Research Journal of Biology Sciences
E-ISSN: 1308-0262 14(2): 206-211, 2021
Research Article

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNİN DOĞAL TETRAPLOİD *Trifolium pratense* L. TOHUMLARININ ÇİMLENMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Havva Karahan [1,a], Hatice Çölgeçen [1,b]

[1] *Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak, Türkiye*

**Corresponding Author:*
E-mail: havva01030@gmail.com

(Received 12th November 2021; accepted 29th November 2021)

a: ORCID 0000-0003-0518-6265, b: ORCID 0000-0001-8246-4279

ÖZET. Nanopartiküllerin kullanımı, ekonomik anlamda olumlu etkilerinden dolayı birçok sektörde dikkat çeken bir konu haline gelmiştir. Gümüş nanopartiküller tohum çimlenmesi, bitki büyümesi, fotosentetik verimliliğin artması ve bitki hastalıklarının kontrolünde antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (17.053 µg L^{-1}, 34.104 µg L^{-1} ve 51.156 µg L^{-1}) hazırlanan biyosentez ürünü olan AgNP'nin doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. tohum çimlenmesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Biyosentez ürünü olan AgNP'nin; tohumların çimlenme yüzdesi, ortalama çimlenme süresi ve kök uzunluğu üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda AgNP'ler çimlenme parametreleri ve büyüme özellikleri açısından farklı tepki göstermiştir. 17.053 µg L^{-1}, 34.104 µg L^{-1} ve 51.156 µg L^{-1} AgNP konsantrasyonlarına yanıt olarak bitkinin çimlenme yüzdesi kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla; %3, %8 ve %13 artmıştır. Aynı zamanda kök, hipokotil ve kotiledon gelişiminde önemli bir artış gözlenmiş ve ortalama çimlenme süresi kısalmıştır.

Anahtar Kelimeler: *İn vitro çimlendirme, Doğal Tetraploid, Trifolium pratense L., Gümüş Nanopartikülü.*

GİRİŞ

Nanopartiküllerin absorpsiyonu, translokasyonu, birikimi, biyotransformasyonu ve toksisitesi konusunda çeşitli bitki türleri için farklı görüşler bildirilmiştir. Gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) yüksek bitkiler üzerindeki etkisi, bitkilerin türüne ve yaşına, nanopartiküllerin boyutu ve konsantrasyonuna, sıcaklık gibi fiziksel koşullara bağlıdır. Örneğin, 10 mg/L AgNP *Hordeum vulgare*' nin tohum çimlenmesini engellediği, keten (*Linum usitatissimum*) ve arpada (*Hordeum vulgare*) sürgün uzunluğunu azalttığı bildirilmiştir [1]. 0.2-1,6 mg L^{-1} arasındaki AgNP konsantrasyonunun *Brassica nigra*'da tohum çimlenmesi, lipaz aktivitesini inhibe ettiği ve *Brassica nigra*' nın çimlenen tohumlarında ve fidesinde şeker içeriğini azalttığı bulunmuştur [2]. Bununla birlikte, AgNP'lerin daha yüksek konsantrasyonlarında bile *Ricinus communis* L. [3] ve *Vicia faba*'nın [4] tohum çimlenmesi, kök uzunluğu veya sürgün uzunluğu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Diğer çalışmalar AgNP'lerin *Brassica juncea* [5], *Phaseolus vulgaris* veya *Zea mays*'ın [6] büyümesini desteklediğini göstermiştir. *Boswellia ovalifoliolata* [7] ve *Pennisetum glaucum*' un [8] tohum çimlenmesi üzerinde AgNP'lerin olumlu etkisi bildirilmiştir. AgNP'lerin etkisi birçok bitki türü için araştırılmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda (17.053 µg L-1, 34.104 µg L-1 ve 51.156 µg L-1) hazırlanan biyosentez ürünü olan AgNP'lerin; doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. tohumlarının çimlenme yüzdesi, ortalama çimlenme süresi, çimlenme hızı ve kök, hipokotil, kotiledon uzunluğu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.' nin 15 günlük aseptik fideleri bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında yetiştirilmiştir. Fideler 10' ar g tartılıp 100 ml saf su ile 80°C' lik su banyosunda 150 rpmde 1 saat çalkalanmıştır. Ekstrakt oda sıcaklığına geldikten sonra filtre kâğıdı (Whatman No. 1) kullanılarak süzülmüştür ve bir cam şişeye aktarılarak +4°C'de saklanmıştır. Hazırlanan ekstrakttan 10 ml alınıp üzerine 1 mM 100 ml gümüş nitrat ($AgNO_3$) stok solüsyonu eklenerek biyosentez başlatılmıştır. Biyosentez ürünlerinin kantitatif analizi ICP-MS ile yapılmıştır.

Tohum ve Kültür Ortamı

Doğal tetraploid *T. pratense* L. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Biyoloji Bölümü deneme bahçesinde yetiştirilmiştir. Tohum ekimi için in vitro MS tohum çimlendirme ortamı hazırlanmıştır. Biyosentez ürünü olan AgNP' lerin farklı konsantrasyonları (17.053 µg L^{-1}, 34.104 µg L^{-1} ve 51.156 µg L^{-1}) MS besi yerine eklenmiştir. MS ortamları 121°C' de 20 dk otoklavlanmıştır ve 17x9x9 cm cam kavanozlara her kavanozda yaklaşık 200 ml olacak şekilde ortamlar dökülmüştür.

Tohum Çimlendirme ve Büyüme

Deneme bahçesinde yetiştirilen ve senelik toplanan doğal tetraploid *T. pratense* L. tohumları önce %96'lık etonelde 1 dakika bekletilmiştir, daha sonra %10' luk sodyumhipoklorit (NaOCl) çözeltisi ile 10 dakika muamele edilmiştir [9]. 3 kez steril distile su ile yıkanarak tohumların yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Tohumlar her bir tohum çimlendirme ortamına 5 adet olacak şekilde ekilmiştir. Tohumlar çimlendikten sonra 15 gün boyunca 24±2°C ve 16/8-saatlik bir fotoperyodla inkübe edilmiştir. Çimlenme yüzdesi, çimlenen tohum sayısı, kök, hipokotil ve kotiledon uzunluğu kaydedilmiştir.

Son çimlenme yüzdesi, deney sonunda toplam çimlenen tohum sayısına göre hesaplanmıştır. Çimlenme parametreleri için aşağıdaki denklemler kullanılmıştır:

(1) Çimlenme Yüzdesi (%) = (Gf/n) × 100

Gf, deney sonunda çimlenen tohumların toplam sayısıdır. n, çalışmada kullanılan toplam tohum sayısıdır.

(2) Ortalama Çimlenme Süresi = Σ NiDi/n

Ni, i. güne kadar çimlenen tohum sayısıdır ve

Di, çalışmanın başlangıcından i'ye kadar geçen gün sayısıdır.

n, çimlenen tohumların toplam sayısıdır.

(3) Çimlenme Hızı = Σ Ni/ΣTiNi

Ni, Ti zamanında yeni çimlenen tohumların sayısıdır.

İstatistik

Tüm denemeler 3 kez tekrarlanmıştır. Çimlenme yüzdesi, ortalama çimlenme süresi ve çimlenme hızı arasındaki farklılıklar Microsoft Office 2013 Excel programından yararlanılarak yapılmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda AgNP uygulamasının doğal tetraploid *T. pratense* L. tohum çimlenmesi ve fide büyümesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubunda doğal tetraploid *T. pratense* L. tohumlarında ilk çimlenme 3 gün sonra gerçekleşmiştir. Biyosentez ürünü olan AgNP ile hazırlanan tohum çimlendirme ortamlarında ilk çimlenme 24 saat sonra olmuştur.

Tohumların çimlenme yüzdesi kontrol grubunda %57, 17.053 µg L^{-1} AgNP' de %60, 34.104 µg L^{-1} AgNP' de %65, ve 51.156 µg L^{-1} AgNP' de %70' dir. Tohumların çimlenme süresi kontrol grubunda 1.3 günde birken AgNP konsantrasyonları ile muameleden sonra 14.4 saatte bir çimlenme gözlenmiştir. AgNP konsantrasyonları ile muameleden sonra tohumların çimlenme hızı kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Tohumlar için en yüksek çimlenme hızı 51.156 µg L^{-1} AgNP' li MS ortamında gerçekleşmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *Farklı konsantrasyonlarda AgNP' nin çimlenme yüzdesi ve ortalama çimlenme zamanına etkisi.*

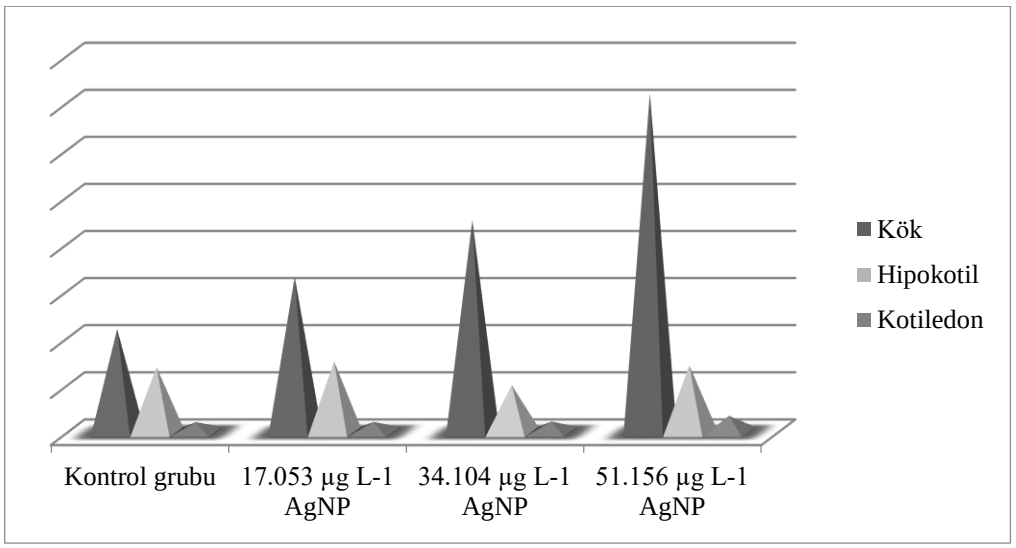
Doğal tetraploid *T. pratense* L. tohumları	**Kontrol grubu**	**17.053 µg L^{-1}**	**34.104 µg L^{-1}**	**51.156 µg L^{-1}**
Çimlenme yüzdesi (%)	57	60	65	70
Ortalama çimlenme zamanı (gün)	1.3	0.6	0.6	0.6

Farklı konsantrasyonlarda AgNP' li ortamlarda yetişen aseptik fidelerin büyüme ve gelişimi kök, hipokotil ve kotiledon gelişimi açısından incelenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Biyosentez ürünü olan AgNP' lerin farklı konsantrasyonlarının doğal tetraploid T. pratense L. fideleri üzerindeki etkisi. a. kontrol grubu, b. 17.053 µg L^{-1} AgNP., c. 34.104 µg L^{-1} AgNP ve d. 51.156 µg L^{-1} AgNP.*

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek büyüme oranı 51.156 µg L^{-1} AgNP içeren ortamda (%229 kökte ve (%62,7 kotiledonda) gerçekleşmiştir. Buna karşın hipokotiledonda en yüksek büyüme oranı %9 ile 17.053 µg L^{-1} AgNP içeren ortamda belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *Farklı konsantrasyonlarda AgNP'lerin doğal tetraploid T. pratense L. aseptik fidelerinin farklı organlarına etkisi.*

SONUÇ

AgNP'ler ürün verimini artırmak için tarımda kullanılmaktadır. Bu çalışma doğal tetraploid *T. pratense* L. tohumlarının çimlenme yüzdesi, ortalama çimlenme süresi ve çimlenme hızı özellikleri açısından farklı konsantrasyonlarda AgNP'lerin farklı tepkileri olduğunu göstermiştir. Doğal tetraploid *T. pratense* L. tohumlarının çimlenme yüzdesini arttırmak için 51.156 μg L^{-1} AgNP konsantrasyonu yeterlidir. Daha yüksek AgNP konsantrasyonlarının bitkide toksisiteye yol açabileceği düşünülmektedir.

Savithramma vd., (2012) AgNP'lerin *Boswellia ovailifoliolata* tohumlarının çimlenme yüzdesini önemli ölçüde artırdığını ancak çimlenme süresini de artırdığını gözlemlemiştir [7]. Geisler-Lee vd., (2013) *Arabidopsis thaliana'* da ve Abdel-Azeem ve Elsayed (2013) *Vicia faba*' da tohum çimlenmesinin AgNP'lerden etkilenmediğini bulmuştur [4] [8]. Bizim çalışmamızda ise biyosentez ürünü olan AgNP' ler tohumun çimlenme yüzdesi ve çimlenme süresini olumlu etkilemiştir.

AgNP' lerin tohum testasına nüfuz etmesi ve tohum çimlenme süreci üzerinde olumlu bir etki göstermesi yapılan bu denemeden ve literatür çalışmalarından çıkarılabilecek bir sonuçtur. AgNP' lerin tohum çimlenme mekanizmaları üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalara dayanarak, AgNP' lerin tohumlarda su emilimini, redüktaz enzimleri seviyelerini, tohumların su emme yeteneklerini arttırması, tohum antioksidan sistemlerini geliştirmesi mümkündür. AgNP' lerin hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri ve malonildialdehit içeriğini azaltarak stresi azalttığı ve bazı enzimlerin (süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz ve katalaz gibi) aktivitelerini arttırdığı bulunmuştur [9]. Bu bilgiden yola çıkarak AgNP' lerin bazı bitki türlerinin tohum çimlenmesini iyileştirdiği düşünülebilir.

KAYNAKLAR

[1] El-Temsah, Y.S., Joner, E.J. (2012): Impact Of Fe And Ag Nanoparticles On Seed Germination And Differences İn Bioavailability During Exposure İn Aqueous Suspension And Soil. Environmental Toxicology, 27: 42-49.

[2] Amooaghaiea, R., Tabatabaeia, F., Ahadia, A. (2015): Role Of Hematin And Sodium Nitroprusside İn Regulating *Brassica nigra* Seed Germination Under Nanosilver And Silver Nitrate Stresses. Ecotoxicology and Environmental Safety, 113: 259-270.

[3] Yasur, J., Rani, P.U. (2013): Environmental Effects Of Nanosilver: İmpact On Castor Seed Germination, Seedling Growth, And Plant Physiology. Environmental Science and Pollution Research, 20(12): 8636-48.

[4] Abdel-Azeem, E.A., Elsayed, B.A. (2013): Phytotoxicity Of Silver Nanoparticles On *Vicia faba* Seedlings. SCI Journal, 6(12): 148-156.

[5] Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M.G., Saradhi, P.P., Khanna, P.K., Arora, S. (2012): Silver Nanoparticle-Mediated Enhancement İn Growth And Antioxidant Status Of *Brassica juncea*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 167: 2225-33.

[6] Salama, H.M.H. (2012): Effects Of Silver Nanoparticles İn Some Crop Plants, Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) And Corn (*Zea mays* L.). International Research Journal of Biotechnology, 3: 190-197.

[7] Savithramma, N., Ankanna, S., Bhumi, G. (2012): Effect Of Nanoparticles On Seed Germination And Seedling Growth Of *Boswellia ovalifoliolata*-An Endemic And Endangered Medicinal Tree Taxon. Nano Vision, 2(1, 2 &3): 61-68.

[8] Parveen, A., Rao, S. (2014): Effect Of Nanosilver On Seed Germination And Seedling Growth İn *Pennisetum glaucum*. Journal of Cluster Science, 26(3): 693-701.

[9] Çölgeçen, H., Büyükkartal, H.N., Toker, M.C. (2008): In Vitro Germination And Structure Of Hard Seed Testa Of Natural Tetraploid *Trifolium pratense* L.. African Journal of Biotechnology, 7 (10): 1473-1478.

[10] Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., Li, K. (2013): Phytotoxicity, Accumulation And Transport Of Silver Nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. Nanotoxicology, 7(3): 323-337.

[11] Lei, Z., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C. (2008): Antioxidant Stress İs Promoted By Nano-Anatase İn Spinach Chloroplasts Under UV-B Radiation. Biological Trace Element Research, 121: 69-7.