



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

***IN VITRO* ORTAMDA YETİŞTİRİLEN BUĞDAYIN
MİKROYAPISAL ANALİZLERİNİN SPEKTROSKOPİK ve
MİKROSKOBİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Merve SİRKECİ

Fizik Anabilim Dalı

Atom ve Molekül Fiziği Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Feyza GÜZELÇİMEN**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayşe ŞEN**

Haziran, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 28.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Fizik Anabilim Dalı, Atom ve Molekül Fiziğı Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Feyza GÜZELÇİMEN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Orkun YAYCILI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Şeyma PARLATAN
İstinye Üniversitesi
Sağık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneliği olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

--

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında bilgisi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan, pes etmemeyi öğreten, yol gösteren ve tez çalışmam boyunca gösterdiği her türlü destek, ilgi ve yardımdan dolayı çok değerli hocam ve tez danışman hocam Doç. Dr. Feyza GÜZELÇİMEN'e en içten dileklerle sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek Lisans tezimin altyapısını oluşturmamızda ve biyokimyasal deneylerin yapılması aşamasında hem teorik hem de deneysel konularda bana destek veren tez eş danışmanım Doç. Dr. Ayşe ŞEN'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışmanın Boğaziçi Üniversitesi Fizik Bölümü'ndeki Medikal Görüntüleme Laboratuvarı'nda (BUMILAB) Taramalı Akustik Mikroskopisi ve Raman Spektroskopisi ile deneylerin yapılabilmesi için olanak sağlayan laboratuvar sorumlusu Prof. Dr. Mehmet Burçin ÜNLÜ'ye ve yapılan deneyler sırasında hem verdikleri bilgiler hem de göstermiş oldukları ilgilerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Bükem TANÖREN'e, Dr. Uğur PARLATAN'a ve Melita PARLAK'a çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden itibaren bilgi ve tecrübelerini hiçbir suretle esirgemeyen her zaman pozitif yaklaşıma sahip olan İstanbul Üniversitesi öğretim üyelerinden saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Gönül BAŞAR'a ve Prof. Dr. İpek Kanat ÖZTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim. Bilgi ve düşünceleri ile her zaman bana destek olan İstanbul Üniversitesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Barış KINACI'ya çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Doğukan BİNGÖL'e ve Ezgi BARIŞ'a teşekkür ederim. Canım arkadaşım Dilara ÇETİNKAYA BULUT'a destekleri için çok teşekkür ederim.

Yaşamım ve tüm eğitim hayatım boyunca her an desteklerini hissettiğim her zaman yanımda olan anneme, babama, kardeşime, teyzeme ve hayatta her zaman dik durmayı öğreten sevgili anneanneme sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2021

Merve SİRKECİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. BUĞDAY	3
2.2. DOKU KÜLTÜRÜ	4
2.3. TUZLULUK STRESÖRÜ	6
2.4. SPEKTROSKOPİK VE MİKROSKOBİK TEKNİKLER.....	9
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	12
3.1. DENEY MATERYALLERİNİN ELDESİ.....	12
3.2. <i>IN-VITRO</i> ŞARTLARDA DOKU KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASI VE FARKLI KONSANTRASYONLARDA TUZ UYGULANMASI.....	12
3.2.1. Besi Ortamının Hazırlanması	12
3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu.....	14
3.2.3. Eksplantların Elde Edilmesi ve Kültür Ortamına Ekimi	14
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZ YÖNTEMLERİ	15
3.3.1. MDA Miktarının Belirlenmesi	15
3.3.2. Klorofil ve Karotenoid Miktarlarının Belirlenmesi.....	15
3.4. RAMAN SPEKTROSKOPİSİ	16
3.5. TARAMALI AKUSTİK MİKROSKOPİSİ	19
4. BULGULAR.....	24
4.1. FARKLI KONSANTRASYONLARDA TUZ UYGULAMASININ BUĞDAY GELİŞİMİNE ETKİSİ.....	24
4.2. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER	26
4.2.1. MDA Miktarı.....	26

4.2.2. Klorofil ve Karotenoid Miktarları	27
4.3. RAMAN ÖLÇÜMLERİ.....	28
4.4. TAM ÖLÇÜMLERİ.....	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
5.1. DOKU KÜLTÜRÜ ORTAMINDA TUZ UYGULAMASI VE BUĞDAY BİTKİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ANALİZİ.....	41
5.2. RAMAN SONUÇLARININ ANALİZİ	45
5.3. TAM SONUÇLARININ ANALİZİ	53
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ	69



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Buğday (<i>Triticum aestivum</i> L.) bitkisinin sistematigi (Kurtuluş, 2019).....	3
Şekil 2.2: Bitkilerin maruz kaldığı abiyotik ve biyotik stres etmenleri (Lichtenthaler, 1996; Jena ve diğ., 2020).....	6
Şekil 3.1: Çalışmamızda kullanılan Selimiye çeşidine ait buğday tohumlarının görünümü.....	12
Şekil 3.2: Buğday embriyolarının besiyere yerleştirilmesi.....	14
Şekil 3.3: Rayleigh, Stokes ve Anti-Stokes enerji geçişlerinin şematik gösterimi (Jablonski diyagramı).....	18
Şekil 3.4: Raman spektroskopisi deney düzeneğinin şematik gösterimi.....	19
Şekil 3.5: Akustik empedans modunda TAM kurulumunun şeması.....	20
Şekil 3.6: Akustik empedans ölçümünün çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi.....	20
Şekil 3.7: TAM deney düzeneğinin şematik diyagramı.....	22
Şekil 4.1: Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan 4 haftalık Selimiye çeşidine ait buğday kültürlerinin görünümü.....	25
Şekil 4.2: Raman Spektroskopisi deney düzeneği.....	29
Şekil 4.3: a) Raman tarama tablası ve b) örnek yerleşimi.....	30
Şekil 4.4: MS besi ortamında tuz içermeyen bir kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda tuz içeren dört grup olarak 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden alınan Raman spektrumları ve band atamaları.....	31
Şekil 4.5: 522 cm ⁻¹ selüloz bandına göre değişimi gösteren üç boyutlu Raman haritaları.....	32
Şekil 4.6: 747 cm ⁻¹ pektin bandına göre değişimi gösteren üç boyutlu Raman haritaları.....	33
Şekil 4.7: 1115 cm ⁻¹ selüloz bandına göre değişimi gösteren üç boyutlu Raman haritaları.....	34
Şekil 4.8: Boğaziçi Üniversitesi, Medikal Görüntüleme Laboratuvarı'nda yer alan SAM AMS-50SI (Honda Electronics) cihazı.....	35

Şekil 4.9: TAM ölçümlerinin elde edilmesini sağlayan programın ara yüzü.	36
Şekil 4.10: Kontrol deney grubunda 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri: a) Kontrol 1, b) Kontrol 2, c) Kontrol 3, d) Kontrol 4.	37
Şekil 4.11: 50 mM NaCl'lik deney grubunda 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri: a) 50 mM 1, b) 50 mM 2, c) 50 mM 3, d) 50 mM 4.	38
Şekil 4.12: 100 mM NaCl'lik deney grubunda 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri: a) 100 mM 1, b) 100 mM 2, c) 100 mM 3, d) 100 mM 4.	39
Şekil 4.13: 150 mM NaCl'lik deney grubunda 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri: a) 150 mM 1, b) 150 mM 2, c) 150 mM 3, d) 150 mM 4.	40
Şekil 5.1: MDA miktarının konsantrasyona göre değişimi.	42
Şekil 5.2: Karotenoid, klorofil a ve klorofil b miktarlarının konsantrasyona göre değişimi.	44
Şekil 5.3: 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen selüloz bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri.	49
Şekil 5.4: 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen pektin, serin ve alifatik bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri.	50
Şekil 5.5: 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen karotenoid, klorofil a ve klorofil b bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri.	51
Şekil 5.6: 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen amide I ve amide III bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri.	52
Şekil 5.7: Medyan değeri ölçüm sayılarının (nokta ölçümlerinin sayısı) konsantrasyona göre değişimi.	54
Şekil 5.8: Tuz konsantrasyonuna bağlı ağırlıklı ortalama yüzey akustik empedans değerleri (MRayl) standart sapmaları ile verilmiştir.	56

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

- Tablo 3.1:** Doku kültürünün oluşturulmasında kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerinin içeriği.....13
- Tablo 4.1:** Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan Selimiye buğday çeşidine ait yaprak örneklerinin hücre membranlarına ait lipid peroksidasyonları.....26
- Tablo 4.2:** Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan Selimiye buğday çeşidine ait yaprak örneklerindeki klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid miktarları.27
- Tablo 5.1:** Raman spektrumlarında gözlemlenen bandların raman kayma dalga sayıları (cm^{-1}), titreşim modları ve band atamaları referansları ile birlikte verilmiştir.....46
- Tablo 5.2:** Farklı tuz konsantrasyonlarında yetiştirilen Buğday bitkilerinden alınan yaprak örnekleri için TAM yöntemi ile belirlenen yüzey akustik empedans değerleri (MRayl cinsinden) standart sapmaları ile verilmiştir. Kontrol, 50 – 100 – 150 mM deney grupları için ağırlıklı ortalama akustik empedans değeri hesaplanmıştır.55

SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Na	: Sodyum
Cl	: Klor
K	: Potasyum
NaCl	: Sodyum klorür
E	: Elektromanyetik dalganın elektrik alan bileşeni
ν	: Frekans
S_0	: Üretilen akustik (ses) sinyali
S_{hedef}	: Hedeften yansıyan akustik (ses) sinyali
S_{ref}	: Referanstan yansıyan akustik (ses) sinyali
Z_{hedef}	: Numunenin akustik empedansı
Z_{alt}	: Alt tabakanın (subtrat) akustik empedansı
Z_{ref}	: Distile suyun (referans) akustik empedansı
ρ	: Yoğunluk
V	: Akustik hız
E_m	: Elastikiyet modülü

Kısaltmalar	Açıklama
MDA	: Malondialdehit
TCA	: Trikloroasetik Asit
TBA	: Thiobarbiturik Asit
RS	: Raman Spektroskopisi
RE	: Raman Etkisi
TAM	: Taramalı Akustik Mikroskopu

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IN VITRO ORTAMDA YETİŞTİRİLEN BUĞDAYIN MİKROYAPISAL ANALİZLERİNİN SPEKTROSKOPİK ve MİKROSKOBİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Merve SİRKECİ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Feyza GÜZELÇİMEN

II. Danışman : Doç. Dr. Ayşe ŞEN

Bu tez çalışmasında, doku kültürü ortamında (*in-vitro* şartlarda) farklı konsantrasyonlarda tuz stres etmenine maruz bırakılarak yetiştirilen Selimiye çeşidine ait dört haftalık buğday fidelerinin mikroyapılarındaki değişimlerin biyokimyasal, spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

Buğday (*Triticum aestivum* L.), sistematik açıdan Poaceae ailesinin bir üyesidir ve dünya çapında en önemli üçüncü tahıl bitkisidir. Dünya nüfusunun yaklaşık %35'inin temel besin kaynağıdır ve kalori ile protein ihtiyacının %20'sini karşılamaktadır.

Bitkiden yüksek verim elde edebilmek için, optimum çevre isteklerini karşılaması gerekmektedir. Optimum isteklerde meydana gelen her türlü sapma, bitkide strese neden olur. Stres bitkinin metabolizmasını etkilemektedir, büyüme ve gelişmesini engelleyebilir; sonuçta ürün ve verim kaybı oluşabilmektedir. Tuzluluk, bitkilerin gelişimini ve ürün verimliliğini etkileyen en önemli abiyotik stres etmenlerinden biridir. Hem karasal hem de sulanan alanların tuz stresöründen büyük ölçüde etkilendiğinin gösterildiği çok sayıda bilimsel çalışma mevcuttur. Bu sayede tuzluluk stres etmeninin bitki üzerine etkilerini değerlendirmeye yönelik güncel çalışmalar artmaktadır. Bir stres etmeninin bitkiye etkilerinin incelenmesi sürecinde, homojen konsantrasyonlarda ve kontrollü koşullarda uygulanmasına olanak sağlayan *in-vitro* ortamların yaratılması da önemlidir.

Selimiye çeşidine ait buğday tohumlarının olgun embriyoları MS besiyeri içeren doku kültürü ortamlarında, tuz içermeyen bir (1) kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM NaCl) tuz içeren dört (4) grup olarak yetiştirilmiştir. İlk aşamada; uygulanan tuz stresörünün bitki örneklerine verdiği zararlanmaların tespitinde biyoindikatör olarak sıklıkla kullanılan malondialdehit (MDA), klorofil ve karotenoid değerlerinin ölçümünde UV-Görünür Bölge Spektroskopisi tekniğine dayanan biyokimyasal yöntemler kullanıldı. İkinci aşamada; Raman Spektroskopisi (RS) ve Taramalı Akustik Mikroskopisi (TAM) yöntemleri uygulanarak, tuzluluk stres etmeninin yetiştirilen buğdayların yaprak örneklerinin mikroyapısı üzerindeki etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

İncelenen örneklerin $200 - 2200 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında Raman spektrumları elde edilmiştir ve titreşim bandları atanmıştır. Bandlara atfedilen titreşim modlarının şiddetlerinin değişimi analiz edilmiştir.

İncelenen örneklerin yüzey morfolojisini bozmadan ve herhangi bir ön hazırlık yapılmadan iki boyutlu yüzey akustik görüntüleri TAM tekniği ile haritalanmış ve ortalama akustik empedans değerleri hesaplanmıştır. Buğdayların yumuşak ve sert dokularının mikroyapısındaki hastalıklara/zararlanmalara bağlı olarak yüzey mikrosertliğinde, elastikiyetinde değişimler tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı doğrultusunda; uygulanan tuzluluk stres etmeninin buğday örneklerinde yarattığı etkilerin tespitinde Raman ve TAM tekniklerinin günümüzde sıklıkla kullanılan biyokimyasal tekniklere göre daha hızlı, insan gücü gereksinimini ve zaman kaybının daha az olduğu stresör tayin yöntemleri olarak kullanılabilirliği ortaya konmuştur.

Haziran 2021, 83 sayfa.

Anahtar kelimeler: Buğday, doku kültürü, *in-vitro*, tuzluluk stresörü, biyokimyasal analizler, MDA, klorofil, karotenoid, UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi, Raman Spektroskopisi, Taramalı Akustik Mikroskopisi

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF MICROSTRUCTURAL ANALYSES OF WHEAT GROWN IN *IN VITRO* CONDITION by SPECTROSCOPIC and MICROSCOPIC METHODS

Merve SİRKECİ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Physics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Feyza GÜZELÇİMEN

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ayşe ŞEN

In this thesis, it was aimed to investigate the changes in the microstructure of of the four-week-old wheat seedlings of Selimiye variety grown in tissue culture medium (in-vitro conditions) by exposing to different concentrations of salt stress factor by biochemical, spectroscopic and microscopic methods.

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is systematically a member of the Poaceae family and is the third most important cereal crop worldwide. It is the main food source of approximately 35% of the world's population as well as meets 20% of the calorie and protein needs. In addition, wheat constitutes a large part of the grain production in Turkey.

In order to obtain high yield from the plant, it must meet the optimal environmental demands. Any deviation from optimal demands causes stress in the plant. A stress impacts the plant metabolism, it can prevent its growth and development; then, product and yield loss may occur. Salinity is one of the major abiotic stress factors affecting growth and crop productivity of plants. There are many scientific studies showing that both terrestrial and irrigated areas are greatly affected by salt stressor. Therefore, the current studies to evaluate the effects of salt stressor on plants are increasing. In the process of examining the effects of a stress factor on

the plant, it is also important to create *in-vitro* environments that allow it to be applied in homogeneous concentrations and under controlled conditions.

Selimiye wheats were grown in tissue culture environments containing MS (Murashige and Skoog) media as one (1) control group without salt and four (4) groups under different salt concentrations (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM NaCl). In the first step, biochemical methods based on UV-Visible Spectroscopy technique were used in the measurement of malondialdehyde (MDA), chlorophyll and carotenoid values, which are frequently used as bioindicators in the determination of the damage caused by the applied salt stressor to the plant samples. In the second step, the effects of salinity stress factor on the microstructure of leaf samples of grown wheats were aimed to be revealed by performing Raman Spectroscopy (RS) and Scanning Acoustic Microscopy (SAM).

Raman spectra of the samples examined have been obtained in the wavenumber range of 200–2200 cm^{-1} and vibrational bands have been assigned. The variation of the intensities of vibration modes attributed to each band has been analyzed.

Two-dimensional surface acoustic images of the investigated samples without disturbing the surface morphology and without any preliminary preparation have been mapped by SAM technique, and the average acoustic impedance values have been calculated. Changes in surface microhardness, elasticity have been determined depending on diseases/damages in microstructure of soft and hard tissues of wheats.

In line with the purpose of this thesis study; in the determination of the effects of applied salt stressor on wheat samples, it has been demonstrated that Raman and TAM techniques can be used as stressor determination methods that are faster as well as less manpower requirement and time loss compared to the biochemical techniques that are frequently used today.

June 2021, 83 pages.

Keywords: Wheat, tissue culture, *in-vitro*, salt stressor, biochemical analysis, MDA, chlorophyll, carotenoid, UV-Visible Spectrophotometer, Raman Spectroscopy, Scanning Acoustic Microscopy

1. GİRİŞ

Çalışmanın ana konusunu; *in-vitro* ortamda farklı konsantrasyonlarda tuz stres etmeni uygulamasına maruz bırakılarak yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğday fidelerinin mikroyapısındaki değişimlerin biyokimyasal, spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle incelenmesi oluşturmaktadır.

Buğday (*Triticum aestivum* L.), insanlar ve hayvanlar için en önemli tahılların başında gelmektedir. İçerdiği yüksek protein ve karbonhidrat miktarı sayesinde hem doyurucu hem de besleyici bir bitkidir. Türkiye tarımsal üretim için elverişli topraklara sahiptir ve bu konuda öncü ülkeler arasındadır. Ülkemizde 2015 yılında yaklaşık 23 milyon ton olan buğday üretimine sahipken 2018 yılında bu miktar 20 milyon tona gerilemiştir. Bundan dolayı buğday üretiminde %11.5'lik bu düşüş ülkemiz için kabul edilebilir değildir. Bunun en önemli nedenlerinden biri kuşkusuz dünyanın ve Türkiye'nin elzem sorunlarından biri olan iklim değişikliğidir.

Mevcut iklim koşulları göz önüne alındığında buğdayın tuzluluk gibi oluşabilecek abiyotik stres etmenlerine karşı toleransının hızlı tayin edilmesi gerekmektedir. Buğday gibi bitkilerin tuz stresörü gibi stres etmenlerine karşı vermiş oldukları cevabın tayininde farklı yöntemler kullanılır. Bu yöntemler arasında sıklıkla tercih edilenlerin başında malondialdehit (MDA), klorofil ve karotenoid miktarlarının tespiti için, UV- Görünür Bölge spektroskopisi yöntemine dayanan biyokimyasal yöntemler gelir. Bu tez çalışmasının amacı, Selimiye çeşidine ait buğday bitkisine uygulanan farklı konsantrasyonlarda tuz stresörlerine karşı vermiş olduğu tepkileri halihazırda kullanımı olan yöntemlere göre daha hızlı ve güvenilir spektroskopik ve mikroskopik yöntemler kullanarak ortaya koymak, insan gücü gereksinimini ve zaman kaybını en aza indirmek yönünde katkıda bulunmaktır. Bu tez çalışması kapsamı için, *in-vitro* ortamda yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğday tohumları Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (Edirne) temin edildi.

Genel kısımlar bölümünde; buğday bitkisi, doku kültürü, tuzluluk stres etmeni ve çalışmamızda kullanılan spektroskopik ve mikroskopik yöntemler hakkında bilgiler içeren bilimsel çalışmalar ve literatür taraması verildi.

Malzeme ve Yöntem bölümünde; deney materyali olan Selimiye çeşidine ait buğday tohumlarının eldesi, besi ortamlarının hazırlanması ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresörü uygulanması, eksplantların elde edilmesi ve doku kültür ortamına ekimi, UV- Görünür Bölge spektroskopisi yöntemine dayanan biyokimyasal yöntemler, Raman Spektroskopisi (RS) ve Taramalı Akustik Mikroskopisi (TAM) ile ilgili teorik bilgiler verildi. Literatürde bu konulara ait yapılmış olan daha önceki çalışmalara ise ilgili bölümlerde verildi.

Bulgular bölümünde; UV- Görünür Bölge spektroskopisi yöntemine dayanan biyokimyasal yöntemler, RS ve TAM yöntemleri ile alınan ölçümler ve analizlerden bahsedildi.

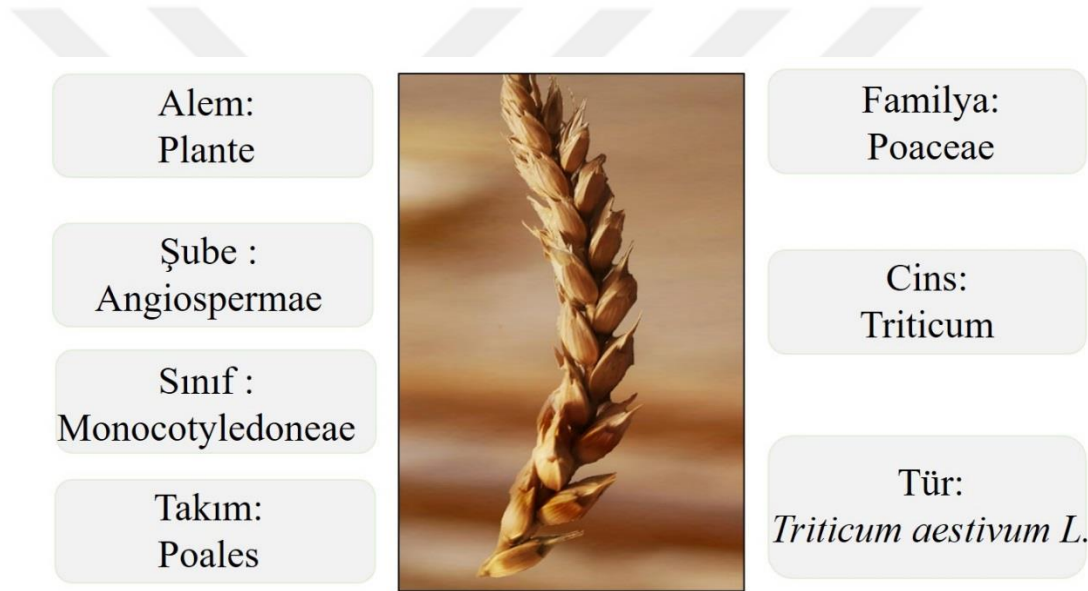
Tartışma ve Sonuç bölümünde; çalışmada incelenen buğday bitki örneklerinin maruz kaldığı tuz stresörü konsantrasyonuna bağlı, moleküler yapı/mikroyapı değişimine etkilerini belirleyen ölçüm sonuçları karşılaştırmalı olarak incelendi ve ayrıntılı olarak yorumlandı.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BUĞDAY

Tahıl ürünlerinden olan buğday (*Triticum aestivum* L.) çevre şartlarına kolay adapte olduğu için dünya çapında yaygın bir şekilde ekimi ve üretimi yapılan bitkisel ürünlerin başında gelmektedir (Davis, 1985; Seçmen ve diğ., 2000; Sheaffer ve Moncada, 2012).

Buğday bitkisi, Poaceae ailesinden Poales takımına mensup *Triticum* cinsine aittir. Monokotil bir bitki olan buğday; kendini dölleyebilen tek yıllık bir bitkidir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisinin sistematiği (Kurtuluş, 2019).

İnsan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yer tutan buğday, temel besin kaynağı olup dünya nüfusunun enerji, besin, kalori ve protein ihtiyacının yaklaşık %20-80'nini karşılamaktadır (Shurpalekar ve Rao, 1977; Cummins ve Robert-Thomson, 2009; Shewry, 2009; Elgün ve Ertugay, 2011).

Buğday, yılda yaklaşık 800 milyon tondan fazla üretimi ile dünya çapında üretilen ilk üç ürün içerisinde yer almaktadır (Shewry, 2009). Buğday üreten ülkeler arasında Türkiye 12. sıradadır (FAO, 2019). 2018 yılında buğday ekimi yapılan alan yaklaşık 73 milyon dekadır. Aynı yıl üretilen buğday, 20 milyon ton olarak yayınlanmıştır (TÜİK, 2019).

2.2. DOKU KÜLTÜRÜ

Tahıllardan ilk başarılı *in-vitro* kültür çalışması La Rue tarafından eksplant olarak endosperm dokusu kullanılarak 1949 yılında yapılmıştır (Şen, 2005).

Doku kültürü ortamı olarak da ifade edilen *in-vitro* kültür ortamlarında bitkinin büyümesi için optimum koşullarda gerekli olan tüm makro ve mikro besin elementleri ve vitaminlerin ilave edildiği yapay besi ortamları içerisinde aseptik ve kontrollü şartlarda bitkiler yetiştirilir. Bitkilerin yetiştirilebilmesi için gerekli olan mikro ve makro elementlerin içerisinde bulunan besiyerler farklı konsantrasyonlarda oluşturulabilmektedir. Bitkilerin kontrollü şartlarda yetiştirilmesinde kullanılan yapay besi ortamları arasında en sık tercih edilenleri MS (Murashige ve Skoog, 1962), LS (Linsmaier ve Skoog, 1965), WS (Wolter ve Skoog, 1966), SH (Schenk ve Hildebrand, 1972), GD (Gresshoff ve Doy, 1972), CHU (Chu, 1978), DKW (Driver ve Kuniyuki, 1984) ve N6 (Li ve diğ., 1988) sayılabilir (Vidalie, 1986; George ve diğ., 1987; Üçler, 1994; Arzani ve Mirodjagh, 1999; Almansouri ve diğ., 2001; Vikrant ve Rashid, 2001; Alizadeh ve diğ., 2004; Açıkgöz, 2017). Bu yapay besi ortamlarının birbirinden farkı içerdikleri mikro ve makro besin elementlerinin konsantrasyonlarının birbirinden farklı olmasıdır.

Sears ve Deckard (1982), buğday bitkisinin 39 genotipini MS besi ortamında kallus ve bitki rejenerasyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır. Arzani ve Mirodjagh (1999), yapmış oldukları çalışmada 28 farklı makarnalık buğday çeşidinin olgunlaşmamış embiyolarını MS besi ortamında yetiştirmişlerdir.

Dodig ve diğ. (2008), MS besiyerinde 96 buğday genotipi ile kurulan doku kültürü çalışmalarında tane verimi, bitki boyu gibi özellikleri üzerine araştırma yapmışlardır. Benzer şekilde Şen ve Alikamanoğlu (2011), olgun buğday embriyoları ile yapmış oldukları çalışmada 3 farklı buğday çeşidini MS besi ortamında kültüre almışlardır.

Doku kültürü ortamlarına bitkilerin gelişimini teşvik etmek için büyüme düzenleyicileri ilave edilebilmektedir. Buğday bitkisinin kültür ortamında teşvik etmek için kullanılan büyüme düzenleyicileri arasında 2.4-D (2.4-Diklorofenoksiasetik Asit), IAA (İndol-3-asetik asit) ve NAA (α -Naftalen Asetik Asit) oksin olarak ve BAP (6-benzilaminopurin) ise sitokinin olarak tercih edilmektedir (Wang ve Wei, 2004).

Alizadeh ve diğ. (2004) buğday embriyoları ile yapmış oldukları çalışmada, 0.2 mg/l IAA, 0.2 mg/l 2.4-D ve 1 mg/l BAP hormonlarının besiyere ilave edilmesi ile rejenerasyon oranının 7'de 5 olduğunu bildirmişlerdir.

Bitki doku kültürü teknikleri, aseptik şartlarda bitkinin çeşitli bölgelerinden alınan eksplantların yapay besiyerlerin içerisine yerleştirilerek burada yeni bir bitki oluşturulmasını sağlar. Doku kültürleri farklı eksplantlar yani kültürün başlangıcı için farklı bitki kısımlarının kullanılmasıyla oluşturulabilir. Bunlar; embriyo, kallus, haploid, meristem, protoplast ve süspansiyon kültürü olarak kurulabilir (Alikamanoğlu, 1999; Babaoğlu ve diğ., 2002). Bu kültür ortamlarının kurulmasında başlangıç materyali olarak bitkilerin embriyoları, meristematik bölgeleri, anterleri gibi kısımları yeni bir bitki oluşumu sağlamak için kullanılır.

Bitki tohumlarından olgun embriyoların çıkartılması ile kurulan kültürlerde fiziksel ve/veya kimyasal faktörlerin bitki gelişimi üzerine etkisi incelenebilmektedir (Babaoğlu ve diğ., 2002; Wang ve diğ., 2004). Kültür ortamlarında bu tip çalışmaların yapılmasının en büyük avantajı bitkilere uygulanan kimyasal/fiziksel faktörlerin kontrollü çevre şartlarında homojen bir şekilde uygulanmalarına olanak sunmasıdır. Bitki doku kültürü çalışmalarının diğer önemli avantajları arasında hastalıklardan arınmış çok sayıda aynı genetik kompozisyona sahip bitkilerin kısa sürede üretimi de bulunmaktadır.

Arzani ve Mirodjagh (1999) yapmış oldukları çalışmada, 28 farklı makarnalık buğday çeşidinin olgunlaşmamış embiyolarından MS besiyeri ile oluşturulmuş doku kültürü ve bu bitkilerin tuz toleranslarına karşı verdiği tepkileri incelemişlerdir.

Ayan (2010), doku kültürü ortamında soya bitkisi üzerinde yapmış olduğu çalışmada tuz ve radyasyon stresi uygulayarak bitkide meydana gelen farklılıkları araştırmıştır. Şen ve Alikamanoğlu (2011), olgun buğday embriyoları ile yapmış oldukları çalışmada 3 farklı buğday çeşidi kullanılmış ve kültür ortamı MS besiyerinin içerisinde tuz stresörü ilave edilerek oluşturulmuştur. Tuzun, rejenerasyonu azalttığını tespit etmişlerdir.

Nazirzadeh (2018), *in-vitro* ortamda MS besiyerine kuraklık ve tuz stres etmeni uygulayarak patatesten meydana gelen değişimleri incelemiştir.

Bilimsel çalışmalar için doku kültürü teknikleri kullanılarak buğday yetiştirmek, arazi şartlarına göre daha kontrollü ve güvenilir bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3. TUZLULUK STRESÖRÜ

Çevremizde bitkilerin yetişmesini etkileyen birçok etmen vardır. Selye (1956), bu etmenler konusunda yıllarca araştırmalar yürüterek stres ve stresör terimlerinin tanımını yapmıştır. Canlılarda bir dizi tepki yaratan çevresel uyarıları stresör olarak, bu uyarıcılara karşı canlının gösterdiği tepkiyi ise stres olarak tanımlamıştır. Stres kavramını Levitt (1980) canlı organizmalar için uygun olmayan çevre şartları olarak tanımlamıştır (Korkmaz ve Durmaz, 2017; Keskin, 2006).

Bitkiler yaşamları boyunca birçok stresöre faktörüne maruz kalırlar. Bilim insanları bu stresörleri kendi içerisinde Şekil 2.2’de gösterildiği gibi abiyotik (cansız etmenler) ve biyotik (canlı etmenler) olarak sınıflandırılırlar (Lichtenthaler, 1996; Jena ve diğ., 2020).



Şekil 2.2: Bitkilerin maruz kaldığı abiyotik ve biyotik stres etmenleri (Lichtenthaler, 1996; Jena ve diğ., 2020).

Tuz stresi etmeni bitkilerin maruz kaldığı abiyotik stresörlerden biridir (Şekil 2.2). Tuzluluk toprağın en üst katmanlarında suda çözünen tuzların birikimidir. Toprakta meydana gelen tuzluluk bitkinin morfolojisini ve anatomisini etkileyen önemli bir faktördür (Yıldırım, 2019). Dünya’daki ve Türkiye’deki kurak/yarı kurak bölgelerde ürün verimini ve büyümesini etkilemektedir (Foolad ve Lin, 1997; Shams, 2019; Tuna, 2019).

Topraktaki tuzluluk; bitkinin boy uzunluğunda/büyümesinde, kök uzunluğunda, bitkinin ozmotik basıncında ve bitkinin yapısında birçok negatif etkiye yol açmaktadır (Büyük ve diğ., 2012).

Tuzluluk stresörüne maruz kalan bitkide öncelikle ozmotik stres oluşmakta ve bununla birlikte su miktarında azalma meydana gelmektedir. Tuz stres etmeninin bitki üzerine bir diğer etkisi de iyon stresi olarak kendini göstermektedir. Tuz stres etmenine maruz kalan bitkilerde Na^+ ve Cl^- iyonları özellikle K^+ iyonu ile rekabet içerisine girmektedirler. Bunun sonucunda hücre içerisindeki iyon oranlarında dengesizlikler ortaya çıkmaktadır. K^+ dışında ayrıca bitki gelişimi için gerekli Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi diğer iyonların alınımının azalmasına neden olmaktadır. Bu durum da hücre canlılığını etkileyerek ölüme kadar giden metabolik süreçleri tetiklemektedir (Parida ve Das, 2005; Kuşvuran ve diğ., 2008; Tarım, 2019).

Delane ve diğ. (1982), bitkiler yüksek seviyelerde NaCl 'ye maruz kaldıklarında yetersiz iyon tedarikinin yaprak büyümesini sınırlayabileceğini öne sürmüşlerdir. Curtis ve Lauchli (1985) kenaf bitkisinde, Aslam ve diğ. (1986) *Atriplex amnicola*'da ve Lazof ve Lauchli (1991) marul bitkisinde tuz stres etmeni altında yaprak uzama süreleri üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Tuz stresörünün birincil etkisinin yaprak çıkma hızının ve genel sürgün gelişiminin yavaşlaması olduğu gösterilmiştir. Sienkiewicz-Cholewa ve diğ. (2018), tuz stres etmeninin buğdayın fizyolojik sürecini olumsuz etkilediğini tespit etmişlerdir.

Bitkiler tuzluluk gibi stres etmenlerine maruz kaldıklarında; süperoksit radikali, singlet oksijen, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilen serbest radikallerin üretimi tetiklenir. (Şen, 2005; Ayan, 2010).

Bu reaktif türlerin hücre içerisinde üretiminin artması hücre membranlarındaki lipit kompozisyonunu, hücrenin önemli yapıtaşları olan protein, karbonhidrat ve klorofil gibi makro moleküllerini ve canlılarda kalıtım materyalini oluşturan nükleik asitlerin yapısını etkilemektedir (Parida ve Das, 2005; Kuşvuran ve diğ., 2008).

Reaktif oksijen türevleri hücre membranlarındaki lipidler ile etkileşime girmesi sonucunda bu lipidlerden elektron kopartarak lipid peroksidasyonunu tetikler. Hücre membranlarındaki lipid peroksidasyon reaksiyonlarının son ürünlerinden biri de malondialdehit (MDA)'dır. Yapılan çalışmalarda reaktif oksijen türevlerinin artan aktivitesi ile orantılı olarak hücre içerisindeki MDA miktarının artış gösterdiği tespit edilmiştir. (Arora ve diğ., 2002; Parida ve Das 2005;

Smirnoff, 2005; Sunkar, 2010). Bu durum MDA'nın bitkilerde stresör zararlanmasında biyoindikatör olarak kullanımını yaygınlaştırmıştır (Şen ve Alikamanoğlu, 2011).

Ayan (2010) Adasoy soya çeşidi üzerinde yapmış olduğu çalışmada, bitkiye tuz ve gama radyasyonu uygulayarak artan stres etmenine bağlı olarak göre biyoindikatör olarak kullanılan MDA miktarının değişimini incelemiştir. Lastochkina ve diğ. (2017), sıvı patates-glukoz agar içeren besi ortamında NaCl stresörü uygulanan buğday bitkisinde MDA miktarında artışın meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Stres etmenleri altında üretimi artan ROT'ların bir diğer önemli etkisi de klorofil gibi hücrenin önemli yapıtaşlarını oluşturan makro moleküller üzerinededir. Tuzluluk nedeni ile bitki hücresinde meydana gelen ozmotik stresöre bağlı olarak bitki daha fazla su kaybetmemek için genellikle stomalarını kapatır. Bu durum fotosentez için gerekli olan havadan karbondioksitin emilimini azaltarak fotosentetik reaksiyonlardaki kuantum verimini düşürür ve fotosentetik aparatın reaksiyon merkezindeki uyarılma enerjisinin artışını tetikler. Sonuç olarak fotosistem II (PSII) elektronları oksijene transfer ederek serbest reaktif oksijen türevlerinin üretimini tetikler. ROT'lar klorofili indirgeyerek yıkımına neden olur ve fotosentezi etkiler. Kloroplastlardaki ROT'ların meydana getirdiği zararlanmanın yıkıcı etkileri ile mücadelede karotenoidler önemli görevler üstlenmiştir. Kloroplastların tilakoid membranları üzerinde yerleşim gösteren karotenoidler ışığı absorbe ederek klorofil a'ya iletmektedirler (Ezer ve diğ., 2010). Karotenoidlerin diğer bir önemli görevi de singlet oksijen gibi ROT'ları süpürerek etkisiz hale getirmektir (Parida ve Das, 2005). Böylece klorofillerin bütünlüğünün korumasına katkı sağlarlar. Klorofil ve karotenoid gibi fotosentetik pigmentlerin miktarının stres etmenleri altında azaldığını bildiren ve bu pigmentlerin stres etmenlerinin bitkideki etkisinin belirlenmesinde biyoindikatör olarak kullanıldığını gösteren çeşitli çalışmalar vardır (Parida ve Das, 2005; Şen ve Alikamanoğlu, 2011; Sienkiewicz-Cholewa ve diğ., 2018; Doğru ve Bildiren, 2020).

Şen ve Alikamanoğlu (2011), MS besiyeri kullanarak iki farklı buğday çeşidinde yapmış oldukları çalışmada tuz konsantrasyonu arttıkça buna bağlı olarak klorofil (a, b ve total) miktarlarında azalmayı tespit etmişlerdir.

Sienkiewicz-Cholewa ve diğ. (2018) yapmış oldukları çalışmada NaCl ve silikon uygulayarak buğday bitkisini yetiştirmişlerdir. Farklı NaCl konsantrasyonu uygulanan ortamda büyüyen

bitkilerin toplam klorofil ile karotenoid miktarlarında kontrol grubuna göre azalma olduğu bildirilmiştir.

Doğru ve Bildiren (2020), iki farklı buğday türü üzerine uygulanan tuz stres etmeninin neden olduğu değişimi inceleyerek klorofil miktarlarının birbirlerinden farklılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Yukarıda verilen literatür taraması sonuçlarına göre, bitkiler üzerine tuzluluk gibi stres etmenlerinin etkisinin tespit edilmesinde MDA, klorofil ve karotenoid miktarlarının optimum koşullarda ve stres etmenlerinde biyokimyasal yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Yine bu tip biyokimyasal analizlerde spektroskopik tekniklerden biri olan UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi tercih edilmektedir. Bu tekniğin biyolojik örneğin ölçüm için hazırlanması, ölçümü ve analiz noktasında bazı sınırlandırmalara sahip olması bilim insanlarını alternatif teknik arayışlarına yönlendirmiştir.

2.4. SPEKTROSKOPİK VE MİKROSKOBİK TEKNİKLER

Spektroskopi; numune ve elektromanyetik radyasyon arasındaki temel etkileşimleri inceleyen bir bilim dalıdır. Örnekteki moleküllerin kimyasal özellikleri hakkında bilgi verir (Parlak, 2020).

Çalışmamızda kullanılan spektroskopik teknikler; UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ve Raman Spektroskopisi'dir.

Absorbsiyon spektroskopik yöntemlerinden olan UV-Görünür Bölge tekniği çalışmanın biyokimyasal analizlerinde kullanılmak için seçildi.

UV-Görünür Bölge tekniği; bir örneğin absorbans özelliklerini dalga boyunun bir fonksiyonu olarak inceler. Işık, örneklerin atom ve molekülleri tarafından absorbe edilebilmektedir. Bu bölgedeki ışığın absorpsiyonu atomların bağlı elektronları ile gerçekleşir (Ünlü, 2012). Bu sayede, örneğin moleküler sistemindeki titreşim ve dönü enerji seviyelerinde bir değişime neden olur. Absorbsiyonu etkileyen parametreler, örnek içindeki moleküller arası uzaklık ve yük dağılımıdır (Ünlü, 2012).

Biyokimyasal analizlerde, bitki örneklerinin absorbans değerleri UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi ile okunarak biyokimyasal biyoindikatörlerin miktar tayini hesaplamaları

yapılabilmektedir (Çekiç, 2004; Şen, 2005; Ayan, 2010; Bahadur ve diğ., 2016; Sharova ve Romanova, 2018).

Saçılma spektroskopik yöntemlerinden olan RS, çalışmamızda yetiştirilen buğday bitkilerinin mikroyapısı üzerindeki etkilerini ortaya koymak için seçilen bir diğer yöntemdir. Bu yöntemde elde edilen Raman spektrumlarında kimyasal yapı, titreşim modları ve bu modlara karşılık gelen relatif şiddet değerlerinin değişimi ile analiz edilebildiği için, titreşimsel spektroskopik tekniklerden biri olarak da bilinmektedir (Haken ve Wolf, 2008).

RS, canlı ve biyolojik örneklerde pratik olarak kullanılabilir, ön hazırlık gerektirmeden ve örneğe zarar vermeden ölçüm alabilir.

RS; biyomedikal çalışmalardan (Lawson ve diğ., 1998), biyofiziğe (Kneipp ve diğ., 2002), adli tıptan (Khandasammy ve diğ., 2018), arkeoloji ve sanata (Casadio ve diğ., 2016; Ziemann ve Madariaga, 2020) kadar farklı güncel uygulama alanlarına sahiptir.

Schrader ve diğ. (1999), yeşil keten tohumu üzerinde yapmış oldukları çalışmada canlı hücrelerin tahribatsız analizinin gücünü göstermeyi amaçlamışlardır. Schrader ve diğ. (2000), bitki ve hayvan dokularında RS'nin kullanımı üzerinde çalışmışlardır. Baranska ve diğ. (2004) ise rezene meyvelerinde, papatya salkımında ve zerdeçal köklerinde çalışmalar yapmışlardır. Philippe ve diğ. (2006), buğday tanelerinin hücre duvarı yapısını incelemişlerdir. Weselucha-Birczynska ve diğ. (2012), işlenmemiş yazlık buğday yapraklarındaki Raman spektrumunu kaydetmiş, karotenoid ve kinonlar gibi aktif moleküllerin dağılımını tespit etmişlerdir. Kurdziel ve diğ. (2015), farklı stresör toleranslarına sahip buğday genotiplerinin taneleri üzerinde yapmış oldukları çalışmada RS ile yağ asidi içeren esterlerin ve proteinlerin dağılımını incelemişlerdir. Rys ve diğ. (2015), taze soya fasulyesinin saksı ortamında yetiştirilmesi ve kuraklık stresörü uygulanması sonucunda kontrol ve diğer grup üzerinde yağ asitleri, karotenoidler ve klorofillerdeki değişimi FT-Raman spektrometresi kullanarak gözlemlemişlerdir. Filek ve diğ. (2019), saksıda yetiştirilen yazlık buğday yaprakları üzerinde yaptıkları çalışmada karotenoid miktarlarını belirlemişlerdir.

Mikroskopi, görebildiğimiz alanın içinde olmayan örnekleri büyütürken görüntüleyebilmek adına mikroskop aletini kullanan teknik bir alandır. Bu aletlerde; örnekten ışığın absorpsiyonu, geçirgenliği, yansımaları, kırılması, girişimi, difraksiyonu vb. özelliklerinden yararlanılarak görüntü elde edilebilmektedir (Junquera ve Carneiro, 2009). Birçok aydınlatma kaynağı (ışık,

elektronlar, iyonlar, x-ışınları vb.) yardımıyla bir görüntü üretilir. Bu sayede, moleküller üzerinde yapılan çalışmalardan canlı organizmalara kadar tüm yaşam bilimi araştırmalarında yaygın olarak tercih edilen bir tekniktir. Mikroskobik teknikler, örneklerin yapısal bileşimini, morfolojisini, fiziksel özelliklerini incelemeyi/değerlendirmeyi mümkün kılar (Rydz ve diğ., 2019).

Çalışmamızda kullanılan mikroskopik teknik; Taramalı Akustik Mikroskopisi'dir.

TAM, her türlü numunenin mikro boyuttaki morfolojisini bozmadan ve boyama işlemi gerektirmeden elastikiyet modülü, ses hızı ve akustik empedans değerlerini belirleyebilen, iki boyutlu yüzey taraması ile haritalandırabilen, hızlı ve kullanımı kolay olan bir tekniktir.

Bu yöntemde kullanılan mikroskop, malzemelerin elastik özellikleri hakkındaki bilgiyi, ses hızı ve akustik empedansı ölçerek veren bir türdür. Bu sistemlerde, incelenen örneğin yapısal içeriğine zarar vermeden (kimyasal etki, radyasyon ve fiziksel deformasyon olmaksızın) yaklaşık iki dakika süren bir tarama ile ses hızı, kalınlık ve akustik empedans bilgisine ulaşmak, mikroskobik seviyede analiz yapmak mümkündür (Güzelçimen, 2020). Yumuşak ve sert dokularda mikro yapı ve hastalığa bağlı olarak sertlik, dolayısıyla da akustik özellikler değişeceğinden TAM ile çok erken safhada bu bölgeler tespit edilebilmektedir (Bilen ve diğ., 2018b; Bilen ve diğ., 2019; Demirkan ve diğ., 2019).

Bitki örneklerinde TAM kullanılarak yapılan çalışmalara göz atarsak; Clair ve diğ. (2000), odun liflerinin hücre duvarı sertliğinin kantitatif ölçümünü yapmışlardır. Elbaum ve diğ. (2008), sera koşullarında yetiştirdikleri makarnalık buğdayının başaklarında bulunan kılçıklar üzerinde yaptıkları çalışmada aktif kısımlardaki hücre duvarlarının kontrplak yapının kusurlarından meydana geldiği düşüncesi ile başlamışlardır ve bu kusurları tespit edebilmek için TAM yöntemini kullanmışlardır. Povey ve diğ. (2013) ise soğan kabuğunun akustik görüntüsünü elde etmişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmada soğan hücrelerini ve makroskopik hücresel yapıyı açıkça gözlemlemişlerdir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEY MATERYALLERİNİN ELDESİ

Tez çalışmamızda kullanılan Selimiye çeşidine ait buğday (*Triticum aestivum* L.) tohumları Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (Edirne) temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Çalışmamızda kullanılan Selimiye çeşidine ait buğday tohumlarının görünümü.

3.2. *IN-VITRO* ŞARTLARDA DOKU KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASI VE FARKLI KONSANTRASYONLARDA TUZ UYGULANMASI

3.2.1. Besi Ortamının Hazırlanması

Buğday bitkisinden elde edilen olgun embriyoların yetiştirileceği doku kültürü ortamının oluşturulması için temel besi ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) kullanıldı. MS besiyerine ilave edilen 20 g/l sukroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$) karbon kaynağı, bitki büyüme düzenleyecisi olarak 50 μ g/l 2.4-D (2.4-Diklorofenoksiasetik Asit) ve katılaştırıcı olarak 8 g/l Agar ilave edilerek araştırmamızda kullanacağımız rejenerasyon besiyeri hazırlandı. Tablo 3.1'de kullanılan inorganik tuzlar ve litre başına ağırlıkları (miligramları) verildi. *In-vitro* ortamda yetiştirilecek buğday embriyolarının tuz stresörüne duyarlılıklarını belirlemek için yukarıda

içeriği verilen rejenerasyon besi ortamına farklı konsantrasyonlarda (50 mM - 100 mM - 150 mM - 200 mM NaCl) NaCl ilave edildi. Oluşturulan karışımların pH değerleri yaklaşık 5.8 ile 6.0 arasında olacak şekilde 1 M NaOH (sodyum hidroksit) ve 1 M HCl (hidroklorik asit) kullanılarak ayarlandı. Oluşturduğumuz besi ortamları 20 dakika 1.2 atmosfer basınçta 121°C otoklavda steril edildi. Daha sonra steril edilen besiyerler aseptik ortamda steril olan magendalara eşit miktarda döküldü (Şen ve Alikamanoğlu, 2011).

Tablo 3.1: Doku kültürünün oluşturulmasında kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerinin içeriği.

İnorganik Tuzlar	mg/l
Amonyum nitrat	1650.0
Borik Asit	6.2
Susuz Kalsiyum klorür	322.2
Kobalt Klorür 6H ₂ O	0.025
Bakır Sülfat 5H ₂ O	0.025
Demir Sülfat 7H ₂ O	27.8
Magnezyum Sülfat	180.7
Manganez Sülfat H ₂ O	16.9
Molibdik Asit 2H ₂ O	0.25
Potasyum İyodür	0.83
Potasyum Nitrat	1900.0
Çinko Sülfat 7H ₂ O	8.6
Sodyum EDTA	37.26
Monobazik Potasyum Fosfat	170.0

3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu için buğday tohumları; %70'lik etil alkolde 20 saniye kadar tutuldu, 3 kez steril distile su serisinden geçirildikten sonra 20 dakika %20'lik ticari çamaşır suyunda bekletildi ve çamaşır suyunu uzaklaştırmak için 3 kez distile su serisinden tekrar geçirildi. Daha sonra tohumlar 35°C'lik etüvde 2 saat süre ile steril distile su içerisinde inkübe edilerek şişmeleri sağlandı (Özgen ve diğ., 1998; Şen, 2005).

3.2.3. Eksplantların Elde Edilmesi ve Kültür Ortamına Ekimi

Yüzey sterilizasyonu sonrası şişmeye bırakılan tohumların olgun embriyoları, aseptik koşullar altında steril pens ve bisturi yardımı ile endospermlerinden ayrıldıktan sonra tuz stres etmeni uygulaması için farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren besiyerlerine ekildi. Kültürler 25 ± 2 °C'de 16 saat ışık/ 8 saat karanlık gün periyodunda 4 hafta boyunca gözlemlendi (Şen, 2005). Şekil 3.2'de kültür ortamına alınan olgun embriyolar görülmektedir.



Şekil 3.2: Buğday embriyolarının besiyere yerleştirilmesi.

3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZ YÖNTEMLERİ

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan tuz stresörünün buğday bitkisinde meydana getirdiği zararlanmaların tespiti için biyoindikatör olarak sıklıkla kullanılan MDA, klorofil ve karotenoid miktarları ölçüldü.

3.3.1. MDA Miktarının Belirlenmesi

Çalışmamızda MDA miktarını belirlemek için Heath ve Packer (1968), yöntemi takip edildi. Bunun için yaklaşık 0.1 g yaprak dokusu %0.1'lik trikloroasetik asit (TCA) içinde homojenize edildi ve elde edilen homojenat 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Ardından 500 µl'lik üst sıvı içerisinde %0.5'lik thiobarbiturik asit (TBA) ve %20'lik TCA içeren 2 ml'lik reaktif çözelti ile karıştırıldı. Bu karışım 95°C'de 60 dakika su banyosunda kaynatıldı ve buz içerisinde soğutuldu.

Soğutulan karışım tekrar 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı UV-Görünür Bölge Spektrofotometresinde (IMPLEN NanoPhotometer, U.K) 532 nm (A_{532}) ve 600 nm (A_{600}) dalga boylarında ölçüldü. Elde edilen absorbans sonuçları Denklem (3.1)'de yerine koyularak, MDA miktarı "nmol/ml" cinsinden hesaplandı.

$$\text{MDA (nmol/ml)} = A_{532} - A_{600} / 155000 \times 10^6 \quad (3.1)$$

3.3.2. Klorofil ve Karotenoid Miktarlarının Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda tuzluluk içeren kültür ortamlarında yetişen Selimiye buğday çeşidine ait bitkilerin yaprak numunelerinde total klorofil ve karotenoid miktarlarının ölçülmesinde Lichtenthaler ve Wellburn (1983), yöntemi kullanıldı. Bunun için her bir deney grubuna ait 0.1 g yaprak örnekleri 1 ml %100'lük aseton kullanılarak havanda homojenize edildi. Ardından homojenat 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvıları 645 nm (A_{645}), 662 nm (A_{662}) ve 470 nm (A_{470}) dalga boyunda UV-Görünür Bölge Spektrofotometre ile okundu. Klorofil a Denklem (3.2)'de, klorofil b Denklem (3.3)'de, total

klorofil Denklem (3.4)'de ve karotenoid Denklem (3.5)'de miktarları aşağıda verilen denklemlerin yardımı ile $\mu\text{g/ml}$ cinsinden hesaplandı.

$$\text{Klorofil a (Kl a)}(\mu\text{g/ml}) = [(11.75 \times A_{662}) - (2.35 \times A_{645})] \quad (3.2)$$

$$\text{Klorofil b (Kl b)}(\mu\text{g/ml}) = [(18.61 \times A_{645}) - (3.96 \times A_{662})] \quad (3.3)$$

$$\text{Total Klorofil }(\mu\text{g/ml}) = \text{Kl a} + \text{Kl b} \quad (3.4)$$

$$\text{Karotenoid }(\mu\text{g/ml}) = [(1000 \times A_{470}) - (2.27 \times \text{Kl a}) - (81.4 \times \text{Kl b})]/227 \quad (3.5)$$

3.4. RAMAN SPEKTROSKOPİSİ

Raman olayı ilk olarak, 1928 senesinde Hintli bilim insanı Sir C.V. Raman'ın kurmuş olduğu bir düzenek ile gözlemlenmiştir. Gaz molekülleri üzerine ışık göndererek yapmış olduğu bu çalışma, Raman'a 1930 senesinde Nobel ödülü kazandırmıştır.

Moleküllerin enerji seviyeleri arasında absorpsiyon, emisyon olaylarının yanı sıra saçılma da gerçekleşir. RS, maddenin bir ışık kaynağı ile aydınlatılmasıyla maddenin titreşim modlarını belirlemek için kullanılan moleküler parmak-izi tekniğidir. Madde üzerine gönderilen ışığın saçılması yoluyla oluşan saçılma spektrumu incelendiğinde, spektrumdaki spektral çizgilerin frekanslarında kayma olduğu fark edilmiştir ve bu olay literatürde Raman etkisi (RE) olarak bilinmektedir. Saçılma spektrumunda moleküllerin titreşim ve dönü çizgilerine karşılık gelen pikler gözlemlenmektedir (Er, 2010).

RS'de; numuneye gönderilen ışığın dalga boyuna göre, numune moleküllerinden saçılan ışığın dalga boyunda oluşan ve Raman kayması olarak bilinen farklar ölçülebilmektedir. Enerjideki değişim, sistemdeki titreşim modları hakkında bilgi verir (Haken ve Wolf, 2008).

Klasik fizikte, saçılan ışık elastik saçılma olarak gözlendiği zaman frekans değişimi gözlenmez, dolayısıyla enerji korunur ve bu olay Rayleigh saçılması olarak adlandırılır. Zamana bağlı elektromanyetik dalganın elektrik alan bileşeni aşağıdaki gibi temsil edilir:

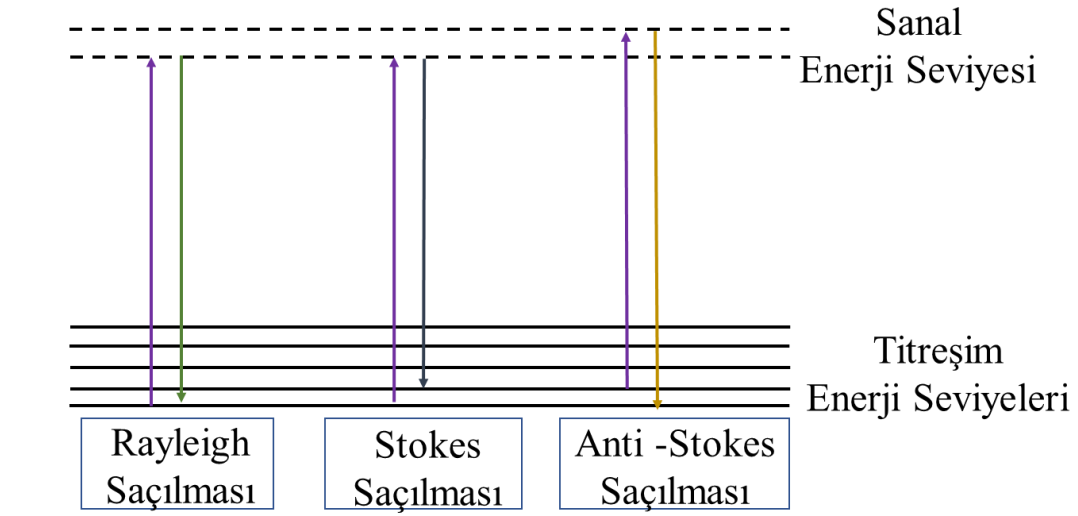
$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.6)$$

E_0 elektrik alanın genliğini, ν_0 gelen ışığın frekansını temsil etmektedir.

Elektromanyetik alan ile molekül etkileşime girdiğinde, bu alan sayesinde moleküle ait enerji seviyelerinde (elektronik kabuklarda) gelen ışığın frekansı ile titreşen bir dipol moment oluşmaktadır. Bu moment, molekülün boyutuna ve şekline bağlı olan kutuplanabilirlik özelliği ile doğru orantılıdır (Haken ve Wolf, 2008).

Titreşen elektrik dipol için, gelen fotonla aynı frekansta olan Rayleigh fotonu, gelen fotondan daha yüksek frekanslı Anti-Stokes fotonu ve gelen fotondan daha düşük frekanslı Stokes fotonu oluşur. Klasik teoriye göre, düşük ve yüksek enerjilerdeki bu çizgilerin aynı şiddete sahip olmaları beklenmektedir. Ancak, Stokes çizgilerinin gerçekte daha şiddetli gözlemlenmesi durumu, RE'nin kuantum mekaniksel yaklaşım altında açıklanabileceğini göstermektedir. Burada, molekülün başlangıçta uyarılmış enerji seviyelerinde olmasını gerektiren Anti-Stokes çizgilerinin şiddetinin daha düşük olmasını, bu seviyelerdeki moleküllerin sayısının sıcaklıkla azalması ile açıklayabiliriz (Nakamoto, 1986; Haken ve Wolf, 2008).

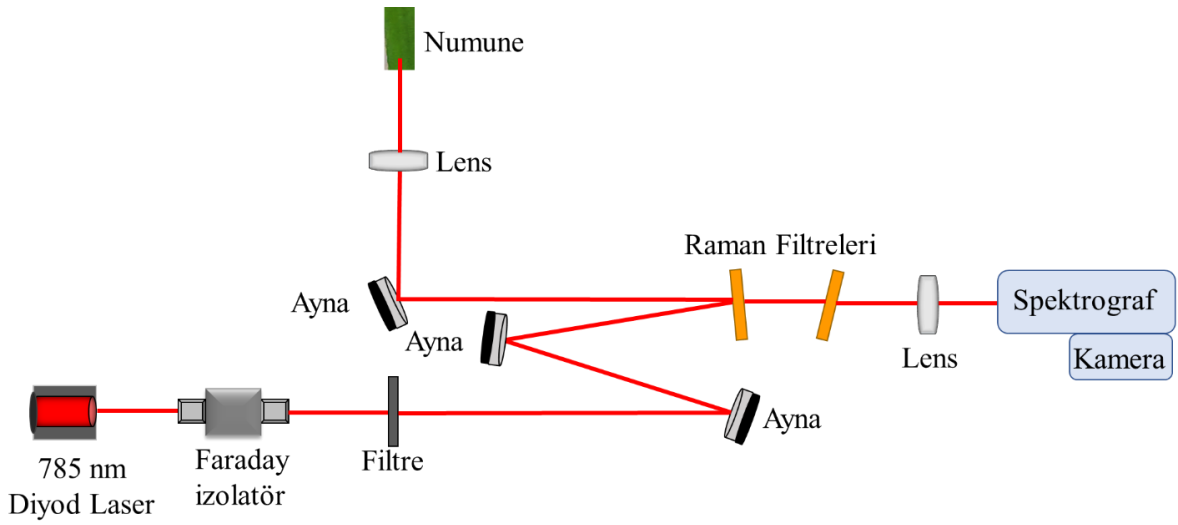
Kuantum mekaniksel teoride; RS'de elastik olmayan saçılma gerçekleşmektedir. Bu durumda, düşük ve yüksek enerjilere kaymaların her ikisi de gözlenebilir. Bu kayma gelen ışığın frekansından bağımsız olarak saçılan moleküle ait bir özelliktir. Sistem enerji kaybettiğinde Stokes saçılması tespit edilirken, saçılan fotonun enerjisi gelen ışığın enerjisine göre artarsa Anti-Stokes saçılması gözlemlenir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Rayleigh, Stokes ve Anti-Stokes enerji geçişlerinin şematik gösterimi (Jablonski diyagramı).

Örnek üzerine UV-Görünür Bölge elektromanyetik dalga boyu aralığında ışık gönderildiğinde, gelen ışına dik yönde saçılma meydana gelir. ν_0 frekansı ile Rayleigh saçılması gerçekleşir ve gelen ışın ile saçılan ışının frekansı eşit olduğu için, bu saçılmadan molekülün titreşim seviyeleri ile ilgili bilgi elde edilemez. Bunun yanı sıra, molekül titreşiminin frekansı ν_m olmak üzere, $(\nu_0 - \nu_m)$ frekansı ile Stokes ve $(\nu_0 + \nu_m)$ frekansı ile Anti-Stokes olayları gerçekleşir (Ferraro ve diğ., 2003).

Raman Spektroskopisi üç ana bölümden oluşmaktadır. Bunlar; Raman spektrometresi, numune aydınlatması ve ışık kaynağı (genellikle Laser)'dır. Laser kaynağı elektronları uyarmak için mercekleş üzerinden örneğe gönderilir ve geri saçılan ışık da aynı mercekleş üzerinden toplanır (Skoog ve diğ., 1998). Şekil 3.4'te, Raman spektroskopisi deney düzeneği şematik olarak gösterilmiştir.



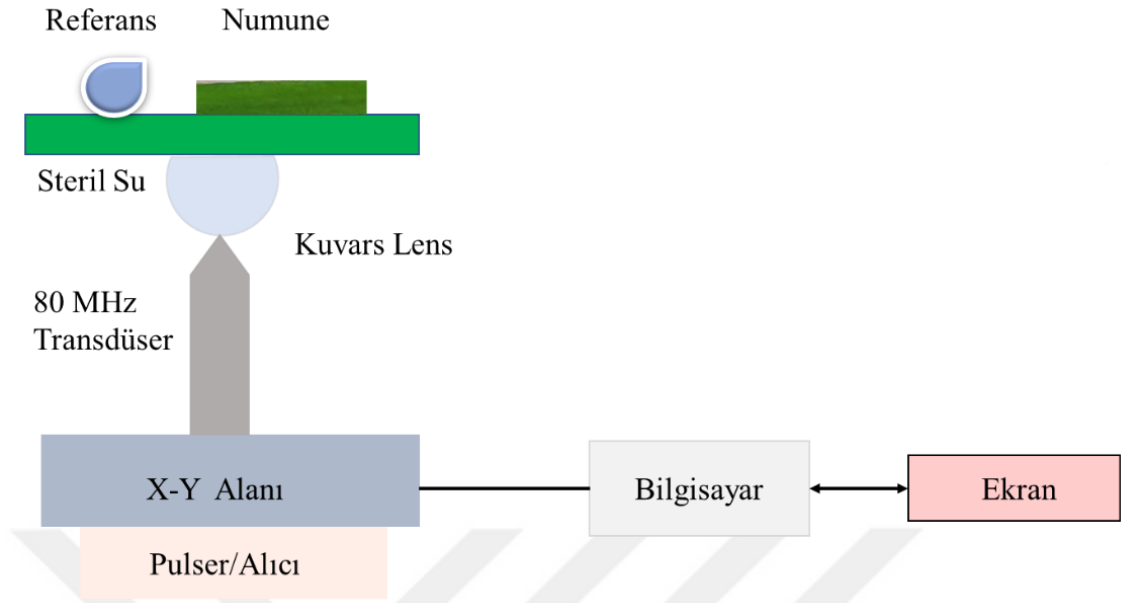
Şekil 3.4: Raman spektroskopisi deney düzeneğinin şematik gösterimi.

3.5. TARAMALI AKUSTİK MİKROSKOPİSİ

TAM düzeneği, kuvars lensli bir dönüştürücü, pulser/alıcı, osiloskop, bilgisayar ve ekrandan oluşmaktadır. Şekil 3.5'te kurulumu şematik olarak verilmektedir (Bilen ve diğ., 2018a; Güzelçimen ve diğ., 2020).

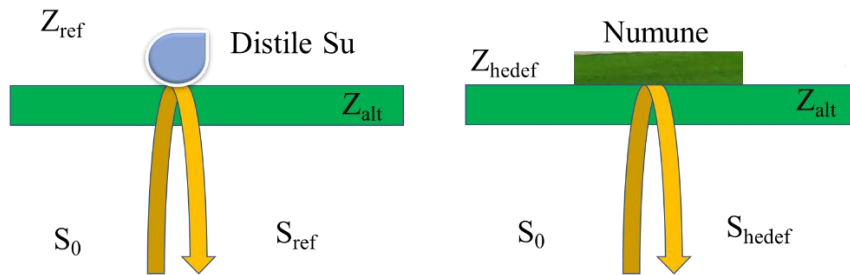
17 μm spot büyüklüğü ve 1.5 mm odak uzaklığı olan 80 MHz'lik dönüştürücü, tekrarlama oranı 10 kHz ile 5 ns genişliğe sahip pulse üretmektedir, numune ve referanstan yansıyan akustik dalgaları topladığı için pulser/alıcı görevi görmektedir (Bilen ve diğ., 2018b; Güzelçimen ve diğ., 2020).

Şekil 3.5'ten görülebileceği gibi su, kuvars mercek ve alt katman (substrat) arasındaki birleşme ortamı olarak kullanılır. Bilgisayar ile X-Y düzlemi kontrol edilmektedir. X-Y düzlemi dönüştürücünün iki boyutlu taramasından sorumludur. Ölçümü yapılacak olan numuneden yansıyan sinyaller ile referans değeri olarak kullanılan distile sudan yansıyan sinyaller osiloskop ile analiz edilir. 300 x 300 örnekleme ile numunenin incelenen bölgesinden yaklaşık olarak 20 μm 'lik yanıl çözünürlük ile akustik yoğunluk ve empedans haritaları görselleştirilmektedir (Güzelçimen ve diğ., 2020).



Şekil 3.5: Akustik empedans modunda TAM kurulumunun şeması.

Akustik empedans ölçümünün çalışma prensibi şematik olarak Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Bir akustik dalga piezo-elektrik dönüştürücü tarafından üretilir ve safir kuvars lens tarafından bir numuneye odaklanır, daha sonra aynı dönüştürücü tarafından yansıtılır ve alınır. İncelenen numune hedef olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 3.6: Akustik empedans ölçümünün çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi.

Referans olarak kullanılan materyal ise genellikle distile (damıtılmış) sudur. Hedef sinyal S_{hedef} ise;

$$S_{hedef} = \frac{Z_{hedef} - Z_{alt}}{Z_{hedef} + Z_{alt}} S_0 \quad (3.7)$$

olarak tanımlanır. S_0 , piezo-elektrik dönüştürücü (80 MHz) tarafından üretilen akustik sinyaldir. Z , akustik empedansı ifade eder ve birimi MRayl'dır ($1 \text{ Rayl} = 1 \text{ kg m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Z_{hedef} , numunenin akustik empedansıdır. Z_{alt} , alt tabakanın (polistiren substratın) akustik empedansı (2.37 MRayl) olarak tanımlanır. Z_{ref} , distile suyun akustik empedansı (1.50 MRayl) olmak üzere referanstan yansıyan sinyal:

$$S_{ref} = \frac{Z_{ref} - Z_{alt}}{Z_{ref} + Z_{alt}} S_0 \quad (3.8)$$

olarak tanımlanır. Sonuç olarak, numunenin akustik empedansı:

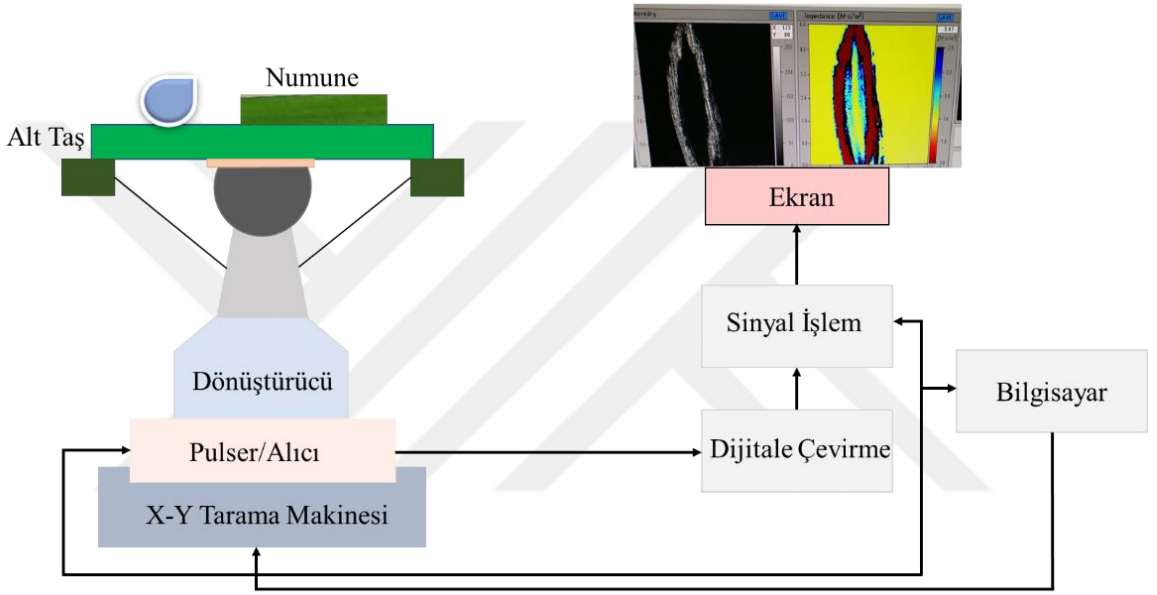
$$Z_{hedef} = \frac{1 + \frac{S_{hedef}}{S_0}}{1 - \frac{S_{hedef}}{S_0}} Z_{alt} = \frac{1 - \frac{S_{hedef}(Z_{alt} - Z_{ref})}{S_{ref}(Z_{alt} + Z_{ref})}}{1 + \frac{S_{hedef}(Z_{alt} - Z_{ref})}{S_{ref}(Z_{alt} + Z_{ref})}} Z_{alt} \quad (3.9)$$

ile hesaplanır. Gözlem sürecinde S_0 'ın sabit olduğu varsayılmaktadır (Bilen ve diğ., 2018b; Bilen ve diğ., 2019; Demirkan ve diğ., 2019; Güzelçimen ve diğ., 2020).

Çalışmamızda kullanılan TAM deney düzeneğinin şematik diyagramı Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Numunenin yapısına göre elde edilen yansımanın yoğunluk görüntüsü, örneğe ait akustik empedansa veya örnekten geçen ses hızına dönüştürülür. Numune altında (X-Y düzleminde) bulunan transformatörler ile mekanik olarak tarama gerçekleşir. Böylece mikroskobik düzeyde iki boyutlu görüntüler gözlenir. İncelenen örnek türüne

(malzeme/doku/hücre/bitki vb.) bağlı olarak transformatörün frekansı değişir. Bu frekans değişimleri ile sistemin çözünürlüğü doğru orantılıdır.

Akustik mikroskop, iki boyutta $16 \mu\text{m}^2$ 'lik bir tarama ile maksimum $4.8 \text{ mm} \times 4.8 \text{ mm}$ alanı yaklaşık iki dakikada tarayarak ölçüm almaktadır (Bilen ve diğ., 2018a; Bilen ve diğ., 2019; Demirkan ve diğ., 2019; Güzelçimen ve diğ., 2020).



Şekil 3.7: TAM deney düzeneğinin şematik diyagramı.

Yüzey akustik empedans değeri, numunenin yoğunluğu, elastikiyeti ve mikrosertliği ile ilişkilidir.

$$Z = \rho \cdot V = \sqrt{E_m \cdot \rho} \quad (3.10)$$

Denklem 3.10'da ρ yoğunluk, V akustik hız, E_m elastikyet modülüdür.

Mikrosertlik, bir numunenin uygulanan bir dış kuvvet ve/veya stres etmenleri altında tepki olarak zararlanmalara/deformasyona direnme derecesini belirler. Bir malzemenin mikrosertliği, elastikiyet modülündeki artışla artma eğilimindedir.



4. BULGULAR

4.1. FARKLI KONSANTRASYONLARDA TUZ UYGULAMASININ BUĞDAY GELİŞİMİNE ETKİSİ

Selimiye çeşidine ait buğdayın olgun embriolarından kurulan kültürlerde tuz stres etmeni uygulanmayan (kontrol) grup ile 50 mM - 100 mM - 150 mM - 200 mM konsantrasyonlarda tuz stresörünün uygulandığı grupların 4 haftalık gelişme süreci sonunda bitkilerin büyüme durumları Şekil 4.1’de görülmektedir.

Doku kültürü ortamında, artan tuz konsantrasyonu uygulamasına bağlı olarak bitki rejenerasyonunda azalma tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında uygulanan en yüksek tuz stres etmeni olan 200 mM NaCl’lik kültür ortamında, 4 haftalık bitki gelişim sürecinde bitki rejenerasyonu elde edilememiştir.



Şekil 4.1: Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan 4 haftalık Selimiye çeşidine ait buğday kültürlerinin görüntümü.

4.2. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Bu tez çalışmasında, kültür ortamında farklı konsantrasyonlarda tuzluluk uygulamasının Selimiye buğday çeşidinde meydana getirdiği biyolojik zararlanmaların tespiti için biyokimyasal ölçümler İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde yer alan Moleküler Radyobiyojoloji ve Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi.

4.2.1. MDA Miktarı

Tuz stres etmeninin hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisini tespit etmek için çalışmamızda MDA miktarı ölçüldü. Kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda tuz uygulanmış Selimiye çeşidine ait 4 haftalık kültürlerin yaprak örneklerindeki MDA analizi sonuçları Tablo 4.1' de verildi. Kontrol grubunda 1.853 ± 0.109 (nmol/ml) olarak hesaplanan değer, 50 mM NaCl uygulamasında 2.045 ± 0.285 (nmol/ml) değerine yükseldiği görüldü. MDA miktarının değeri, 100 mM ve 150 mM NaCl'lik gruplarda kontrol grubuna ait MDA miktarının altında bir değere sahip olduğu tespit edildi.

Tablo 4.1: Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan Selimiye buğday çeşidine ait yaprak örneklerinin hücre membranlarına ait lipid peroksidasyonları.

Tuz Konsantrasyonları	MDA (nmol/ml)
Kontrol	1.853 ± 0.109
50 mM NaCl	2.045 ± 0.285
100 mM NaCl	1.395 ± 0.161
150 mM NaCl	1.359 ± 0.103

± Standart Sapma

4.2.2. Klorofil ve Karotenoid Miktarları

Tuz stres etmeninin Selimiye buğdayı çeşidinden kurulan kültürlerde total klorofil, klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı üzerine etkisini tespit etmek için yaptığımız spektrofotometrik ölçümlerin sonuçları Tablo 4.2’de verildi. Klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarının, çalışmamızda uygulanan tuz stresörünün en düşük dozu olan 50 mM’lık deney grubundaki buğday bitki örnekleri için, kontrol ve 100 – 150 mM NaCl’lik deney gruplarının üzerinde bir değere sahip olduğu tespit edildi.

Tablo 4.2: Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan Selimiye buğday çeşidine ait yaprak örneklerindeki klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid miktarları.

Tuz Konsantrasyonları	Klorofil a (µg/ml)	Klorofil b (µg/ml)	Total Klorofil (µg/ml)	Karotenoid (µg/ml)
Kontrol	16.036±3.313	7.839±2.344	23.875±4.261	6.594±1.411
50 mM NaCl	18.669±1.365	8.415±1.492	27.084±2.844	6.929±1.464
100 mM NaCl	15.330±4.578	7.277±4.180	22.607±8.045	6.597±2.475
150 mM NaCl	15.780±2.605	6.521±1.860	22.301±4.451	5.723±1.194

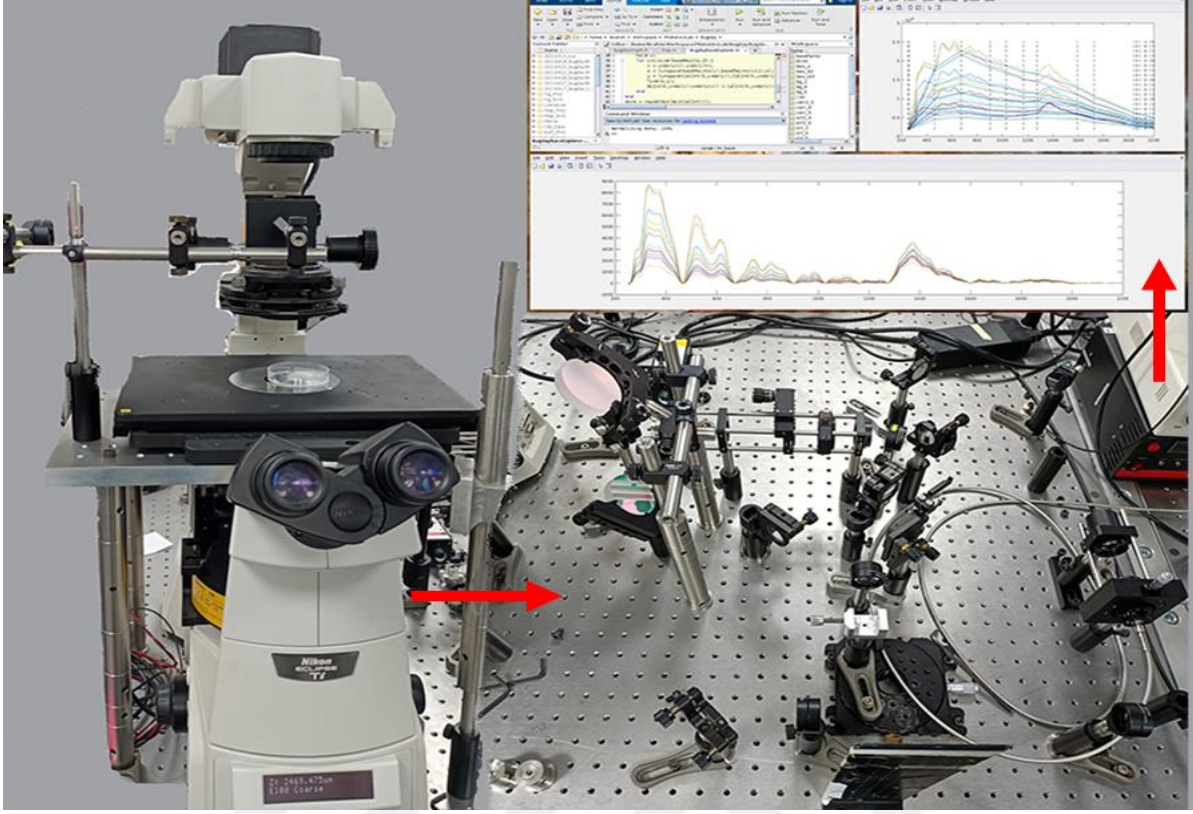
± Standart Sapma

4.3. RAMAN ÖLÇÜMLERİ

Bu tez çalışmasında doku kültürü ortamında farklı tuz konsantrasyonlarında (kontrol, 50 – 100 – 150 mM NaCl) 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğday yapraklarından alınan örneklerinin Raman spektrumları, Boğaziçi Üniversitesi, Medikal Görüntüleme Laboratuvarı'nda yer alan Ocean QE Pro Spektrofotometre, 10x mikroskop objektif cihazı ile analiz edilmiştir (Şekil 4.2).

Raman sisteminde, dalga boyu 785 nm olan diyot Laser ışığı kullanıldı. Spektrofotometrenin giriş aralığı (entrance slit) 50 μm ve spektral çözünürlüğü 11 cm^{-1} 'dir.

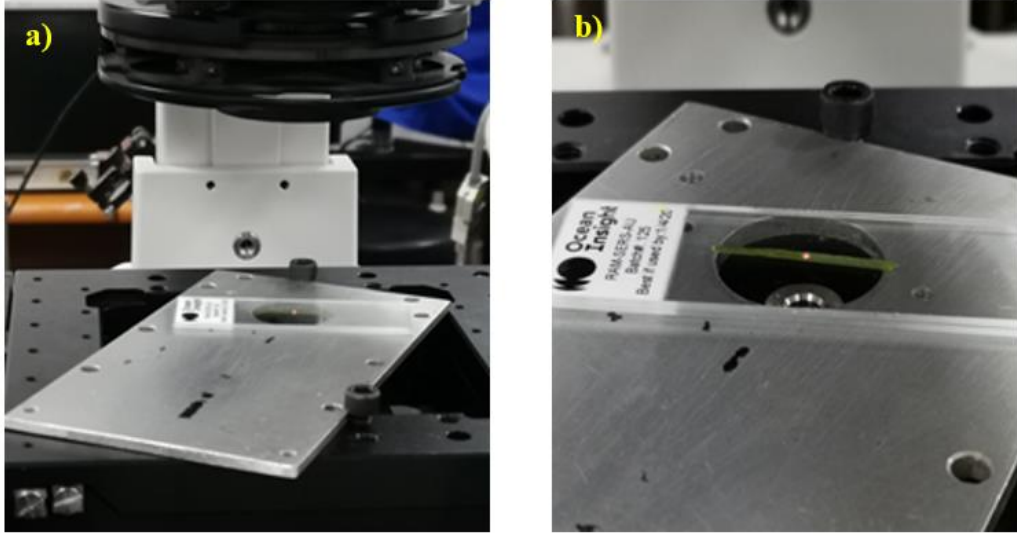
Ölçüm ve analiz parametrelerinden; örnek üzerinde Laser gücü ~100 mW, spektrometrenin sinyal toplama zaman aralığı 1 s olarak ayarlanmıştır. Önışlemede, Karanlık/Beyaz gürültü düzeltilmesi, Raman kayması kalibrasyonu, Floresan taban düzeltilmesi, vektör normalizasyonu yapılmıştır. Görüntüleme, 10 μm tarama adımları ile 600 μm x 600 μm alanını kapsayacak şekilde kaydedilmiştir.



Şekil 4.2: Raman Spektroskopisi deney düzeneği.

Buğday yaprak örneklerinin mikroyapısıyla ilgili bilgilerin eldesi için hızlı, güvenilir ve yüksek hassasiyetli spektroskopik tekniklerden olan RS uygulanarak, örnek ile etkileşen laser ışığının dalga boyuna göre, örnekten saçılan ışığın dalga sayısındaki farklar ölçüldü ve Raman spektrumları kaydedildi.

Bu spektroskopik yöntemde, kullanılan Raman tarama tablasını ve deney aşamasında ölçüm için bitki yapraklarından alınan örneklerin bu tablaya yerleşimini gösteren görseller Şekil 4.3'te verilmektedir.



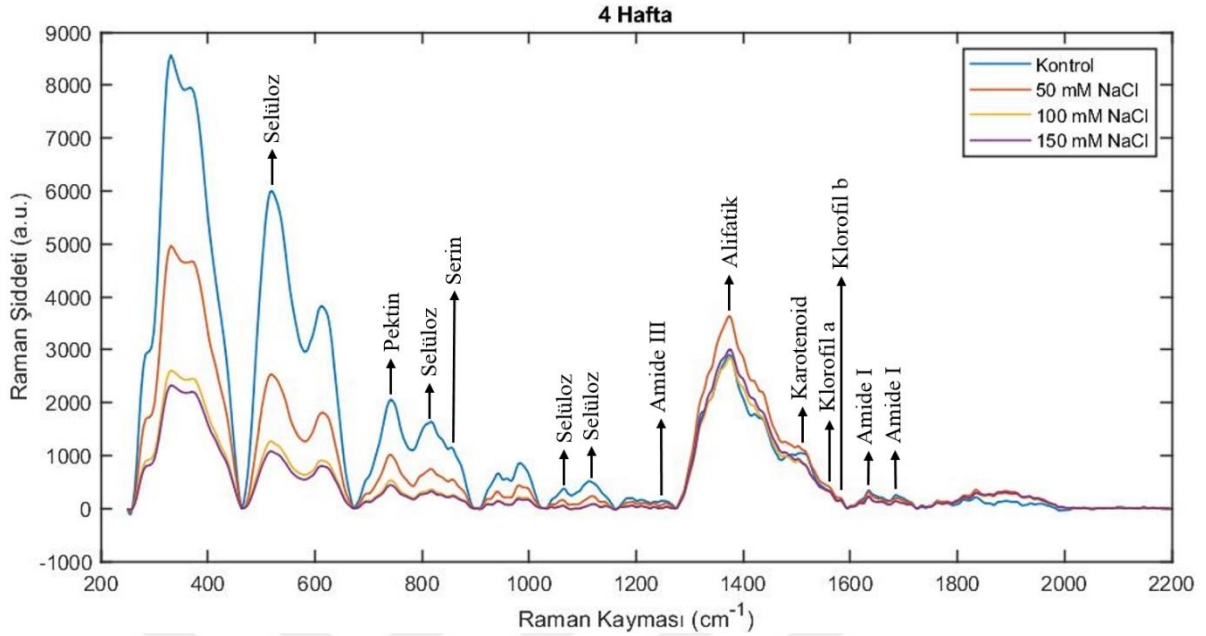
Şekil 4.3: a) Raman tarama tablası ve b) örnek yerleşimi.

RS yöntemi ile elde edilen veriler, MATLAB programı (MATLAB:R2021a, 2021) yardımıyla Raman kayma dalga sayısı (cm^{-1}) ile relatif Raman şiddeti arasındaki ilişkiyi gösteren spektrumlar olarak kaydedildi.

Raman ölçümlerinde yapılan uygulamalardan biri olan nokta analizi, örneğin tek bir noktasının Raman spektrumunu elde etmede yaygın olarak kullanılır. Ölçüm, örneğin herhangi noktasal bir kısmından ve yaklaşık birkaç dakikalık kısa bir süre içerisinde yapılabilir (Smith ve Dent, 2005).

Raman ölçümlerinde, doku kültürü ortamında farklı tuz konsantrasyonları (kontrol, 50 – 100 – 150 mM NaCl) uygulanarak tuz etmenine maruz bırakılan buğdaylardan alınan her bir yaprak örneğinden 3721 nokta üzerinde tarama yapılarak, nokta analiz ölçümü gerçekleştirildi. Her deney grubundan yaprak örnekleri için nokta Raman ölçümleri alındı.

Besi ortamında tuz içermeyen bir kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda tuz içeren dört stres etmeni grubu olarak 4 haftalık yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumları ve band atamaları Şekil 4.4'te görülmektedir.

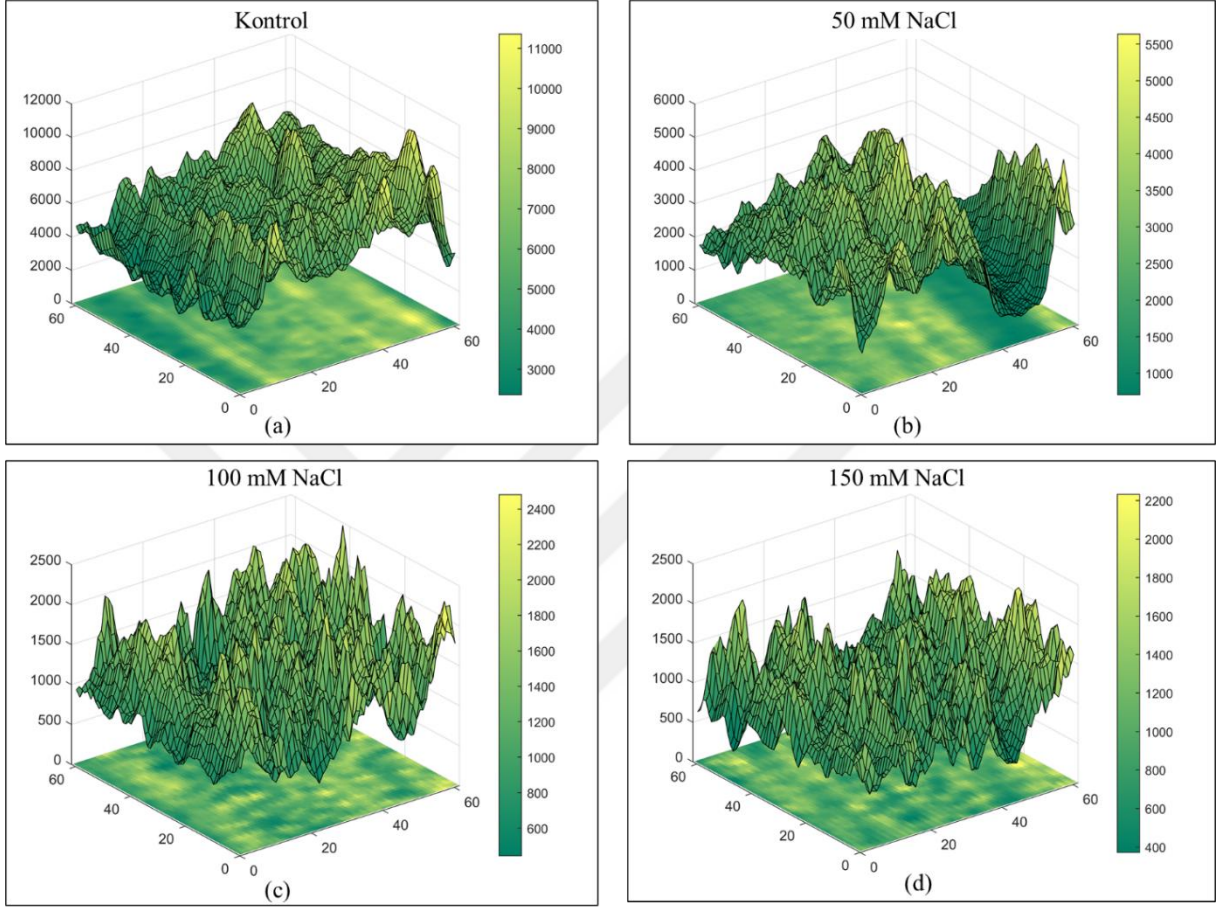


Şekil 4.4: MS besi ortamında tuz içermeyen bir kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda tuz içeren dört grup olarak 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden alınan Raman spektrumları ve band atamaları.

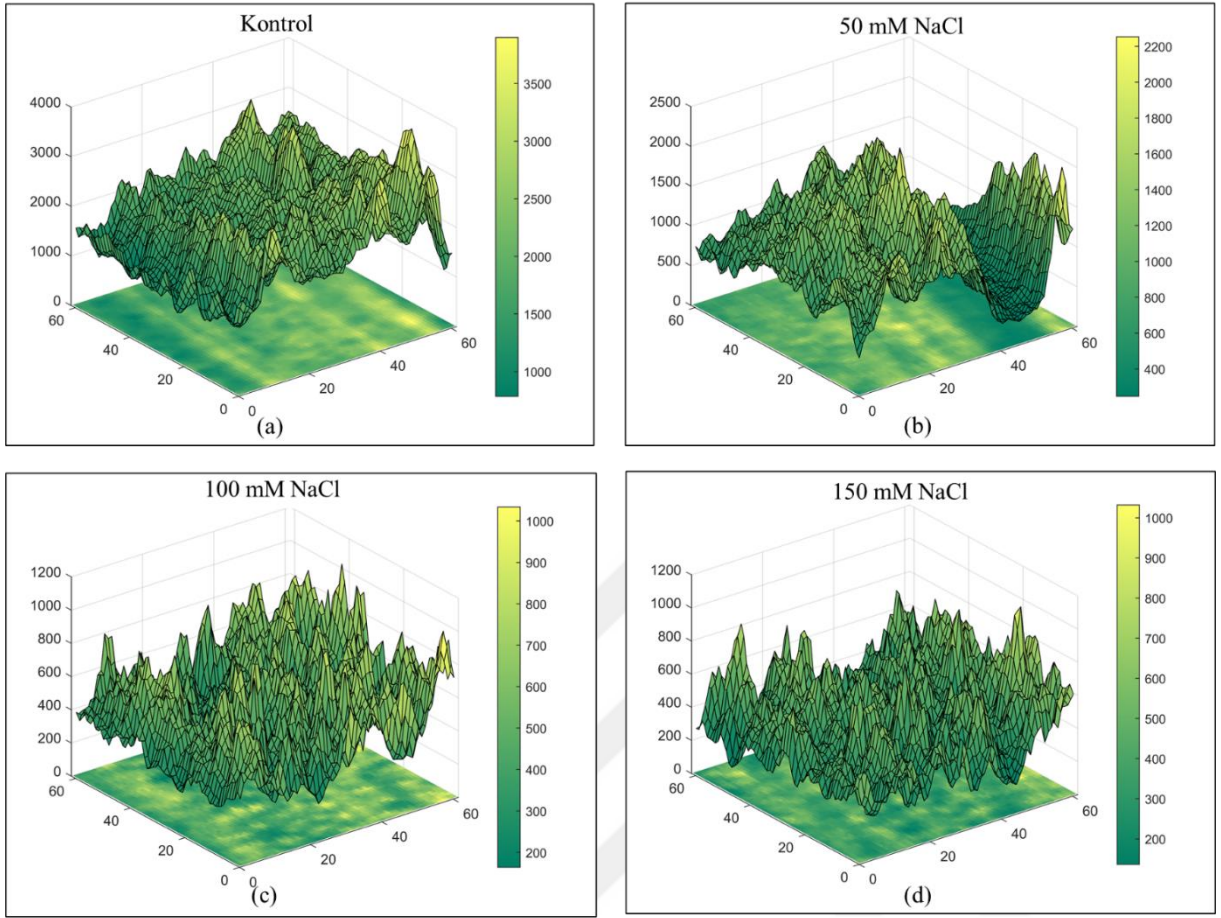
Buğday bitki yaprak örneklerinin kimyasal yapılarındaki farklılıkları ayrıntılı olarak görselleştirmek için, iki selüloz bandına (522 ve 1115 cm^{-1}) ve pektin bandına (747 cm^{-1}) ait dalga sayısı kaymaları üzerinden 2-3 boyutlu Raman haritalandırma tekniği kullanıldı (Şekil 4.5 - 4.7). 2-3 boyutlu Raman haritalarının oluşturulmasında MATLAB programından (MATLAB:R2021a, 2021) yararlanıldı. Bu grafikler, örnek üzerinde taranan bölgenin moleküler yapısının görüntülenmesi anlamını taşımaktadır. Bu görüntülerin şiddet dağılımları, farklı dalga sayılarına göre değişim göstermektedir.

Bu haritalandırmada, tarama tablası kullanılarak, her adımda 10 μm ilerlemek üzere, x-y eksenlerinde toplamda 610 'ar μm^2 'lik alan tarandı. 61 'er noktadan alınan birer saniyelik ölçümler sonucu elde edilen spektral görüntü sayesinde, incelenen kimyasal yapının uzamda nasıl değişiklik gösterdiği anlaşılabilir. Görüntüler, sinyal toplama zamanını iyileştirmek adına, çözünürlükten feragat edilerek elde edildi. Bitkilerle yapılan Raman görüntüleme deneylerinde 10 μm 'lik yanal çözünürlük oldukça yeterlidir. Fakat daha fazla

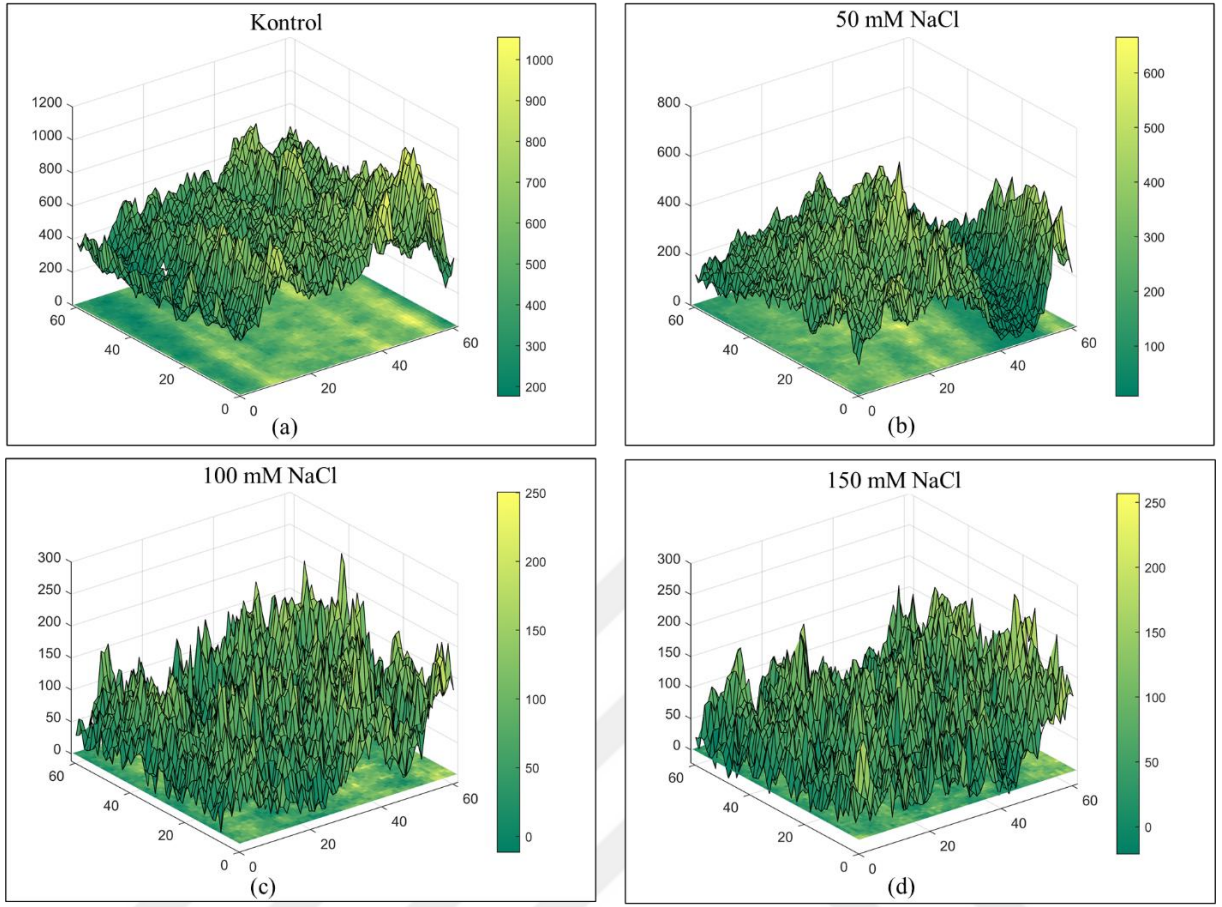
ayrıntının istendiği durumlarda, sinyal/gürültü oranı göz önünde bulundurulmadan daha yüksek çözünürlüklü görüntü elde etmek de mümkündür.



Şekil 4.5: 522 cm⁻¹ selüloz bandına göre değişimi gösteren üç boyutlu Raman haritaları.



Şekil 4.6: 747 cm^{-1} pektin bandına göre değişimi gösteren üç boyutlu Raman haritaları.

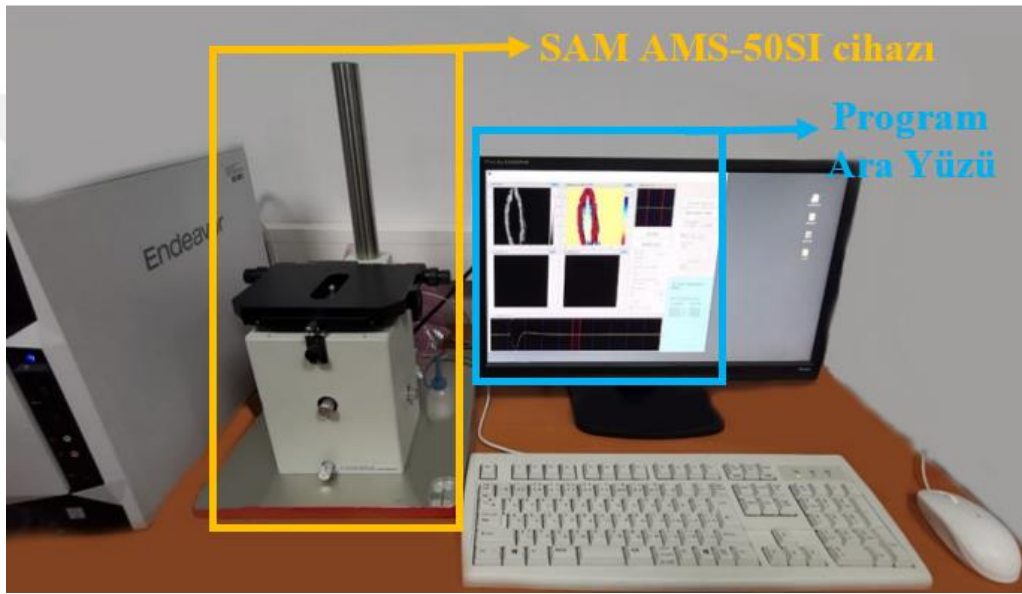


Şekil 4.7: 1115 cm^{-1} selüloz bandına göre değişimi gösteren üç boyutlu Raman haritaları.

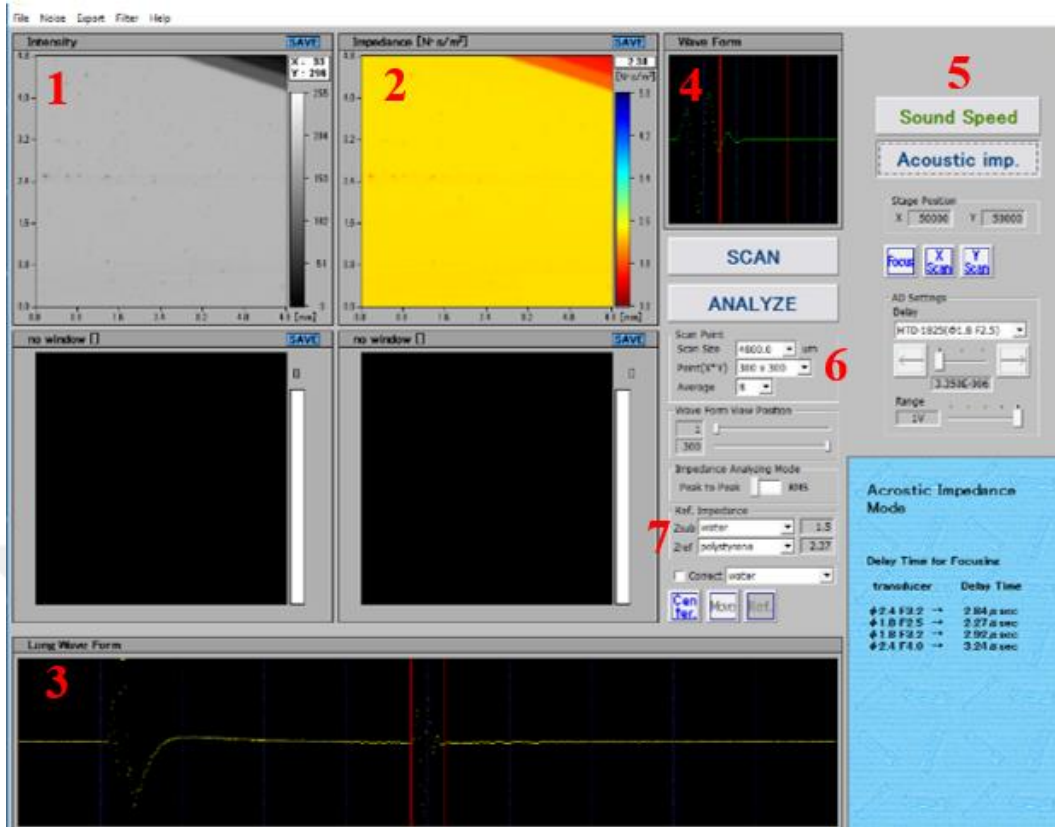
Bu tez çalışmasında, iki selüloz bandının (522 ve 1115 cm^{-1}) ve pektin bandının (747 cm^{-1}) şiddetlerinde ciddi farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; Şekil 4.7'den görülebileceği gibi, kontrol grubu örneklerinden alınan 1115 cm^{-1} selüloz bandının ölçümünde $200 - 1000$ arasında değişim gösterirken, bitki rejenerasyonunun tespit edildiği en yüksek tuz konsantrasyonuna sahip 150 mM NaCl 'lik deney grubunda $0 - 250$ arasında değişmektedir.

4.4. TAM ÖLÇÜMLERİ

Bu tez çalışmasında doku kültürü ortamında farklı tuz konsantrasyonlarında (kontrol, 50 – 100 – 150 mM NaCl) 4 haftalık yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan alınan yaprak örneklerinin yüzey akustik görüntüleri, Boğaziçi Üniversitesi, Medikal Görüntüleme Laboratuvarı'nda yer alan SAM AMS-50SI (Honda Electronics) cihazı ile analiz edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Boğaziçi Üniversitesi, Medikal Görüntüleme Laboratuvarı'nda yer alan SAM AMS-50SI (Honda Electronics) cihazı.

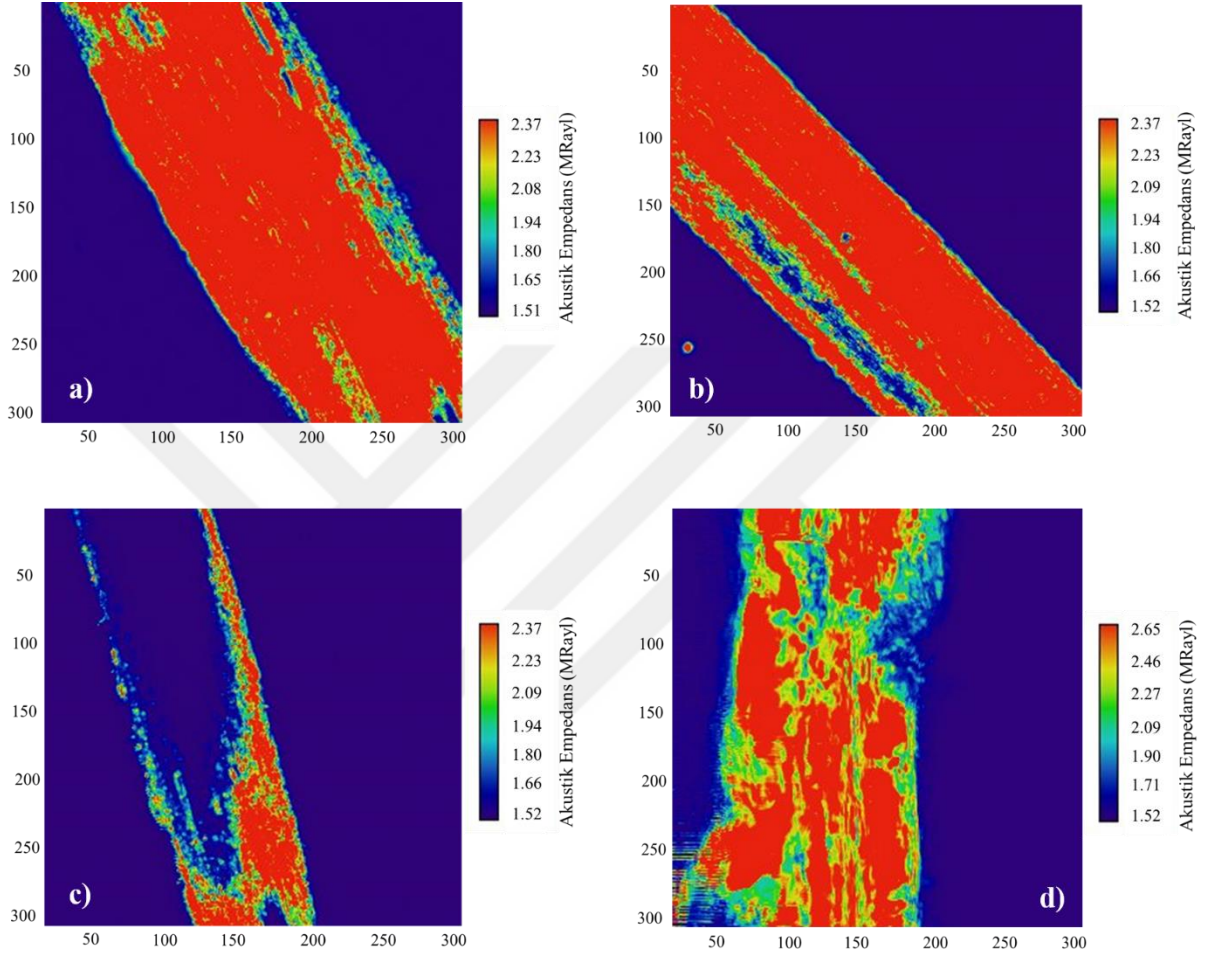


Şekil 4.9: TAM ölçümlerinin elde edilmesini sağlayan programın ara yüzü.

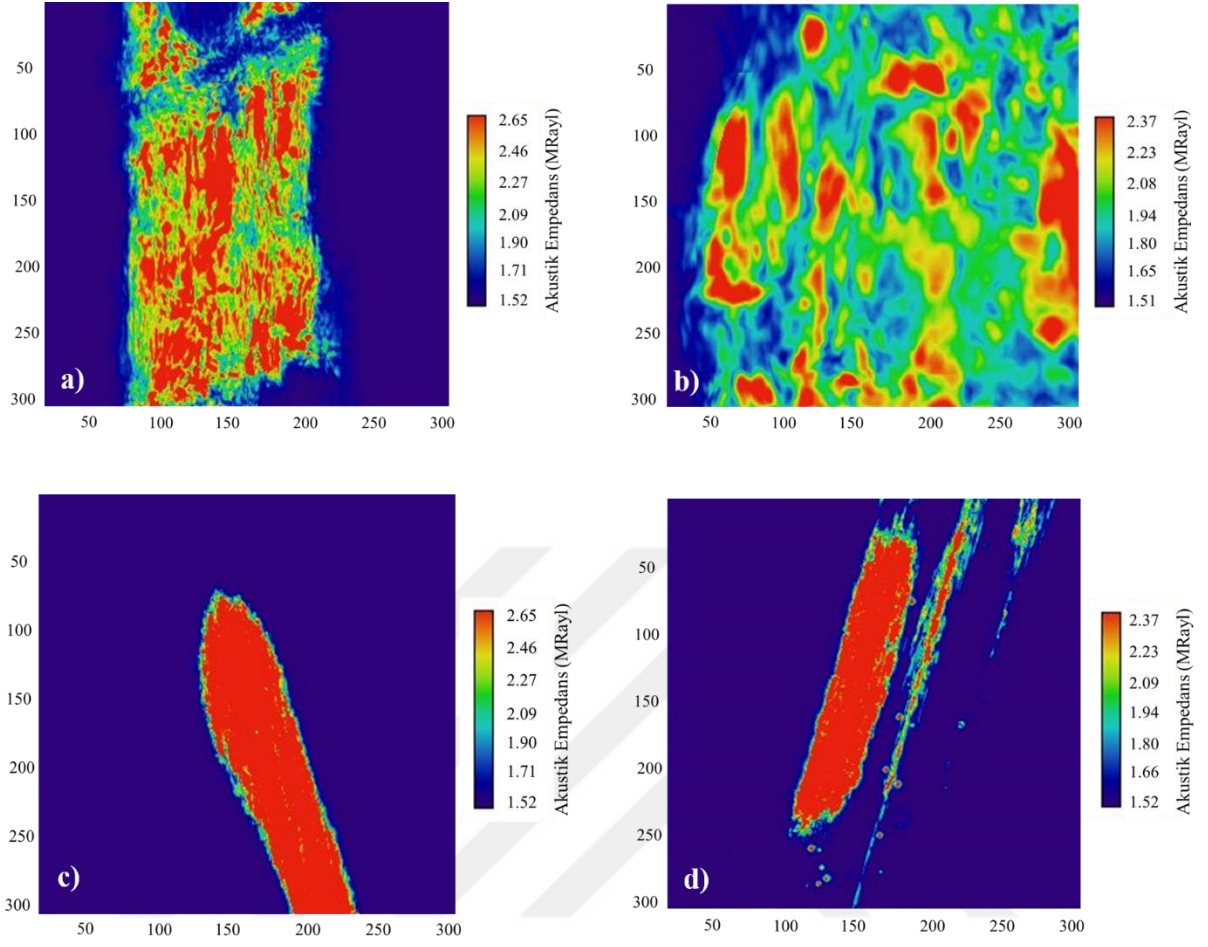
TAM ölçümleri alınması ve verilerin kaydedilmesi esnasında kullanılan bilgisayar programının ara yüzü Şekil 4.9'da görülmektedir. Ara yüzde, 1: bitki yaprak örneğine ait ölçümlenen yüzey alanından yansıyan ses sinyallerinin şiddet değişimini; 2: akustik yüzey görüntüsünü; 3: örnekten yansıyan akustik sinyalleri, 4: ölçüm için seçilen akustik sinyali; 5: ölçüm alınması istenilen modun seçildiği ve X-Y odak noktalarının belirlendiği bölgeyi; 6: kaydetme ve analiz etme bölgesini; 7: referans ve alttaş (substrat) malzemelerine ait akustik empedans değerlerinin verildiği bölgeyi ifade eder.

TAM yöntemi ile doku kültüründe uygulanan farklı konsantrasyonlardaki tuz uygulamalarının bitkide yaratmış olduğu etkiler/zararlanmalar, örnek başına yaklaşık iki dakikalık bir ölçüm sonucu ile saptandı. Tüm bitki deney gruplarındaki buğdaylardan, her bir deney grubu için

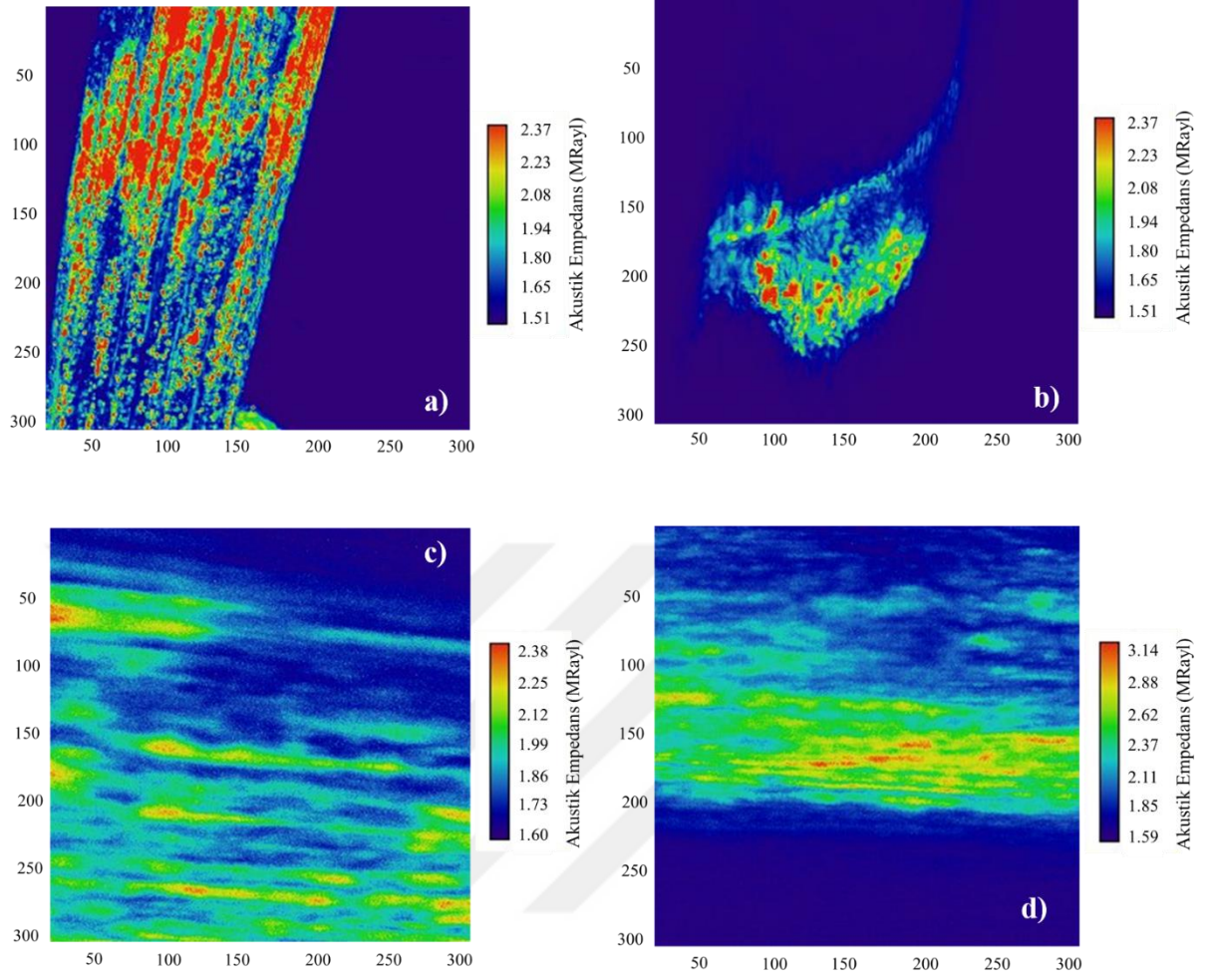
ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri Şekil 4.10 – 4.13'te gösterilmiştir.



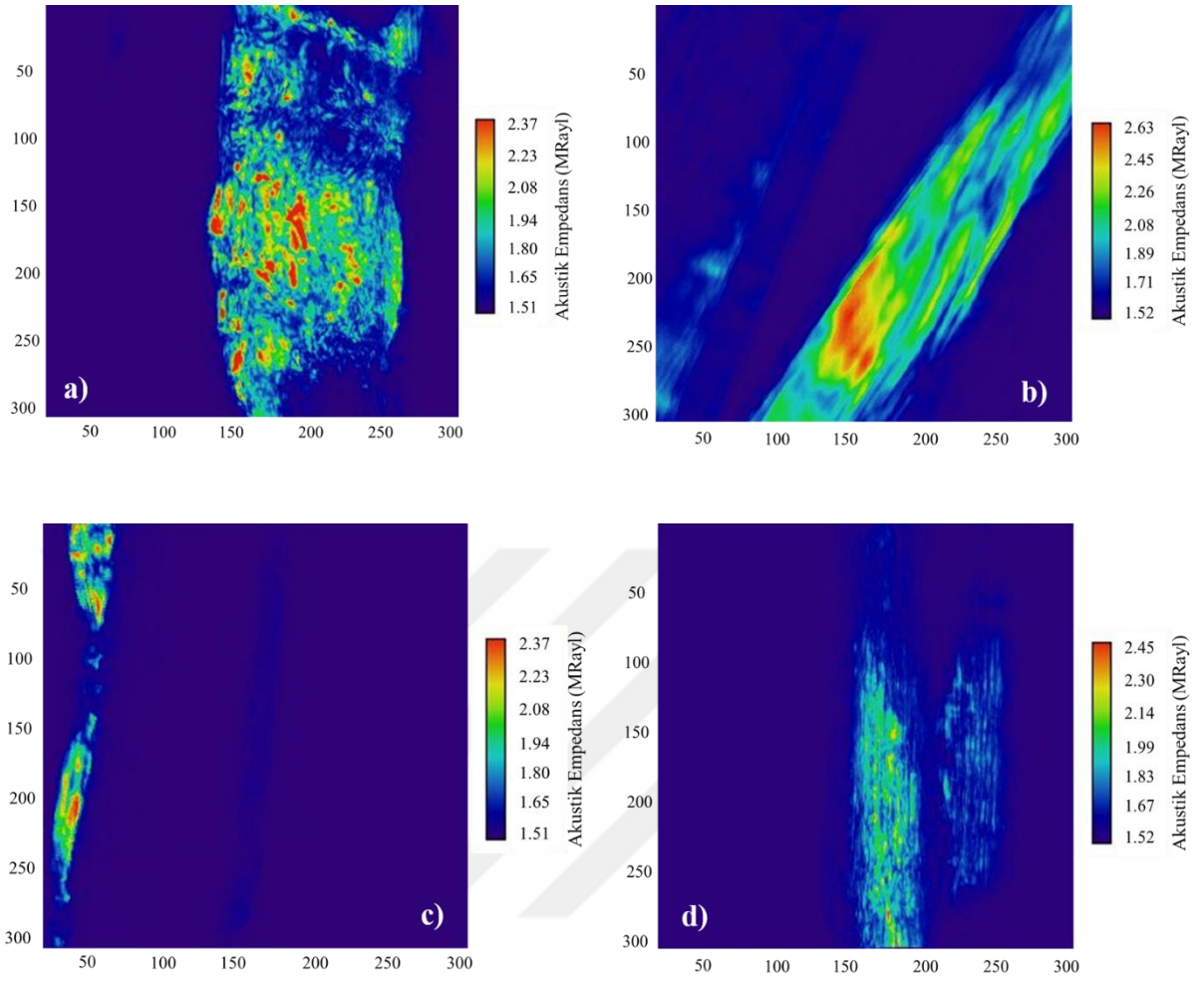
Şekil 4.10: Kontrol deney grubunda 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri: a) Kontrol 1, b) Kontrol 2, c) Kontrol 3, d) Kontrol 4.



Şekil 4.11: 50 mM NaCl'lik deney grubunda 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri: a) 50 mM 1, b) 50 mM 2, c) 50 mM 3, d) 50 mM 4.



Şekil 4.12: 100 mM NaCl'lik deney grubunda 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri: a) 100 mM 1, b) 100 mM 2, c) 100 mM 3, d) 100 mM 4.



Şekil 4.13: 150 mM NaCl'lik deney grubunda 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdaylardan ölçüm alınan örnekler arasından seçilen 4'er yaprak örneğinin TAM yöntemi ile elde edilen yüzey akustik görüntüleri: a) 150 mM 1, b) 150 mM 2, c) 150 mM 3, d) 150 mM 4.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada; Selimiye çeşidine ait olgun buğday embriyoları doku kültürü ortamında kontrol, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl stres etmenine maruz bırakarak 4 hafta boyunca yetiştirildi. Tuz stres etmeninin buğday bitkisinde neden olduğu etkiler/zararlanmalar; UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi kullanılarak biyokimyasal biyoindikatörlerin ölçülmesi, RS kullanılarak biyokimyasal biyoindikatörlerin band ataması ve relatif şiddetlerinin ölçülmesi, TAM kullanılarak yüzey akustik görüntüleri ve akustik empedans değişimlerinin ölçülmesi yoluyla tespit edildi.

5.1. DOKU KÜLTÜRÜ ORTAMINDA TUZ UYGULAMASI VE BUĞDAY BİTKİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ANALİZİ

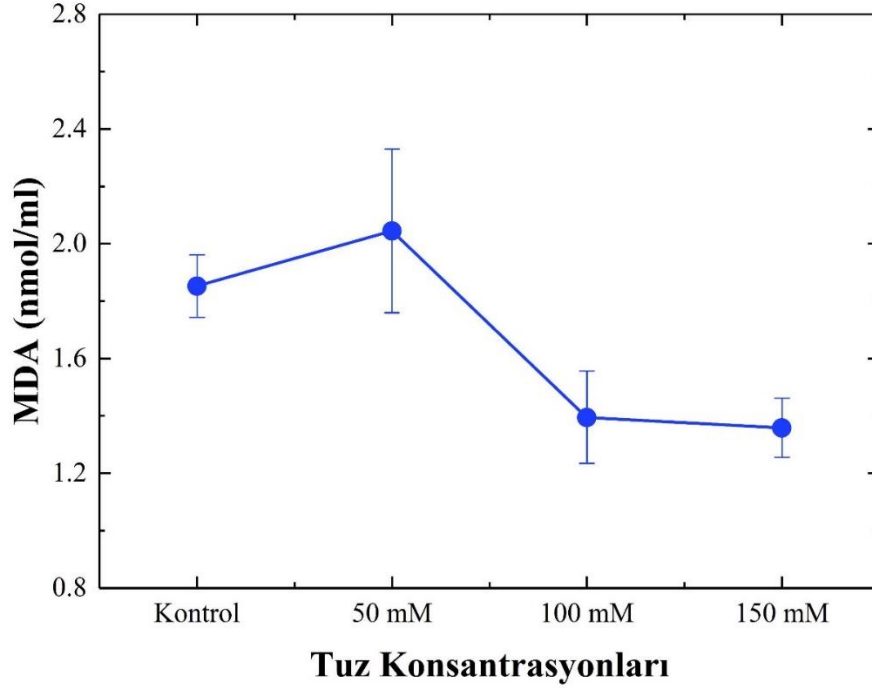
Selimiye buğday çeşidinin olgun embriyolarına doku kültürü ortamında uygulanan farklı konsantrasyonlarda tuzun etkisi 4 haftalık büyüme sürecinde düzenli periyotlarla takip edildi. Bu süreç boyunca 200 mM NaCl konsantrasyonuna ait doku kültürü ortamındaki bitkilerde büyümenin gerçekleşmediği, diğer gruplarda ise büyümenin olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızdaki tüm ölçümler kontrol, 50, 100 ve 150 mM NaCl üzerinden yapıldı. Tuz stresörünün etkisi 50 mM NaCl olan en düşük konsantrasyondan itibaren görülmüştür. Kurulan doku kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz stres etmeni uygulandıktan sonra kontrol grubu baz alınarak incelendiğinde, tuz konsantrasyonu arttıkça bitki büyümesinde konsantrasyona bağlı olarak azalma meydana gelmiştir.

İzci (2009) üç farklı pamuk, Avcı ve diğ. (2020) pamuk, Kadan ve Üzal (2020) biber bitkisine doku kültürü ortamında farklı NaCl konsantrasyonları uygulamışlar ve artan konsantrasyona bağlı olarak bitki büyümesinde azalmanın meydana geldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermektedir.

4. haftanın sonunda doku kültürü ortamında rejenere olan buğday bitki yapraklarındaki klorofil a, klorofil b, total klorofil, karotenoid ve MDA analizi yapıldı.

MDA ölçümü, tuz stresörünün neden olduğu hasarı belirlemek için sık kullanılan bir ölçümdür. Çalışmamızda Denklem 3.1 yardımıyla hesaplanan MDA miktarı değerleri dikkate alındığında, 50 mM NaCl'lik grupta kontrol grubuna göre artışın meydana geldiği görülmüştür. MDA

analizinde, 100 mM ve 150 mM NaCl'lik gruplardaki MDA değerleri kontrol grubunda altında tespit edilmiştir (şekil 5.1).



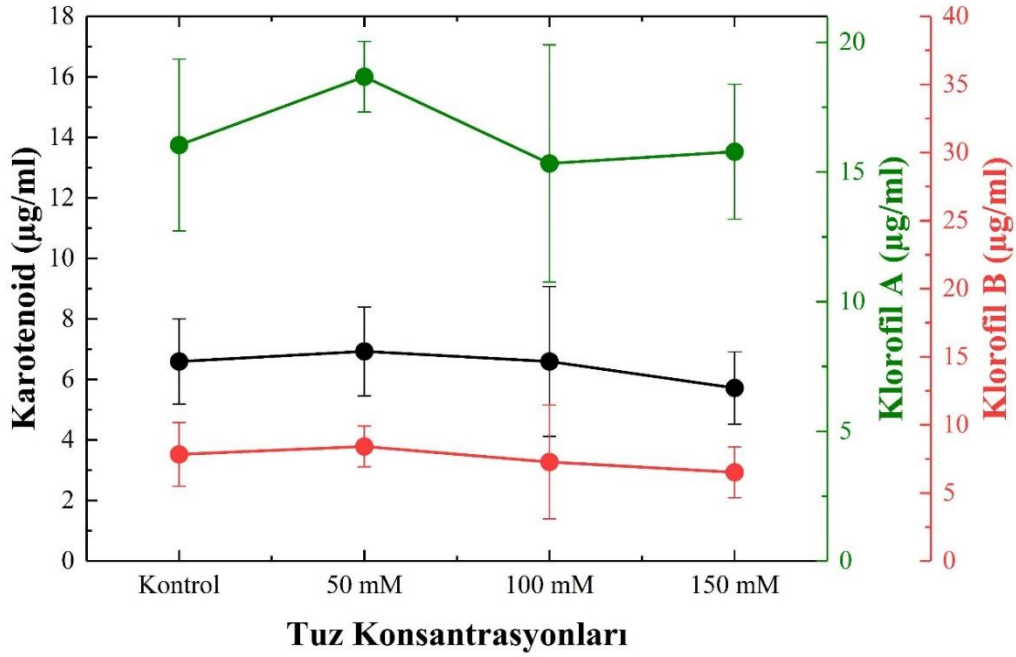
şekil 5.1: MDA miktarının konsantrasyona göre değişimi.

Tuz stres etmeninin etkisi ile artan ROT'ların hücre zarındaki doymamış-yağ-asitlerinde oksidasyona sebep olduğunu ve buna bağlı olarak membranlarda lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA içeriğinin maruz kalınan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (Baran, 2011; Yıldıztuğay, 2011; Karadağ, 2013; Mir ve diğ., 2015; Kırkışla, 2018). Fakat yapmış olduğumuz çalışmada görüldüğü gibi, stres etmenlerine bağlı ölçüm alınan MDA miktarının uygulanan stres etmeninin şiddeti ile doğru orantılı olarak artış/azalış göstermediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Shalata ve Tal (1998), Koca ve diğ. (2006), *Lycopersicon pennellii* de tuz stresörü uygulayarak MDA miktarındaki dirençli çeşitte duyarlı eşitde göre daha düşük olduğunu saptamışlardır. Esfandiari ve diğ. (2007), iki farklı buğday çeşidi üzerine tuz stres etmeni uygulamış ve MDA miktarının birinde arttığını diğerinde ise değişiklik meydana gelmediğini bildirmişlerdir.

Ayan (2010), Adasoy soya çeşidi ile yapmış olduğu çalışmada uygulanan tuz stres etmenine göre MDA miktarının, 50 mM NaCl grubunda kontrol grubuna göre azaldığını tespit etmiştir. En yüksek MDA miktarını kontrol grubunda, en düşük miktarı ise 60 mM NaCl olan grubunda olduğunu hesaplamıştır. Kırkıyla (2018), yapmış olduğu çalışmada tuz stresörü altında buğday bitkisinin sürgün dokusunda MDA miktarını ölçmüş bu ölçüm değerlerinin rakamsal olarak artış gösterdiğini fakat bu artışın istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediğini rapor etmiştir.

Çalışmamızda Selimiye buğday çeşidinin olgun embriyolarından kurulan kültürlerde dört farklı konsantrasyondaki tuz stres etmeninin yapraklarında meydana getirdiği klorofil miktarlarındaki değişimi de belirlendi. Total klorofil miktarı; kontrole göre 100 mM ve 150 mM NaCl stresörü uygulanan gruplarda düştüğü gözlenirken, 50 mM NaCl stresörü uygulanan grupta artışın meydana geldiği saptanmıştır. Benzer sonuçlar klorofil a ve b miktarları için de söz konusudur (Şekil 5.2).

Çalışmamızda yapraklarda bulunan karotenoid miktarı da ölçülerek, 50 mM NaCl'lik grupta kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, 100 mM ve 150 mM NaCl'lik stres etmeni uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre azalış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5.2). Bu sonuçlar doğrultusunda tuz stres etmeni altında büyüyen Selimiye çeşidine ait buğday yapraklarında zararlanmalar meydana getirdiği, klorofil ve karotenoid miktarlarındaki değişimlerin gözlenmesi vasıtasıyla belirlenmiştir.



Şekil 5.2: Karotenoid, klorofil a ve klorofil b miktarlarının konsantrasyona göre değişimi.

Garg ve Singla (2004) yaptıkları çalışmada dört nohut çeşidi üzerinde farklı tuz stres etmenlerini (NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄) uygulayarak 40, 70 ve 100 gün sonra yapraklarındaki klorofil miktarını tayin etmişlerdir. Tuz stres etmeninin bitkide meydana getirdiği sararmaların klorofil pigmenti üzerinde olumsuz etkisi olduğunu bildirmişlerdir ve buna bağlı olarak klorofil miktarlarında azalmalar olduğunu gözlemişlerdir. Tuz stresörü metabolik olayların aksamasına, Ca ve K, P, Mg ve N gibi makro elementlerinin emilimlerinde azalmaya neden olarak klorofil sentezini olumsuz etkilediği vurgulanmaktadır (Yakıt, 2005).

Sairam ve diğ. (2002) ve Sairam ve Srivastava (2002) buğday bitkine uygulanan tuz etmenleri sonucunda klorofil miktarında azalma tespit etmişlerdir. Fasulye (Çanakçı ve Munzuroğlu, 2004), mısır (Khodory, 2004), Charbaji ve Ayyoubi (2004) ise üzüm çeşitlerinde ve arpa (El-Tayeb, 2005) bitkilerinde artan tuz uygulamasının etkisi ile klorofil (a, b ve total) miktarlarını azalttığı tespit edilmiştir.

Karotenoidler, yeşil bitkilerin klorofillerinde yağ ve proteinlere bağlı olarak bulunurlar (Karadurak, 2020).

Dut üzerine yapılan bir çalışmada tuz stresörünün yapraklarda bulunan klorofil miktarının yanısıra karotenoid miktarında azalttığı rapor edilmiştir (Agastian ve diğ., 2000). Benzer şekilde haşhaş bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise tuz stres etmeninin karotenoid miktarında azaltma yarattığı gösterilmiştir (Durukan, 2011). Kırkışla (2018), buğday bitkisi üzerinde tuz stresörünün etkisini tespit etmek için yapılan çalışmada yapraklardaki klorofil miktarlarının yanı sıra karotenoid miktarında azaldığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen ölçüm sonuçları da bir önceki sonuçlar ile bağdaşmaktadır.

5.2. RAMAN SONUÇLARININ ANALİZİ

Selimiye çeşidine ait olgun buğday embriyolarının doku kültürü ortamında 4 hafta boyunca yetiştirilmesi ile elde edilen yaprak örneklerinden alınan numunelerin tuz konsantrasyonuna bağlı Raman spektrumları incelendi. Uygulanan farklı konsantrasyonlarda tuz uygulamalarına karşı bitkinin verdiği tepkiler, spektrumda gözlenen Raman kayma dalga sayılarına titreşim modlarındaki şiddet değişimleri vasıtasıyla tayin edilmeye çalışıldı. Tablo 5.1’de, spektrumlardaki bandlara karşılık gelen band atamaları yapıldı ve atfedilen titreşim modları verildi.

Raman Spektroskopisinde, C=C, C-O-C ve C-N gibi kimyasal bağların titreşimleri güçlü sinyaller vermektedir (Kneipp ve diğ., 1999; Farber, 2018). Gerilme titreşimleri; atomlar arasındaki mesafenin, atomların bağ eksenleri boyunca devamlı olarak değişmesi ile ilgilidir (Çelik ve diğ., 2003; Kumsar, 2015). Esneme titreşimleri v ile gösterilir, atomların birbirlerine doğru yaklaşma ve uzaklaşma hareketi ile ilgilidir. Eğilme titreşimi; atomlar arasındaki açının değişmesi ile ilgilidir ve dört tipi vardır bunlar; kesilme, sallanma, burulma ve bükülmedir (Çelik ve diğ., 2003; Kumsar, 2015). Çalışmamız da elde edilen Raman spektrumu band atamalarında gözlemlenen eğilme titreşim modları burulma ve düzlem dışı bükülmedir. δ burulma titreşimine, γ düzlem dışı bükülme titreşimine karşılık gelmektedir (Kumsar, 2015; Farber, 2018; Farber, 2020).

Tablo 5.1: Raman spektrumlarında gözlemlenen bandların raman kayma dalga sayıları (cm^{-1}), titreşim modları ve band atamaları referansları ile birlikte verilmiştir.

Raman Kayması (cm^{-1})	Titreşim modu	Band ataması	Referans
522	ν (C-O-C)	Selüloz	Edwards ve diğ., 1997
747	γ (C-O-H)	Pektin	Synytsya ve diğ., 2003
816	ν (C-O-C)	Selüloz	Edwards ve diğ., 1997
855	C-C-N gerilme	Serin	Zhu, 2011
1065	ν (C-O-C)	Selüloz	Edwards ve diğ., 1997
1122	ν (C-O-C)	Selüloz	Edwards ve diğ., 1997
1235 - 1250	C-N gerilmesi	Amide III	Williams ve diğ., 1980
1382	δ CH ₂ eğilme titreşimi	Alifatik	Yu ve diğ., 2007
1515	C=C gerilmesi	Karotenoid	Jehlicka ve diğ., 2014
1554	COC titreşimi	Klorofil a	Jehlicka ve diğ., 2014
1563	COC titreşimi	Klorofil b	Schulz ve Baranska, 2007
1630	C=O gerilmesi	Amide I	Williams ve diğ., 1980; Schulz ve Baranska, 2007
1680	C=O gerilmesi	Amide I	Williams ve diğ., 1980; Schulz ve Baranska, 2007

Çalışmamızda uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça, Raman spektrumunda şiddeti azalan bandlar; 522, 747, 816, 855, 1065, 1122, 1235 – 1250, 1630, 1680 cm^{-1} olarak gözlemlendi.

522, 816, 1065, 1115 cm^{-1} bandları selüloza, 747 cm^{-1} pektin, 855 cm^{-1} serin, 1630 - 1680 cm^{-1} arası amide I ve 1235 - 1250 cm^{-1} arası ise amide III bandlarına karşılık

gelmektedir (Williams ve diğ., 1980; Edwards ve diğ., 1997; Synytsya ve diğ., 2003; Schulz ve Baranska, 2007; Zhu, 2011). Karotenoid 1515 cm^{-1} , klorofil 1556 cm^{-1} ve alifatikler 1374 cm^{-1} bandlarına karşılık geldiği ise önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Schulz ve Baranska, 2007; Yu ve diğ., 2007; Jehlicka ve diğ., 2014).

4 haftalık buğday yaprak örneklerine ait Raman spektrumu ölçümlerinin, olgun buğday embriyolarının yetiştigi besiyer içerisindeki tuz konsantrasyonu artarken, Raman spektrum cevabının $450 - 1250\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde azalma yönünde olduğu, $1250 - 1600\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında tuz konsantrasyonu 50 mM NaCl olarak uygulanan gruba ait örneklerde diğer incelenen gruplara göre bir artış gözlemlendi. $1600 - 1800\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ise, tuz konsantrasyonu arttıkça Raman şiddet değerlerinde lineer bir azalış tespit edildi.

Bitkiler stres etmenlerine maruz kaldıklarında hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ROT'ların üretimi tetiklenir. Üretimdeki bu artış hücrenin önemli yapıtaşları olan protein, karbonhidrat ve klorofil gibi makro moleküllerinin yapılarına zarar verir (Parida ve Das, 2005; Kuşvuran ve diğ., 2008; Sienkiewicz-Cholewa ve diğ., 2018; Doğru ve Bildiren, 2020). Bu durum, çalışmamızda elde ettiğimiz Raman spektrumlarında tespit edilen ve spektrumda karakteristik bandlara karşılık gelen klorofil ve karotenoid biyoindikatörlerin şiddetlerinde değişime neden olmaktadır. Raman spektrumundaki klorofile ait en şiddetli pik 50 mM NaCl 'de görüldü ve bunu kontrol, 100 mM NaCl ve 150 mM NaCl 'ye ait olan pikler takip etti. Bu analizin biyokimyasal ölçümler ile belirlenen klorofil miktarları ile uyumlu olduğu görüldü. ROT'ların meydana getirdiği zararlanmanın etkilerini azaltmada görevli olan karotenoidlerin değişimi de Raman spektrumunda gözlemlendi. Spektrumda karotenoide ait en şiddetli pik 50 mM NaCl 'de görüldü ve bunu 100 mM NaCl , kontrol ve 150 mM NaCl 'ye ait pikler takip etti. Klorofil miktarında olduğu gibi RS ile biyokimyasal ölçümler sonucunda belirlenen karotenoid miktarlarının da uyumlu olduğu görüldü.

Bitkilerin hücre duvarlarının yapısında bulunan selüloz, bitkinin temel yapı taşlarından biridir (Akoğlu ve diğ., 2010). Selülozün bitkinin mikrosertliği ve elastikiyeti ile bağlantılı olduğu söylenebilir. Raman analizi sonucunda tuz stres etmeninin etkisi ile selülozün titreşim modlarına atfedilen band şiddetlerindeki değişim gözönüne alındığında, bitkinin yapısal özelliklerinden olan mikrosertliğinde meydana gelen değişimler ile ilgili de bilgi edinilebileceği yorumuna varılabilir.

Selüloz, hemiselüloz dışında bitkinin hücre duvarlarının yapısında pektin, protein ve ligninler de bulunur (Kaur ve diğ., 2017). Pektin, bitkilerin hücre duvarlarının yapısında bulunması nedeni ile stres etmenlerine karşı vermiş olduğu cevaplar, ilgili bandın şiddetlerinin farklılığı ile yorumlanabilir. Selüloz, hemiselüloz ve pektin değerlerinin tuz stres etmeni altında düştüğü literatürde de bildirilmiştir (Piro ve diğ., 2003).

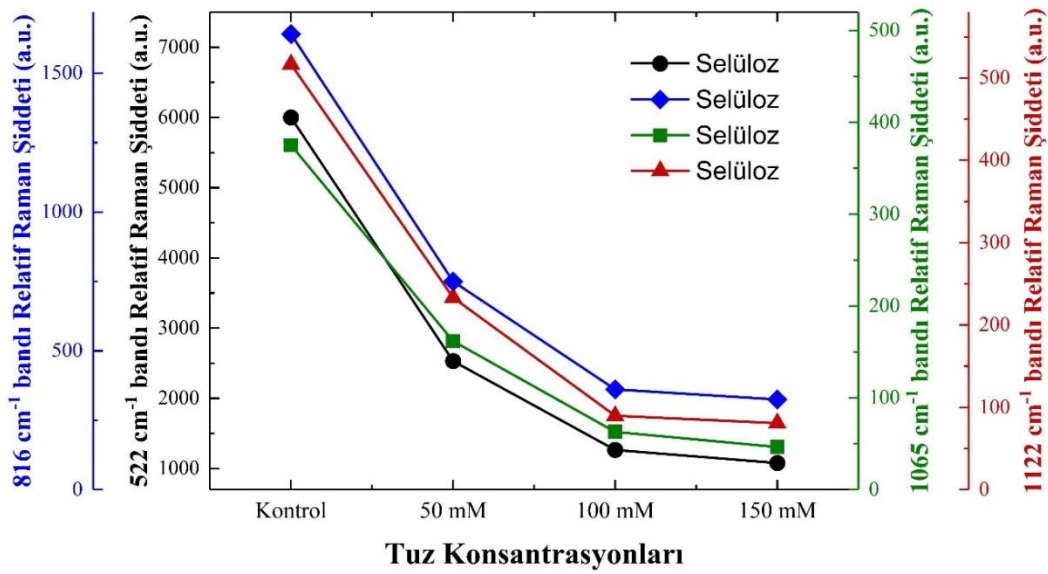
Raman haritalanması kullanılarak Şekil 4.5 - 4.7’de görülen selüloza ait iki bandın (522 ve 1115 cm^{-1}) ve pektine ait bandın (747 cm^{-1}) şiddet değerlerinde belirgin farklılık olduğu gözlemlendi. Aradaki bu farklılığın nedeni, tuz stres etmenine maruz kalarak büyüyen bitkilerin membranlarında tuza bağlı olarak meydana gelen zararlanmalar nedeni ile yapısının bozulmasını ve işlevini kaybetmesiyle Raman spektrumundaki şiddetlerde düşüşün meydana gelmesi olarak yorumlamaktayız.

Proteinlerin tuz stresörü altındaki bitkilerde ozmotik düzenlemeyi sağladığı bildirilmektedir (Ashraf ve Haris, 2004). Uygulanan tuz stres etmenine bağlı olarak protein sentezi ve seviyesinin azalmasına ve sonuç olarak bitkinin büyümesi ve gelişmesini olumsuz yönde etkilemektedir (Artlip ve Funkhouser, 1995; Kong ve diğ., 2005; Sönmez, 2019). Stresör aminoasidi olarak bilinen serin, bitki dokusunda stres etmeninin meydana getirdiği olumsuz etkilerin giderilmesinde görevli olduğu literatürde bildirilmiştir (Ros ve diğ., 2014; Olgun ve diğ., 2016). Serin aynı zamanda tirozin ile birlikte hücre duvarının yapısında bulunan aminoasitlerden biridir (Zhu, 2011). Stres etmeni altında büyüyen bitkilerde serin aminoasiti ve prolin birikiminin arttığı literatürde bildirilmektedir (Mansour, 2000).

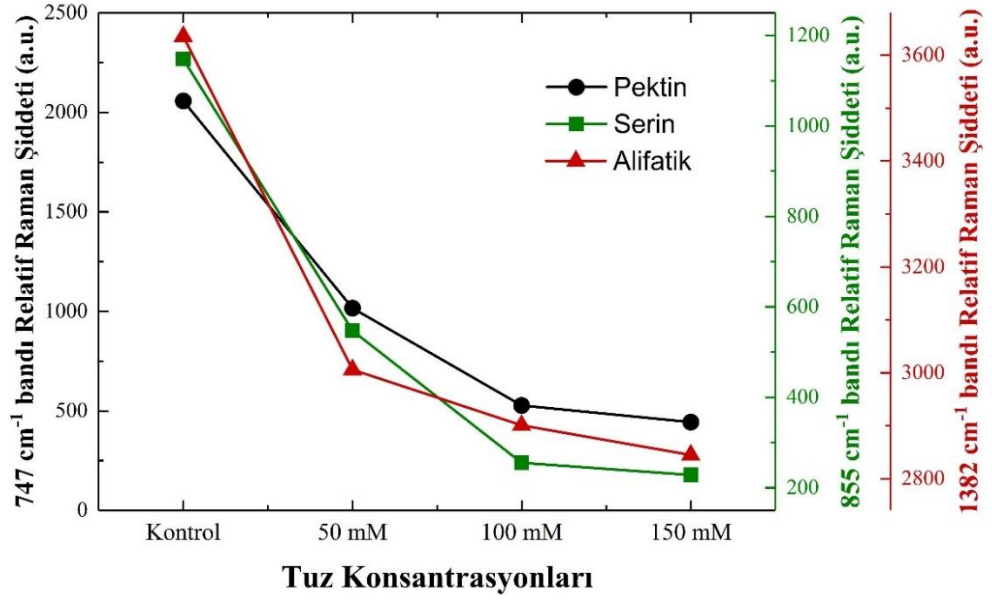
Literatür bilgisine göre Raman spektrumlarında protein değişimi Amide I (1630 – 1680 cm^{-1} arası) ve Amide III (1234 - 1248 cm^{-1}) bantlarında gözlemlenir (Williams ve diğ., 1980; Schultz ve Baranska, 2007). Çalışmamızda elde ettiğimiz Raman spektrumlarında bu bantların Raman şiddetlerinin uygulanan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.

Yapılarında karbon ve hidrojen bulunduran alifatiklerin hidrokarbonik yapıda oldukları bildirilmiştir (Sheppard, 1948). Farklı bitki yaprak yapılarında, alifatik hidrokarbon serilerinin bulunduğu literatürdeki çalışmalarda mevcuttur (Li ve diğ., 2012; Bush ve McInerney, 2015; Pu ve diğ., 2017; Pu ve diğ., 2018). Çalışmamızda 1382 cm^{-1} 'e atanan alifatik bandının Raman şiddeti değerleri 50 mM NaCl’lik tuz uygulanan deney grubunda daha şiddetli olduğu gözlemlendi.

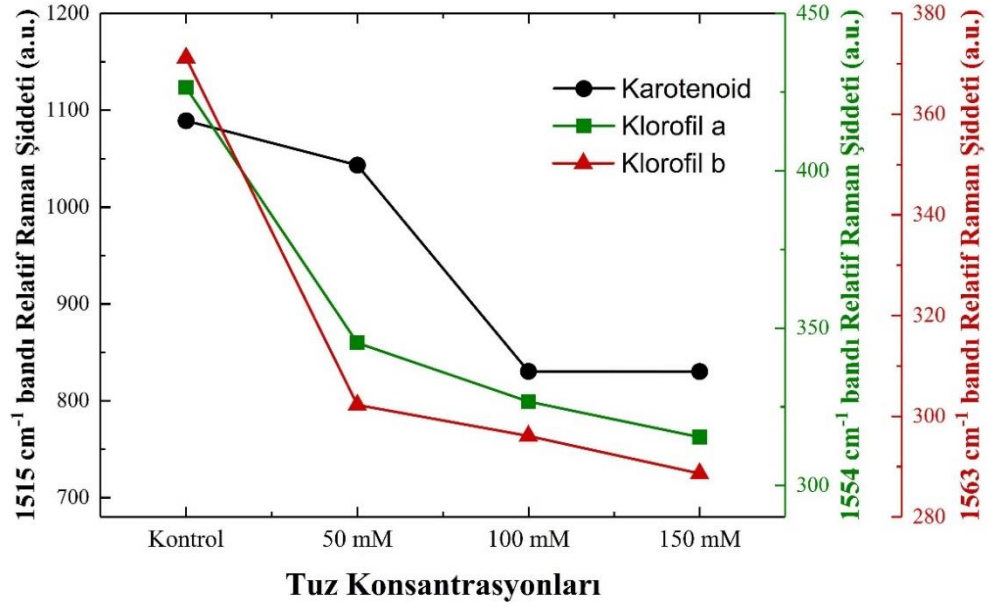
4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen selüloz bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri Şekil 5.3'te; pektin, serin ve alifatik bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri Şekil 5.4'te; karotenoid, klorofil a ve klorofil b bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri Şekil 5.5'te; amide I ve amide III bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri Şekil 5.6'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



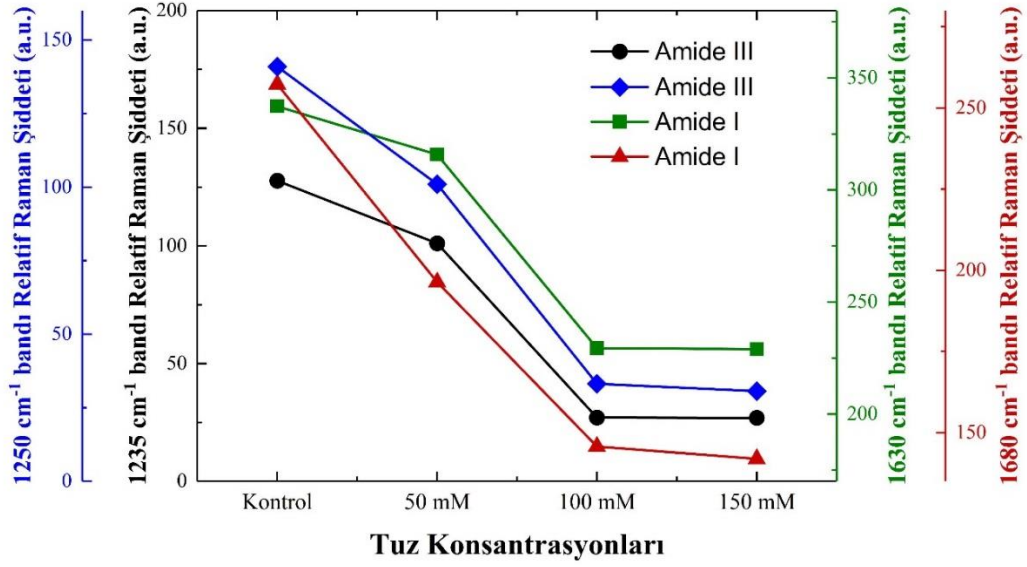
Şekil 5.3: 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen selüloz bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri.



Şekil 5.4: 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen pektin, serin ve alifatik bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri.



Şekil 5.5: 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen karotenoid, klorofil a ve klorofil b bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri.



Şekil 5.6: 4 hafta boyunca yetiştirilen Selimiye çeşidine ait buğdayların yaprak örneklerinden elde edilen Raman spektrumlarında gözlenen amide I ve amide III bandlarının tuz konsantrasyonuna bağlı Raman şiddeti değişimleri.

İncelenen buğday yaprak örneklerinin Raman spektrumlarındaki belirli titreşim modlarına karşılık gelen bandların Raman şiddet değişimleri, örneklerin maruz kaldığı tuz stresörüne karşı vermiş olduğu tepkiler ve stres etmeninin neden olduğu zararlanmalardan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. RS, incelenen bitkinin mikroyapısında meydana gelebilecek değişimleri daha hızlı, yüksek hassasiyetle ve yüksek çözünürlükle belirleyebilmemize olanak sağlar. RS tekniği, bitki yüzeyine 785 nm dalga boyunda laser ışığı gönderilerek incelenen bitki yüzeyinde yüksek çözünürlükte hızlı bir taramaya olanak sağlamaktadır. Bu yöntem ile yapılan ölçümlerde ön hazırlık gerekmemekte olup, her bir örneğe ait 200 – 2200 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki spektrum bir kerede ve istenilen çözünürlüğe bağlı olarak 5 dakika ile 30 dakika arasında değişen sürelerde hızlı bir şekilde elde edilmektedir.

Bu çalışmada her bir bitki yaprağı örneği için Raman spektrumu, yaklaşık 30 dakikada kaydedildi. UV-Görünür Bölge Spektroskopisinde ise, ölçümü yapılacak her bir biyoindikatör için ayrı ayrı uzun bir ön hazırlık işlemi yapılması gerekmektedir. Çalışmamızdaki biyokimyasal analizler; MDA, klorofil ve karotenoid ölçümleri örnek başına yaklaşık 30 dakika ile 120 dakika arasında değişen sürelerde tamamlanmaktadır ve her bir analiz

ölçümü için spektrofotometre cihazı farklı dalga boyuna ayarlanmıştır. RS ile UV-Görünür Bölge Spektroskopi tekniğine dayanan biyokimyasal yöntemler karşılaştırıldığında; RS tekniğinin hem insan gücü gereksinimini hemde ölçüm zamanını önemli ölçüde azalttığı görülmektedir.

5.3. TAM SONUÇLARININ ANALİZİ

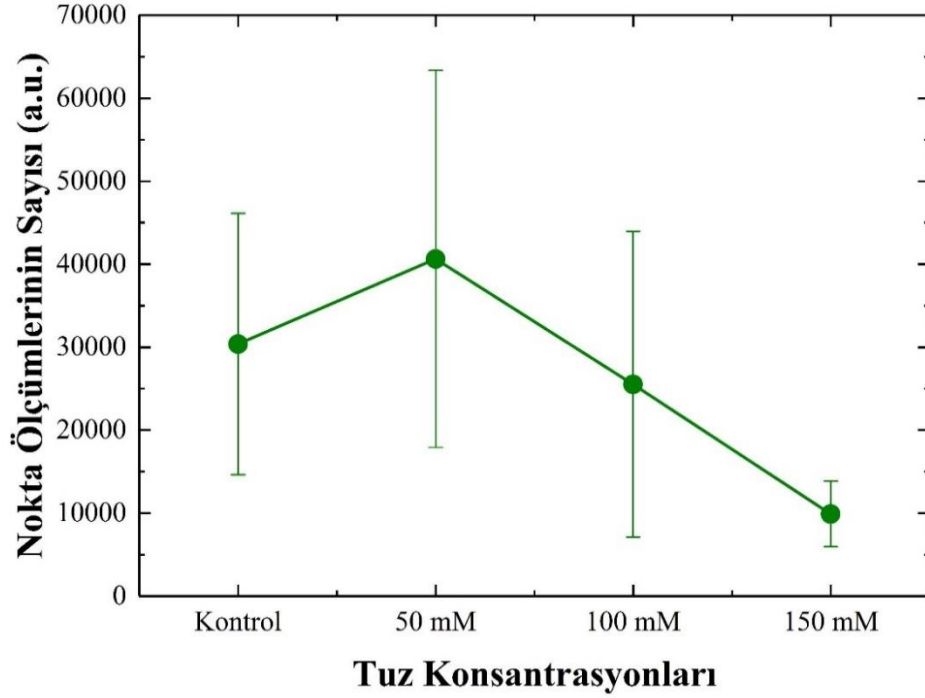
TAM ile buğday bitkisinin yüzeyi hızlı bir şekilde tarandı ve tuz konsantrasyonuna bağlı olarak bitkinin yüzeyinde meydana gelen değişimler gözlemlendi.

Tuz stres etmeninin bitkilerin zarlarında neden olduğu olumsuz etkiler lipid kompozisyonun, zarın yapısında bulunan proteinlerin aktivitesinin değişimi ile oluşan zar yapısının bozulması sonucunda zarın akışkanlığının ve geçirgenliğinin etkilenmesidir (Wu ve diğ., 1998; Reddy ve Iyengar, 1999; Huang, 2006).

Çalışmamızda dört farklı deney grubuna ait buğday yaprak örneklerinin 4.8 mm x 4.8 mm'lik alanı akustik dalga gönderilerek tarandı. Bulgular Bölümü'nde örneklerin akustik görüntüleri verilmiştir (Şekil 4.10 – 4.13).

NaCl stresörü uygulanmış örneklerin yüzey akustik empedansının daha hassasiyetle elde edilebilmesi için, kontrol grubu referans alınarak diğer gruplarda gösterdiği değişimi medyan ortalama yöntemine göre hesaplandı ve verilerden oluşturulan grafik Şekil 5.7'de verildi. Bu yönteme göre, her grup için ölçülmüş örneklerin TAM görüntüsü analiz edildi. Bu analizin aşamaları aşağıdaki gibidir:

- Kontrol grubundaki ölçümlerin medyan değerlerinin hesaplanması ve ortalamalarının alınması,
- Ortalama değerinden büyük olan nokta ölçüm sayısının, tüm görüntülerde bulunup sayılması,
- Kontrol grubu referans alınarak; 50 – 100 – 150 mM deney gruplarının her biri için, medyan değerinden büyük olan nokta ölçüm sayılarının ortalaması ve standart sapma değerlerinin hesaplanmasıdır.



Şekil 5.7: Medyan değeri ölçüm sayılarının (nokta ölçümlerinin sayısı) konsantrasyona göre değişimi.

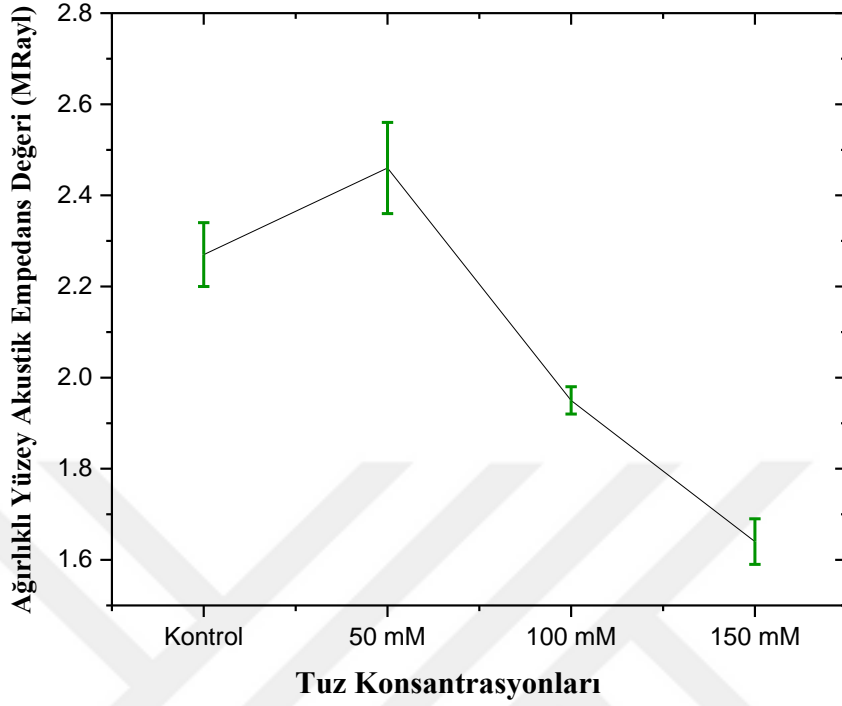
Yapılan hesaplara göre, kontrol ortalama değeri 30389 ve ortalama değeri için 15758 standart sapma miktarı; 50 mM NaCl için ortalama 40640 ve standart sapma değeri 22725 bulunmuştur. 100 mM ve 150 mM NaCl stresörü altında kontrol medyan değeri ölçüm sayılarında azalma göstererek; 100 mM için ortalama değerin 25554 ve standart sapmanın 18429; 150 mM için ortalama değerin 9916 ve standard sapmanın 3967 olduğu hesaplanmıştır (Şekil 5.7).

Medyan ölçüm hesabına ek olarak; buğday bitkilerinden alınan yaprak örneklerinin yüzey akustik empedans değerleri hesaplandı. MATLAB programı (MATLAB:R2021a, 2021) yardımıyla, her bir yaprak yüzeyi için görüntülenen akustik haritalarda tamamen yaprağa ait olan alanlar alınacak şekilde bir eşik (threshold) bölgesi seçilip, bu alanlara karşılık gelen yüzey akustik empedans değerleri hesaplandı.

Tablo 5.2’de kontrol grubundaki her bir örnek için yüzey akustik empedans değerleri standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. Kontrol, 50 – 100 – 150 mM NaCl deney grupları için ağırlıklı ortalama akustik empedans değeri de hesaplanmıştır.

Tablo 5.2: Farklı tuz konsantrasyonlarında yetiştirilen Buğday bitkilerinden alınan yaprak örnekleri için TAM yöntemi ile belirlenen yüzey akustik empedans değerleri (MRayl cinsinden) standart sapmaları ile verilmiştir. Kontrol, 50 – 100 – 150 mM deney grupları için ağırlıklı ortalama akustik empedans değeri hesaplanmıştır.

Deney Grubu	Ağırlıklı Ortalama Akustik Empedans Değeri (MRayl)	Standart sapma değeri
Kontrol	2.27	0.07
50 mM NaCl	2.46	0.10
100 mM NaCl	1.95	0.03
150 mM NaCl	1.64	0.05



Şekil 5.8: Tuz konsantrasyonuna bağlı ağırlıklı ortalama yüzey akustik empedans değerleri (MRayl) standart sapmaları ile verilmiştir.

Her bir örnek üzerinden elde edilen akustik empedans değerlerinin standart sapmaları dikkate alınarak, ağırlıklı (mean) ortalama hesabı yapıldı. Ağırlıklı ortalama değerlerine bakıldığında, buğday bitkisinin yüzey akustik empedansının 50 mM tuz stresörüne maruz kalmış olan deney grubu için en yüksek değeri aldığı görülmektedir (Şekil 5.8). Ortalama akustik empedans değerlerine bakıldığında, farklı tuz konsantrasyonlarında yetiştirilen 4 haftalık Selimiye çeşidine ait buğday yaprak örneklerinin yüzey akustik empedans değerlerinde bir değişim meydana geldiği görülmektedir.

Çalışmamızda TAM yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlarda, tuz stres etmeninin bitki yüzeyinde meydana getirdiği zararlanmalar sonucunda bitkinin mikrosertlik ve yüzey elastikiyetinin de değiştiği saptanmıştır. Kontrol grubu baz alınarak, tuz konsantrasyonu farkına göre karşılaştırma yaptığımızda bitkinin yüzey akustik empedansının en yüksek olduğu değer 50 mM NaCl'lik tuz konsantrasyonuna sahip deney grubunda gözlemlendiği görülmektedir.

Denklem 3.14'ten de anlaşılacağı gibi, akustik empedans değeri örneğin elastikiyeti ile doğru orantılı olarak değiştiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında TAM yöntemi uygulanarak elde edilen ölçüm sonuçlarının analizi, doğrudan bitki yaprak örneklerinin mikrosertlik ve elastikiyetlerinin değişimine de işaret ettiği düşünülmektedir.

TAM sonuçlarından; bitkilerin maruz kaldıkları stres etmenleri ile başa çıkabilmek ve yaşamlarını devam ettirebilmek için bölgesel oluşabilecek zararlanmalara karşı öncelikli olarak yüksek bir direnç gösterdikleri ve maruz kalınan stresörün süresine bağlı olarak da sonrasında bu direnci koruyamadıkları yorumu yapılabilir.

Bu tez çalışmasında; TAM ile incelenen buğday bitki örneklerinin maruz kaldığı tuz konsantrasyonu değişimine bağlı olarak moleküler yapısının değişime uğradığı görülmektedir. Böylece TAM tekniğinin hem örneğe zarar vermeden hem de 2 dakika gibi çok kısa bir sürede stres etmeninin bitkinin mikroyapısına vermiş olduğu zararlanmaları tayin edebilme amaçlı olarak kullanılabilmesi öngörülebilmektedir. Literatür taraması sonucunda; Clair ve diğ. (2000), Elbaum ve diğ. (2008), Povey ve diğ. (2013) yapmış oldukları çalışmalarda TAM'ın bitki hücre yapısının analizinde kullanmışlardır. Fakat TAM'ın stres etmenlerinin bitki üzerinde meydana getirdiği etkinin tespitine yönelik kullanımına rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ışığında tuzluluk gibi stres etmenlerine maruz kalan bitkilerin stres maruziyetlerinin belirlenmesine yönelik yapılacak çalışmalarda Raman ve TAM gibi yüksek çıktılı ileri analiz tekniklerinin entegre edilmesi, analiz sürecine kolaylık, hız ve zaman kazandırma yönünde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz, M.A., 2017, *Achillea gypsicola türünde kallus kültürü ile sekonder metabolit üretim potansiyelinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Ordu Üniversitesi.
- Agastian, P., Kingsley, S.J. and Vivekanandan, M., 2000, Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes, *Photosynthetica*, 38, 287–290.
- Akoğlu, A., Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L. and Çakır, İ., 2010, Bakteriye selülozun özellikleri ve gıda sanayisinde kullanımı, *Gıda*, 35 (2), 127-134.
- Alikamanoğlu, S., 1999, *In vitro tekniklerle haploid şeker pancarı (Beta vulgaris L.) bitkisinin eldesi ve somatik mutasyonların oluşturulmasında gama radyasyonunun kullanılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Alizadeh, H., Naghavi, M.R., Omid, M. and Saatian, B., 2004, Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.), 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, 1.10.2004, ISBN: 920-842-209, http://www.agronomyaustraliaproceedings.org/images/sampledata/2004/poster/3/4/2/89_3_saatian.pdf, [Ziyaret Tarihi: 30.08.2020].
- Almansouri, M., Kinet, J.M. and Lutts, S., 2001, Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.), *Plant and Soil*, 231, 243-254.
- Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., 2002, Oxidative stress and antioxidative systems in plants, *Current Science*, 82, 10.
- Artlip, T.S. and Funkhouser, E.A., 1995, Protein synthetic responses to environmental stresses, M. Pessaraki (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Physiology*, 627– 644.
- Arzani, A. and Mirodjagh, S.S., 1999, Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and in vitro salt stress, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 67-72.
- Ashraf, M and Harris, P.J.C., 2004, Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, *Plant Science*, 166 (1), 3-16.
- Aslam, Z., Jeschke, W.D., Barrett- Lennard, E.G., Setter, T.L., Watkin, E. and Greenway, H., 1986, Effects of external NaCl on the growth of atriplex amnicola and the ion relations and carbohydrate status of the leaves, *Plant, Cell & Environment*, 9 (7), 571-580.
- Ayan, A., 2010, *Soya (Glycine max L. Merrill) doku kültüründe antioksidan savunma sistemlerine oksidatif stresin etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Avcı, U.Y., Ahmed, H.A.A., Akdoğan, G. and Uranbey, S., 2020, Farklı pamuk çeşitlerinin *in vitro* koşullarda tuz stresine toleransının belirlenmesi, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi (GBAD)*, 9 (1), 13-26.

- Babaoğlu, M., Gürel, E. and Özcan, S., 2002, Bitki biyoteknolojisi I doku kültürü ve uygulamaları, *Selçuk Üniversitesi Vakıf Yayınları*, Konya. ISBN: 975-6652-04-7.
- Bahadur, A., Jangid, K.K., Singh A.K, Singh, U., Rai, U., Singh, M.K., Rai, N., Singh, P.M., Rai, A.B. and Singh, B., 2016, Tomato genotypes grafted on eggplant: Physiological and biochemical tolerance under waterlogged condition, *Vegetable Science*, 43 (2), 208-215.
- Baran, A., 2011, *Bitkilerin tuz stresine toleransında salisilik asit ve prolinin fizyolojik rolünün araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi.
- Baranska, M., Schulz, H., Rösch, P., Strehle, M.A. and Popp, J., 2004, Identification of secondary metabolites in medicinal and spiceplants by NIR-FT-Raman microspectroscopic mapping, *The Analyst*, 129, 926-930.
- Bilen, B., Gökbulut, B., Kafa, U., Heves, E., İnci, M.N. and Ünlü, M.B., 2018a, Scanning acoustic microscopy and time-resolved fluorescence spectroscopy for characterization of atherosclerotic plaques, *Scientific Reports*, 8, 14378.
- Bilen, B., Gökbulut B., Kafa, U., Heves, E., İnci, M.N. and Ünlü, M.B., 2018b, Time-Resolved fluorescence spectroscopy for characterization of atherosclerotic plaques, *Scientific Reports*, 8, 1-10.
- Bilen, B., Türker Şener L., Albeniz, I., Albeniz, I., Sezen, M., Ünlü, M.B. and Uğurlucan, M., 2019, Determination of ultrastructural properties of human carotid atherosclerotic plaques by Scanning Acoustic Microscopy, Micro-Computer Tomography, Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy, *Scientific Reports*, 9, 1-10.
- Bush, R.T. and McInerney, F.A., 2015, Influence of temperature and C4 abundance on n-alkane chain length distributions across the central USA, *Org Geochem*, 79, 65–73.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. and Aras, S., 2012, Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, *Türk Hij. Den. Biyol. Derg*, 69 (2), 97–110.
- Casadio, F., Daher, C. and Bellot-Gurlet, L., 2016, Raman Spectroscopy of cultural heritage materials: Overview of applications and new frontiers in instrumentation, sampling modalities, and data processing, *Topics in Current Chemistry*, 374 (5), 62.
- Charbaji, T. and Ayyoubi, Z., 2004, Differential growth of some grapevine varieties in Syria in response to salt in vitro, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40 (2), 221-224.
- Chu, C.C., 1978, In: Proceedings of symposium on plant tissue culture, *Science Press, Peking*, 43–50.
- Clair, B., Djespoux, G., Chanson, B. and Thibaut, B., 2000, Possible use of scanning acoustic microscopy to study local wood properties: preliminary study of experimental conditions, *Annals of Forest Science*, 57 (4), 335-343.
- Cummins, G.A. and Robert-Thomson, C., 2009, Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24, 1347–1351.

- Curtis, P.S. and Lauchli, A., 1985, Responses of kenaf to salt stress: germination and vegetative growth, *Crop Science*, 25 (6), 944-949.
- Çanakçı, S., and Munzuroğlu, Ö., 2004, Fasulye *phaseolus vulgaris* l. çeliklerinde ağırlık değişimleri, pigment ve protein miktarları üzerine asetilsalisilik asit ve tuz NaCl uygulamasının karşılıklı etkileri, *Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24 (1), 23-40.
- Çekiç, F.Ö., 2004, *Tuz ve ağır metal stresine maruz bırakılan domates bitkisinde bazı fizyolojik parametrelerin ve antioksidant savunma sisteminin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi.
- Çelik, İ., Akkurt, M., İde, S., Tutar, A. and Çakmak, O., 2003, C₇H₈Br₄ molecule conformation analysis and optimization of quantum mechanical methods, the resulting x-ray structure analysis of electronic and structural parameters in comparison with the results, *Gazi University Journal of Science*, 16 (1), 27- 35.
- Davis, P., 1985, *Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Vol. 9*, Edinburgh University Pres, Edinburgh, ISBN: 9780852244944.
- Delane, E., Greenway, H., Munns, R. and Gibbs, J., 1982, Ion concentration and carbohydrate status of the elongating leaf tissue 4Hordeum vulgare growing at high external NaCl: I. relationship between solute concentration and growth, *Journal of Experimental Botany*, 33 (4), 557–573.
- Demirkan, İ., Yaprak, G., Ceylan, C., Algül, E., Parlak, M., Ünlü, M.B. and Bilen, B., 2019, Acoustic impedance measurement of radiotherapy-induced effect on the human tooth by 320 MHz scanning acoustic microscopy, *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XVII*, 108811S.
- Dodig, D., Zoric, M., Mitic, N., Nikolic, R. and Surlan- Momirovic, G., 2008, Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95, 107.
- Doğru, A. and Bildiren, Ş., 2020, Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde foliar bor uygulamalarının neden olduğu fizyolojik ve biyokimyasal değişimler, *Boron*, 5 (2), 100-107.
- Driver, J.A. and Kuniyuki, A.H., 1984, *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock, *HortScience*, 19 (4), 507-509.
- Durukan, H., 2011, *Tescilli haşhaş (Papaver somniferum L.) çeşitlerinde tuz stresinin antioksidant enzimler üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi.
- Edwards, H. G., Farwell, D. W. and Webster, D., 1997, FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 53, 2383–2392.
- El-Tayeb, M.A., 2005, Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid, *Plant Growth Regulation*. 45, 215–224.

- Elbaum, R., Gorb, S. and Fratzl, P., 2008, Structures in the cell wall that enable hygroscopic movement of wheat awns, *Journal of Structural Biology*, 164, 101–107.
- Elgün, A. and Ertugay, Z., 2011, Tahıl İşleme Teknolojisi, *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları*, 297, 411.
- Er, E., 2010, *Konfokal Raman Yöntemleri*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi.
- Esfandiari, E., Shekari, F., Shekari, F. and Esfandiari, M., 2007, The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling, *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 1842-4309.
- Ezer, T., Kara, R. and Demir, İ., 2010, Bazı akuatik ve akuatik olmayan biryofitlerin pigment konsantrasyonlarının karşılaştırılması; klorofil a/b ve toplam karotenoid, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3 (2), 181-183.
- FAO, 2019, *FAO Statistical Databases*, <http://www.fao.org/faostat/en/#home>, [Ziyaret Tarihi: 18.05.2020].
- Farber, C. and Kurouski, D., 2018, Detection and identification of plant pathogens on maize kernels with a hand-held Raman Spectrometer, *Anal. Chem.*, 90, 3009–3012.
- Farber, C., Bryan, R., Paetzold, L., Rush, C. and Kurouski, D., 2020, Non-Invasive characterization of single-, double- and triple-viral diseases of wheat with a hand-held Raman Spectrometer, *Frontiers in Plant Science*, 11, 1-7.
- Ferraro, J.R., Nakamoto K. and Brown C. W., 2003, *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd Ed., Academic Press, San Diego, ISBN: 9780122541056.
- Filek, M., Sieprawska, A., Koscielniak, J., Oklestková, J., Jurczyk, B., Telke, A., Biesaga-Koscielniak, J. and Janeczko, A., 2019, The role of chloroplasts in the oxidative stress that is induced by zearalenone in wheat plants – The functions of 24-epibrassinolide and selenium in the protective mechanisms, *Plant Physiology and Biochemistry*, 137, 84–92.
- Foolad, M. and Lin, G., 1997, Genetic potential for salt tolerance during germination in *Lycopersicon* species, *HortScience*, 32, 296-300.
- Garg, N. and Singla, R., 2004, Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress, *Braz. J. Plant Physiol*, 16 (3).
- George, E.F., Puttock, D.J.M. and George, H.J., 1987, *Plant culture media. Vol. 1, formulations and uses*, Exegetics Limited, England.
- Gresshoff, P.M. and Doy, C.H., 1972, Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture, *Australian J. Biol. Sci.*, 25, 259-264.
- Güzelçimen, F., Tanören, B., Çetinkaya, Ç., Dönmez, K.M., Efker, H.İ., Özen, Y., Bingöl, D., Sirkeci, M., Kınacı, B., Ünlü, M.B. and Özçelik, S., 2020, The effect of thickness on surface structure of rf sputtered TiO₂ thin films by XPS, SEM/EDS, AFM and SAM, *Vacuum*, 182, 109766.

- Haken, H. and Wolf, H.C., 2008, *Molekül Fiziği ve Kuantum Kimyası*, Değişim Yayınları, İstanbul, ISBN: 9786054031030.
- Heath, R.L. and Packer L., 1968, Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125 (1), 189-198.
- Huang, B., 2006, Cellular membranes in stress sensing and regulation of plant adaptation to abiotic stresses, *Plant-Environment Interactions, Published by CRC/Taylor and Francis*, 416.
- İzci, B., 2009, Pamukta (*G. hirsutum* L.) farklı tuz konsantrasyonlarının *in vitro* koşullarda fotosentetik pigmentler üzerine etkisi, *Alınteri*, 17B, 7-13.
- Jehlicka, J., Edwards, H.G.M., Osterrothova, K., Novotna, J., Nedbalova, L., Kopecky, J., Nemeč, I. and Ören, A., 2014, Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: implications for astrobiology, *Philos. Trans. R. Soc A.*, 372.
- Jena, J., Sahoo, S.K. and Dash, G.K., 2020, An introduction to abiotic stress in plants, *Advances in Agronomy*, 9 (1-9), 163-186.
- Junquera, L.C. and Carneiro, J., 2009, *Temel Histoloji (Text & Atlas)*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 9789754206999.
- Kadan, H.Y. and Üzal, Ö., 2020, Tuz stresi ve geri kazanım sürecinde biberin (*Capsicum annuum* L.) bitki gelişimi ve iyon alımındaki değişimler, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (3), 1476-1485.
- Karadağ, F., 2013, *Farklı dozlarda selenyum uygulamalarının haşhaş (Papaver somniferum L.) yapraklarında antioksidan enzimler üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Karadurak, E.K., 2020, *Botryococcus sp.'nin karotenoid kompozisyonlarında ışığa bağlı değişimlerin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi.
- Kaur, S., Dhugga, K.S., Beech, R. and Singh, J., 2017, Genome-wide analysis of the cellulose synthase-like (Csl) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), *BMC Plant Biology*, 17, 193.
- Keskin, C.B., 2006, *Buğdayda (Triticum aestivum L.) absisik asitle ilişkili gen anlatımı*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Khandasammy, S.R., Fikiet, M.A., Mistek-Morabito, E. and Ahmed. Y., 2018, Bloodstains, paintings, and drugs: Raman spectroscopy applications in forensic science, *Forensic Chemistry*, 8, 111–133.
- Khodory, S.E.A., 2004, Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants, *International Journal of Agriculture and Biology*, 6 (1), 5-8.

- Kırkışla, M., 2018, *Bitki kökenli duman solüsyonunun tuz stresi altındaki buğday (Triticum aestivum L.) bitkisinde çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi.
- Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R.R. and Feld, M.S., 1999, Surface enhanced non-linear Raman scattering at the single-molecule level, *Chemical Physics*, 247, 155-162.
- Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R.R. and Feld, M.S., 2002, Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14,18.
- Koca, H., Özdemir, F. and Turkan, İ., 2006, Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. Pennellii*, *Biologia plantarum*, 5 (4), 745-748.
- Kong, K., Daduang, S., Wongkham, C.H., Bun– Nag, S., Kosittrakun, M. and Theerakulpisut, P., 2005, Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings, *Sci. Asia*, 31, 403–408.
- Korkmaz, H. and Durmaz, A., 2017, Bitkilerin abiyotik stres faktörlerine verdiği cevaplar, *GÜFBED/GUSTIJ Derleme/Review*, 7 (2), 192-207.
- Kumsar, F., 2015, *İki ve çok atomlu moleküllerin dönme-titreşim enerjilerinin yaklaşım yöntemleriyle incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hitit Üniversitesi.
- Kurdziel, M., Dlubacz, A., Weselucha-Birczynska, A., Filek, M. and Labanowska, M., 2015, Stable radicals and biochemical compounds in embryos and endosperm of wheat grains differentiating sensitive and tolerant genotypes – EPR and Raman studies, *Journal of Plant Physiology*, 183, 95–107.
- Kurtuluş, G., 2019, *Buğday (Triticum aestivum L.)’da alüminyum toksisitesine karşı kitosan uygulamasının etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi.
- Kuşvuran, Ş., Yaşar, F., Abak, K. and Ellialtıoğlu, Ş., 2008, Tuz stresi altında yetiştirilen tuz tolerant ve duyarlı *Cucumis sp.*’nin bazı genotiplerinde lipid peroksidasyonu, klorofil ve iyon miktarlarında meydana gelen değişimler, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci)*, 18 (1), 13-20.
- Lastochkina, O., Pusenkova, L., Yuldashev, R., Babaev, M., Garipova, S., Blagova, D., Khairullin, R. and Aliniaiefard, S., 2017, Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity, *Plant Physiology and Biochemistry*, 121, 80–88.
- Lawson, E.E., Barry, B.W., Williams, A.C. and Edwards, H.G.M., 1998, Biomedical applications of raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy*, 28 (2-3), 111-117.
- Lazof, D. and Lauchli, B., 1991, The nutritional status of the apical meristem of *Lactuca sativa* as affected by NaCl salinization: An electron-probe microanalytic study, *Planta*, 184, 334-342.

- Levitt, J., 1980, *Responses of Plants to Environmental Stresses: Chilling, freezing, and high temperature stresses, Second Ed., Vols. I II*, New York and London Academic Press, ISBN 10: 0124455018, 497.
- Li, H., Qureshi, J.A. and Kartha, K.K., 1988, The influence of different temperature treatments on anther culture response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Science*, 57 (1), 55-61.
- Li, R., Luo, G., Meyers, P.A., Gu, Y., Wang, H. and Xie, S., 2012, Leaf wax nalkanechemotaxonomy of bamboo from a tropical rain forest in South west China, *Plant Syst Evol*, 298 (4), 731–738.
- Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R., 1983, Determinations of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents, *Biochem. Soc. Transac.*, 11, 591-592.
- Lichtenthaler, H.K., 1996, Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants, *Journal of Plant Physiology*, 148 (1–2), 4-14.
- Linsmaier, E. M. and Skoog, F., 1965, Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, 100–127.
- Mansour, M.M.F., 2000, Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress, *Biologia Plantarum*, 43, 491-500.
- MATLAB:R2021a, 2021, Natick, Massachusetts, The Mathworks, Inc., MATLAB version 9.10.0.1613233 (R2021a).
- Mir, B.A., Mir, S.A., Khazird, J., Tonfacke, L.B., Cowanb, D.A., Vyasa, D. and Koula, S., 2015, Cold stress affects antioxidative response and accumulation of medicinally important withanolides in *Withania somnifera* (L.) Dunal, *Industrial Crops and Products*, 74, 1008–1016.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays Tobacco Cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nakamoto, K., 1986, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5. Ed., John Wiley and Sons, New York, ISBN: 0471010669.
- Nazirzadeh, A., 2018, *Farklı patates (solanum tuberosum L.) çeşitlerinin in vitro kuraklık ve tuzluluk stresine tepkileri*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.
- Olgun, M., Başçiftçi-Budak, Z., Ayter, N.G., Turan, M., Aydın, D., Şaban, Z., Sönmez, A.C. and Koyuncu, O., 2016, Potasyum iyodür uygulamasının ekmeklik buğday çeşitlerinin biyokimyasal özellikleri üzerine etkisi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11 (2), 46-60.
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S. and Sancak, C., 1998, Effects callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes, *Plant Cell Reports*, 18, 331-335.

- Parida, A.K. and Das, A.B., 2005, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.
- Parlak, M., 2020, *Tissue imaging with scanning acoustic microscopy and raman spectroscopy*, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi.
- Philippe, S., Barron, C., Robert, P., Devaux, M.F., Saulnier, L. and Guillon, F., 2006, Characterization using Raman Microspectroscopy of arabinoxylans in the walls of different cell types during the development of wheat endosperm, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5113-5119.
- Piro, G., Leucci, M.R., Waldron, K. and Dalessandro, G., 2003, Exposure to water stress causes changes in the biosynthesis of cell wall polysaccharides in roots of wheat cultivars varying in drought tolerance, *Plant Science*, 165, 559–569.
- Povey, M.J.W., Watson, N. and Parker, N.G., 2013, Ultrasonic and acoustic microscopy: principles and applications to food microstructures, *Food microstructures, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 192-222.
- Pu, Y., Wang, C. and Meyers, P.A., 2017, Origins of biomarker aliphatic hydrocarbons in sediments of alpine Lake Ximencuo, China, *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*, 475, 106–114.
- Pu, Y., Jia, J. and Cao, J., 2018, The aliphatic hydrocarbon distributions of terrestrial plants around an alpine lake: a pilot study from Lake Ximencuo, Eastern Qinghai-Tibet Plateau, *Front. Earth Sci.*, 12 (3), 600–610.
- Reddy, M.P. and Iyengar, E.R.R., 1999, *Crop Responses to Salt Stress: Seawater Application and Prospects*, Handbook of Plant Crop Stress, In: Pessarakli, M. (ed.), 50, Marcel Dekker, New York, ISBN 0-8247-1948-4, 1041-1068.
- Ros, R., Bertomeu, J.M. and Krueger, S., 2014, Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions, *Trends in Plant Science*, 19 (9), 564-569.
- Rydz, J., Siskova, A. and Eckstein, A.A., 2019, Microscopic techniques in materials science: Current trends in the area of blends, composites, and hybrid materials, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, 9072958.
- Rys, M., Szaleniec, M., Skoczowski, A., Stawoska, I. and Janeczko, A., 2015, FT-Raman spectroscopy as a tool in evaluation the response of plants to drought stress, *Open Chem.*, 13, 1091–1100.
- Sairam, R.K. and Srivastava, G.C., 2002, Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress, *Plant Science*, 162 (6), 897-904.
- Sairam, K.R., Rao, V.K. and Srivastava, G.C., 2002, Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration, *Plant Science*, 163 (5), 1037-1046.

- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C., 1972, Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can J Bot*, 50, 199–204.
- Schrader, B., Klump, Schenzel, K. and Schulz, H., 1999, Non-destructive NIR FT Raman analysis of plants, *Journal of Molecular Structure*, 509, 201–212.
- Schrader, B., Schulz, H., Andreev, G.N., Klump, H.H. and Sawatzki, J., 2000, Non-destructive NIR-FT-Raman spectroscopy of plant and animal tissues, of food and works of art, *Talanta*, 53 (1), 35-45.
- Schulz, H. and Baranska, M., 2007, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 43, 13–25.
- Sears, R.G. and Deckard, E.L., 1982, Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration, *Crop science*, 22 (3), 546-550.
- Seçmen, Ö.İ., Gemici, Y., Görk. G., Bekat, L. and Leblebici, E., 2000, *Tohumlu bitki sistematigi*, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, ISBN: 975-483-028-2.
- Selye, H., 1956, *The Stress of life*, New York: McGraw-Hill.
- Shalata, A. and Tal, M., 1998, The effect of salt stress on lipid peroxidation in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*, *Physiologia Plantarum*, 104, 169-174.
- Shams, M., 2019, *Tuz stresinin biberde bitki gelişimi, fizyolojik ve biokimyasal özellikler, dna metilasyonu ile tohum çimlenmesi üzerine etkisi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi.
- Sharova, E. and Romanova, A., 2018, Ascorbate in the apoplast of elongating plant cells, *Biological Communications*, 63 (1), 77-86.
- Sheaffer, C.C. and Moncada, K.M., 2012, Crop Profiles: Grasses-Wheat. Introduction to Agronomy Food, *Crops and Environment 2nd Edition*, USA, 541-547.
- Sheppard, N., 1948, Some characteristic frequencies in the raman spectra of saturated aliphatic hydrocarbons, *J. Chem. Phys.*, 16, 690-697.
- Shewry, P.R., 2009, Wheat, *Journal of Experimental Botany*, 60 (6), 1537–1553.
- Shurpalekar, S. R. and Rao, P.H., 1977, *Wheat Germ*. In "Advances in Food Research, Volume 23", Chichester, C.O. (ed), Academic Press, New York, 187-304.
- Sienkiewicz-Cholewa, U., Sumislawska, J., Sacala, E., Dziagwa-Becker, M. and Kieloch, R., 2018, Influence of silicon on spring wheat seedlings under salt stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 54.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T. A., 1998, *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, ISBN: 9780030020780.
- Smirnoff, N., 2005, *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, Blackwell Publishing, UK, Garsington Road, Oxford, ISBN: 978-1-4051-2529-1.

- Smith, E. and Dent, G., 2005, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, ISBN: 0 471 49668 5.
- Sönmez, E., 2019, *Tuz stresi altındaki mısır (Zea mays L.) bitkisinde potasyum uygulamalarının fizyolojik ve biyokimyasal etkisinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi.
- Sunkar, R., 2010, *Plant stress tolerance*, Humana Press, UK, Hatfield, ISBN: 978-1-60761-702-0.
- Synnytsya, A., Copikova, J., Matejka, P. and Machovic, V., 2003, Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins, *Carbohydr. Polymers*, 54, 97–106.
- Şen, A., 2005, *Buğday (Triticum aestivum L.) doku kültüründe tuz stresinin etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Şen, A. and Alikamanoğlu, S., 2011, Effect of salt stress on growth parameters and antioxidant enzymes of different wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties on in vitro tissue culture, *Fresenius Environmental Bulletin*, 20, 2a.
- Tarım, C., 2019, *Patates (Solanum Tuberosum L.) genotiplerinin tuz stresine tepkilerinin laboratuvar ve sera koşullarında karşılaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi.
- Tuna, T.Ü., 2019, *Kavunda mikroalg (Chlorella vulgaris) kullanımının genç bitki aşamasında tuza tolerans üzerindeki etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Çankırı Karatekin Üniversitesi.
- TÜİK, 2019, *Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel üretim istatistikleri*, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001, [Ziyaret Tarihi: 16.08.2020].
- Üçler, A.Ö., 1994, *Titrek kavak (Populus tremula L.) ve Kafkas ihlamumuru (Tilia rubra Dc.)'nun doku kültürü teknikleri ile üretilmesi*, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Ünlü, İ.D., 2012, *İlaç numunelerinde amilorid hidroklorid ve hidroklorotiyazid kemometrik yöntemlerle tayinleri*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Vidalie, H., 1986, *In vitro culture and its applications in horticulture*, *Economic Botany*, 51 (1), 92-93.
- Vikrant, A. and Rashid, A., 2001, Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 33-38.
- Wang, C-T. and Wei, Z.M., 2004, Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf base, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 149-156.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A., 2004, Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, *Trends in Plant Science*, 9 (5), 244-252.

- Weselucha-Birczynska, A., Labanowska, M., Kurdziel, M. and Filek, M., 2012, Resonance Raman and EPR spectroscopy studies of untreated spring wheat leaves, *Vibrational Spectroscopy*, 60, 113-117.
- Williams, R.W., Cutrera, T., Dunker, A.K. and Peticolas, W.L., 1980, The estimation of protein secondary structure by laser raman spectroscopy from the amide III' intensity distribution, *Elsevier North- Kolland Biomedical Press*, 115 (2), 306-308.
- Wolter, K.E. and Skoog, F., 1996, Nutritional requirements of fraxinus callus cultures, *American Journal of Botany*, 53 (3), 263-269.
- Wu, J., Seliskar, D.M. and Gallagher, J.L., 1998, Stress tolerance in the marsh plant spartina patens: impact of NaCl on growth and plasma membran lipid composition, *Physiologia Plantarum*, 102, 307- 317.
- Yakit, S., 2005, *Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde (Zea mays L.) stres parametreleri üzerine Ca, K ve Mg'un etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi.
- Yıldırım, Ö., 2019, *Tuz stresi altındaki biber bitkisine kalsiyum uygulamalarının etkisinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi.
- Yıldızıtugay, E., 2011, *Endemik Centaurea tuzgoluensis Aytaç & H. Duman ve Centaurea lycaonica Boiss. & Heldr'nin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine tuz stresinin etkileri*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi.
- Yu, M.M., Schulze, H.G., Jetter, R., Blades, M.W. and Turner, R.F., 2007, Raman microspectroscopic analysis of triterpenoids found in plant cuticles, *Appl. Spectrosc.*, 61, 32–37.
- Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q. and Wan, X., 2011, Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrochimica Acta Part A*, 78, 1187–1195.
- Ziemann, M.A. and Madariaga, J.M., 2020, Applications of Raman spectroscopy in art and archaeology, *Journal of Raman Spectroscopy*, 52 (1), 8-14.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Merve SİRKECİ
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☼ T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Fakülte	FEN FAKÜLTESİ
Bölümü	FİZİK BÖLÜMÜ
Mezuniyet Yılı	15.09.2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Enstitü Adı	FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anabilim Dalı	FİZİK ANABİLİM DALI
Programı	ATOM VE MOLEKÜL FİZİĞİ PROGRAMI

Makale ve Bildiriler	
<p>“The effect of thickness on surface structure of rf sputtered TiO₂ thin films by XPS, SEM/EDS, AFM and SAM” F. Güzelçimen, B. Tanören, Ç. Çetinkaya, M. Dönmez Kaya, H. I. Efker, Yunus Özen, D. Bingöl, M. Sirkeci, B. Kınacı, M.B. Ünlü, S. Ozçelik, Vacuum 182, 2020, 109766.</p>	