4±0.3	1.8±0.6	32.3±8.2 A	4.3±0.7 B-D
	2.0	2.0	29.6±7.4 C-F	1.8±0.8	2.5±1.5	13.7±1.8 C-E	3.9±1.1 CD
	3.0	3.0	29.6±16.1 D-G	1.2±0.1	1.2±0.1	10.0±0.7 C-E	2.9±0.4 D
PVA + IAA	1.0 g/l + 3.0 mg/l	3.0	18.5±7.4 FG	1.0±0.0	1.0±0.0	32.5±7.7 A	4.5±0.7 A-D
			P				
			0.000***	0.362^{ö.d.}	0.336^{ö.d.}	0.000***	0.012*

*Kültürler, ilk 5 gün tamamen karanlık koşullarda inkübe edilmiştir.

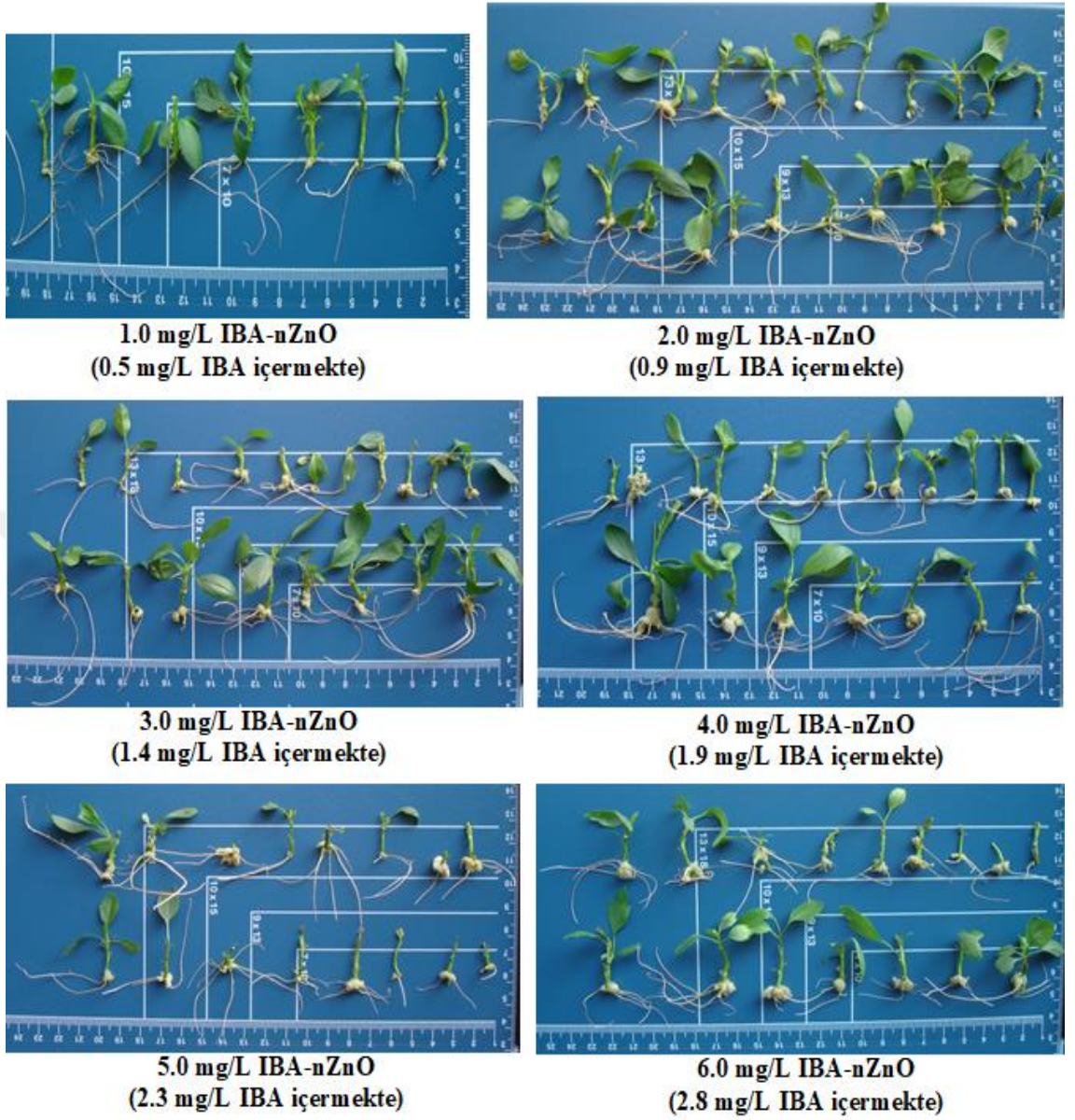
**Her sütunda Duncan testine ($P \leq 0.05$) göre aynı harflerin verildiği uygulamalar arasında istatistiksel farklılık bulunmamaktadır.



Şekil 4.11 67 nolu elma genotipinde mikro çeliklerin köklenme oranı üzerine oksinlerin ve oksinler ile yüklenmiş ZnO nanoparçacıkların etkisi

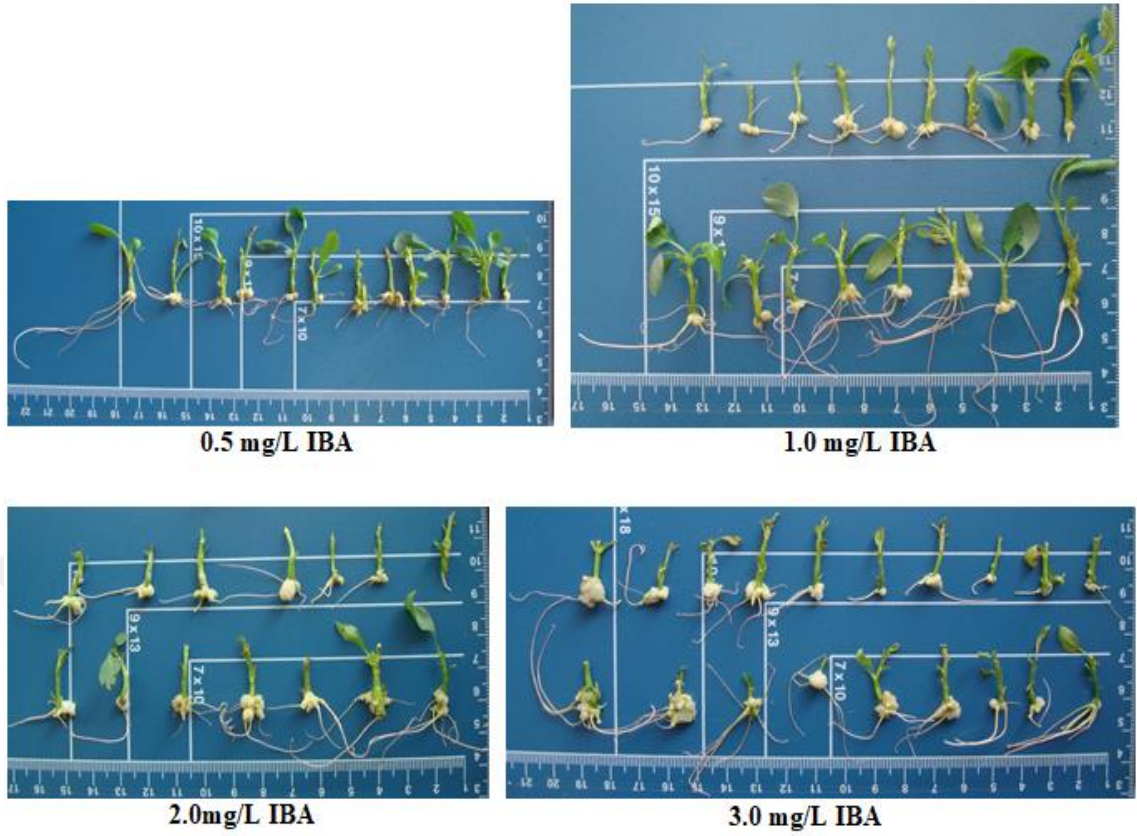
Bununla birlikte bu uygulamaya ait köklenme oranı IBA-nZnO'in diğer dozları (Şekil 4.12), IAA-nZnO'in 5.0 mg/L ve 6.0 mg/L ve IBA'nın tüm dozlarında (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L) (Şekil 4.13) belirlenen ve %39.7 ile %65.4 arasında değişen köklenme oranı değerleri ile aynı istatistik grup içerisinde yer almıştır (Çizelge 4.3).

Çalışmada, en düşük köklenme oranı %7.4 ile 0.5 mg/L IAA uygulamamasında kaydedilmiş olmakla birlikte bu uygulama ile 3.0 mg/L IAA; 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/L IAA-nZnO ve 1.0 g/L PVP+3.0 mg/L IAA uygulamaları (%18.5-%29.6 köklenme oranı) arasında bu bakımdan önemli bir farklılık bulunmamıştır. Genel olarak, IAA'nın tüm dozlarında, IAA-nZnO'in 1.0-4.0 mg/L arasındaki düşük dozlarında ve PVA+IAA uygulamasında mikro çeliklerde *in vitro* köklenme oranları bir hayli düşük oranlarda gerçekleşmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.12 67 nolu elma genotipinde IBA-nZnO parçacıkları ilave edilmiş besin ortamında köklendirilmiş mikro çelikler

Çalışmada, 67 nolu elma genotipinin 1-4 skalasında değerlendirilmiş olan köklü mikro çeliklerinde köklenme düzeyi 1.0 ± 0.0 ile 2.8 ± 0.6 ve ortalama kök sayısı 1.0 ± 0.0 ile 3.5 ± 1.4 adet arasında değişmiştir. Her iki özellik bakımından uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.3).



Şekil 4.13 67 nolu elma genotipinde IBA ilave edilmiş besin ortamında köklendirilmiş mikro çelikler

Ortalama kök uzunluğu, IBA-nZnO'nun 1.0, 2.0 mg/L; IAA-nZnO'nun 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 mg/L; IBA'nın 1.0 mg/L gibi düşük dozlarında ve 1.0 g/L PVA+3.0 mg/L IAA uygulamasında diğer uygulamalardan önemli düzeyde daha yüksek belirlenmiştir. Bu uygulamalarda ortalama kök uzunluğu 20.2 ± 3.4 mm ile 32.5 ± 7.7 mm arasında değişmiştir. Bununla birlikte diğer uygulamaların özellikle yüksek dozlarında ve IBA'nın tüm dozlarında ortalama kök uzunluğu düşük değerlerde kaydedilmiştir (6.5 ± 1.8 mm- 17.0 ± 8.0 mm) (Çizelge 4.3).

Çalışmada, IBA ve IBA-nZnO uygulamalarının yüksek dozları mikro çeliklerde kallus gelişimini artırmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.12, 4.13). PVA+IAA uygulamasında da kallus gelişimi fazla olmuştur. Bu uygulamalarda köklenmiş mikro çeliklerde kallus çapı 4.4 ± 0.9 mm ile 6.8 ± 0.4 mm arasında belirlenmiştir. Bu uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. En düşük kallus gelişimleri ise IAA ve IAA-nZnO'nun 1.0-4.0 mg/L düşük dozlarında kaydedilmiştir. Bu

uygulamalarda kallus çap değerleri 2.9 ± 0.4 mm ile 4.3 ± 0.6 mm arasında belirlenmiştir (izelge 4.3).

Köklenme oranları ve köklenmiş çeliklerde köklenme düzeyi, ortalama kök sayısı ve kök uzunluğu özellikleri bir arada değerlendirildiğinde özellikle 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L IBA-nZnO nanoparçacık uygulamaları (0.5 mg/L ve 0.9 mg/L IBA içermekte) sırasıyla %40.3 ve %70.4 köklenme oranları, 2.0 ± 0.4 ve 2.3 ± 0.4 köklenme düzeyleri, 2.6 ± 0.7 ve 2.5 ± 0.6 adet ortalama kök sayıları ve 20.4 ± 1.6 mm ve 20.2 ± 3.4 mm ortalama kök uzunlukları ile kaliteli *in vitro* bitkiciklerin üretiminde etkin uygulamalar olarak öne çıkmıştır (izelge 4.3 ve şekil 4.12).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) hastalığına yüksek düzeyde dayanıklı olan Doğu Karadeniz Bölgesi sahil kesimi yerel elma çeşitlerinden 67 nolu genotipin mikro çeliklerinin *in vitro* köklenmesi üzerine IBA ve IAA ile yüklü ZnO nanoparçacıkların etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada, IAA ve IBA, nZnO'ya başarıyla yüklenerek stabil yapıda nanoparçacıklar üretilmiştir. Oksinleri yükleme verimi, IAA ve IBA'yı çözmek üzere 1 N NaOH yerine mutlak etanolün kullanılması ile karıştırmanın 240. dakikasında %87 ve %89 düzeylerine ulaşmıştır (Çizelge 4.1). Karakeçili vd. (2019), oksin yükleme kapasitesindeki bu artışın muhtemelen yükleme ortamının polaritesindeki değişim ile ilgili olduğunu, oksin yüklemesinin olası mekanizmasının, oksinlerin nZnO yüzeyi ile hidrojen bağları arasındaki etkileşime bağlı bulunduğunu ve proton donörü ve alıcı arasındaki hidrojen bağının seçiciliğinin, oksinlerin 1N NaOH çözeltisinde çözündüğü durumda yok edilebildiğini bildirmektedir. Çalışmada nanoparçacıkların karakterizasyonu ile ilgili FTIR-ATR analizleri IAA ve IBA moleküllerinin nZnO parçacıklarına başarıyla yüklendiğini göstermiştir (Şekil 4.1). UV analizi sonucunda saf nZnO için maksimum absorpsiyon 410 nm'de gözlenmiştir (Vimala vd. 2017). IAA ve IBA için karakteristik pikleri, her iki oksin için de spektrumda gözlenmiştir. IAA için 3384 cm⁻¹'deki pik birincil amin gruplarına, 2910 cm⁻¹ ve 1688 cm⁻¹'deki pikler asidik alkol grubuna ve karbonil grubuna, 1406 cm⁻¹ ve 1040 cm⁻¹'deki pikler aromatik halkanın HC = CH ve HC-CH gerilme titreşimlerine karşılık gelmiştir (Shetti ve Nandibewoor 2009, Tian vd. 2016). Çalışmada, IBA spektrumu, birincil amin gruplarını 3376 cm⁻¹'de gösterirken 2871 cm⁻¹'deki pik, asitli alkol grubuna aittir. Karbonil grubu 1695 cm⁻¹'e, 1402 cm⁻¹ ve 1095 cm⁻¹'deki pikler, aromatik halkanın HC = CH ve HC-CH germe titreşimlerine karşılık gelmektedir (Shetti ve Nandibewoor 2009, Tian vd. 2016). ZnO nanoparçacıkların yüzeyindeki hidrojen bağlanmış -OH gruplarına ait zayıf bir pik ~3400 cm⁻¹'de gözlenmiştir. Zn-O deformasyon titreşimi için 673 cm⁻¹'de daha yoğun bir pik gözlenmiştir (Tian vd. 2017). Parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyelinin ölçümü kapsamında nZnO'ların ortalama zeta potansiyel değeri -16.1±4.54 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.3). 50 nm nZnO parçacık büyüklüğü ölçümündeki farklılık, su

içinde dağılmış nanoparçacıklarda sıklıkla karşılaşılan bir durum olup numune hazırlama sırasında parçacıkların koagülasyonundan kaynaklanmaktadır (Ghaffari vd. 2017). Şekil 4.9'da görüldüğü üzere nZnO parçacıklarına ait olan termogramda, yüzeyde adsorbe edilmiş su moleküllerinin buharlaşması ve hidroksil gruplarından kaynaklanan bağlı su moleküllerinin salınması nedeniyle tüm sıcaklık aralığında yaklaşık sadece %3'lük bir ağırlık kaybı görülmektedir (Cao vd. 2015). IAA-nZnO için 220-465°C arasındaki ağırlık kaybı IAA'nın termal bozulmasından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde, IBA'nın termal bozulması, birkaç adımda 360-521°C aralığında görülmektedir.

Oksinler ile yüklü nanoparçacıkların besin ortamına ilave edilerek mikro çeliklerin köklenmesi üzerine etkileri ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır. Ayrıca, oksinler ile yüklü çinko oksit nanoparçacıkların elmada mikro çeliklerin köklenmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışması bir ilktir. Bilindiği üzere çinko, IAA'nın triptofandan sentezinde önemli işlevlere sahip bir elementtir. Bunun yanı sıra çinkonun bitki büyümesi, gelişmesi ve veriminde önemli rol oynadığı da bilimsel verilerle ortaya konulmuştur (Mousavi vd. 2013). Çinko oksit ise eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri ile çok fonksiyonlu bir maddedir (Kolodziejczak-Radzimska ve Jesionowski 2014). Bunun ötesinde çinko oksit nanoparçacıkları, çeşitli özellikleri, işlevleri ve uygulamaları ile çok yönlü kullanılabilir malzemelerden biri olarak 21. yüzyılda öne çıkmıştır. ZnO nanoparçacıkları muazzam fiziksel ve optik özelliklere, bazı bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkilere sahiptir (Sabir vd. 2014). Tarımda, bu nanoparçacıkların bitki büyüme ve gelişimi, çimlenme, bitki besleme, hastalık ve zararlılarla mücadele gibi birçok alanda etkilerinin araştırıldığı görülmektedir (Lin ve Xing 2007, Lee vd. 2010, Shaymurat vd. 2012, Prasad vd. 2012, Burman vd. 2013, Helaly vd. 2014, Laware ve Raskar 2014, Das vd. 2015, Maithreyee ve Gowda 2015, Raliya vd. 2015, Chutipaijit 2015, Amiri vd. 2016, Dastjerdi vd. 2016, Zafar vd. 2016, Goodarzi vd. 2017, Vankova vd. 2017, Mousavi Kouhi ve Lahout 2018, Faizan vd. 2018, Kavianifar vd. 2018, Maity vd. 2018, Medina-Velo vd. 2018, Das vd. 2019, Garcia-Lopez vd. 2019, Rossi vd. 2019, Ogunyemi vd. 2019). Bu kapsamda yeni bir bakış açısıyla bu tez çalışmasında IBA ve IAA ile yüklü çinko oksit nanoparçacıkların 67 nolu yerel elma çeşidinin mikro çeliklerinin *in vitro* köklenmesi üzerine etkileri

incelendiğinde besin ortamına ilave edilen IBA-nZnO parçacıkların tüm dozlarında (1-6 mg/L) %40.3 ile %70.4 arasında değişen oranlarda, IAA-nZnO parçacıkların ise sadece 5 mg/L ve 6 mg/L dozlarında %40.7 ve %48.1 oranlarında yüksek köklenme değerleri elde edilmiştir. Karakeçili vd. (2019), mikro çelikleri zor köklenen ahlat genotipinin (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) mikro çeliklerine IAA-nZnO ve IBA-nZnO parçacıklarını 20, 40, 80, 200 ve 400 mg/L dozlarında aseptik koşullarda yavaş daldırma yöntemiyle (1 saat) uyguladıklarında 400 mg/L IBA-nZnO ve IAA-nZnO uygulanmış çeliklerde sırasıyla %50.0 ve %41.7 oranlarında en yüksek köklenme düzeyine ulaşmışlardır. Sadece nZnO uygulanmış mikro çeliklerde ise köklenme elde edememişlerdir. Bu çalışmada da sadece nZnO uygulamalarında elma mikro çeliklerinde köklenme meydana gelmemiştir. Bulgularımız, araştırmacıların bulguları ile örtüşmektedir. Bununla birlikte Helaly vd. (2014), muzda doku kültürü çalışmalarında mikro sürgünlerde kontrol uygulamasında köklenme meydana gelmezken besin ortamına ilave edilen 50, 100 ve 200 mg/L nZnO uygulamalarında %70'in üzerinde köklenme elde etmişlerdir. Bu sonuçlar, elma mikro çeliklerinde köklenme ile ilgili olarak nZnO uygulamalarından elde ettiğimiz bulgular ile uyuşmamaktadır. Bununla birlikte araştırmacıların 50-200 mg/L seviyelerindeki nZnO uygulama dozları, çalışmamızda esas aldığımız 1-6 mg/L nZnO dozlarının çok üzerindedir.

Çalışmamızda nanoparçacık uygulamaları kapsamında elma mikro çeliklerinin *in vitro* köklenmesinde en iyi köklenme oranlarının elde edildiği IBA-nZnO uygulamalarının değerleri (%40.3-%70.4), normal IBA uygulamalarının değerleri (%39.7-%51.4) ile istatistiksel anlamda benzer bulunmuştur. Bir başka ifadeyle 67 nolu elma genotipinde IBA-nZnO uygulamaları köklenme oranlarını normal IBA uygulamasından daha yüksek bir seviyeye taşımamıştır. Oysa, Karakeçili vd. (2019) tarafından zor köklenen ahlat genotipinde 400 mg/L IBA-nZnO ve IAA-nZnO uygulamaları ile köklenme başarısının, normal IAA ve IBA uygulamalarına göre en az iki kat arttığı bildirilmektedir. Ancak, bitki genotiplerinin dışında oksin ve oksin yüklü nanoparçacıkların mikro çeliklere uyulama yöntemleri de bu iki çalışmada birbirinden farklılık göstermektedir.

Bu çalışmada elma mikro çeliklerinin *in vitro* köklendirilmesinde normal IAA uygulamalarına göre IBA uygulamalarından elde edilen yüksek değerler, diğer araştırmacıların, bitkilerde köklenme üzerine IBA'nın, IAA'dan daha etkili bir oksin olduğu yönündeki bulguları ile uyumludur (Zimmerman ve Fordham 1985, Stefancic vd. 2005, Ciccotti vd. 2008). Çalışmamızda bu elma genotipinde IBA'nın tüm dozlarında (0.5-3.0 mg/L) mikro çeliklerde %39.7-%51.4 arasında köklenme sağlanmıştır. Bu oranlar IAA uygulamalarında elde edilmiş köklenme oranlarından (%7.4-%29.6) önemli düzeyde daha yüksektir (Çizelge 4.3). Zimmerman ve Fordham (1985), elma mikro çeliklerinin *in vitro* köklenmesinde IBA'nın en etkili oksin olduğunu, IAA'nın ise en az etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ciccotti vd. (2008) de mikro sürgünleri oldukça zor köklenen *Malus sieboldii* elma genotiplerinde en iyi köklenme değerlerini (%34-%100), IAA yerine 5 mg/L IBA'nın kullanıldığı uygulamadan elde etmişlerdir. Araştırmacıların bulguları, bu çalışmada ulaşılan sonuçlarla uyumludur. IBA ve IAA ile ilgili bu durum, IBA'nın, IAA'ya göre daha kararlı bir oksin olmasından dolayı köklendirme ortamında IAA'dan daha uzun bir süre varlığını korumasına, IBA'nın önemli bir kısmı bağlanmış veya IAA'ya dönüştürülmüş olsa dahi IBA'nın ortamda varlığını sürdürmesinden dolayı dokudaki gerçek IBA seviyesinin düşmemesine bağlanmıştır (Nordstrom vd. 1991, Van der Krieken vd. 1993, Stefancic vd. 2005, Frick ve Strader 2018). Ayrıca, Van der Krieken vd. (1993) elma sürgünlerinde IAA'nın IBA'dan daha hızlı bozulduğunu öne sürmektedir.

Farklı elma genotiplerinde mikro çeliklerin köklendirilmesi amacıyla çok sayıda araştırmacının çalışmalarında IBA'yı esas aldıkları ve köklenme üzerine olumlu etkilerini belirledikleri görülmektedir (Werner ve Boe 1980, Pua ve Chong 1985, Zimmerman ve Fordham 1985, Welander 1985, Alvarez vd. 1989, Standardi ve Romani 1990, Baraldi vd. 1991, Moncousin vd. 1992, Noiton vd. 1992, Harbage vd. 1993, Stimart ve Harbage 1993, Karhu ve Zimmerman 1993, Yepes ve Aldwinckle 1994, Pawlicki ve Welander 1995, Harbage ve Stimart 1996, Isutsa vd. 1998, Sharma vd. 2000, Litwinczuk 2000, Magyar-Tabori vd. 2002, Sharma vd. 2007, Ciccotti vd. 2008, Naija vd. 2009, Dumanoglu vd. 2009, Yaseen vd. 2009, Boudabous vd. 2010, Ghanbari 2014, Meneguzzi vd. 2017). Bu tez çalışmasında da IBA'nın 67 nolu elma genotipinin mikro çeliklerinin *in vitro* köklenmesi üzerine etkin rolü ortaya konulmuştur. Genel anlamda

IBA, kök apikal meristeminin, kökçüklerin, adventif köklerin oluşumu ve gelişimi üzerine kuvvetli bir etkiye sahiptir (Frick ve Strader 2018). Bu çalışmada, 0.5, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/L IBA dozlarından elde edilen köklenme bulguları arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık bulunmamıştır. Köklenme oranı %39.7 ile %51.4, köklenme düzeyi 1.8-2.5, ortalama kök sayısı 2.0-3.1 adet ve ortalama kök uzunluğu 6.8-12.9 mm arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.3). M7 elma anacının *in vitro* köklendirilmesinde Werner ve Boe (1980) da besin ortamına 1.0, 2.0 ya da 3.0 mg/L IBA ilave etmiş ve 2.0 mg/L IBA içeren ortamda 28 günde köklenme elde etmişlerdir. Pua ve Chong (1985) ise *in vitro* koşullarda Macspur elma çeşidinde mikro çeliklerde en yüksek köklenme oranını 3.0 mg/L IBA içeren ortam üzerinde %100 olarak belirlemişlerdir. Alvarez vd. (1989), M26 ve M9 elma klon anaçlarının mikro çeliklerini *in vitro* koşullarda köklendirmek üzere 0.0, 0.02, 0.2, 0.8, 2.4 ya da 3.0 mg/L dozlarında IBA'nın etkilerini araştırmışlar ve en yüksek köklenme oranları M26 anacında %100 olarak 0.8 mg/L ve M9 anacında %80 olarak 2.4 mg/L IBA uygulamalarından elde etmişlerdir. Litwinczuk (2000), M26, MM106 ve P14 yarı kuvvetli elma anaçlarının mikro çoğaltımında köklenme oranlarını 1.0 mg/L IBA ilave edilmiş ortamlarda P14 ve MM106 anaçlarında %98.5 ve %89.9, M26 anacında ise sadece %66.4 olarak belirlemişlerdir. Magyar-Tabori vd. (2002), JTE-H, M26 ve MM106 elma anaçlarının *in vitro* köklenmesinde esas aldıkları 1.0, 2.0, 3.0 mg/L IBA dozlarının tamamında JTE-H anacında %91.4-100 ve MM106 anacında %33-46 köklenme elde ederken, M26 anacında en yüksek köklenme oranına 1.0 mg/L IBA dozunda ulaşmışlardır. Boudabous vd. (2010), Douce de Djerba elma çeşidinin mikro çoğaltımı için *in vitro* köklendirme denemelerinde en yüksek köklenme değerlerini 3.0 mg/L IBA uygulamasından elde etmişlerdir. Bu uygulamada köklenme oranı %66.7, sürgün başına kök sayısı 5.9 adet ve ortalama kök uzunluğu 4.1 cm olarak belirlenmiştir. Ghanbari (2014), Azayesh-Esfahan, Morabbaee Mashhad ve M9 elma anaçlarının mikro çoğaltımında 0.5, 1.0 ve 1.5 mg/L IBA dozlarının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında tüm anaçların 1.5 mg/L IBA dozunda başarıyla köklendirildiğini, Azayesh-Esfahan'ın tüm anaçlar arasında en yüksek köklenme oranına (%48.33) sahip olduğunu bildirmişlerdir. Meneguzzi vd. (2017), Geneva® serisi yeni elma anacı G.814'ün mikro çoğaltım protokolü kapsamında köklenme aşamasında 0, 0.25, 0.50, 1, 1.5 ve 2.5 mg/L IBA'nın köklenme oranı, kök sayısı, kök

uzunluğu ve kallus gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada en iyi köklenme 1.5 mg/L IBA uygulamasında elde edilmiştir. Bu uygulama ile köklenme oranı yaklaşık %100, sürgün başına kök sayısı 2 adet ve kök uzunluğu 6 mm, kallus gelişme oranı %60 olarak kaydedilmiştir. Araştırmacılar, farklı elma genotiplerinde IBA'nın 0.5-3.0 mg/L arasında değişen dozlarında yüksek köklenme oranları elde etmişlerdir. Bu bulgular çalışmamızda 0.5-3.0 mg/L IBA dozlarından elde ettiğimiz bulgular ile büyük ölçüde uyurşmaktadır.

Bu çalışmada her ne kadar köklenme oranı bakımından normal IBA uygulamaları, IBA-nZnO uygulamaları ile birlikte yüksek değerler ortaya koymuş ise de özellikle kök gelişimi bakımından normal IBA uygulamaları, IBA-nZnO'nun 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L düzeyindeki düşük dozlarının gerisinde kalmıştır. Köklenme düzeyi ve ortalama kök sayısı bakımlarından uygulamalar arasındaki farklılıklar önemli bulunmamıştır. Kallus apı sadece normal IAA uygulamaları ve IAA-nZnO'nun düşük dozlarında küçük değerlere (2.9 ± 0.4 mm- 4.3 ± 0.6 mm) sahip olmuştur. Diğer uygulamalarda kallus gelişimi 4.4 ± 0.9 mm ile 6.8 ± 0.4 mm arasında belirlenmiştir. Normal ya da ZnO nanoparçacıklara yüklü oksinlerin özellikle düşük dozlarında aşırı bir kallus gelişimi gözlenmemiştir (şekil 4.12, 4.13). Köklü mikroeliklerde büyük kallus oluşumu kök gelişimini ve bitki kalitesini olumsuz etkilemektedir (Mokotedi vd. 2000, Gaba 2005).

Sonuç olarak, bu çalışmada köklenme oranı ve kök gelişimi verileri bir arada değerlendirildiğinde özellikle 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L IBA-nZnO uygulamaları (0.5 mg/L ve 0.9 mg/L IBA içermekte) sırasıyla %40.3 ve %70.4 köklenme oranları, 2.0 ± 0.4 ve 2.3 ± 0.4 köklenme düzeyleri, 2.6 ± 0.7 ve 2.5 ± 0.6 adet ortalama kök sayıları ve 20.4 ± 1.6 mm ve 20.2 ± 3.4 mm ortalama kök uzunlukları ile 67 nolu yerel elma çeşidinin mikro çeliklerinin *in vitro* köklenmesinde etkin uygulamalar olarak öne çıkmıştır (izelge 4.3 ve şekil 4.12). Karakeçili vd. (2019) de ZnO nanoparçacıkların zor köklenen bitkilerde köklenme kapasitesini artırmada oksin taşıyıcılar olarak tarımsal biyoteknolojide büyük bir potansiyele sahip olduğunu bildirmektedir. Bu tez çalışmasında ulaştığımız sonuç, araştırmacıların bulgusu ile uyumludur. Bu tez çalışmasında özellikle düşük dozlarda IBA ile yüklü ZnO nanoparçacıkları, köklenmesi zor olan bitkilerde sağlıklı bir kök sistemi ile birlikte mikro çeliklerin *in vitro* köklenmesi için önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abobatta, W.F. 2018. Nanotechnology application in agriculture. *Acta Scientific Agriculture*, 2(6); 99-102.
- Alvarez, R., Nissen, S.J. and Sutter, E.G. 1989. Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured *in vitro* and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid. *Plant Physiology*, 89; 439-443.
- Amirchakhmaghi, N., Hosseinpour, B. and Yousefzadeh, H. 2019. Development of a micropropagation protocol for *Malus orientalis* using axillary buds. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55; 625-634.
- Amiri, H., Mousavi, M. and Torahi, A. 2016. Improving date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. Estambaran) calogenesis by the use of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4(5); 557-563.
- Anonymous. 2018. Web Sitesi: <http://www.fao.org/faostat>. Erişim Tarihi: 25.03.2020.
- Auderset, G., Moncousin, C., O'Rourke, J. and Morre, D.J. 1996. Stimulation of root formation by thiol compounds. *HortScience*, 31(2); 240-242.
- Baraldi, R., Malavasi, F.F.F., Predieri, S. and Castagneto, M. 1991. Effect of potassium humate on apple cv. 'Golden Delicious' cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24; 187-191.
- Berk, S. ve Akkurt, İ. 2012. Nanopartikül: geleceğın korkulu rüyası. *Tuberk Toraks*, 60(2); 180-184.
- Boudabous, M., Mars, M., Marzougui, N. and Ferchichi, A. 2010. Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through *in vitro* culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica*, 157(3); 513-524.
- Burman, U., Saini, M. and Kumar, P. 2013. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95(4); 3-5.
- Chutipaijit, S., 2015. Establishment of condition and nanoparticle factors influencing plant regeneration from aromatic rice (*Oryza sativa*). *International Journal of Agriculture & Biology*, 17; 1049-1054.
- Chutipaijit, S., Whalley, A.J.S. and Sutjaritvorakul, T. 2018. *In vitro* plant growth promotion by ZnO nanomaterials in indica rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Materials Today: Proceedings*, 5; 14944-14949.

- Ciccotti, A.M., Bisognin, C., Battocletti, I., Salvadori, A., Herdemertens, M. and Jarausch, W. 2008. Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. *Agronomy Research*, 6(2); 445-458.
- Collett, L. 2011. About The Apple – *Malus domestica*. Web Sites: <https://mafiadoc.com/about-the-apple-malus-domestica-oregon-state-university>. Erişim Tarihi: 25.03.2020.
- Das, B., Debnath, K., Sarkar, K.K., Priya, B. and Mukherjee, S. 2015. Effect of different nanoparticles on germination and seedling growth in tomato. *Research on Crops*, 16(3); 542-550.
- Das, S., Yadav, A. and Debnath, N. 2019. Entomotoxic efficacy of aluminium oxide, titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.): a comparative analysis. *Journal of Stored Products Research*, 83; 92-96.
- Dastjerdi, E.B., Sahid, I.B. and Jusoh, K.B. 2016. Phytotoxicity assessment of nano-ZnO on groundnut (*Arachis hypogaea*) seed germination in MS medium. *Sains Malaysiana*, 45(8); 1183-1190.
- Davies, P.J. 2004. Introduction. The plant hormones: their nature, occurrence and function, In: *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Davies, P.J. (ed), Kluwer Academic Publishers, 1-15, Dordrecht, Boston, London.
- De Klerk, G.J., Ter Brugge, J. and Marinova, S. 1997. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49; 39-44.
- De Klerk, G.J., Van der Krieken, W. and De Jong, J.C. 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 35; 189-199.
- De Klerk, G.J., Hanecakova, J. and Jasik, J. 2008. Effect of medium-pH and MES on adventitious root formation from stem disks of apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95; 285-292.
- Diaz-Sala, C., Hutchison, K.W., Goldfarb, B. and Greenwood, M.S. 1996. Maturation-related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: the role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. *Physiologia Plantarum*, 97(3); 481-490.
- Dobranszki, J., Magyar-Tabori, K., Jambor-Benczur, E., Lazanyi, J., Bubán, T. and Szalai, J. 2000. Influence of aromatic cytokinins on shoot multiplication and their after-effects on rooting of apple cv. Husvete rozmaring. *International Journal of Horticultural Science*, 6(4); 84-87.

- Dodds, J.H. and Roberts, L.W. 1993. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, 231, New York.
- Druart, P. 1997. Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biologia Plantarum*, 39(1); 67-77.
- Dumanoglu, H., Aygün, A. ve Erdoğan, V. 2009. Elma genotiplerinin mikro çoğaltımında farklı amonyum nitrat düzeylerinin sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2(1); 177-182.
- Dumanoglu, H., Aygün, A., Erdoğan, V., Serdar, Ü., Kalkışım, Ö., Baştaş, K. ve Maden, S. 2013. Doğu Karadeniz Bölgesi sahil kuşağındaki elma genetik materyalinin, kara leke ve ateş yanıklığı hastalıklarına dayanıklılık, geç çiçeklenme ve meyve özellikleri bakımından değerlendirilmesi. TÜBİTAK Proje No: 109O197; Ankara.
- Dumanoglu, H., Aygün, A., Erdoğan, V., Serdar, Ü., Kalkışım, Ö., Pakyürek, M.A., Güler, G., Baştaş, K. ve Maden, S. 2016. Doğu Karadeniz Bölgesi sahil kuşağındaki elma genetik materyalinin mikro çoğaltım potansiyelinin belirlenmesi. VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 25-29 Ağustos 2015, Çanakkale. Bahçe, 45 (Özel Sayı: VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri - Meyvecilik); 80-84.
- Ercisli, S. 2004. A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51; 419-435.
- Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S.T. and Hayat, S. 2018. Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*, 56(2); 678-686.
- Frick, E.M. and Strader, L.C. 2018. Roles for IBA-derived auxin in plant development. *Journal of Experimental Botany*, 69(2); 169-177.
- Gaba, V.P., 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development, In: *Plant Development and Biotechnology*. Trigiano, R.N. and Gray, D.J. (eds), CRC Press, 87-89, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
- Garcia-Lopez, J.I., Nino-Medina, G., Olivares-Saenz, E., Lira-Saldivar, R.H., Barriga-Castro, E.D., Vazquez-Alvarado, R., Rodriguez-Salinas, P.A. and Zavala-Garcia, F. 2019. Foliar application of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate boosts the content of bioactive compounds in habanero peppers. *Plants*, 8, 254; 1-20.
- Ghaffari, S.B., Sarrafzadeh, M.H., Fakhroueian, Z., Shahriari, S. and Khorramizadeh, M.R. 2017. Functionalization of ZnO nanoparticles by 3-mercaptopropionic acid for aqueous curcumin delivery: synthesis, characterization, and anticancer assessment. *Materials Science and Engineering C*, 79; 465-472.

- Ghanbari, A. 2014. Impacts of plant growth regulators and culture media on *in vitro* propagation of three apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 3(1); 11-20.
- Goldfarb, B., Hackett, W.P., Furnier, G.R., Mohn, C.A. and Plietzsch, A. 1998. Adventitious root initiation in hypocotyl and epicotyl cuttings of eastern white pine (*Pinus strobus*) seedlings. Physiologia Plantarum, 102(4); 513-522.
- Goodarzi, G.R., Noor, V.P and Ahmadloo, F. 2017. Effects of nanoparticle treatments on propagation of *Prunus mahaleb* L. by seed. Journal of Forest Science, 63(9); 408-416.
- Harbage, J.F., Stimart, D.P. and Evert, R.F. 1993. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. Journal of the American Society for Horticultural Science, 118(5); 680-688.
- Harbage, J.F. and Stimart, D.P. 1996. Effect of pH and 1*H*-indole-3-butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings. Journal of the American Society for Horticultural Science, 121(6); 1049-1053.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, Jr.F.T. and Geneve, R.L. 2011. Plant Propagation: Principles and Practices (8th Edition). Prentice-Hall, 915, Boston.
- Helaly, M.N., El-Metwally, M.A., El-Hoseiny, H., Omar, S.A., El-Sheery, N. I. 2014. Effect of nanoparticles on biological contamination of *in vitro* cultures and organogenic regeneration of banana. Australian Journal of Crop Science, 8(4); 612-624.
- Horikoshi, S. and Serpone, N. 2013. Introduction to nanoparticles, In: Microwaves in Nanoparticle Synthesis, First Edition. Horikoshi, S. and Serpone, N. (eds), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany.
- Isutsa, D.K., Pritts, M.P. and Mudge, K.W. 1998. A protocol for rooting and growing apple rootstock microshoots. Fruit Varieties Journal, 52(2); 107-116.
- James, D.J. 1983. Adventitious root formation '*in vitro*' in apple rootstocks (*Malus pumila*) II. Uptake and distribution of indol-3yl-acetic acid during the auxin-sensitive phase in M.9 and M.26. Physiologia Plantarum, 57(1); 154-158.
- Karakeçili, A., Korpavev, S., Dumanoglu, H. and Alizadeh, S. 2019. Synthesis of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid loaded zinc oxide nanoparticles: effects on rhizogenesis. Journal of Biotechnology, 303; 8-15.
- Karhu, S.T. and Zimmerman, R.H. 1993. Effect of light and coumarin during root initiation of rooting apple cultivars *in vitro*. Advances in Horticultural Science, 7(1); 33-36.

- Kavianifar, S., Ghodrati, K., Naghdi Badi, H. and Etminan, A. 2018. Effects of nano elicitors on callus induction and mucilage production in tissue culture of *Linum usitatissimum* L. Journal of Medicinal Plants, 17(67); 45-54.
- Kepenek, K. and Karoğlu, Z. 2011. The effects of paclobutrazol and daminozide on *in vitro* micropropagation of some apple (*Malus domestica*) cultivars and M9-rootstock. African Journal of Biotechnology, 10(24); 4851-4859.
- Keresa, S., Mihovilovic Bosnjak, A., Baric, M., Habus Jercic, I., Sarcevic, H. and Bisko, A. 2012. Efficient axillary shoot proliferation and *in vitro* rooting of apple cv. 'Topaz'. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40(1); 113-118.
- Kolodziejczak-Radzimska, A. and Jesionowski, T. 2014. Zinc oxide-from synthesis to application: a review. Materials, 7; 2833-2881.
- Korasick, D.A., Enders, T.A. and Strader, L.C. 2013. Auxin biosynthesis and storage forms. Journal of Experimental Botany, 64(9); 2541-2555.
- Lane, W.D. and McDougald, J.M. 1982. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. Canadian Journal of Plant Science, 62(3); 689-694.
- Laware, S.L. and Raskar, S. 2014. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth, flowering and seed productivity in onion. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(7); 874-881.
- Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.C., Braam, J. and Alvarez, P.J.J. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. Environmental Toxicology and Chemistry, 29(3); 669-675.
- Li, F., Sun, C., Li, X., Yu, X., Luo, C., Shen, Y. and Qu, S. 2018. The effect of graphene oxide on adventitious root formation and growth in apple. Plant Physiology and Biochemistry, 129; 122-129.
- Lin, D. and Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environmental Pollution, 150; 243-250.
- Litwinczuk, W. 2000. Efficiency of a double-phase medium in micropropagation of semi-dwarf apple rootstocks M.26, MM.106 and P 14. Journal of Fruit Ornamental Plant Research (Poland), VIII(3-4); 97-106.
- Luby, J.J. 2003. Taxonomic classification and brief history, In: Apples, Botany, Production and Uses. Ferree D.C. and Warrington I.J. (eds), CABI Publishing, 1-14, Cambridge.
- Machakova, I., Zazimalova, E. and George, E.F. 2008. Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors, In: Plant Propagation by

- Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds), Springer, 175-204, Dordrecht, The Netherlands.
- Magyar-Tabori, K., Dobranszki, J., Jambor-Benczur, E., Lazanyi, J., Szalai, J. and Ferenczy, A. 2002. Effects of indole-3-butyric acid levels and activated charcoal on rooting of *in vitro* shoots of apple rootstocks. *International Journal of Horticultural Science*, 8(3-4); 25-28.
- Maithreyee, M.N. and Gowda, R. 2015. Influence of nanoparticles in enhancing seed quality of aged seeds. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 48(2); 310-313.
- Maity, A., Natarajan, N., Vijay, D., Srinivasan, R., Pastor, M. and Malaviya, D.R. 2018. Influence of metal nanoparticles (NPs) on germination and yield of oat (*Avena sativa*) and berseem (*Trifolium alexandrinum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences*, 88(2); 595-607.
- Medina-Velo, I.A., Zuverza-Mena, N., Tamez, C., Ye, Y., Hernandez-Viezcas, J.A., White, J.C., Peralta-Videa, J.R. and Gardea-Torresdey, J.L. 2018. Minimal transgenerational effect of ZnO nanomaterials on the physiology and nutrient profile of *Phaseolus vulgaris*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6; 7924-7930.
- Meneguzzi, A., Gonçalves, M.J., Camargo, S.S., Grimaldi, F., Weber, G.C. and Rufato, L. 2017. Micropropagation of the new apple rootstock 'G. 814'. *Ciência Rural*, Santa Maria, 47(6); 1-5.
- Modgil, M. and Thakur, M. 2017. *In vitro* culture of clonal rootstocks of apple for their commercial exploitation. *Acta Horticulturae*, 1155; 331-336.
- Mokotedi, M.E.O., Watt, M.P., Pammenter, N.W. and Blakeway, F.C. 2000. *In vitro* rooting and subsequent survival of two clones of a cold-tolerant *Eucalyptus grandis* x *E. nitens* hybrid. *HortScience*, 35(6); 1163-1165.
- Moncousin, C., Ribaux, M., O'Rourke, J. and Gavillet, S. 1992. Effects of type of carbohydrate during proliferation and rooting of microcuttings of *Malus Jork 9*. *Agronomie*, 12(10); 775-781.
- Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A. and George, E.F. 2008. Plant growth regulators III: gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds, In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. George, E.F., Hall, M.A. and De Clark, G.J. (eds), Springer, 227-281, Dordrecht, The Netherlands.
- Mousavi, S.R., Galavi, M. and Rezaei, M. 2013. Zinc (Zn) importance for crop production – a review. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(1); 64-68.

- Mousavi Kouhi, S.M. and Lahouti, M. 2018. Application of ZnO nanoparticles for inducing callus in tissue culture of rapeseed. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(2); 133-141.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3); 473-497.
- Nagy, J.K. and Sule, S. 2006. Optimization of rooting of *in vitro* propagated *Malus x domestica* 'Pinova'. *Acta Horticulturae*, 725: 431-434.
- Naija, S., Elloumi, N., Ammar, S., Kevers, C. and Dommès, J. 2009. Involvement of polyamines in the adventitious rooting of micropropagated shoots of the apple rootstock MM106. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 45; 83-91.
- Noiton, D., Vine, J.H. and Mullins, M.G. 1992. Effects of serial subculture *in vitro* on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in microcuttings of 'Jonathan' apple. *Plant Growth Regulation*, 11; 377-383.
- Nordstrom, A.C., Jacobs, F.A. and Eliasson, L. 1991. Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology*, 96; 856-861.
- Ogunyemi, S.O., Abdallah, Y., Zhang, M., Fouad, H., Hong, X., Ibrahim, E., Masum, M.M.I., Hossain, A., Mo, J. and Li, B. 2019. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1); 341-352.
- Orlikowska, T. 1992. Effects of mineral composition and acidity of media, saccharose level, brand and quantity of agar on rooting of fruit rootstocks *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 34 (1-2); 45-52.
- Papstein, F. and Sedlak, J. 2015. Micropropagation of Czech apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 1083; 267-271.
- Pawlicki, N. and Welander, M. 1995. Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Science*, 106(2); 167-176.
- Podwyszynska, M. and Cieslinska, M. 2018. Rooting shoots of apple varieties and their tetraploids obtained by the *in vitro* technique. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 17(1); 49-62.
- Pop, T.I., Pamfil, D. and Bellini, C. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1); 307-316.

- Prasad, T.N.V.K.V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Raja Reddy, K., Sreeprasad, T.S., Sajanalal, P.R. and Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6); 905-927.
- Pua, E.C. and Chong, C. 1985. Regulation of *in vitro* shoot and root regeneration in 'Macspur' apple by sorbitol (D-glucitol) and related carbon sources. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110(5); 705-709.
- Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* spp. *Acta Horticulturae*, 78; 437-442.
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W.N. and 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; 1584-1594.
- Rossi, L., Fedenia, L.N., Sharifan, H., Ma, X. and Lombardini, L. 2019. Effects of foliar application of zinc sulfate and zinc nanoparticles in coffee (*Coffea arabica* L.) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135; 160-166.
- Sabir, S., Arshad, M. and Chaudhari, S.K. 2014. Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications. *The Scientific World Journal*, 2014; 1-8.
- Sauer, M., Robert, S. And Kleine-Vehn, J. 2013. Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64(9); 2565-2577.
- Selby, C., Kennedy, S. and Harvey, B. 1992. Adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr.—the influence of plant growth regulators. *New Phytologist*, 120(4); 453-457.
- Sharma, M., Modgil, M. and Sharma, D.R. 2000. Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38; 1236-1240.
- Sharma, T., Modgil, M. and Thakur, M. 2007. Factors affecting induction and development of *in vitro* rooting in apple rootstocks. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45; 824-829.
- Shaymurat, T., Gu, J., Xu, C., Yang, Z., Zhao, Q, Liu, Y. and Liu, Y. 2012. Phytotoxic and genotoxic effects of ZnO nanoparticles on garlic (*Allium sativum* L.): a morphological study. *Nanotoxicology*, 6(3); 241-248.
- Shetti, N.P. and Nandibewoor, S.T. 2009. Kinetic and mechanistic investigations on oxidation of L-tryptophan by diperiodatocuprate(III) in aqueous alkaline medium, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 223(3); 299-317.

- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Firoz, M. and Al-Khaishany, M.Y. 2015. Role of nanoparticles in plants, In: Nanotechnology and Plant Sciences. Siddiqui, M., Al-Whaibi, M. and Mohammad, F. (eds), 19-35, Springer, Cham.
- Sriskandarajah, S., Mullins, M.G. and Nair, Y. 1982. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. Plant Science Letters, 24(1); 1-9.
- Sriskandarajah, S., Skirvin, R.M. and Abu-Qaoud, H. 1990. The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21; 185-189.
- Standardi, A. and Romani, F. 1990. Effects of some antioxidants on *in vitro* rooting of apple shoots. HortScience, 25(11); 1435-1436.
- Stefancic, M., Stampar, F. and Osterc, G. 2005. Influence of IAA and IBA on root development and quality of *Prunus* 'GiSelA 5' leafy cuttings. HortScience, 40(7); 2052-2055.
- Stimart, D.P. and Harbage, J. F. 1993. Growth of rooted 'Gala' apple micro cuttings *ex vitro* as influenced by initial adventitious root count. HortScience, 28(6); 664-666.
- Şengel-Türk, C.T. ve Haşçıçek, C. 2009. Polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzey modifikasyonu. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 38(2); 137-154.
- Thangavelu, R.M., Gunasekaran, D., Jesse, M.I., S.U, M.R., Sundarajan, D. and Krishnan, K. 2018. Nanobiotechnology approach using plant rooting hormone synthesized silver nanoparticle as “nanobullets” for the dynamic applications in horticulture – an *in vitro* and *ex vitro* study. Arabian Journal of Chemistry, 11(1); 48-61.
- Tian, H., Gao, J., Li, H., Boyd, S.A. and Gu, C. 2016. Complete defluorination of perfluorinated compounds by hydrated electrons generated from 3-indole-acetic-acid in organomodified montmorillonite. Scientific Reports, 6(32949); 1-9.
- Tian, B., Liu, S., Zhang, Y., Li, C. and Wang, Z. 2017. Hydrophilic, mesoporous structural ZnO nanospheres for pH-triggered release of drug. Materials Letters, 188; 165-168.
- Van der Krieken, W.M., Breteler, H., Visser, M.H.M. and Mavridou, D. 1993. The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system. Plant Cell Reports, 12; 203-206.
- Van Staden, J., Zazimalova, E. and George, E.F. 2008. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists, In: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A. and De Clark, G.J. (eds), 205- 226, Dordrecht, The Netherlands.

- Vankova, R., Landa, P., Podlipna, R., Dobrev, P.I., Prerostova, S., Langhansova, L., Gaudinova, A., Motkova, K., Knirsch, V. and Vanek, T. 2017. ZnO nanoparticle effects on hormonal pools in *Arabidopsis thaliana*. Science of the Total Environment, 593-594; 535-542.
- Walkey, D.G. 1972. Production of apple plantlets from axillary-bud meristems. Canadian Journal of Plant Science, 52; 1085-1087.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F.J. and Kopittke, P.M. 2016. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. Trends in Plant Science, 21(8); 699-712.
- Webster, C.A. and Jones, O.P. 1989. Micropropagation of the apple rootstock M.9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenization *in vitro*. Journal of Horticultural Science, 64(4); 421-428.
- Webster, C.A. and Jones, O.P. 1991. Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple. Journal of Horticultural Science, 66(1); 1-6.
- Welander, M. 1985. *In vitro* shoot and root formation in the apple cultivar Åkerö. Annals of Botany, 55(2); 249-261.
- Werner, E.M. and Boe, A.A. 1980. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. HortScience, 15(4); 509-510.
- Wertheim, S.J. and Webster, A.D. 2003. Propagation and nursery tree quality, In: Apples, Botany, Production and Uses. Ferree D.C. and Warrington I.J. (eds), CABI Publishing, 125-151, Cambridge.
- Yaseen, M., Ahmad, T., Abbasi, N.A. and Hafiz, I.A. 2009. Assessment of apple rootstocks M 9 and M 26 for *in vitro* rooting potential using different carbon sources. Pakistan Journal of Botany, 41(2); 769-781.
- Yepes, L.M. and Aldwinckle, H.S. 1994. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. Plant Growth Regulation, 15; 55-67.
- Zafar, H., Ali, A., Ali, J.S., Haq, I.U. and Zia, M. 2016. Effect of ZnO nanoparticles on *Brassica nigra* seedlings and stem explants: growth dynamics and antioxidative response. Frontiers in Plant Science, 7(535); 1-8.
- Zimmerman, R.H. and Fordham, I.M. 1985. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 110(1); 34-38.