

**QUIZALOFOP-P-ETİL HERBİSİTİNİN SOĞAN (*Allium
cepa* L.) KÖKLERİNDEKİ GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN RAPD ve COMET ASSAYLERLE
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Savaş YEŞİLBAŞ**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

MART 2010

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**QUİZALOFOP-P-ETİL HERBİSİTİNİN SOĞAN (*Allium cepa* L.)
KÖKLERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN RAPD ve COMET
ASSAYLERLE BELİRLENMESİ**

Savaş YEŞİLBAŞ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MART 2010

ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ danışmanlığında, Savaş YEŞİBAŞ tarafından hazırlanan “Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Soğan (*Allium cepa* L.) Köklerindeki Genotoksik Etkilerinin RAPD ve Comet Assaylerle Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca .../03/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir

Unvanı	Adı, Soyadı	İmza
Jüri Başkanı	Doç Dr. Ersin KIVRAK	

Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr İbrahim H. CİĞERCİ
------------	---------------------------------

Danışman	Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ
----------	-------------------------------

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... tarih ve
sayılı kararıyla onaylanmıştır.
Doç. Dr. Rıdvan ÜNAL
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Herbisitlerin Tanımı ve Tarihçesi	3
2.2 Herbisitlerin Sınıflandırılması	4
2.3 Herbisit Kullanımı ve Canlılar Üzerindeki Etkileri	5
2.4 Asetil CoA Karboksilaz İnhibitörü Herbisitler ve Quizalofop-P-Etil (QPE)	7
2.5 <i>Allium</i> Biyotest Sistemi ve Herbisitlerin Genotoksik Etkileri	9
2.6 Genotoksitenin DNA Seviyesinde İzlenmesi	12
2.6.1 Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE, Comet Assay)	13
2.6.2 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)	15
3. MATERYAL ve METOT	19
3.1 Bitki Materyali	19
3.2 Herbisit Materyali	19
3.3 Test Materyalinin Hazırlanması	19
3.4 Kök İnhibisyon Testi	19
3.5 Kök Uçları Toplam Çözünür Protein İçeriğinin Belirlenmesi	20
3.6 Nukleus İzolasyonu ve Alkali Comet Assay	21
3.7 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Tekniği	22
3.7.1 DNA İzolasyonu	22
3.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23
3.7.3 PCR Döngüleri	23
3.7.4 Agaroz Jel Elektroforezi	24
3.7.5 RAPD Bantlarının Değerlendirilmesi	25
3.8 İstatistiksel Analizler	26
4. BULGULAR	27

4.1 QPE'nin Kök Büyümesi Üzerine Etkisi	27
4.2 QPE'nin Toplam Çözünür Protein İçeriğine Etkisi	27
4.3 Comet Assayle Belirlenen QPE Teşvikli DNA hasarı	29
4.4 RAPD Analizleri	30
4.4.1 Genomik DNA İzolasyonu	30
4.4.2 RAPD Profillerinin Diyagnostik Analizi	32
4.4.3 RAPD Profillerinin Numerik Analizi	45
4.4.4 Genomik Kalıp Kararlılığı (GTS, %)	49
4.5 Kök İnhibisyonu, Toplam Çözünür Protein İçeriği, Comet Skorları ve RAPD	50
Profil Parametrelerindeki Değişimlerin Karşılaştırılması	
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	59
6.1 İnternet Kaynakları	71
7. ÖZGEÇMİŞ	72

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

QUIZALOFOP-P-ETİL HERBİSİTİNİN SOĞAN (*Allium cepa* L.) KÖKLERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN RAPD ve COMET ASSAYLERLE BELİRLENMESİ

Savaş YEŞİLBAŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ

Bu çalışma farklı süre ve konsantrasyonlardaki quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin *Allium cepa*'da (mutfak soğanı) genotoksik potansiyelinin belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Köklendirilmiş soğanlar (24 saat distile suda), pozitif kontrol (10 ppm metil metansulfonat MMS) ve farklı konsantrasyonlarda (0.75, 1.5 ve 3.0 ppm) QPE ile 48 ve 96 saat süreyle muamele edilmiştir. Bu süreler sonunda, QPE herbisitinin kök büyümesi, kök ucu toplam çözünür protein içeriği, comet assay ile belirlenen tek-iplik DNA kırıkları seviyesi ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) assay ile belirlenen genomik kalıp kararlılığı üzerine olan etkileri analiz edilmiştir. Her iki uygulama süresinde, kök büyümesi negatif kontrole göre yüksek QPE konsantrasyonlarında (1.5 ve 3.0 ppm) önemli ölçüde inhibe olmuştur ($P < 0.5$). Negatif kontroldeki kök dokusu toplam çözünür protein içeriği 48 saat uygulamasına göre 96 saat uygulamasında önemli seviyede azalmıştır ($P < 0.5$). Negatif kontrol gruplarına göre, 48 saatteki tüm QPE konsantrasyonları kök uçlarının toplam çözünür protein içeriğini önemli ölçüde azaltmışken, 96 saat uygulamaları arttırmıştır ($P < 0.5$). Tüm QPE uygulamaları arasında, toplam çözünür protein içeriğindeki en fazla azalma (% 13) 48 saat 1.5 ppm QPE uygulamasına maruz kalmış kök uçlarında ölçülmüşken, en fazla artış (% 10) 96 saat 3.0 ppm QPE ile muamele edilmiş kök uçlarında belirlenmiştir. 48

ve 96 saat negatif kontrol comet sonuçları ile karşılaştırıldığında, sırasıyla 14.25 ± 2.89 ve 16.25 ± 1.43 AU ölçülmüştür, farklı konsantrasyonlarda uygulanan QPE herbisitinin soğan kök dokusu nukleuslarında tek-iplik DNA kırıklarını teşvik ettiği (32.5 ± 2.9 - 42.5 ± 4.9 AU) belirlenmiştir. Bununla birlikte, QPE herbisiti uygulama süreleri ve konsantrasyonları arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P < 0.5$). En yüksek tek iplik DNA kırıkları 48 (70.25 ± 3.7 AU) ve 96 saat (89.25 ± 3.9 AU) pozitif kontrol uygulamalarında belirlenmiştir. Negatif kontrolde, 319-2219 baz çifti moleküler ağırlık aralığında 94 RAPD bandı 9 oligo primer kullanılarak çoğalmıştır. RAPD analizlerinde, negatif kontrol RAPD profillerine göre tüm uygulama gruplarında bant kayıpları ve/veya yeni bant belirlenmiştir. 48 saat QPE herbisiti uygulamalarında negatif kontrole göre belirlenen RAPD bant sayılarındaki değişim (bant kaybı ve/veya yeni bant) 96 saat uygulamalarından daha yüksekti. RAPD bulgularından elde edilen dendogram tüm uygulamaları 4 grupta kümelemiştir: (i) pozitif kontrol (48 ve 96 saat), (ii) 48 saat QPE uygulamaları (0.75, 1.5 ve 3.0 ppm), (iii) negatif kontrol ve (iv) 96 saat QPE uygulamaları (0.75, 1.5 ve 3.0 ppm). RAPD bulgularına göre, RAPD profillerinde en fazla bant değişimine pozitif kontrol uygulaması (48 ve 96 saat) neden olmuştur. % 100'e sabitlenen negatif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, 48 ve 96 saat QPE herbisiti uygulanmış soğanlarda kök uzunluğu ve genomik kalıp kararlılığında azalma, tek-iplik DNA kırığı seviyesinde artış belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu parametrelerdeki artış veya azalma seviyeleri 96 saat uygulamalarına göre 48 saat uygulamalarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırma bulgularımız, quizalofop-P-etil herbisitinin *Allium cepa* L.'da genotoksik etkiye sahip olduğunu açıkça göstermiştir.

2010, 72 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Allium cepa* L., Quizalofop-P-etil, Comet Assay, RAPD, Genotoksisite

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF QUIZALOFOP-P-ETHYL HERBICIDE IN ONION ROOTS (*Allium cepa* L.) BY RAPD AND COMET ASSAYS

Savaş YEŞİLBAŞ

Afyon Kocatepe University

Institutes of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Süleyman CENKÇİ

This research was performed to determine the genotoxicity potential of quizalofop-P-ethyl (QPE) herbicide at different concentrations and exposure times in *Allium cepa* L. (common onion). The rooted onion bulbs (in distilled water for 24 h) were treated with negative control (distilled water), positive control (10 ppm methyl methanesulfonate, MMS) and different concentrations (0.75, 1.5 and 3.0 ppm) of QPE for 48 and 96 h. The effects of QPE herbicide on the root growth, total soluble protein content of root tips, the level of single stranded DNA breaks revealed by comet assay and changes in genomic template stability shown by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay were analyzed at the end of these periods. At both treatment periods, the root growth was significantly inhibited at high concentrations (1.5 and 3.0 ppm) of QPE ($P < 0.5$). Total soluble protein content of root tips in the negative control was significantly reduced in 96 h treatment in comparison to 48 h treatment ($P < 0.5$). In comparison to their negative controls, all QPE concentrations at 48 h decreased the total soluble protein content of root tips, while once at 96 h increased it significantly ($P < 0.5$). Among the all QPE concentrations, the highest (13 %) decrease in protein content was measured in the root tips exposed to 1.5 ppm QPE at 48 h, whereas the highest increase (10 %) was determined for the root tips treated with 3.0 ppm QPE at 96 h. In

comparison to 48 and 96 h comet results, measured 14.25 ± 2.89 and 16.25 ± 1.43 AU, respectively, induction of single stranded DNA breaks (32.5 ± 2.9 - 42.5 ± 4.9 AU) were determined in the nuclei of root tips exposed different concentrations of QPE. However, there was no significant difference among the application periods and concentrations of QPE ($P < 0.5$). The highest single stranded DNA breaks were determined for 48 (70.25 ± 3.7 AU) and 96 h (89.25 ± 3.9 AU) positive control treatments. 94 RAPD bands in the range of 319-2219 bp were amplified in the negative control by using 9 oligo-primers. In RAPD analysis, band lost and/or gain in RAPD profiles were determined in all treatment groups in comparison to RAPD profiles of negative control. In comparison to negative control, the number of RAPD band changes (band lost and band gain) at 48 h QPE treatments were higher than once at 96 h treatments. The UPGMA dendrogram developed from RAPD results clustered all treatments in to four groups: (i) positive control (48 and 96 h), (ii) 48 h QPE treatments (0.75, 1.5 and 3.0 ppm), (iii) negative control (iv) 96 h QPE treatments (0.75, 1.5 and 3.0 ppm). According to the RAPD results, positive control treatments caused to the highest change in the number of RAPD profiles among the treatment groups. In comparison to their negative controls fixed to 100 %, a decrease in root length and genomic template stability values and an increase in the level of single stranded DNA break was determined in onions treated with QPE for 48 and 96 h. However, the level of decrease or increase in these parameters were determined high at 48 h treatments in comparison to 96 h ones. Our research findings clearly indicated that quizalofop-P-ethyl has genotoxic effects in *Allium cepa* L.

2010, 72 Pages

Key words: *Allium cepa* L., Quizalofop-P-ethyl, Comet Assay, RAPD, Genotoxicity

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince ihtiyaç duyduğum her an maddi ve manevi yardımlarıyla yanımda olan, her türlü desteği veren ve ilgisini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ' ye, özellikle laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgileri ve sabırlarıyla beni yönlendiren ve tez çalışmamda büyük emekleri olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Muhsin KONUK ve ismini sayamadığım Biyoloji Bölümü'ndeki tüm hocalarıma ilgi ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince yanımda olan ve manevi desteğini hissettiğim yüksek lisans arkadaşlarım Sayın Ahmet BOZDAĞ'a, Sayın Yücel GÜRKAYA'ya ve laboratuvar çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi Sayın Hakan TERZİ'ye teşekkür ederim.

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme hep yanımda oldukları ve bana güvendikleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Savaş YEŞİLBAŞ

AFYONKARAHİSAR, Mart 2010

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1. Simgeler

µg	Mikrogram
µg/L	Mikrogram/litre
µL	Mikrolitre
cm	Santimetre
dk	Dakika
M	Molarite
mg/L	Miligram/litre
mg/mL	Miligram/mililitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
N	Normalite
ng	Nanogram
ng/µL	Nanogram/mikrolitre
ng/µL	Nanogram/mikrolitre
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir kısım
rpm	Revolutions per minute (r/min)
U	Ünite (birim)
V	Volt

2. Kısaltmalar

BSA	Bovin serum albumin
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EtOH	Etil alkol
G+C	Guanin+Sitozin
GTS	Genomik kalıp kararlılığı
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
MMS	Methyl methano sulfonate
NK	Negatif kontrol
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PK	Pozitif kontrol
QPE	Quizalofop-p-etil
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trikloro asetik asit
UV	Ultraviyole ışık
βME	β- merkaptetanol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Quizalofop-P-etil (QPE)'in kimyasal yapısı	9
Şekil 4.1	Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulamasının kök büyümesi üzerine etkisi	28
Şekil 4.2	Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulamasının toplam çözünür protein içeriği üzerine etkisi	29
Şekil 4.3	Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulamasının kök nukleuslarında Comet Assayle belirlenen DNA hasar seviyeleri üzerine etkisi	30
Şekil 4.4	Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulanmış soğan genomik DNA'larından OPA01, OPA02, OPA03 ve OPB04 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	35
Şekil 4.5	Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulanmış soğan genomik DNA'larından OPA10, OPB01, OPB02 ve OPB05 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	36
Şekil 4.6	Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulanmış soğan genomik DNA'larından OPB06 ve OPB07 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	37
Şekil 4.7	48 saat süreyle uygulanan QPE herbisit uygulamaları için 9 primerle elde edilen RAPD verilerinin FreeTree programında elde edilen ve FreeView paket programı ile çizilen UPGMA dendogramı	47
Şekil 4.8	96 saat süreyle uygulanan QPE herbisit uygulamaları için 9 primerle elde edilen RAPD verilerinin FreeTree programında elde edilen ve FreeView paket programı ile çizilen UPGMA dendogramı	48
Şekil 4.9	48 ve 96 saat süreli QPE herbisit uygulamaları için 9 primerle elde edilen RAPD verilerinin FreeTree programında elde edilen ve FreeView paket programı ile çizilen UPGMA dendogramı	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	RAPD-PCR reaksiyonlarında test edilen primerler, sekansları ve GC içerikleri	25
Çizelge 4.1	Uygulama grubu fide köklerinden spektrofotometre ile belirlenen soğan kök dokusu genomik DNA miktar ve saflığı	31
Çizelge 4.2	Her bir uygulama örneği için 10 primerle belirlenen DNA bantların ebatları (BE) ve negatif kontrole göre, QPE uygulamalarında mevcut “1” ve kayıp “0” RAPD bantları	38
Çizelge 4.3	Farklı sürelerde (48 ve 96 saat) herbisit uygulamalarına maruz bırakılmış soğan bitkileri için RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, primer sekansları, her bir primerle elde edilmiş DNA ebat aralığı, negatif kontrolde elde edilen DNA bant sayısı, monomorfik ve polimorfik DNA bant sayıları	42
Çizelge 4.4	Negatif kontrol (NK) RAPD profillerinde belirlenen DNA bant sayıları, ve negatif kontrole göre uygulama gruplarında belirlenen yeni oluşan (+) ve kaybolmuş (-) DNA bantlarının UVIssoft görüntü analiz programı ile belirlenen moleküler ebatları (baz çifti, bç)	43
Çizelge 4.5	9 primerle elde edilmiş RAPD bulgularına göre QPE herbisitinin 48 ve 96 saat uygulamalarında Treview Paket programında hesaplanmış olan (Nei 1978) genetik benzerlik katsayıları	47
Çizelge 4.6	48 ve 96 saat sürelerle uygulanan farklı konsantrasyonlardaki QPE herbisitinin soğanda 9 RAPD primeri için hesaplanmış genomik kalıp kararlılık değerleri (GTS, %)	49
Çizelge 4.7	48 ve 96 saat sürelerle uygulanan farklı konsantrasyonlardaki QPE herbisitinin soğanda kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği, comet skorları ve RAPD profilleri (GTS) parametrelerinde negatif kontrole göre (%100’e sabitlenmiş) değişimler	51

1. GİRİŞ

20. yüzyılın başlangıcından itibaren gelişen sanayi ve teknolojiyle birlikte artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacı da artmaktadır. Buna göre dünyanın yüzölçümü değişmemekle birlikte erozyon, yeni yerleşim yerlerinin açılması gibi nedenlerle tarıma elverişli alanlar gittikçe azalmaktadır. Ayrıca bitkilerden günümüzde altı milyardan fazla insan yararlanmaya uğraşırken diğer taraftan binlerce bitki zararlıları (bitki patojeni, böcek türü, yuvarlak solucan ve yabancı ot türü) bu bitkilerle rekabet etmektedir (Harte *et al.* 1991).

Bitkilerin ve bitkisel ürünlerin korunması, kaliteli ve bol ürün elde edilmesi için tarımsal ilaçların kullanılması kaçınılmaz olmuştur (Menzer *et al.* 1991). Genel olarak kullanılan bu ilaçlara pestisit denilmektedir. Pestisit terimi kısaca “pest” adı verilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan madde anlamına gelmektedir. Pestisitler evsel atıklar, endüstriyel atıklar ve tarımsal mücadelelerde ortama karışıp zor parçalanan maddelerdir. Pestisitler karbon, hidrojen ve klor içerdiklerinden klorlu hidrokarbonlar olarak da tanımlanırlar. Pestisitler; herbisit, insektisit, fungusit, rodentisit, akarisit, bakterisit, avirid, nematosit olarak kullanılmaktadır (Harte *et al.* 1991).

Kullanılan pestisitler tarım ürünlerinin üretimini artırmak için başarılı bir şekilde kullanılsada istenmeyen zararlılara olduğu kadar yaşayan diğer canlılar ve insanlar içinde zehirli olabilmektedir (Gutrie and Perry 1980). Bazı pestisitlerin oldukça yavaş parçalanmaları, pestisitlerin çevrede birikmelerine neden olmakta (Gal *et al.* 1992; Chau *et al.* 1982), bu da pestisitlerin kullanıldığı bölgelerde çevreyle ilgili sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Chau *et al.* 1982).

Ülkemizde hiç tarım ilacı kullanılmadığı takdirde ortalama ürün kaybı oranının %65 olacağı belirlenmiştir. Bugün tarım ilacı kullanılmasına rağmen ürün kaybının % 35 olduğu tahmin edilmektedir (Öztürk 1997). Ülkemizde kullanılan pestisitlerin üretimi, taşınması, depolanması ve uygulanmasında sorunlar ortaya çıkabilmektedir.

Aktif maddelerin çevre ve insan sağlığı açısından toksik, mutajenik, kanserojenik, teratojenik olmasından dolayı bunların bıraktığı kalıntı düzeylerinin ölçölmesi bütün dünyada olduğu gibi ölkemizde de önemli bir konu olmuştur. Pestisitlerin kullanımı sırasında buharlaşma özelliğinde olanlar solunumla, diğerleri de deri yoluyla bünyeye girebilmektedir (Haktanır ve Arcak 1998).

Bu araştırmada, kimyasal yapısına göre organik herbisitlerin fenoksi bileşikleri grubundan olan quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin farklı konsantrasyon ve farklı uygulama sürelerinin *Allium cepa* L.'da kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği, comet skorları ve RAPD profilleri üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Herbisitlerin Tanımı ve Tarihçesi

Herbisitler, zararlı bitki hücrelerinde genellikle fotosentezde görevli protein komplekslerine bağlanarak fotosentezi durduran ve istenmeyen bitki türlerinin büyümesini engelleyen toksik maddelerdir (İnt. Kyn. 1). Herbisitlerin içindeki etkinlik gösteren kimyasal maddeler “aktif madde” olarak nitelendirilmekte ve ticari preparatlarda “dolgu maddesi” ile karışık halde bulunmaktadır. İçerdikleri aktif maddelerin formülasyonuna bakılarak herbisitlerin etkinliği hakkında bir fikir edinmek mümkündür. Aktif maddeler kısaltmalarla ifade edilmektedir. Mesela, 2,4-diklorfenoksiasetik asit; “2,4-D” olarak ifade edilmektedir. Günümüzde herbisitlerin hemen hemen tamamı organik maddelerden oluşmuştur. Yani C, H, O’den meydana gelmiştir. Karbonların sıralanışı ya halka (aromatik) ya da zincir (alifatik) şeklindedir (Güncan 1985).

İlk kullanılan organik herbisit olan 2,4-D İngilizler tarafından ikinci dünya savaşı sırasında geliştirilmiştir. Savaş sonrası hastalık, zararlı ve yabancı otlarla kimyasal savaşım konusunda önemli ilerlemeler olmuştur. İkinci dünya savaşı öncesine kadar tabii kaynaklı organik ve inorganik maddelerin bitki koruma alanında kullanılmasına devam edilmiştir. Dünyada tarımsal mücadele ilacı üretimi hızla artmakta ve gün geçtikçe yeni ilaçlar geliştirilmektedir. Sentetik olarak üretimlerin hızlanmasıyla bu maddelerin kullanılması yoğunlaşmıştır. Buna bağlı olarak kullanılan ilaç çeşitleri de artmaktadır. Yabancı otların herbisitlere karşı dayanıklılık olgusu ilk kez 1960’ların sonlarında ABD’de simazine dayanıklı *Senecio vulgaris* ile ortaya konmuştur (Ryan 1970). Herbisitlere karşı meydana gelen dayanıklılık olayları 1980 yıllarında asitolaktat sentetaz (ALS) inhibitörü herbisitlerinin de piyasaya sürülmesi ile çok hızlı artışla günümüze kadar devam etmiştir. Günümüzde dünyada herbisitlere karşı 110 adet geniş yapraklı, 73 adet dar yapraklı olmak üzere toplam 183 yabancı ot türüne ait 313 adet dayanıklı biyotip olduğu tespit edilmiştir (Heap 2007).

2.2 Herbisitlerin Sınıflandırılması

Herbisitler aktivitelerine, kullanım alanlarına, kimyasal özelliklerine ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler. Bitki bünyesindeki etkinlik mekanizmasına göre herbisitler; fotosentezi önleyen, (urasil, üre bileşikleri, triazin), solunumu önleyen, (dinitrophenol, pentachlorophenol, anilin), mitoz bölünmeyi önleyen (carbamat, chloracylamid, anilin), çimlenmeyi önleyen (carbamatlar, anilin) ve *Asetil CoA karboksilaz* enzimini engelleyerek yağ metabolizmasını durduran herbisitler (diclofop, fluazifop, sethoxydim, quizalofop-P-ethyl, clethodim) olarak sınıflandırılabilir (Barbour 1996; İnt. Kay. 2). Herbisitleri bitki dokularına nüfuz ettikleri dokulara göre de sınıflandırmak mümkündür. Bu açıdan toprak altı organlardan ve yapraklardan bitki dokularına nüfuz eden herbisitler mevcuttur.

Bazı herbisitler sadece temas ettikleri dokularda etki gösterirken (kontakt herbisitler), bazıları ise bitki taşınım sistemi ile tüm bitki dokularına dağılarak bitkide bütüncül etki gösterebilirler (Prokop and Veverka 2003). Ayrıca, hiçbir ayırım yapmadan tüm bitkileri öldüren total herbisitlerin yanı sıra özellikle dikotil bitkilere daha çok zarar veren seçici herbisitler mevcuttur. Dikotil ve monokotil bitkiler arasında morfolojik ve herbisit metabolizması bakımından farklılıkların varlığı hassaslık ve toleranslılığı ortaya çıkarır (Sterling and Hall 1997). Seçici herbisitler genellikle buğday, arpa ve pirinç gibi monokotil tarım ürünlerinin tarımının yapıldığı ekim alanlarındaki geniş yapraklı dikotil bitkilerin yok edilmesinde kullanılır. Seçici herbisitlerin dikotil bitki metabolizmasına özgü metabolik yöntemlerle bu bitkilere seçici etki yaptığı düşünülmektedir. Zararlı otlarla mücadelede, zararlı otların gelişim evrelerine uygun zamanlarda farklı herbisitler kullanılmaktadır. Bu bakımdan herbisitler ekim öncesi (pre-sowing), ekim sonrası-çıkış öncesi (pre-emergence) ve çıkış sonrası (post-emergence) olmak üzere de gruplandırılabilir (Günca 1985).

Herbisitleri çok farklı şekillerde sınıflandırmak mümkün olmakla birlikte, birçok karışıklık ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı en açıklayıcı sınıflandırma herbisitleri kimyasal yapılarına göre yapılan sınıflandırmadır. Herbisitlerin kimyasal yapılarına göre yapılan sınıflandırma Özer vd. (1997)'e göre özetlenmiştir.

- a) Alifatik asitler: Dalapon, glyphosat, TCA
- b) Amidler ve tiyoamidler: Alachlor, carbetamid, chlorthiamid, diphenamid, napropamid, pentanachlor, propachlar, propyzamid, propanil
- c) Benzoik asitler: Chloramben, dicamba, 2,3,6-TBA
- d) Bipiridiliumlar: Diquat, paraquat
- e) Karbamatlar: Asulam, barban, chlorpropham, cycloate, eptc, molinate, pheapmedipham, propham, thiobencarp, vernalate
- f) Dinitroanilinler: Butralin, ethalfluralin, nitralin, oryzalin, penoxalin, perdimethalin, trifluralin
- g) Nitril bileşikleri: Bromoxynil, dichlobenil, oxynil
- h) Dinirtofenoller: Dinosebacetat, dinoseb- DNBP, DNOC
- i) Fenoksi bileşikleri: Quizalofop-P-ethyl, 2,4-D, fenoprop-2,4,5-Tp, MCPA, MCPB, mecoprop, 2,4,5-T, dichlofop-methyl, 2,4-DB, fluazifop-buthyl, haloxyfop
- j) Diazinler: Maleic hydrazide, pyrazon
- k) Triazinler: Atrazin, cyanazin, cyprazin, methoprotryn, met amitron, prometryn, propazin, simazin, terbumeton, terbutilazin, tritazin, isomethiozin, metribuzin
- l) Üre bileşikleri: Chlortoluron, cycluron, diuron, isoproturan, linuron, metoxuron, monolinuron, monuron, fluometuron, metabenzthiazuron
- m) Urasil grubu bileşikler: Bromacil, terbacil, lenacil
- n) Diğer organik herbisitler: Amitrol-aminotriazol, fenac, picloram, bromfenoxim, flurenol, chlorfenprop-methyl

2.3 Herbisit Kullanımı ve Canlılar Üzerindeki Etkileri

Toprağa uygulanan herbisitlerin büyük bir kısmı, bitkilere uygulananların ise bir kısmı toprağa geçmektedir. Toprağa geçen bu herbisitlerin miktarı, uygulanan herbisit in dozuna ve uygulama zamanına bağlıdır. Toprağa taşınan herbisitlerin aktivitesi üzerine ise herbisit in çeşidi, toprak faktörleri, topraktaki bitki türleri ve yoğunluğu, iklim değişiklikleri etki etmektedir (Gün can 1985). Herbisitler kullanıldığı zaman etkisini bir süre sonra yitirir ve tekrar ilaçlama yapılır. Bu işlem bir iki defa tekrarlandığı zaman ürün üzerinde herbisit kalıntısı oluşur. Bu durum insan ve çevre sağlığı açısından büyük

problem oluşturmaktadır (Gürcan 2001). İlaç kalıntılarının toprağa, suya, havaya ve gıdalara bulaşarak onları kirletmesi ve sonuçta insan sağlığı ile doğal dengeyi olumsuz yönde etkilemesi birer çevre sorunudur. Herbisitlerin kullanımından dolayı bazı hastalık etkeni organizmalar zamanla kendilerini etkileyen kimyasal maddelere karşı dirençli hale gelirler. Bu durumda kimyasal maddenin yüksek doza çıkarılması ya da kimyasalların değiştirilmesi gerekmektedir. Bazı herbisitlerde kolaylıkla ayrışmaya uğramayıp, uygulandıkları ve taşındıkları çevrede dirençli olarak kalabilirler (Ahmed *et al.* 1998). Bu özellik bazı hastalıkları kontrol etmede avantaj olabilse de kimyasal maddelerin çevrenin diğer kısımlarına hareketleri yönünden dezavantajdır. Bu durum kimyasal maddelerin hedef olarak seçildiği zararlı ve hastalık etkeni organizmaların dışındaki diğer canlıların etkilenmesine neden olmaktadır. Toprak fauna ve florası diğer doğal yaşam içindeki canlılarda olduğu şekilde bu etkiden zarar görebilir (Ahmed *et al.* 1998).

Bitki, hastalık ve zararlılara karşı kullanılan herbisitler yağmur, rüzgar gibi çeşitli abiyotik etkenlerle toprağa dolaylı yoldan ulaşırlar. Bu yollarla toprağa karışan herbisitler toprak mikroorganizmalarının kısmen ya da tamamen yok olmasına neden olurlar. Toprak yüzeyinde ve yağmur suyunda belirlenen kalıntıların toprakta bulunan heterotrof bakteri ve mantarlarda önemli bir depresyona neden olduğu bulunmuştur. Nitrit ve nitrat bakterilerinin sayısında kısmen bir azalmaya sebep olmaktadır (Ahmed *et al.* 1998). Herbisitin topraktaki birikimi; toprağın çözünürlüğüne, bozunma hızına, topraktaki hareketliliğine bağlıdır. Çözünürlük aynı zamanda sıcaklığa bağlıdır. Bozunma hızı, sıcaklık, pH ve toprağın geçmişinden etkilenir. Sıcaklık aynı zamanda tehlikeli maddelerin yarılanma ömrünü de etkiler. Bu oranı etkileyen diğer faktörler; bitki örtüsünün yapısı, toprağın nem oranı ve mikrobiyolojik olarak ayrışabilme durumudur. Biriken herbisitler zamanla bitkilerin kökleri ile bitkilerin bünyesine alınabilirler (Geyikçi 1999).

Herbisitler zararlılara karşı uygulandıktan sonra su ortamına taşınmaktadır. Herbisit kalıntılarının suda eser miktarda bulunması durumunda bile akuatik canlıların besin zincirinde çok önemli yeri olan zoo ve fitoplanktonların gelişmelerini engelleyebilir (Aguilar *et al.* 1997; Gedikli 2001; Wurl and Obbard 2005). Suların herbisitlerle

kirlenmesinin balıklar ve kuşlar için hayati önemi olmakla birlikte suyu insan ve hayvanların içmesi bakımından da istenmeyen durumlar ortaya çıkabilmektedir (Atamanalp ve Yanık 2001; Erdogrul vd. 2005). Herbisitler bütün canlı gruplarını toksisite ve kalıcılık özelliğine bağlı olarak etkilemektedirler. Bu etkileşim sistemi içerisinde doğal olarak insan en hassas hedef durumundadır. İnsanlarda zehirlenmeler herbisitlerin vücuda deri, solunum veya sindirim yolları ile alınması ile gerçekleşmektedir. Zehirlenme akut (bir defa da tek bir dozdan) veya kronik (uzun sürede birikim sonucu) olarak iki şekilde gerçekleşir. Gıdalardaki herbisit kalıntılarının vücuda alımı ile oluşan kronik zehirlenme sonucu akciğer hastalıkları, kanser, beyinde hasar, karaciğer ve böbrekte nefrozlar oluşabilir. Teratojen (bebeğe deformasyon), mutajen (genetik bozukluklar) ve alerjen etki gösteren herbisitler de vardır (Delen *et al.* 2005).

Tüketilen gıda maddeleri içinde bulunmasına izin verilen en fazla kalıntı derişimi tolerans olarak ifade edilir ve ppm, ppb, mg/kg gibi birimlerle gösterilir. Toleransın üzerinde ilaç kalıntısı bulunan tarım ürünlerinin tüketilmesi insan sağlığı açısından son derece zararlıdır. Herbisitlerin tolerans değerleri bazı faktörlere göre değişir. Bu faktörler herbisit kimyasal yapısı, kullanma dozu ve formülasyonu, kültür bitkisi veya ürün çeşidi, değerlendirme şekli, tüketim sıklığı ve miktarı, ilaçlamadan sonra geçen süre ve iklim koşulları şeklinde özetlenebilir. Kültür bitkisi veya ürünün tüketilme sıklığı ve miktarı tolerans değerinin saptanmasında en önemli faktördür. Bu konuda toplumun beslenme rejimi ve alışkanlıkları önemlidir. Örneğin buğday, yurdumuzda sık ve fazla tüketilir. Bu nedenle bir herbisit buğdaydaki tolerans değerinin düşük olması gerekir. Her herbisit zararsız olarak bir günde alınabileceği miktar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtilmiştir (Conway and Pretty 1991).

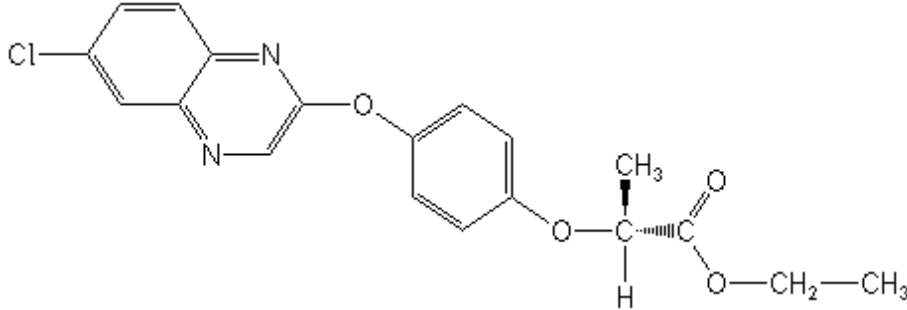
2.4 Asetil CoA Karboksilaz İnhibitörü Herbisitler ve Quizalofop-P-etil (QPE)

Amerika Ot Bilim Topluluğu (Herbicide Classification of the Weed Science Society of America, 1997) ve Herbisit Dirençlilik Aksiyon Komitesi (Herbicide Resistance Action Committee, HRAC) kriterlerine göre organik herbisitler etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır (İnt. Kyn. 2). Bu sınıflandırmaya göre herbisitlerden bazıları Asetil

CoA karboksilaz inhibitörlerdir. Diclofop, fluazifop, sethoxydim, quizalofop-P-ethyl ve clethodim ve benzeri herbisitler bitkilerde Asetil CoA karboksilaz enzim aktivitesini inhibe ederek lipid biyosentezini durdururlar (İnt. Kyn. 2). Bu gruptaki herbisitler bütüncül etki gösterir yani ksilem ve floem ile tüm bitki dokularına taşınarak hücrelerde büyüme ve metabolik işlevler için gerekli olan önemli membran lipidlerinin biyosentezini durdururlar. Bu herbisitlere maruz kalan bitkilerde büyümenin durması ve bitki büyüme noktalarındaki meristematik dokuların ölümü gerçekleşir (Barbour 1996; İnt. Kyn. 3).

Quizalofop-P-etil (QPE) (Şekil 1) zararlı otların sürgünleşmesi sırasında uygulanan seçici, bütüncül etki gösteren ve kimyasal olarak bir fenoksi asit herbisitidir (Barbour 1996). Patates, soya fasulyesi, şeker pancarı, yerfıstığı, sebze, pamuk ve keten tarımının yapıldığı tarım alanlarındaki tek yada çok yıllık yabancı otların büyümelerini kontrol etmek için kullanılır. QPE içeren ürünlerin ticari adları Assure II, Pilot Super, Targa D+ ve Targa Super'dir. QPE, benazolin ve clopyralid gibi diğer herbisitlerle formüle edilerek de kullanılmaktadır. QPE, yaprak yüzeyi vasıtasıyla absorbe edilir ve tüm bitki boyunca ilerler. Gövde ve kökün aktif büyüme bölgelerinde birikir. Quizalofop-P ve quizalofop-P-etil bileşikleri birbirinden tamamen farklıdır. QPE herbisiti yeni bir bileşik olduğundan dolayı toksisitesi ve çevresel etkileri hakkında çok az bir bilgi bulunmaktadır. Oral yolla maruz kalındığında çok az etki eden bir bileşiktir. Öldürücü doz oranı, herbisitlerin öldürücülüğünü belirler ve zehirlilik açısından önem taşır. Öldürücü doz genellikle zararlı sayısının % 50'sini öldüren doz olarak kullanılır ve buna LD adı verilir. Buna göre LD, zararlı sayısında % 50 ölüm meydana getirmek için hedef organizmanın canlı kütlesine (kg), mg cinsinden verilmesi gereken herbisit miktarıdır ve mg/kg olarak birimlendirilir. QPE'ye ait LD₅₀ değeri erkek farelerde 1,210 mg/kg ve dişi farelerde ise 1,182 mg/kg'dır. Farelerde yapılan kısa süreli (90 gün) bir çalışmada 128 mg/kg seviyesinde etki gözlenmemiştir. Bu doz, kronik besleme deneylerinde test edilen en yüksek doz olarak saptanmıştır. Yabani ördekler ve kuşlarda yapılan testler, QPE herbisitinin bu organizmalara karşı toksik olmadığını göstermiştir. QPE arılarda toksik olup; LD₅₀ değeri 0.1 mg/kg'ın üzerindedir. Memeliler veya sucul türlerin dokularında birikme potansiyeliyle ilgili bir bilgi mevcut değildir. Steril edilmiş

toprakta (mikroorganizma içermeyen) bileşik hızlı bir şekilde yıkılmaktadır. Toprak organizmaları bileşiğin yıkılma oranını arttırmaktadır (İnt. Kyn. 4).



Şekil 2.1 Quizalofop-P-etil (QPE)'in kimyasal yapısı [$C_{19}H_{17}ClN_2O_4$; MW, 372.80 g/Mol; CAS No: 100646-51-3]

2.5 *Allium* Biyotest Sistemi ve Herbisitlerin Genotoksik Etkileri

Herbisitler, genetik etkileri kontrol edilmemiş kimyasal maddelerdir. Herbisit çeşitleri devamlı olarak arttığı için insanlar açısından tehlike oluşturmaktadır. Bu maddelerin zararlarının tam olarak bilinmemesine rağmen insan sağlığına zararlı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle tarımda ve diğer birçok sahada kullanılan herbisitlerin genetik etkilerinin belirlenmesi için farklı organizmalarda farklı tiplerde mutajenite testleri uygulanmaktadır. Bunlar *Drosophila*'da en fazla kullanılan eşeye bağlı letalite testi (Kilbey *et al.* 1984), mayalarda *Saccharomyces cerevisiae* genotoksisite testi (Buschini *et al.* 2003), bakterilerde *Salmonella* mutajenite testi (Mamber *et al.* 1993), *Bacillus subtilis* tamir testi (Silva *et al.* 2006) hayvanlarda fare ve hamster kemik iliği mikronükleus testi (Ono *et al.* 2006) ve insan lenfosit hücre kültürlerinde kardeş kromatit değişimi (SCE) (Sivikova *et al.* 2005) testleridir.

Çevresel etkilerin belirlenmesinde kullanılan temel araştırmalarda, bitki materyallerinin kullanılması yerinde ve faydalı bir metottur. Çevresel kirleticilerin mutajenik etkilerinin değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılan bazı bitki türleri *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Crepis capillaris*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana tabaccum*, *Pisum sativum*, *Tradescantia* clone 4430, *Vicia faba*

ve *Zea mays*'ı içerdği bildirilmiştir (Grant 1994). Bu tür araştırmalarda bitkilerin kullanılmasının birçok nedeni vardır. Bitkilerin depolanması taşınması ve kullanılması çok kolay, ucuzdur. Ayrıca bitki kökleri biyolojik testler için uygun materyallerdir. Çünkü kökler toprağa ve suya karışan kimyasallara ilk maruz kalan dokulardır. *Allium* test metodu kullanılan kimyasalın çeşitli toksik ve klastojenik etkilerini direk olarak göstermektedir. Butachlor ve 2,4-D herbisitlerinin *Allium cepa* üzerine etkisini araştıran bir çalışmada mitotik indeksin azaldığı bulunmuş ve kromozom aberasyonları saptanmıştır (Ateeq *et al.* 2002).

2,4 D ve 2, 4, 5-T herbisitlerinin farklı buğday türleri olan *Triticum aestivum*, *T. durum*, *Aegilops ligustica* mayotik hücreleri üzerinde sitolojik etkileri araştırılmıştır. Sonuçta muamele grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında bu herbisitlerin doz artışına bağlı olarak buğday türlerinde anormal hücrelerin sayısını arttırdığı görülmüştür (Al-Najjar and Soliman 1982).

Doxey (1949), çavdar (*Secala cereale*) ve soğanın (*Allium cepa*) kök uçlarına isopropyl phenyl carbamatın farklı konsantrasyon ve sürelerle muamelesiyle mitoz üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Soğan ve çavdarda poliploid nükleitler, soğanda multinukleatlı hücreler ve çavdarda ise kromatid fragmetlerinin ortaya çıktığı görülmüştür.

Crocker (1959), farklı konsantrasyon ve sürelerle uygulanan 2,4-D ve 2,4,5-T' nin *Allium cepa* kök ucu mitozu üzerindeki etkilerinin konsantrasyonla orantılı olarak arttığı, fizyolojik etkilerinin yapışkanlık, kromozom yoğunluğu ve iğ formasyonundaki gecikme gibi etkilerinin iki saatten sonra hemen gözlemlendiği, yapısal tesirlerinin ise kromozom ve kromatit bozulmaları ile kendini gösterdiğini ve bu tesirlerin x-ışınları tesirlerine benzer olduğunu belirtmiştir. Mayoz gözlemlerinde ise fragmentler, halka kromozomlar, anafazda köprüler, geç kalan kromozomlar ve tetraploid gibi etkiler olduğu gözlemlenmiştir.

Kolkisin ve herbisit elbanilin farklı yoğunlukları değişik sürelerde *Allium cepa* ve *Hordeum vulgare*'nin mitozu üzerine etkilerine bakıldığında mitotik olarak *Hordeum vulgare*'nin ilaçlara karşı hassasiyeti *Allium cepa*'dan daha az olmuştur. Kolkisin ile

inhibasyon oluşmuş ve bunun sonucu c-mitozlar ve poliploidi oluşmuştur. Elbanil herbisitinin inhibasyonu ise daha çok g bir şekilde kromozomları etkilemiş ve bunun sonucu olarakta mitozda kümeleşme ve piknosis oluştuğu gözlenmiştir (Gunther and Nasta 1972).

Stomp ve hyvar X herbisitlerinin 0.001, 0.0001, 0.00005 ve 0.00001 ppm'lik konsantrasyonları 2, 4, 8 ve 24 saat *Allium cepa*'nın kök uçlarının tabi tutulmasıyla mitotik aktivitenin konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Stomp özellikle iğ ipliklerine etki yapmıştır. Hyvar X ise kromozomlarda kırılma ve yapışkanlığa neden olmuştur. Ayrıca kromozom kontraksiyonu, anafazda köprü ve fragment oluşumu ile mikronükleus ve iki çekirdekli hücelere rastlanılmıştır (Bilaloğlu 1984).

Asulum ile msma herbisiti ve chlorpyriphos ile endosülfan insektisitinin farklı konsantrasyonları değişik sürelerde *Allium cepa*'nın kök ucu meristemlerinde sitolojik etkilerine bakılmıştır. Mitotik indeksin yüksek olduğu endoslfanlı hariç diğer pestisitlerde düzenli olarak grlmştir. Msmanın en etkili klastojenik olduğu gözlenmiş ve bunu sırasıyla endosülfan, chloropyriphos ve asulum izlemiştir (Rao *et al.* 1988).

Sentetik piretroit bir insektisit olan cypermethrin ve fenvalerate'ın *Allium cepa* kök meristem hücrelerinde sitogenetik etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre her iki bileşik de bitkide mitotik indeksin azalmasına ve kromozomlarda aberasyon oluşumuna sebep olmuştur (Chauhan *et al.* 1999).

Bir başka yapılan çalışmaya göre, cypermethrin'in *Allium sativum* kök meristem hücrelerinde etkileri araştırılmış sonuçta bu insektisin mitotik indeksin azalmasına ve kromozom hasarları oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir (Saxena *et al.* 2005).

Allium cepa L.'nın kök uçları üzerine quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin toksik ve sitotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, QPE herbisitinin *Allium* kök büyümesini inhibe ettiği, mitotik indeksi önemli düzeyde azalttığı, anafaz-telofaz kromozom

aberasyonlarını teşvik ettiği ve kromozomal aberasyonların seviyesini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Yildiz and Arikan 2008).

2.6 Genotoksisitenin DNA Seviyesinde İzlenmesi

Genotoksisite, hücrenin genomik DNA bütünlüğünü etkileyen ve onu tahrip eden bir etkiyi tanımlar. Genotoksik etmenler hücre DNA'sına hasar verirler. DNA hasarları genelde onarılır, fakat genomun genelinde ağır hasarların oluşması DNA hasar onarım mekanizmasında aksamalara neden olur. Bu da genelde genomik DNA bütünlüğünü bozan değişik şekillerde mutasyonlarla sonuçlanır. Bu nedenle genotoksinler aynı zamanda mutajenler veya kanserojenler olarak adlandırılır. Teknolojik gelişmelerle birlikte çok değişik amaçlarla üretilen veya kullanımı artan toksik özellikli maddelerin genotoksik özellikleri mevcuttur. Fakat, bu tip maddelerin kullanımı yaygınlaşırken bu maddelerin organizmalar üzerindeki etkileri çok fazla bilinmemektedir. Bu nedenle araştırma konuları içerisinde yeni veya DNA üzerindeki özellikleri belirlenmemiş potansiyel genotoksinler yer almaktadır. Bitkiler hareketsiz organizmalar olduğundan çevresel kirleticilere doğrudan maruz kalmaktadır. Çevresel kimyasalların hücre yapısı veya fonksiyonunda hasar oluşturan (sitotoksik), normal kromozom davranışlarını bozan (sitogenetik) ve DNA molekülünde genetik bilginin değişmesi anlamında mutasyonlara neden olan hasarların oluşması (mutajenik) gibi sonuçların izlenmesinde ve araştırılmasında bitkiler kullanılabilir. Genotoksinlerin bitkiler üzerinde oluşturdıkları etkilerin son durumları biyokimyasal (örneğin; toplam protein içeriği, klorofil pigment içeriği ve karotenoid içeriği gibi), fizyolojik (örneğin; kök ve fide büyümesi), kromozomal (mikronükleus assay, kromozomal aberasyon assayı) ve moleküler seviyede takip edilebilir (Antonsie-wiez 1990; Gichner and Plewa 1998; Rank and Nielsen 1993; Conte *et al.* 1998; Atienzar *et al.* 1999; Kovalchuk *et al.* 2001; Yıldiz *et al.* 2009; Cenkci *et al.* 2009). Bu bağlamda, çevresel kirliliğin neden olduğu muhtemel genetik hasarın izlenmesinde hayvan biyotestlerine alternatif olarak soğan (*Allium cepa*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), arpa (*Hordeum vulgare*), soya fasulyesi (*Glycine max*), telgraf çiçeği (*Tradescantia* spp.), bakla (*Vicia faba*), mısır (*Zea mays*) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris*) gibi bitkiler kullanılmaktadır (Ma *et al.* 1995; Enan 2006; Liu *et al.* 2007; Cenkci *et al.* 2009).

2.6.1 Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE, Comet Assay)

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Son yıllarda geliştirilen comet tekniği de çeşitli tipte DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım görmektedir. İlk kez Östling ve Johanson (1984) tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasarını tespit etmek üzere tek hücre jel elektroforez tekniği (SCGE, comet assay) geliştirilmiştir. Östling ve Johanson mikroskop lamı üzerinde, bir ince tabaka agar jeline süspanse ettikleri az sayıda hücreyi, tuz ve deterjanlarla lizis ettikten sonra, nötral şartlarda elektroforeze tabi tutmuşlardır. Elektroforez sırasında uygulanan elektrik akımı, kırılmış ve hafif DNA parçalarının nukleustan hızlı göçünü sağlamaktadır. Comet tekniği, hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile nukleustan salınması prensibine dayanır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, hasarlı DNA, nukleustan anoda doğru göç etmekte ve etidyum bromid gibi fluoresan bağlayıcı bir boya ile boyandıklarında bu hasarlı hücreler, kuyruklu yıldız (comet) benzeri görünüm almaktadır (Östling and Johanson 1984). DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemektedir. DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı alkali şartlar altında ($\text{pH} > 13$), DNA tek sarmal kırılmalarının tespitine izin veren comet tekniği geliştirilmiştir (Singh *et al.* 1988). Kullanılan daha güçlü lizis koşulları, proteinlerin % 95 ve fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile alkali oynak bölgelerin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde tanınması sağlanmıştır. Pek çok genotoksik ajanın çift zincir kırıklarından daha fazla tek zincir kırıkları ve/veya alkali oynak bölgeler oluşturmaları nedeniyle metodun bu versiyonu daha çok önerilir hale gelmiştir (Singh *et al.* 1988; Tice *et al.* 1990). Böylelikle comet tekniğinin yeni dizaynı, birey hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasarı büyüklüğünün direk olarak tespitini sağlamaktadır. Bunun yanında, DNA hasar/onarım tespiti ve mekanizması çalışmalarında kullanılabilmektedir (Tice *et al.* 2000; Olive *et al.* 1990).

Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerdendirmenin yanı sıra Comet görüntü analiz programlarını kullanmak suretiyle kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi ile ilgili parametreler belirlenebilir (Collins 2002). Comet görüntü analiz programları kullanılarak kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi veya sonuçların gözle değerdendirilmesi diğer parametrelere göre doz-yanıt ilişkisini daha iyi yansıtmassı sebebiyle tercih edilmektedir (Moller 2006 a, b; Olive 1999).

Gözle değerdendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak ayrılırlar. Hasarlı hücreler ise hasar seviyelerine göre farklı kategorilere ayrılabilir. Bazı çalışmalarda hücreler hasarsız, az hasarlı ve çok hasarlı olarak 3 sınıfa ayrılabilđiđi gibi bazı çalışmalarda ise bu sınıflandırma genişletilerek 5 kategoriye ayrılmışlardır. Ayrıca mikroskopta okülere yerleştirilen mikron seviyesinde ölçüm yapabilen cetvelden de yararlanılabilir. Gözle değerdendirme, hızlı (5 dakikadan az bir sürede 1000 hücre sayılabilmektedir) ve bilgisayar programı gerektirmediğinden ucuz ve kolay bir yöntemdir (Baltacı *et al.* 1998; Sardas *et al.* 1995; Sardas *et al.* 1997). Gözle skorldama, 0 (kuyruk yok)'dan 4 (nerdeyse bütün DNA kuyrukta)'e kadar 5 kategoride incelenir. Eğer 100 Comet skorlandıysa ve herbir Comet 0-4 arasında değerdendirildiyse toplam skor 0-400 arasında olur (Collins 2004).

SCGE tekniği tek bir hücrede DNA hasarının direk tayininin yanı sıra, bir populas-yondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine, dolayısıyla da bir tedavi sırasında hücrelerin cevabının özellikle radyoterapi ve kemoterapi rejimlerinde tümör cevabının saptanmasına yardımcı olabilmektedir. Ayrıca dirençli hücre populas-yonunun tanımlanmasını da sağlamaktadır (Collins *et al.* 1997). Comet assay tekniği pek çok deneysel şartlarda DNA hasar ve onarımını incelediğinden, son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelemesinde kullanımı artan bir yöntemdir (Collins *et al.* 1997; Faust *et al.* 2004). Yöntem tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen hemen hemen her ökaryot hücrede DNA hasar ve onarımını tespit etmektedir. Oldukça küçük hacimde örneklerle çalışılabilmekte ve sonuçlar bir günde elde edilebilmektedir.

SCGE tekniğinin farklı uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lysing solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH), metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle deneylerde şartlar standart tutulmalıdır. Ayrıca insana yönelik çalışmalarda genotoksik etkiyi potansiyelize ettiği tartışılan faktörler SCGE tekniği de etkileyebilir. Comet assay, az sayıdaki ve farklı dokulara ait hücrelere uygulanabilir, pratik, hassas, ekonomik, sonuçları güvenilir ve hızlı bir tekniktir (Hartmann *et al.* 2003). Ayrıca, comet assay çeşitli tiplerdeki DNA hasarlarını tespit edebilir ve endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlemleri, DNA onarım ve hasarının temel mekanizması gibi çalışmalarda yaygın olarak kullanılabilir (Collins *et al.* 1997; Gichner and Plewa 1998). Bununla birlikte, yöntem *in vivo* modellerde herhangi bir dokuya da uyarlanabildiğinden, sadece hızlı çoğalan hücrelerde uygulanabilen diğer genotoksisite testlerinden daha üstündür (Gichner and Plewa 1998).

2.6.2 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD tekniği ilk defa 1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından uygulanan, polimeraz zincir reaksiyonunu temel alan rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı bir metottur. Welsh ve McClelland (1990) yirmi nükleotid uzunluğunda primer geliştirdikleri benzer bir yöntemi rastgele primerli polimeraz zincir reaksiyonu AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) olarak isimlendirmişlerdir (Welsh and McClelland 1990). Bu metotla aynı temele dayanan, ancak farklı olarak daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmak izi profili elde edilen bir yöntem de Caetano-Anolles ve arkadaşları tarafından (1991) DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak yayınlanmıştır. Bu uygulamalarda rastgele dizili primerlerin uzunlukları, amplifikasyon şartları ve görüntüleme metodu standart PCR şartlarından farklıdır (Caetano *et al.* 1991; Başbüyük *et al.* 2000).

Polimeraz zincir reaksiyonu, Cetus Şirketi'nin bir grup bilim adamınca 1984 yılında, *in vivo* koşullar yerine *in vitro* koşullarda geliştirilen bir DNA amplifikasyon prosedürüdür. Bu metotla basit enzimatik reaksiyonlarla kompleks DNA örneğinden çok miktarda, spesifik DNA fragmentleri üretilir (Mullis *et al.* 1986; Avise 1994). PCR hücresiz gen

amplifikasyonu, nükleik asitlerin klonlanması, analiz edilmesi ve modifikasyonundaki birçok standart prosedürü kolaylaştırmıştır (Avisé 1994). PCR seçicilik, hassaslık ve hız olmak üzere üç özellik ile karakterize edilir (Mullis *et al.* 1986; Saiki *et al.* 1988; Arnheim and Erlich 1992). Geleneksel klonlama yöntemi ile DNA fragmentlerinin kompleks genomdan elde edilmesi aylara varan uzun süreler gerektirir. Bu metotta, tek zincirli kalıp sekanstan spesifik DNA fragmenti sentezi için DNA polimeraz ve iki oligonükleotid primer kullanılır. Standart klonlama ve moleküler biyoloji analizlerinde alışılmış milyonlarca molekül ihtiyacına karşın, PCR az miktarda başlangıç materyaline gereksinim duyar (Mullis *et al.* 1986; Saiki *et al.* 1988; Arnheim and Erlich 1992). DNA saflaştırılmasında birçok uygulama kullanılmasına karşın, PCR ham hücre lizatından bile çok iyi örnekler verir (Arnheim and Erlich 1992).

RAPD yönteminin en önemli avantajı, araştırılan taksonun genomik DNA dizisi ile ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir (Hillis and Mortiz 1990; Williams *et al.* 1990; Welsh and McClelland 1990; Başbüyük *et al.* 2000). Amplifikasyonda tek bir primer seti kullanılır ve bu oligonükleotid, özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğalma yapar (Hillis and Mortiz 1990; Williams *et al.* 1990; Welsh and McClelland 1990; Welsh and Petersen 1991). Kullanılan primerler, bütün türler için kullanılabilen evrensel primer setleridir (Yu *et al.* 1993). RAPD yönteminde kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacağından, yakın türleri ayırma konusunda birçok yöntemden daha duyarlıdır (Mathieu-Daude *et al.* 1997). RAPD hızlı ve kolay bir tekniktir ve kullanılan teçhizat ve malzemeler diğer tekniklere göre daha ucuzdur (Tingey *et al.* 1992; Rafalski *et al.* 1991; Mathieu-Daude *et al.* 1997; Waugh and Poweil 1992). RAPD tekniğinde polimorfizm derecesi oldukça yüksektir (Nicese *et al.* 1998; Waugh and Poweil 1992; Rafalski *et al.* 1991; Weeden *et al.* 1992). Tüm bu avantajların yanında, RAPD yönteminin en önemli dezavantajı, belirteçlerin dominant olması sebebiyle heterozigotları teşhis etmenin zor olmasıdır (Mathieu-Daude *et al.* 1997). Reaksiyon birçok hassas değişkenle birbirine bağlı olduğu için elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği düşüktür.

RAPD tekniği sadeliği, kullanışlılığı ve getirdiği diğer pek çok avantaj nedeniyle büyük ilgi görmüş ve çok sayıda araştırmacı grup tarafından kullanılmaya başlanmıştır. RAPD

yöntemi, polimorfizm sayısının sınırsızlığı nedeni ile çok sayıda karakterin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. RAPD belirteçleri; genetik haritaların yapımı, popülasyon yapısının genetik analizi, bireylerin parmak izi, ayırt edici özelliklerin haritasının yapımı, genomun özel bölgesi için hedef belirteç belirlenmesi gibi değişik alanlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda, ekoloji ve popülasyon biyolojisinde de yaygın kullanım alanı bulmaktadır (Rafalski *et al.* 1994). RAPD metodu prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının DNA parmak izleri, genotipin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, prenatal tanı, ebeveyn belirleme, kültür ve ırk belirlenmesi, adli tıp, klinik tanı, evrimsel sorunlar, lasyon biyolojisi, salgınlar ve ekoloji gibi alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Rafalski *et al.* 1994). Ayrıca bu yöntem, klinik mikrobiyolojide, özellikle ayırt edilmesi çok zor olan bakterilerin belirlenmesinde kullanılır (Açık *vd.* 2001).

Çevresel kirleticilerin organizmaların genomları üzerine etkisi hakkında çalışmalar büyük ilgi görmektedir. Kimyasallara maruz bırakma sonucunda gerçekleşen DNA köprüleri, DNA kırığı ve mutasyonları içeren DNA fonksiyonu ve yapısındaki değişimleri genetik etkilerin bir sınıfını kapsar. Ayrıca, genotoksik ajanların DNA ile etkileşimleri sonucunda dolaylı genetik etkiler de ortaya çıkmaktadır. Genotoksinlere maruz bırakılmış organizmalara ait RAPD profillerinde gözlenen değişiklikler DNA hasarına ve/veya mutasyonlara neden olmaktadır (Atienzar and Jha 2006). Ontogenetik ve ekotoksikolojik (Wolf *et al.* 2004; Wang *et al.* 2007) olayların değerlendirmesinde RAPD güçlü bir teknik olarak son zamanlarda kullanılmaktadır. 10’mer RAPD oligonükleotit primerindeki tek nükleotid değişikliği, verilen kalıp DNA’nın parmakizinde önemli farklılıklara neden olmaktadır. Aynı şekilde, genomik DNA’da bir tek nükleotid değişikliğinin DNA parmakizinde aynı etkiye sahip olması beklenir (Atienzar and Jha 2006). Teorik olarak, genomik DNA’daki bu tek baz değişim mutasyonlarını RAPD tespit edebilir (Welsh and McClelland 1990).

Omurgalı ve omurgasız hayvanlar, bitkiler ve bakterilerde genotoksinlerin etkisi ile genomik DNA’da meydana gelen çeşitli DNA hasarı ve mutasyonların belirlenebildiğini gösteren bilimsel yayınlar RAPD’in güçlü bir biyomarkör olduğunu

göstermiştir (Savva *et al.* 1994; Liu *et al.* 2005, 2007; Enan 2006; Wang *et al.* 2007; Cenkci *et al.* 2009, 2010).

RAPD tekniğinde; genotoksik etkinin teşhisi, kontrol ve uygulama örneklerinden elde edilen RAPD profillerinin karşılaştırılmasıyla yapılır (Atienzar and Jha 2006). DNA hasarı ve mutasyonel olaylar, RAPD profillerinde yeni DNA bantlarının oluşmasına, kontrol grubu RAPD profillerinde mevcut olan DNA bantlarının kaybolmasına ve RAPD profillerinin görünüşünde değişikliklere neden olur (Atienzar *et al.* 1999). Toksik maddelerin etkisinde kontrol grubuna göre RAPD profillerindeki değişiklikler her bir primer için genomik kalıp kararlılık yüzdesi (GTS %) olarak hesaplanır (Atienzar *et al.* 1999). GTS yüzdeleri ile fide kök uzunlukları, protein içerikleri, pigment içerikleri gibi klasik fizyolojik ve biyokimyasal verilerin kontrol gruplarına göre değişim yüzdeleri karşılaştırılarak toksik maddelerin organizma üzerindeki etkileri yaygın olarak mukayese edilmektedir (Atienzar *et al.* 1999; Liu *et al.* 2005, 2007; Cenkci *et al.* 2010).

3. Materyal ve Metot

3.1 Bitki Materyali

Araştırma materyali için ticari olarak satılan *Allium cepa* L. (mutfak soğanı) (2n=16) kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan mutfak soğanları halk arasında “arpacık” veya “fiske” olarak bilinmektedir. Soğanlar Konya ili Akşehir ilçesine bağlı köylerden temin edilmiştir. Soğanlar testler öncesi serin, kuru ve ışık görmeyen ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2 Herbisit Materyali

Bu çalışmada, organik bir herbisit olan quizalofop-P-etil (quizalofop-P-ethyl, QPE) fenoksi bileşiği kullanılmıştır.

3.3 Test Materyalinin Hazırlanması

Soğanlar kullanılmadan önce serin, kuru ve havalandırılan ortamda muhafaza edilmiştir. Denemelerde yaklaşık 10-20 mm çapında ve 2-3 g ağırlığında soğanlar kullanılmıştır. Köklendirme denemelerinden önce soğanların tabana yakın dış kabukları soyulmuş ve kök primordiyalarına zarar verilmeksizin kuru kökler dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

3.4 Kök İnhibisyon Testi

Distile su (dH₂O) ile doldurulmuş deney tüplerine (15 mm çap × 100 mm uzunluk) yerleştirilen soğanlar 24 saat süreyle köklendirilmiştir. Bu süre sonunda, sağlıklı homojen köklenmenin olduğu soğanlar kontrol (distile su) ve quizalofop-P-etil herbisitinin farklı konsantrasyonlarına (ppm) 48 ve 96 saat sürelerle maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada quizalofop-P-etil herbisitinin 0.75, 1.5 ve 3.0 ppm konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar Yıldız and Arıkan (2008)’e göre kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu için distile su uygulanmıştır. Pozitif kontrol için 10 ppm metil metansulfonat (MMS; Acros Organics, Cas no; 66–27–3) çözeltisi kullanılmıştır. Her

24 saatte bir çözeltiler yenilenmiştir. Denemeler, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve laboratuvarın direkt güneş ışığı almayan kısmında gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonunda, kontrol ve farklı herbisit konsantrasyonlarının her birine ait 5'er soğandan en uzun 10 kökün uzunluğu (mm) ölçülerek, o konsantrasyona ait ortalama kök uzunluğu belirlenmiştir (her konsantrasyon için 50 kök = 5 soğan $\times$ 10 kök).

3.5 Kök Uçları Toplam Çözünür Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Her bir uygulamaya ait yaklaşık 1 gr taze kök dokusu toplam çözünür protein izolasyonu için kullanılmıştır. Kök dokularından protein izolasyonu Damerval *et al.* (1986)'a göre yapılmıştır. Soğutulmuş porselen havan içerisinde sıvı azot kullanılarak kök dokusu toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen doku, % 0.07 β -merkaptoetanol (β ME, Sigma, Cas no; 60-24-2) içeren asetonda hazırlanmış 5 mL % 10'luk trikloroasetik asit (TCA, Sigma, Cas no; 76-03-9) çözeltisinde süspanse edildikten sonra ependorf tüplere (2 ml) alınmıştır. -20°C 'de 1 saat inkübe edilen tüpler, 10000 rpm'de (4°C 'de) 15 dakika santrifüj (Nüve NF 800 R) edilmiştir. Proteinlerin -20°C 'de 1 saat çökmesinden sonra tüpler, 10000 rpm'de (4°C) 15 dakika tekrardan santrifüj edilmiştir. Süpernatant döküldükten sonra pelet üzerine asetonda hazırlanmış 0.5 mL % 0.07 β ME ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra 4.5 mL aynı çözeltiliden ilave edilerek tüpler en az 1 saat -20°C 'de tutulmuştur. Daha sonra, 4°C 'de 15 dakika 10000 rpm'de santrifüj sonrası süpernatant dökülmüştür. Tüplerin dibindeki peletler desikatörde kurutularak, kullanılma anına kadar -20°C 'de saklanmıştır.

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonu Bradford metoduna (1976) göre belirlenmiştir. Bradford stok çözeltisi (5X) hazırlamak için 100 mg Commasie Brilliant Blue G-250 (Sigma, Cas no; 228-058-4), 50 mL % 95 etanol (EtOH, Sigma) ve 100 mL % 85'lik fosforik asit (H_3PO_4) karıştırılmıştır. Karışım 200 mL'ye su ile tamamlandıktan sonra 1:4 oranında distile su ile seyreltilerek (1X) Whatman No.1 filtre kağıdı ile süzölmüştür. Standart çözeltisi için 1 mg Bovin Serum Albumin (BSA, Sigma, Cas no; 232-936-2) 1 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltisine (0-25 μL) uygun olarak distile su (500-475 μL) ilave edilmiş ve 0-0.05 mg/mL BSA karışımı hazırlanmıştır. Her bir uygulamaya ait 5 mg protein peleti distile

suda hazırlanmış 500 µL % 20'lik TCA içinde çözülmüştür. Protein örnek çözeltileri 4 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örnekler 5 dakika 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek pelletlerin üzerine 500 µL 1 N NaOH ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında 2 saat tutulmuştur. Her bir örnekten 25 µL cam tüplere alınmış ve üzerine 475 µL distile su ve 5 mL Bradford çözeltisi (1:4) ilave edilmiştir. Altı tekrarlı olarak hazırlanan standart ve örnek çözeltilerin absorbansları 595 nm dalga boyunda spektrofotometre (TU-1880 Double Beam UVI-VIS) ile belirlenmiştir. Standart grafiğinden (BSA) yararlanılarak örneklerin protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.6 Nukleus İzolasyonu ve Alkali Comet Assay

Soğan kök uçlarındaki hücrelere ait nukleusları Pfosser *et al.* (1995)'e göre izole edilmiştir. Kök uçları 1 cm uçtan kesilip uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık 20 mg kök ucu (25–30 soğan kökü) buzda soğutulmuş 1 ml Tris-MgCl₂ tamponu (4 mM MgCl₂.6H₂O, 0.5 % w/v Triton X-100, 0.2 M Tris, pH 7.5) içinde keskin bir jilet yardımıyla hızlıca doğranmıştır. Hücre nukleuslarının da bulunduğu karışım 50 µm naylon ağdan süzülerek bir ependorf tüp içerisine alınmıştır. Alkali comet assayinde kullanılacak her bir mikroskop lamı 50 °C'de hazırlanmış % 1'lik NMA (normal erime dereceli agaroz) ile kaplanarak düz bir yüzey üzerine ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra, 100 µl % 0.8'lik LMA (düşük erime dereceli agaroz) 37 °C'de 20 µl nukleus süspansiyonu ile karıştırılmıştır. Bu karışım lam üzerinde mevcut olan NMA katmanı üzerine damlatıldıktan sonra yayılmıştır. Lamalar 2-3 dakika buz kasetlerinin üzerinde katılaştırıldıktan sonra buzda soğutulmuş lizing solüsyonunda (1 M NaCl; 30 mM NaOH, 0.5 % w/v SDS, pH 12.3) 1 saat bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra lamlar, yatay jel elektroforez tankına yerleştirilerek DNA elektroforetik tamponda (30 mM NaOH ve 1.5 mM EDTA pH 12.3) (Fairbairn *et al.* 1995) bir saat boyunca DNA sarmal açılması için bekletilmiştir. Elektroforez buz üzerinde soğutulmuş tankta 25 voltajda (1V cm⁻¹) (30 dk) gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası, lamlar üç kez 0.4 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.5) nötralize edildikten sonra EtBr (etidyum bromür, 10 mg/L) ile boyanmıştır. Nukleus DNA'sı UV ışık kaynağı ile desteklenmiş olan floresan mikroskobu (OLYMPUS BX50F-3, Japonya) ile gözlenmiştir. Comet görünümünün

sayılmasında sıfırdan (kuyruksuz) dörde kadar (tüm DNA'ların kuyruk verdiği) olan beş ayrı sınıflama kullanılmıştır. Her bir lam için 100 adet rastgele seçilen nukleuslar analiz edilmiştir ve her bir çekirdeğe comet şekline göre 0-4 arasında rakamlar verilmiştir. Her bir örneğin toplam DNA hasar seviyeleri 0-400 arasındaki “keyfi üniteler (AU, arbitrary units)” arasında oluşturulmuştur. Her bir deneme grubu için üç farklı kök grubundan üçer farklı okuma gerçekleştirilerek elde edilen verilerin ortalamaları ve standart hataları hesaplanmıştır.

3.7 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Tekniği

3.7.1 DNA İzolasyonu

Uygulama grubu soğanların yaklaşık 0.3 g taze kök dokusu DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Genomik DNA, RAPD-PCR çalışmalarında yeterli olan Doyle ve Doyle (1990) CTAB-DNA izolasyon prosedürünün laboratuvarımıza uyarlanması ile ekstrakte edilmiştir. Kök dokusu önceden soğutulmuş steril havan içerisine yerleştirilmiştir. Örneğin üzerine sıvı azot eklenerek bir süre beklendikten sonra hızlı ve etkin bir şekilde öğütülmüştür. Bu işlemi takiben, önceden soğutulmuş steril bir spatula ile havan içerisindeki öğütülmüş bitki örneği iki ayrı steril 1.5 ml ependorf tüp içine eşit miktarda aktarılmıştır. Aktarma işleminin ardından önceden su banyosunda 60 °C’ de ön ısıtmaya tutulmuş CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisinden [% 2 CTAB, % 1 PVP- 40.000, 20 mM 2-merkaptoetanol, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl] 1 ml her tüpe eklenmiştir. Ependorf tüpleri parmaklar arasında ters-düz edilerek karıştırılmış ve 60 °C’deki sıcak su banyosuna alınmıştır. Daha sonra tüplere 0.4 ml kloroform eklenmiştir. Bu süre zarfında her 5 dakikada bir örnekler ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Tüpler, inkübasyon sonrası oda sıcaklığında 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, örneklerin süpernatantları dikkatlice temiz bir ependorf tüpe bir mikropipet yardımıyla alınmıştır. Tüplere 10 µl RNaz eklendikten sonra 60 °C’de 20 dk bekletilmiştir. RNA temizleme işlemini takiben -20 °C’de önceden soğutulmuş iso-propanol son hacmin % 60’ı olacak şekilde tüplere eklenmiş ve örnekler sarsılmadan her iki faz birbirine dikkatlice karıştırılmıştır. Bu aşamada iplikçik halinde ve beyaz renkli bir kütle toplanması gözlenmiştir. Örnekler 4 °C’de 30 dk bekletildikten

sonra 3000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş ve kalan sıvı damlaları tekrar santrifüj edildikten sonra mikropipetle alınmıştır. Tüpler daha sonra 1 mL % 70'lik etanol ile yıkanmış ve sonrasında sıvı kısım tüplerden uzaklaştırılmış ve 4-5 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, DNA çöktürmeleri 0.2 mL TE tampon [10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0] çözeltisi içinde çözüldükten sonra 24 saat 4 °C' de bekletilmiştir. DNA'lar, spektrofotometrik miktar tayini ve agaroz jel elektroforezde genomik DNA'ların kontrolü yapıldıktan sonra -20 °C' de saklanmıştır.

DNA örnekleri 2 mL kuvars cam küvetler kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarında TU-1880 Double Beam UV-VIS Spektrofotometre ile okunmuştur. DNA miktarı; DNA ($\mu\text{g/ml}$)= $A_{260} \times \text{Seyreltme Oranı} \times 50$ formülü kullanılarak belirlenmiştir. DNA saflığı, A_{260}/A_{280} oranı hesaplanarak tespit edilmiştir. DNA örnekleri TE tamponunda çözüldüğü için çalışmada kör olarak TE tamponu kullanılmıştır.

3.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Her bir PCR reaksiyonu 0.2 mL ince cidarlı ependorf tipi tüplerde 25 μl toplam solüsyon içerisinde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu bileşenleri ön denemelerde optimize edilmiştir. 25 μl PCR karışımı; 1x PCR tampon çözeltisi (50 mM KCl, 1 mM Tris-HCl; pH 8.8), 1 U *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA Polimeraz enzimi (Fermentase, Vilnius, Litvanya), 2.0 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP (50 μM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP), 10 μM 10 baz dizilimli primer, 50 ng/ μl genomik DNA ve steril ddH₂O ile hazırlanmıştır. Bu çalışmada toplam 40 adet 10'ner oligonükleotit primer (QIAGEN Operon GmbH, Cologne, Almanya) kullanılmıştır. Kullanılan primerler, sekansları ve GC içerikleri Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

3.7.3 PCR Döngüleri

PCR döngüleri, Uvigene (Uvitech Ltd. UK) marka ısı-döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR karışımları 94 °C'de 4 dk başlangıç denatürasyonuna maruz bırakıldıktan sonra, toplamda 40 döngü olmak üzere; 94 °C'de 45 sn denatürasyon

(DNA zincirlerinin ayrılması), 37 °C’de 45 sn annealing (primerlerin bağlanması) ve 72 °C’de 60 sn polimerizasyon (zincirlerin uzaması) programı kullanılmıştır. 72 °C’de 8 dk son polimerizasyon döngüsü gerçekleştirildikten sonra PCR döngüleri tamamlanmıştır. PCR örnekleri bekletilmeden veya -20 °C saklandıktan sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

3.7.4 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerine 6X yükleme tamponu (10 mM Tris-HCl pH 7.6, % 0.03 bromofenol blue, % 0.03 ksilen siyanol FF, % 60 gliserol, 60 mM EDTA) karıştırılmıştır. 1X TBE [Tris-HCl (10.8 g), Borik asit (5.5 g) ve EDTA (2 mL)] ile hazırlanan % 1.8’lik agaroz jele DNA örnekleri 100 bç DNA ladder (Fermentas GeneRuler 100 bç DNA Ladder Plus), 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA) ile birlikte yüklenmiştir. DNA örnekleri yürütücü tampon çözeltisi (1X TBE) bulunan jel tankı içerisinde (BIO-RAD Wide Mini Sub-Cell GT System, İtalya) 100 voltta 120 dk yürütülmüştür. Agaroz jel daha sonra 10 µl (0.625 mg/ml) etidyum bromür eklenmiş 200 ml saf su içinde 20 dk bekletilerek boyamaya bırakılmıştır. Distile su ile durulandıktan sonra ultraviyole ışık altında renkli kamera ile agaroz jeli görüntülenmiştir. PCR ürünleri için % 1.8 agaroz; genomik DNA’ların analizi için % 0.8 agaroz kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 RAPD-PCR reaksiyonlarında test edilen primerler, sekansları ve GC içerikleri.

No	Primer	G+C (%)	5'-3' sekans	Primer	G+C(%)	5'-3' sekans	
1	OPA01	70	CAGGCCCTTC	21	OPB01	60	GTTTCGCTCC
2	OPA02	60	TGCCGAGCTG	22	OPB02	60	TGATCCCTGG
3	OPA03	60	AGTCAGCCAC	23	OPB03	70	CATCCCCCTG
4	OPA04	60	AATCGGGCTG	24	OPB04	60	GGACTGGAGT
5	OPA05	60	AGGGGTCTTG	25	OPB05	70	TGCGCCCTTC
6	OPA06	70	GGTCCCTGAC	26	OPB06	70	TGCTCTGCCC
7	OPA07	60	GAAACGGGTG	27	OPB07	70	GGTGACGCAG
8	OPA08	60	GTGACGTAGG	28	OPB08	70	GTCCACACGG
9	OPA09	70	GGGTAACGCC	29	OPB09	70	TGGGGGACTC
10	OPA10	60	GTGATCGCAG	30	OPB10	70	CTGCTGGGAC
11	OPA11	60	CAATCGCCGT	31	OPB11	60	GTAGACCCGT
12	OPA12	60	TCGGCGATAG	32	OPB12	60	CCTTGACGCA
13	OPA13	60	CAGCACCCAC	33	OPB13	70	TTCCCCCGCT
14	OPA14	60	TCTGTGCTGG	34	OPB14	50	TCCGCTCTGG
15	OPA15	60	TTCCGAACCC	35	OPB15	60	GGAGGGTGTT
16	OPA16	60	AGCCAGCGAA	36	OPB16	60	TTTGCCCGGA
17	OPA17	60	GACCGCTTGT	37	OPB17	60	AGGGAACGAG
18	OPA18	60	AGGTGACCGT	38	OPB18	60	CCACAGCAGT
19	OPA19	60	CAAACGTCGG	39	OPB19	70	ACCCCCGAAG
20	OPA20	60	GTTGCGATCC	40	OPB20	60	GGACCCTTAC

3.7.5 RAPD Bantlarının Değerlendirilmesi

RAPD profillerindeki belirgin değişiklikler (negatif kontrole göre yeni bantların ortaya çıkması ve/veya mevcut bantların kaybolması) değerlendirilmiştir. Değerlendirmesi güç olan veya tüm örnekler için monomorfik DNA bantları üreten primerler değerlendirmeye alınmamıştır. Her bir primer için çoğalmış olan bantların varlığı “1” ve yokluğu “0” belirlenmiştir. Çoğalmış bantların analizi Lynch and Milligan (1994)’e

göre yapılmıştır. Uygulama grupları arasındaki uzaklıklar ikili karşılaştırma matrisi RAPD (9 primer) verileri için Jaccard's algoritması kullanılarak yapılmıştır. Uygulama grupları için 1000 tekrarlı bootstrap testinden sonra uzaklık verileri UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means, UPGMA) ağaçlarının meydana getirilmesi için kullanılmıştır. UPGMA ağaçları Saitou and Nei (1987)'e göre FreeTree (Pavliček *et al.* 1999) ve TreeView (Page 1996) paket programları kullanılarak "0" ve "1" matrisinden oluşturulmuştur.

RAPD profillerinde değişikliğin belirlenmediği veya sayılması güç skorlar üreten primerler genomik kalıp kararlılığı (GTS, Genomic Template Stability) hesaplanmasına katılmamıştır. GTS (%), $100 - (100 \cdot a/n)$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Formüldeki "a" her bir primer için DNA profillerindeki değişiklik gösteren ortalama DNA bant sayısını, "n" ise negatif kontrol grubu profilinde aynı primer için belirlenen toplam DNA bant sayısını ifade etmektedir (Atienzar *et al.* 1999). Her bir deneme grubu için tüm primerlerle hesaplanan GTS değerlerinin ortalamaları hesaplanmıştır. Her bir parametrenin hassasiyetini karşılaştırmak için, her parametredeki (kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği, comet assayle belirlenen DNA hasar skorları ve GTS değerleri) değişimler negatif kontrole (% 100'e sabitlenmiştir) göre yüzde değişimleri olarak tekrardan hesaplanmıştır.

3.8 İstatistiksel Analizler

Verilerin varyans analizi SPSS (v 15.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği ve comet skorlarındaki farklılıklar tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. 48 veya 96 saat uygulamalarında elde edilen negatif kontrol ve her bir uygulama arasındaki önemli düzeydeki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi, ($P \leq 0.05$) ile değerlendirilmiştir. Aynı deneme gruplarının 48 ve 96 saat uygulamaları arasındaki farklılıklar student-T-testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Bu araştırmada soğanlar (*Allium cepa* L.) 24 saat, oda sıcaklığında, düşük ışık ortamında ve distile suda köklendirilmiştir. Bu süre sonunda, homojen köklenme gösteren soğanlar seçilerek distile su (negatif kontrol, NK), 10 ppm metil metansulfonat (pozitif kontrol, PK) ve quizalofop-P-ethyl (QPE) herbisitinin farklı konsantrasyonlarıyla (0.75, 1.50 ve 3.0 ppm) kültüre edilmiştir. Uygulamaların 48. ve 96. saatlerinde soğanlar hasat edilerek; kök büyümesi, kök dokularındaki toplam çözünebilir protein içeriği, comet assayle belirlenen kök hücre çekirdeklerindeki DNA hasar seviyesi, RAPD assayle belirlenen genomik DNA'daki değişimlerin seviyesi analiz edilmiştir.

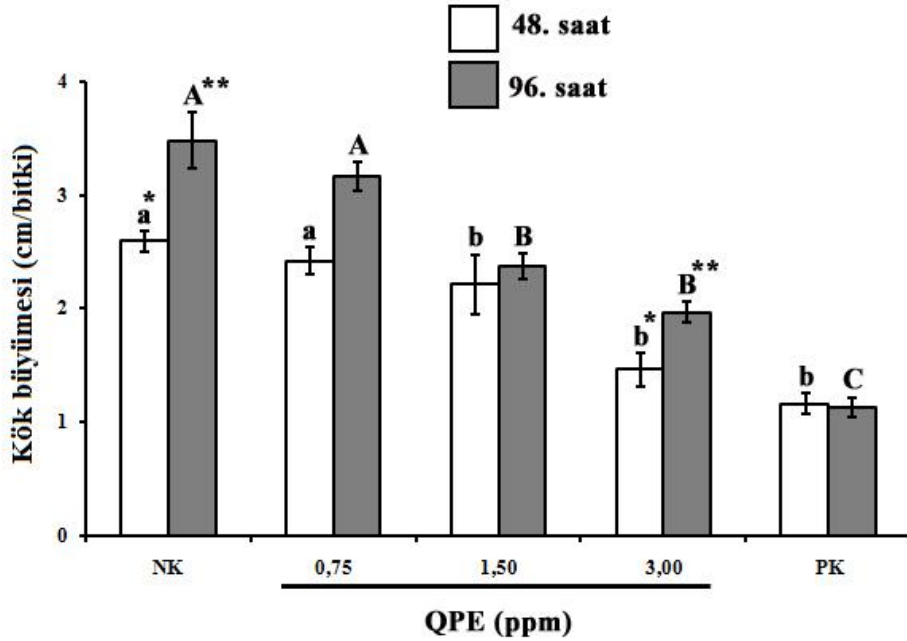
4.1 QPE'nin Kök Büyümesi Üzerine Etkisi

48 ve 96 saat uygulamalarında, soğanda kök büyümesi negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol ve yüksek konsantrasyondaki (1.5 ve 3.0 ppm) QPE uygulamalarında önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) engellenmiştir (Şekil 4.1). Bununla birlikte, 48 süre sonunda bu QPE herbisiti ve pozitif kontrol gruplarının kök uzunluk değerleri arasında önemli ($P \leq 0.05$) bir fark belirlenmemişken, 96 saat uygulamasında pozitif kontrol uygulaması 1.5 ve 3.0 ppm QPE'ye göre kök uzamasını önemli ($P \leq 0.05$) seviyede engellediği tespit edilmiştir. 48 ve 96 saat uygulama gruplarının Student-T-testine göre yapılan ikili karşılaştırmalarında, negatif kontrol grubu fidelerin kökleri için 96 saat sonunda önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) uzunluk artışı belirlenmiştir (Şekil 4.1). 3.0 ppm QPE uygulaması haricindeki uygulamalarda 48 saate göre 96 saat sonunda kök büyümesinde önemli ($P \leq 0.05$) düzeyde bir artış belirlenmemiştir.

4.2 QPE' nin Toplam Çözünür Protein İçeriğine Etkisi

Herbisit uygulaması sonrası kök dokusu toplam çözünür protein içeriği Bradford (1976) yöntemine göre analiz edilmiştir. Negatif kontrole ait kök dokuları toplam çözünür protein içeriği 48 saate göre 96 saat sonunda önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte,

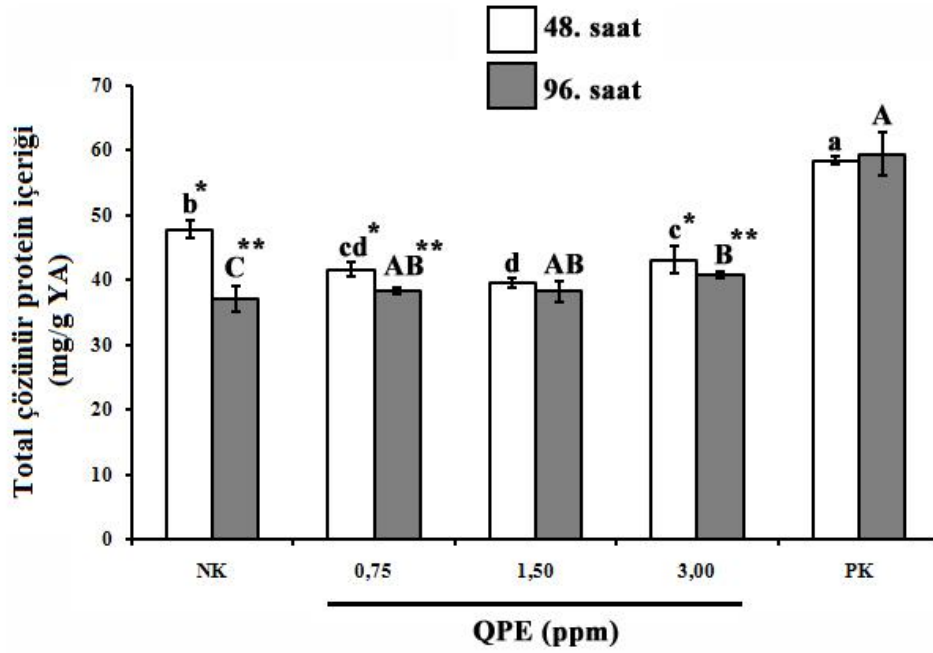
negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kök dokusu toplam çözünür protein içeriği 48 saat herbisit uygulamalarında önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) azalmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulamasının kök büyümesi üzerine etkisi.

[NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, 10 ppm metil metansulfonat, $n = 100$, Ortalama değerleri gösteren barlara ait standart hata çubukları üzerindeki farklı küçük harf(ler) 48 saat verileri arasında, farklı büyük harf(ler) 96 saat verileri arasında Duncan testine göre önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılıkları göstermektedir. *,** ise aynı uygulamanın 48 ve 96 saatleri arasında Student-T-testine göre önem düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılık olduğunu göstermektedir]

Bu uygulama grupları arasında, protein içeriğindeki en fazla azalma (% 17,3) 1.50 ppm QPE uygulaması için tespit edilmiştir. 96 saatin sonunda, tüm QPE herbisiti uygulamaları kök dokularının toplam çözünebilir protein içeriğini negatif kontrole göre arttırmıştır. Bu artışlar 0.75 ve 3.0 ppm QPE uygulamaları için anlamlı ($P \leq 0.05$) bulunmuştur. QPE uygulamalarında farklı olarak, pozitif kontrol uygulaması 48 saat için % 22, 96 saat için % 57 oranlarında toplam çözünür protein içeriğini arttırmıştır.



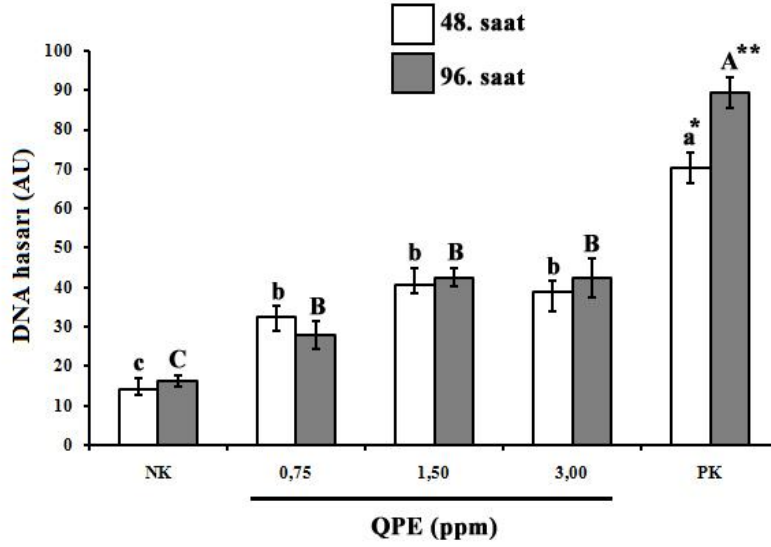
Şekil 4.2 Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulamasının toplam çözünür protein içeriği üzerine etkisi.

[NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, 10 ppm metil metansulfonat, $n = 100$, Ortalama değerleri gösteren barlara ait standart hata çubukları üzerindeki farklı küçük harf(ler) 48 saat verileri arasında, farklı büyük harf(ler) 96 saat verileri arasında Duncan testine göre önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılıkları göstermektedir. *,** ise aynı uygulamanın 48 ve 96 saatleri arasında Student-T-testine göre önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılık olduğunu göstermektedir]

4.3 Comet Assayle Belirlenen QPE Teşvikli DNA hasarı

Uygulama yapılmış ve yapılmamış soğan kök uçlarına ait nukleuslarda teşvik edilen DNA hasarlarını belirleyebilmek için comet assayin alkalın versiyonu kullanılmıştır. 48 saat uygulama süresinde, negatif kontrol uygulamasıyla karşılaştırıldığında, pozitif kontrol ve tüm QPE herbisiti konsantrasyonlarında DNA hasar seviyeleri önemli düzeyde artmıştır (Şekil 4.3). 48 saat uygulamalarında en yüksek DNA hasar seviyesi (70.25 ± 3.71 AU) pozitif kontrol gruplarında belirlenmiştir. Süre artımı ile birlikte pozitif kontrol grubunda belirlenen DNA hasar seviyesi (89.25 ± 3.90 AU) önemli düzeyde artmıştır (Şekil 4.3). Bununla birlikte, aynı süre uygulanan (48 veya 96 saat) QPE herbisitinin test edilen tüm konsantrasyonları arasında (Duncan test, $P < 0.5$) ve

aynı konsantrasyonun farklı süreleri arasında (48 ve 96 saat) (Student-T-test, $P < 0.5$) belirlenen DNA hasar seviyeleri arasında önemli bir fark belirlenmemiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Farklı süre ve farklı konsantrasyonda QPE herbisit uygulamasının kök nukleuslarında Comet Assayle belirlenen DNA hasar seviyeleri üzerine etkisi.

[NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, 10 ppm metil metansulfonat, $n = 100$, Ortalama değerleri gösteren barlara ait standart hata çubukları üzerindeki farklı küçük harf(ler) 48 saat verileri arasında, farklı büyük harf(ler) 96 saat verileri arasında Duncan testine göre önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılıkları göstermektedir. *,** ise aynı uygulamanın 48 ve 96 saatleri arasında Student-T-testine göre önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılık olduğunu göstermektedir]

4.4 RAPD Analizleri

4.4.1 Genomik DNA İzolasyonu

Uygulama yapılmış ve yapılmamış soğan kök uçlarından yaklaşık 300 mg kök dokusu genomik DNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Bu çalışmada, RAPD profillerini daha iyi değerlendirebilmek amacıyla 48 ve 96 saat negatif kontrol genomik DNA'ları ekstraksiyon sonrası karıştırılmıştır ve tek bir negatif kontrol grubu oluşturulmuştur. Çizelge 4.1 uygulama grupları için spektrofotometre ile okunan A_{260} ve A_{280} değerlerini,

DNA saflığını (A_{260}/A_{280}) ve elde edilen DNA miktarlarını ($\mu\text{gDNA/ml}$) göstermektedir.

Çizelge 4.1 Farklı uygulama gruplarına ait 100 mg taze kök dokusundan izole edilen ve spektrofotometre ile belirlenen genomik DNA miktar ve saflığı. [NK: negatif kontrol, PK; 10 ppm metil metansulfonat]

Uygulama	Süre	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	$\mu\text{g DNA/ml}$
NK	48 ve 96 saat	0,034	0,02	1,7	17,0
PK	48 saat	0,679	0,361	1,88	339,8
	96 saat	0,186	0,108	1,72	93,0
0,75 ppm QPE		0,259	0,13	1,99	129,5
1,5 ppm QPE	48 saat	0,585	0,293	1,99	292,5
3 ppm QPE		0,255	0,131	1,94	127,5
0,75 ppm QPE		0,081	0,049	1,65	40,5
1,5 ppm QPE	96 saat	0,162	0,086	1,88	81,0
3 ppm QPE		0,044	0,03	1,46	22,0

Ekstre edilen DNA miktarları göreceli olarak incelendiğinde, negatif kontrol grubuna ait 100 mg taze kök dokusundan yaklaşık 17 $\mu\text{g/ml}$ DNA izole edilmiştir. 48 saat uygulama gruplarından (pozitif kontrol ve üç farklı QPE herbisiti uygulaması) ortalama olarak 222 $\mu\text{g/ml}$ DNA izole edilmiştir. Ekstre edilen ortalama DNA miktarı 96 saat uygulamaları için ise yaklaşık 60 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, tüm grupların 100 mg taze kök dokularından ortalama olarak 126 $\mu\text{g/ml}$ genomik DNA izole edilmiştir ve bu miktar ile yaklaşık 2500 adet PCR reaksiyonu (reaksiyon başına 50 ng kalıp DNA) kurmak mümkündür. Elde edilen genomik DNA'ların saflığı (A_{260}/A_{280}) 1.46–1.99 aralığında değişmiştir (Çizelge 4.1). Genomik DNA'lar 10 ng/ μl konsantrasyon olacak şekilde double-distile suda (ddH_2O) seyreltildikten sonra PCR reaksiyonu kurulumunda kullanılmıştır. PCR öncesi stok ve çalışma genomik DNA'ları $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de derin dondurucuda aliyotlara ayrılarak saklanmıştır.

4.4.2 RAPD Profillerinin Diyagnostik Analizi

Bu araştırmada, % 50-70 GC oranlı Operon A (OPA) ve Operon B (OPB) serisi 40 adet primer ön denemelerde kullanılmıştır. Bu primerlerden sadece 10 tanesi değerlendirilebilir ve bilgi verici RAPD profilleri üretmiştir. Bu 10 farklı primerin kullanılmasıyla, uygulama yapılmamış (negatif kontrol) ve farklı (48 ve 96 saat) sürelerde uygulama yapılmış (pozitif kontrol ve 0.75, 1.5 ve 3.0 ppm QPE herbisiti) soğanların kök genomik DNA'larından elde edilen RAPD profillerine ait jel görüntüleri Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'de verilmiştir. Resimlerde verilen her bir agaroz jelin birinci hattında RAPD profillerine ait DNA bantlarının moleküler ağırlığını belirlemek için 100 bç DNA markörü yürütülmüştür. 10 farklı primerle elde edilen görüntülerden, RAPD reaksiyonu sonrası her bir uygulama için amplifiye olan bantların varlığı "1" veya yokluğu "0" değerlendirilmiştir ve amplifiye olmuş bantların moleküler büyüklükleri Uvitec paket programı ile tespit edilmiştir. Çizelge 4.2, tüm primerler ile uygulama gruplarından elde edilen RAPD bantlarının varlığı ve yokluğu için oluşturulmuş "1-0" matrisini göstermektedir.

Elde edilen RAPD bulgularına göre, primer OPB02 (7 DNA bandı) her bir uygulama grubunda aynı DNA bantlarını üretmiştir (Şekil 4.5). Bu nedenle OPB02 primerinin ürünleri RAPD değerlendirmelerinden çıkarılmıştır. RAPD çalışmalarında kullanılan ve polimorfik DNA bandı üreten primerler, primer sekansları, her bir primerle elde edilmiş DNA moleküler büyüklük aralığı, negatif kontrolde elde edilen DNA bant sayısı, monomorfik ve polimorfik DNA bant sayıları Çizelge 4.3'te 48 ve 96 saat uygulamaları için verilmiştir. Negatif kontrol grubunda çoğalmış DNA bantlarının moleküler büyüklükleri 319 bç (OPA10) ile 2219 bç (OPB06) aralığında değişmiştir ve test edilmiş 9 farklı primerle toplamda 94 PCR bandı çoğalmıştır.

48 saat uygulama gruplarında moleküler ebatları 252 bç (OPA04) ile 2219 bç (OPA06) aralığında değişen 61 adedi polimorfik, 51 tanesi ise monomorfik olan toplamda 112 farklı DNA bandı çoğalmıştır. Dolayısıyla, 48 saat uygulamasına ait RAPD bantlarının polimorfik ve monomorfik yüzdeleri sırasıyla % 54,6 ve % 45,5 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Bununla birlikte, 96 saat uygulamasında, 48 saat uygulaması ile aynı

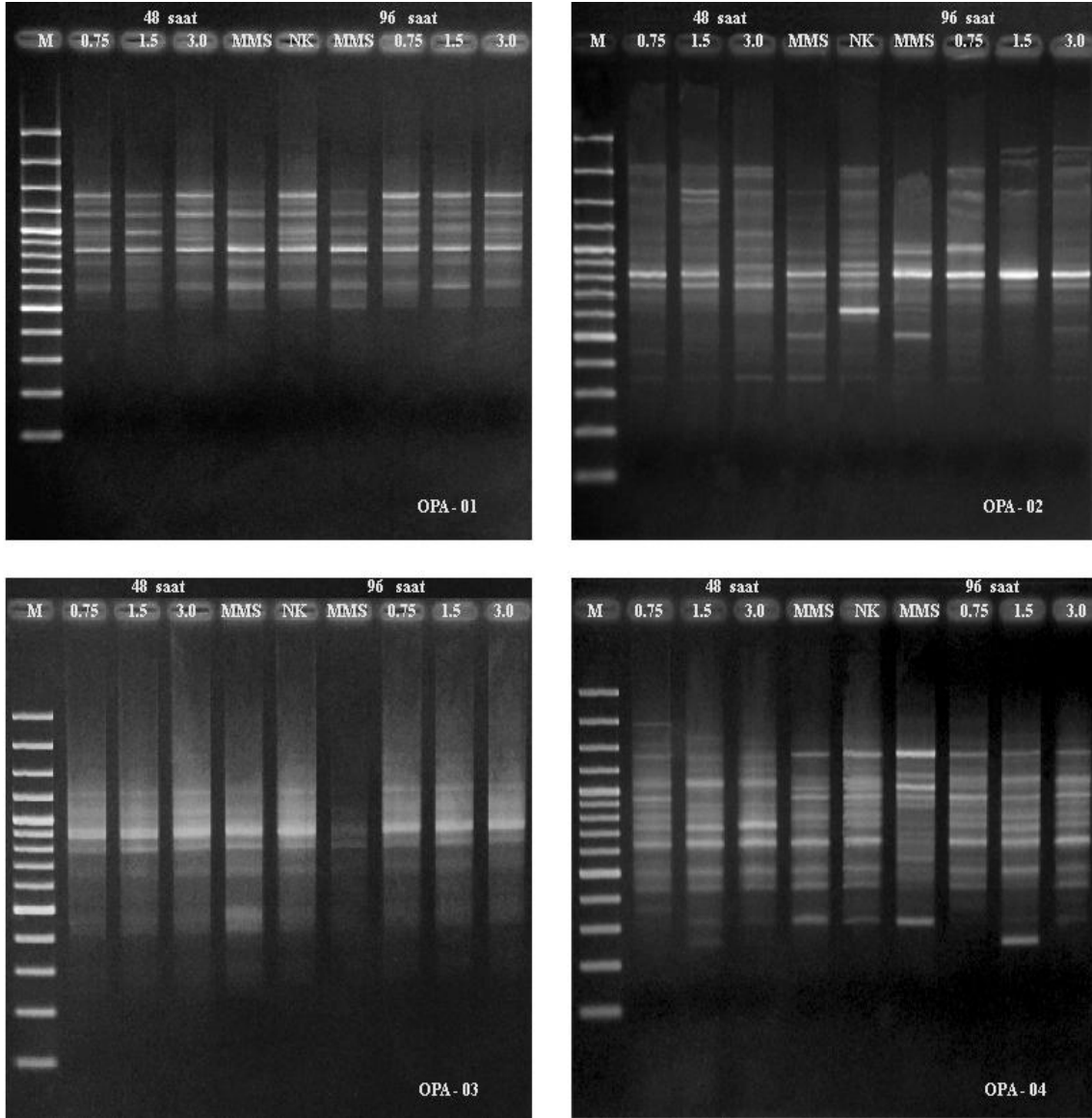
moleküler büyüklük aralığında, toplamda 109 farklı DNA bandı çoğalmıştır. Bu bantlardan 58 tanesinin polimorfik, 51 tanesinin monomorfik olduğu belirlenmiştir. 96 saat uygulamasına ait RAPD bantlarının polimorfik ve monomorfik yüzdeleri sırasıyla % 53,2 ve % 46,7 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Negatif kontrol, pozitif kontrol ve QPE herbisiti uygulanmış soğanlara ait RAPD profillerinin DNA bandı sayı ve ebatlarında belirgin farklılıklar belirlenmiştir. RAPD bant profillerindeki değişiklikler Çizelge 4.4’de özetlenmiştir. Uygulama grubu RAPD profillerinde, negatif kontrol grubunda mevcut olan bantlarda kaybolma veya negatif kontrol RAPD profilinde olmayan yeni DNA bantların uygulama grubu RAPD profillerinde oluşması değişikliklerin nedenini oluşturmuştur. 48 ve 96 saat uygulamalarında kaybolan veya yeni oluşan DNA bantlarının moleküler ebatları genelde 1000 bp’den daha küçük olduğu gözlemlenmiştir.

48 saat süreyle pozitif kontrol ve farklı QPE herbisiti ile uygulama yapılmış gruplarda primer OPA03 ile belirlenen RAPD profilleri negatif kontrol grubu ile tamamen aynı olmuştur. Buna ilaveten, 48 süreyle uygulanmış pozitif kontrolde OPA04 ile yeni bant oluşumu, OPB07 ile bant kaybı gerçekleşmemiştir. Bununla birlikte, diğer primer koşullarında negatif kontrole göre en az bir bant kaybı ve/veya yeni bant oluşumu belirlenmiştir. Pozitif kontrolde kaybolan bantların sayısı (26 bant) yeni oluşanlardan (12 bant) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, OPA02 ve OPA10 primerleri için pozitif kontrolde sırasıyla 6 ve 9 bant kaybı tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). 48 saat süreyle uygulanan QPE uygulamalarında OPA03 ve OPA07 primerlerinde polimorfik DNA bandı belirlenmemiştir. Fakat diğer primerlerle en az bir bant kaybı ve/veya yeni bant oluşumu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 48 saat uygulamasında toplamda en fazla DNA bandı değişimi (38 kaybolan veya yeni oluşan bant) pozitif kontrol grubunda belirlenmiştir. 0.75, 1.5 ve 3.0 ppm QPE uygulamalarında belirlenen toplam DNA bandı değişimi sayısı sırasıyla 30, 35 ve 29 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Dolayısıyla, 48 saat uygulamasında, soğan kök dokusunda en fazla DNA bandı değişimi 1.5 ppm QPE uygulamasında belirlenmiştir.

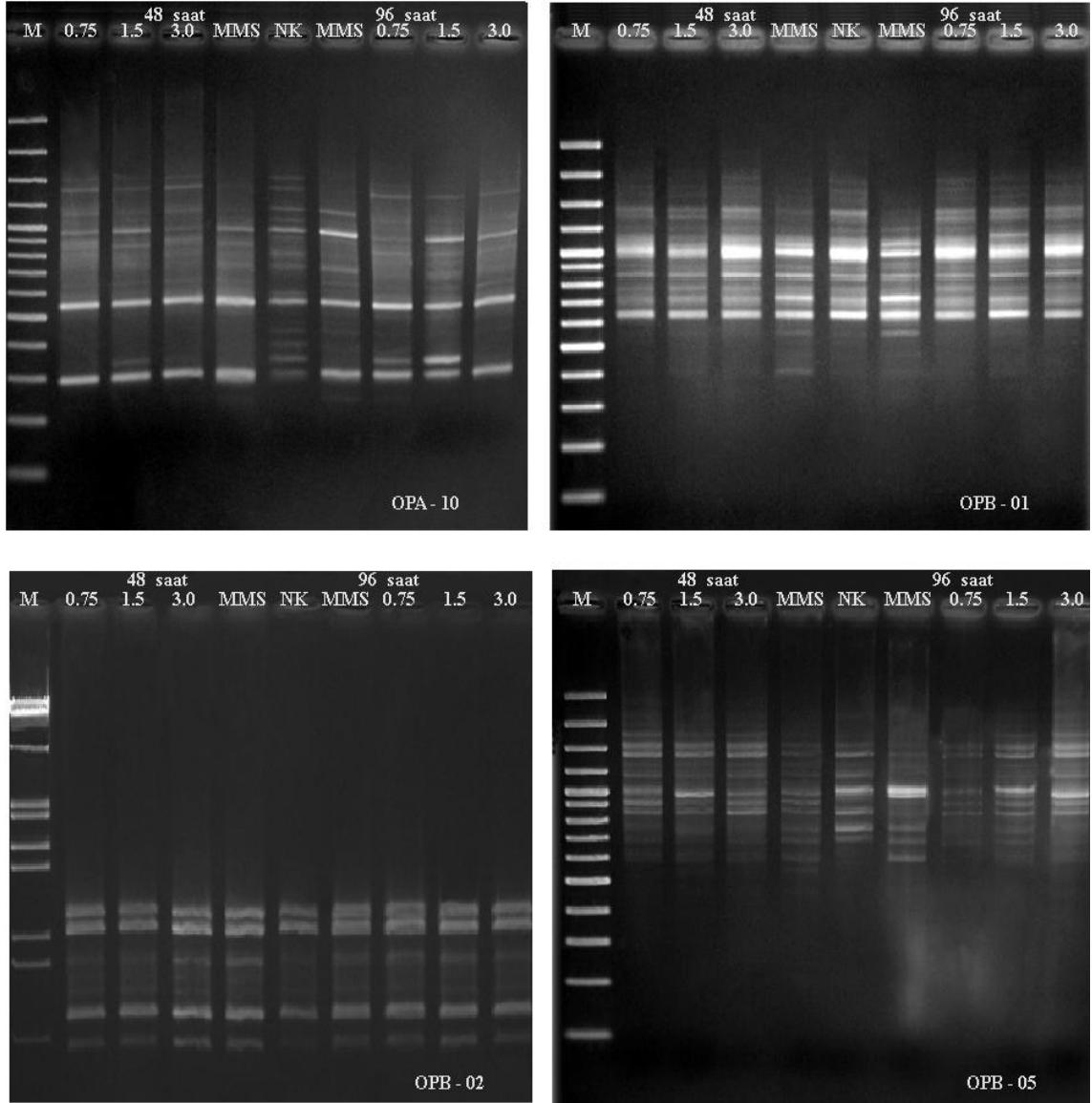
96 saat uygulamasında, pozitif kontrol RAPD profillerinde, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm primerlerde en az bir adet bant kaybı ve/veya yeni bant oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Pozitif kontrol RAPD profillerinde belirlenmiş olan bant değişim sayısı 41'dir. Bu grupta kaybolan bantların sayısı (30) yeni oluşan (11) bantlardan daha fazladır. 96 saat QPE herbisiti uygulamalarında, negatif kontrole karşılaştırıldığında, toplamda belirlenen RAPD bandı değişimi doza bağımlı olarak artmıştır. 0.75, 1.5 ve 3.0 ppm QPE herbisiti uygulamalarında toplam bant değişimleri sırasıyla 22, 26 ve 27 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrole benzer şekilde, tüm QPE herbisiti uygulamalarında kaybolan bantların sayısı yeni oluşan bant sayısından daha fazla bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Bununla birlikte, 48 ve 96 saat uygulamalarına ait pozitif kontrol gruplarında toplamda 48 farklı bantta kayıp veya yeni bant oluşumu belirlenmiştir. Bu polimorfik bantlardan 31 adedi (% 63'ü) aynı moleküler ağırlıkta ve ortak polimorfik bantların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Benzer ilişkideki polimorfik bantlar 48 ve 96 saat QPE herbisiti uygulamaları arasında belirlenmiş olsa da bu bantların sayısı oldukça azdır, bu nedenle değerlendirme yapılmamıştır. Fakat 48 ve 96 saat uygulamalarında belirlenen bant değişim sayıları karşılaştırıldığında, 48 saat uygulamasında belirlenen polimorfik bantların sayıları 96 saat uygulamalarında belirlenenlerden daha fazla bulunmuştur (Çizelge 4.4).



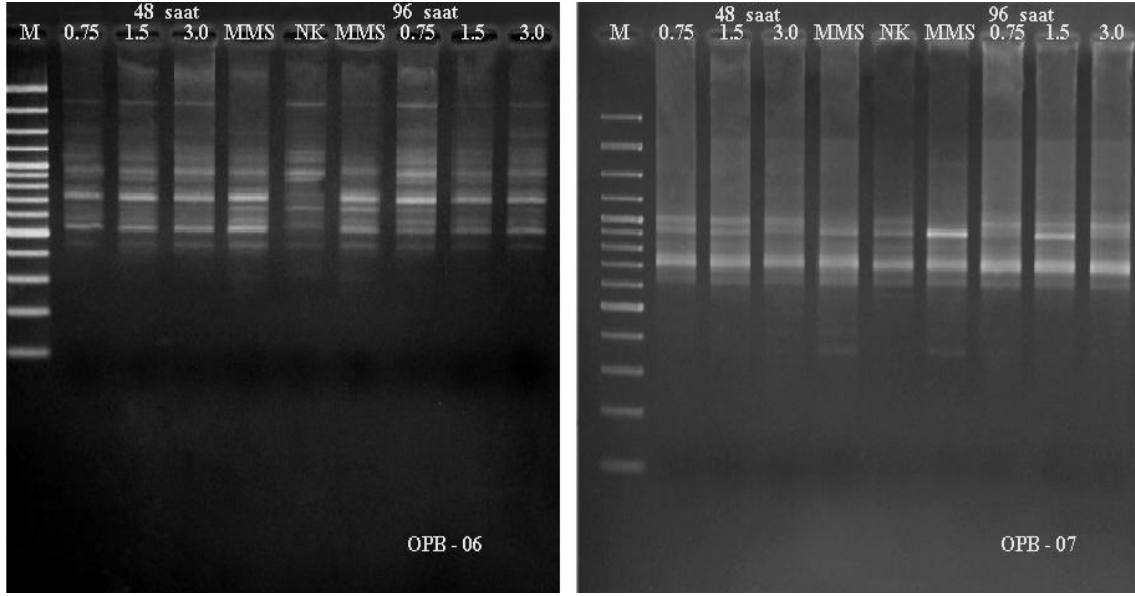
Şekil 4.4 Farklı süre konsantrasyonda QPE herbisit uygulanmış soğan genomik DNA'larından OPA01, OPA02, OPA03 ve OPB04 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri.

[M: GeneRuler 100 bp, Fermentas; NK: negatif kontrol; MMS: 10 ppm metil metansulfonat, pozitif kontrol].



Şekil 4.5 Farklı süre konsantrasyonda QPE herbisit uygulanmış soğan genomik DNA'larından OPA10, OPB01, OPB02 ve OPB05 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri.

[M: GeneRuler 100 bp, Fermentas; NK: negatif kontrol; MMS: 10 ppm metil metansulfonat, pozitif kontrol].



Şekil 4.6 Farklı süre konsantrasyonda QPE herbisit uygulanmış soğan genomik DNA'larından OPB06 ve OPB07 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri.

[M: GeneRuler 100 bp, Fermentas; NK: negatif kontrol; MMS: 10 ppm metil metansulfonat, pozitif kontrol].

Çizelge 4.2 Her bir uygulama örneği için 10 primerle belirlenen DNA bantların ebatları (BE) ve negatif kontrole göre, QPE uygulamalarında mevcut “1” ve kayıp “0” RAPD bantları. [NK: negatif kontrol, PK; 10 ppm metil metansulfonat]

	Primer	BE	48 saat					96 saat			
			QPE (ppm)			PK	NK	PK	QPE (ppm)		
			0,75	1,5	3				0,75	1,5	3
1	OPA 01	1387	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2		1266	1	1	1	0	1	0	1	1	1
3		1161	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4		1010	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5		929	1	0	1	1	1	0	1	1	1
6		840	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7		793	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8		754	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9		625	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10		590	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11		505	0	1	0	1	0	1	1	1	1
12	OPA 02	2082	1	1	1	0	1	0	1	1	1
13		1937	1	1	1	0	1	0	1	1	1
14		1525	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15		1662	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16		1333	0	1	1	0	1	0	0	0	0
17		1153	0	0	1	0	1	0	0	0	0
18		1076	0	0	1	0	1	1	1	0	0
19		985	0	0	0	1	1	1	0	0	0
20		877	0	0	1	1	1	0	0	0	0
21		821	1	1	0	1	1	1	1	1	1
22		750	1	1	0	1	1	1	1	1	1
23		690	0	0	0	1	0	1	1	1	1
24		628	0	0	0	1	1	1	0	0	0
25		500	0	0	0	1	1	1	0	0	1
26		453	1	0	0	0	1	0	0	0	0
27		350	1	1	1	1	0	0	0	0	1
29	OPA 03	1257	1	1	1	1	1	0	1	1	1
30		1083	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31		925	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32		816	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	Primer	BE	48 saat					96 saat			
			QPE (ppm)			PK	NK	PK	QPE (ppm)		
			0,75	1,5	3				0,75	1,5	3
33		674	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34		486	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35		430	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	OPA 04	1401	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37		1936	1	0	0	0	0	0	0	0	0
38		1632	0	1	1	0	0	0	0	0	0
39		1217	0	0	1	0	1	0	0	0	1
40		1086	1	1	0	1	1	1	1	1	1
41		1023	0	0	1	1	1	1	1	0	0
42		963	1	0	0	1	1	1	1	1	1
43		900	0	1	1	0	0	1	0	0	1
44		823	1	1	0	1	1	0	1	1	1
45		762	0	0	0	0	0	1	0	0	0
46		752	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47		662	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48		530	1	1	1	1	1	1	1	1	1
49		455	1	1	1	1	1	0	1	1	1
50		334	1	1	1	1	1	1	0	0	1
51		252	0	1	0	0	0	0	0	1	0
52	OPA 10	1541	1	1	1	0	1	0	1	0	0
53		1434	1	1	1	0	1	0	1	1	1
54		1187	1	1	1	0	1	1	0	0	0
55		1071	0	0	0	0	1	0	0	0	0
56		990	1	1	1	1	1	1	1	1	1
57		891	1	1	1	1	0	0	0	0	0
58		818	0	0	0	0	1	0	1	1	1
59		732	0	0	0	1	1	1	0	1	1
60		659	1	1	1	0	0	1	0	1	1
61		600	0	0	0	0	1	0	0	0	0
62		576	1	1	1	1	1	1	1	1	1
63		446	0	0	0	0	1	0	0	0	0
64		396	0	0	0	0	1	0	0	0	0
65		359	0	1	0	0	1	0	1	1	0
66		319	1	1	1	1	1	1	1	1	1
67	OPB 1	1898	0	0	1	0	1	0	1	1	1

		48 saat					96 saat				
Primer	BE	QPE (ppm)			PK	NK	PK	QPE (ppm)			
		0,75	1,5	3				0,75	1,5	3	
68		1701	0	0	1	0	1	0	1	1	1
69		1542	0	0	1	0	1	0	1	1	1
70		1446	1	1	1	0	0	0	0	0	0
71		1375	1	1	1	1	1	1	1	1	1
72		1154	0	0	0	1	1	1	1	1	1
73		1087	1	0	1	1	1	1	1	1	0
74		1011	1	1	1	1	1	1	1	1	1
75		959	1	1	1	0	1	0	1	1	1
76		891	1	1	1	1	1	1	1	1	1
77		844	1	1	1	1	1	1	1	1	1
78		766	1	1	1	1	1	0	1	1	1
79		707	1	1	1	1	1	1	1	1	1
80		632	1	1	1	1	1	1	1	1	1
81		555	0	0	0	1	0	1	0	0	0
82		464	0	0	0	0	0	1	0	0	0
83		400	0	0	0	1	1	1	0	0	0
84	OPB 2	1056	1	1	1	1	1	1	1	1	1
85		975	1	1	1	1	1	1	1	1	1
86		810	1	1	1	1	1	1	1	1	1
87		754	1	1	1	1	1	1	1	1	1
88		710	1	1	1	1	1	1	1	1	1
89		350	1	1	1	1	1	1	1	1	1
90		245	1	1	1	1	1	1	1	1	1
91	OPB 5	1733	1	1	1	0	1	0	1	1	1
92		1547	1	1	1	1	1	1	1	1	1
93		1406	1	1	1	1	1	1	1	1	1
94		1281	1	1	1	1	1	1	1	1	1
95		1173	1	1	1	1	1	1	1	1	1
96		1027	1	0	0	0	1	1	0	1	0
97		874	0	1	1	1	1	1	1	1	1
98		923	1	1	1	1	1	1	1	1	1
99		845	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100		766	1	1	1	1	1	1	1	1	1
101		700	1	1	1	1	1	1	1	1	1
102		607	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	Primer	BE	48 saat					96 saat			
			QPE (ppm)			PK	NK	PK	QPE (ppm)		
			0,75	1,5	3				0,75	1,5	3
103		539	0	0	0	1	0	1	0	0	0
104	OPB 6	2219	1	1	1	0	1	0	1	1	1
105		1475	0	0	1	1	0	0	1	0	1
106		1151	0	0	0	0	1	0	1	1	1
107		1052	1	1	0	0	1	0	1	0	0
108		915	1	1	1	1	1	1	0	0	0
109		879	1	1	1	1	0	1	1	1	1
110		857	1	1	1	1	1	0	1	1	1
111		635	0	0	0	1	1	1	1	0	1
112		568	1	0	0	1	0	0	1	1	1
113		537	1	1	1	1	1	1	1	1	1
114		439	1	1	1	1	1	1	1	1	1
115		394	0	0	1	1	0	0	0	0	0
116	OPB7	978	1	1	1	1	1	1	1	1	1
117		900	1	1	1	1	1	1	1	1	1
118		800	1	1	1	1	1	1	1	1	1
119		735	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120		684	1	1	1	1	1	1	1	1	1
121		600	1	1	1	1	1	1	1	1	1
122		300	0	0	0	1	0	1	0	0	0

Çizelge 4.3 Farklı sürelerde (48 ve 96 saat) herbisiti uygulamalarına maruz bırakılmış soğan bitkileri için RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, primer sekansları, her bir primerle elde edilmiş DNA ebat aralığı, negatif kontrolde elde edilen DNA bant sayısı, monomorfik ve polimorfik DNA bant sayıları.

Süre	Primer	En büyük bant (bp)	En küçük bant (bp)	NK bant sayısı	Uygulamalarda çoğalmış bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Toplam bant sayısı
48 Saat	OPA01	1387	505	10	40	3	8	11
	OPA02	2082	350	13	32	15	1	16
	OPA03	1257	430	7	28	0	7	7
	OPA04	1936	252	11	41	9	6	15
	OPA10	1541	319	13	30	12	3	15
	OPB01	1898	400	14	43	9	7	16
	OPB05	1733	539	12	44	4	9	13
	OPB06	2219	394	8	38	8	4	12
	OPB07	978	300	6	25	1	6	7
Toplam				94	321	61	51	112
96 Saat	OPA01	1387	505	10	42	3	8	11
	OPA02	2082	350	13	29	13	3	16
	OPA03	1257	430	7	27	1	6	7
	OPA04	1936	252	11	39	8	6	14
	OPA10	1541	319	13	28	11	3	14
	OPB01	1898	400	14	49	9	7	16
	OPB05	1733	539	12	46	3	10	13
	OPB06	2219	439	8	31	9	2	11
	OPB07	978	300	6	25	1	6	7
Toplam				94	316	58	51	109

Çizelge 4.4 Negatif kontrol (NK) RAPD profillerinde belirlenen DNA bant sayıları, ve negatif kontrole göre uygulama gruplarında belirlenen yeni oluşan (+) ve kaybolmuş (-) DNA bantlarının UVIssoft görüntü analiz program ile belirlenen moleküler ebatları (baz çifti, bç). [ND: negatif kontrol ile karşılaştırıldığında uygulama fidelerinin RAPD profillerinde değişiklik olmadığını belirtmektedir; PK, pozitif kontrol]

48.sa							96.sa			
Primer	NK	PK	QPE (ppm)			MMS	QPE (ppm)			
			0,75	1,5	3		0,75	1,5	3	
OPA01	10	+	505	ND	505	ND	505	505	505	505
		-	1266	ND	929	ND	929;1266	ND	ND	ND
OPA02	13	+	350;690	350	350;1525	350	690	690	690	350;690
		-	453;1076;1	500;628;87	453;500;62	453;500;62	453;877;115	453;500;628	453;500;628	453;628;877
			153;1333;1	7;985;1076	8;877;985;	8;750;821;	3;1333;1937	;877;985;11	;877;985;10	;985;1076;1
			937;2082	;1153;1333	1076;1153	985	;2082	53;1333	76;1153;133	153;1333
OPA03	7	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		-	ND	ND	ND	ND	1257	ND	ND	ND
		+	ND	1936	252;900;16	900;1632	762;900	ND	252	900
OPA04	11				32					
		-	1217	1023;1217	963;1023;1	823;963;10	455;823;121	334;1217	334;1023;12	1023
OPA10	13	+	891	659;891	659;891	659;891	659	ND	659	659
		-	359;396;44	359;396;44	396;446;60	396;446;60	359;396;446	396;446;600	396;446;600	359;396;446
			6;600;818;	6;600;732;	0;732;818;	0;732;818;	;600;818;10	;732;1071;1	;1071;1187;	;600;1071;1
			1071;1187;	818;1071	1071	1071	71;1434;154	187	1541	187;1541
OPB01	14	+	400;555	1446	1446	1446	400;464;555	ND	ND	ND

		-	959;1542;1 701;1898	1154;1542; 1701;1898	1087;1154; 1542;1701; 1898	1154	766;959;154 2;1701;1898	ND	ND	1087
OPB05	12	+	539	ND	ND	ND	539	ND	ND	ND
		-	1027;1733	974	1027	1027	1733	1027	ND	1027
		+	394;568;87 9;1475	568;879	879	394;879;14	879	568;879;147	568;879	568;879;147
OPB06	8					75		5		5
		-	1052;1151; 2219	635;1151	635;1151	635;1052;1 151	857;1052;11 51;2219	915	635;915;105 2	915;1052
OPB07	6	+	300	ND	ND	ND	300	ND	ND	ND
		-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Toplam			12(+); 26(-) 38	7(+); 23(-) 30	10(+); 25(-) 35	9(+); 20 (-) 29	11(+); 30 (-) 41	5 (+); 17 (-) 22	6 (+); 20 (-) 26	7 (+); 20 (-) 27

4.4.3 RAPD Profillerinin Numerik Analizi

Tüm primerlerle belirlenen bantların varlığı “1” ve yokluğunu “0” gösteren matris tablosu hazırlanmıştır (Çizelge 4.2). Soğan köklerinde uygulama solüsyonlarıyla teşvik edilmiş DNA polimorfizm seviyesini hesaplamak amacıyla Jaccard algoritması kullanılarak UPGMA metoduna göre genetik benzerlik katsayıları FreeTree paket programı yardımıyla oluşturulmuştur (Pavliček *et al.* 1999). 48 ve 96 saat süreyle yapılan pozitif kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki QPE herbisiti uygulamalarına ait genetik yakınlık katsayıları Çizelge 4.5’de verilmiştir. 48 saat uygulamasında, negatif uygulama grubuna genetik olarak en uzak (0.669) pozitif kontrol uygulaması belirlenmiştir. Bununla birlikte, QPE herbisiti uygulama konsantrasyonlarının genetik benzerlik katsayıları negatif kontrole göre yakından uzağa doğru 3.0 ppm QPE herbisiti (0.718) > 0.75 ppm QPE herbisiti (0.713) > 1.5 ppm QPE herbisiti (0.676) şeklinde sıralanmıştır (Çizelge 4.5). 48 saat uygulamasına benzer şekilde, 96 saat uygulamasında negatif kontrole genetik olarak en uzak (0.640) grubu pozitif kontrol uygulaması oluşturmuştur (Çizelge 4.5). Bununla birlikte, 96 saat QPE uygulamalarından negatif kontrole en yakın (0,783) grubu 0.75 ppm QPE herbisiti oluşturmuştur. Yapılan hesaplamalara göre, 1.5 ve 3.0 ppm QPE herbisiti uygulamalarının negatif kontrole göre benzerlik katsayıları sırasıyla 0.748 ve 0.743 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, 48 saat QPE herbisiti uygulamalarının negatif kontrol grubuna göre yakınlık değerleri 96 saat uygulamalarına göre daha uzak çıkmıştır (Çizelge 4.5).

RAPD çalışmasında kullanılan gruplar için hesaplanmış olan genetik yakınlık değerlerinden yola çıkılarak genetik ilişkinin ağaçlandırılması UPGMA yöntemine göre FreeTree programında yapılmıştır. RAPD verilerinden dendogram oluşturmak için “1” ve “0” matriksi değerleri FreeTree programında 1000 kez farklı şekillerde çalıştırılarak olası dendogramlar belirlenmiştir. RAPD verileri 48 saat, 96 saat ve tüm (48 ve 96 saat) uygulamalar şeklinde ayrı ayrı analiz edilmiştir. Elde edilen referans dendogramlar TreeView paket programı (Page 1996) kullanılarak çizilmiştir.

48 saat uygulama grupları için 23 farklı dendogram ağacı elde edilmiştir ve en çok oluşan referans dendograma göre, pozitif kontrol diğer gruplardan bağımsız bir şekilde

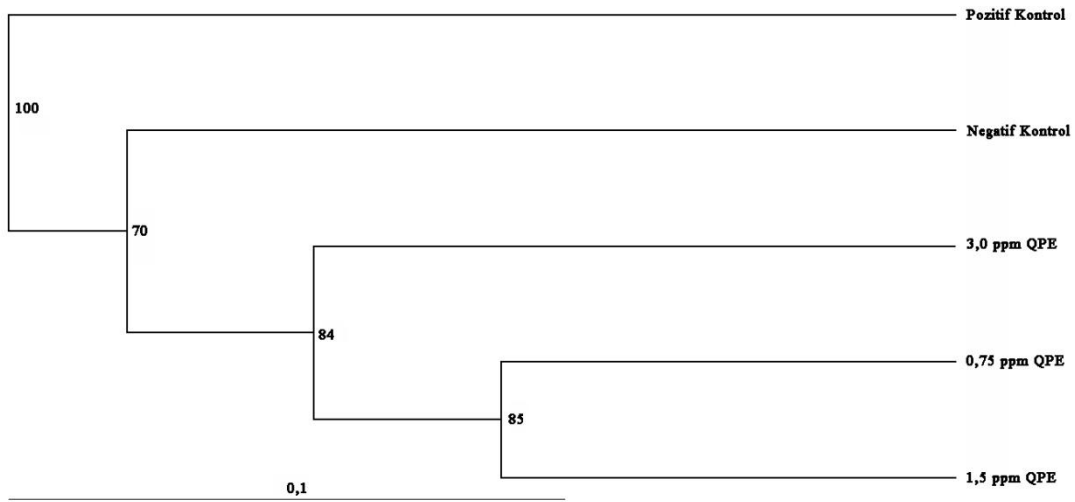
% 100 bootstrapt değerinde (bootstrapt değeri; iki küme veya çifti ayırıştırma gücü) ayrılmıştır (Şekil 4.7). İkinci kümede, negatif kontrol grubu tek başına grup oluşturmuştur. Negatif kontrol, pozitif kontrolle % 100, 3.0 ppm QPE grubu ile % 70 oranda ayrılmıştır. 0.75 ve 1.5 ppm QPE grupları % 85 oranı ile birlikte gruplanmıştır ve bu grup daha sonra 3.0 ppm QPE uygulaması ile % 84 oranı ile kümelenmiştir (Şekil 4.7).

96 saat uygulama grupları için 1000 defa tekrarlanan kümeleme analizinde ise sadece 10 farklı UPGMA dendogramı oluşturmuştur. En sık tekrarlayan referans dendogram Şekil 4.8’de verilmiştir. 96 saat uygulama grubundan elde edilen dendogram, 48 saat uygulaması için elde edilen dendogramla tamamen benzerdir (Şekil 4.7 ve 4.8). Bununla birlikte, 96 saat uygulama grubu için elde edilen referans dendogramın grupları kümeleme gücü oldukça yüksek oranda olmuştur (Şekil 4.8). Referans kümeleme analizine göre pozitif kontrol, negatif kontrol ve 3.0 ppm QPE uygulamaları tek başına kümelenirken 0.75 ve 1.5 ppm QPE uygulamaları düşük bootstrapt değeri ile küme oluşturmuştur.

Şekil 4.9 tüm deneme gruplarının toplu UPGMA dendogramı göstermektedir. Bu dendogram analizine göre, tüm gruplar 3 farklı küme oluşturmuştur. İlk kümede, 48 ve 96 saat pozitif kontrol grupları 98 bootstrapt değeri ile birlikte gruplanmıştır. İkinci ve üçüncü kümeler % 91 oranında birinci kümeden ayrılmıştır. İkinci küme 48 saat farklı konsantrasyonlarda (0.75, 1.5 ve 3.0 ppm) QPE herbisiti uygulama gruplarından oluşmuştur. Üçüncü kümede ise tek başına gruplanmış olan negatif kontrol grubu ve 96 saat farklı konsantrasyonlardaki (0.75, 1.5 ve 3.0 ppm) QPE herbisiti uygulamalarından oluşan alt kümeden oluşmaktadır (Şekil 4.9).

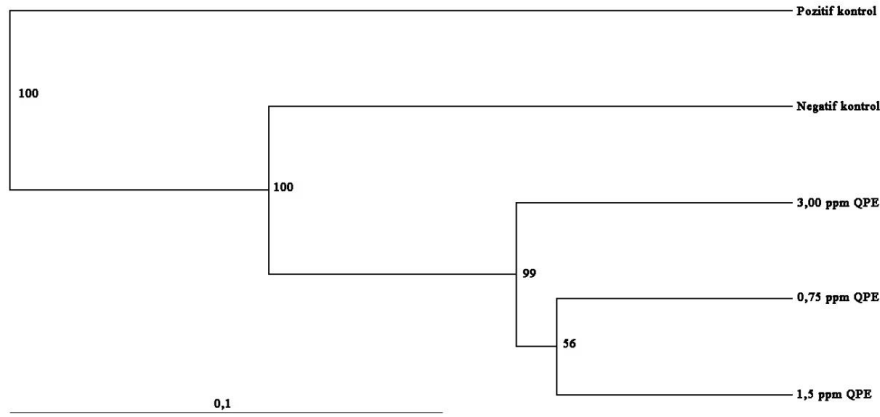
Çizelge 4.5 9 primerle elde edilmiş RAPD bulgularına göre QPE herbisitinin 48 ve 96 uygulamalarında Treview Paket programında hesaplanmış olan (Nei 1978) genetik benzerlik katsayıları. [NK: negatif kontrol, PK; 10 ppm metil metansulfonat]

Süre	Uygulamalar	Uyg. No	1	2	3	4	5
48 Saat	0,75 ppm QPE	1	1.000				
	1,5 ppm QPE	2	0,837	1.000			
	3 ppm QPE	3	0,755	0,784	1.000		
	PK	4	0,683	0,644	0,641	1.000	
	NK	5	0,713	0,676	0,718	0,669	1.000
96 Saat	0,75 ppm QPE	1	1.000				
	1,5 ppm QPE	2	0,891	1.000			
	3 ppm QPE	3	0,863	0,882	1.000		
	PK	4	0,625	0,637	0,650	1.000	
	NK	5	0,783	0,748	0,743	0,640	1.000



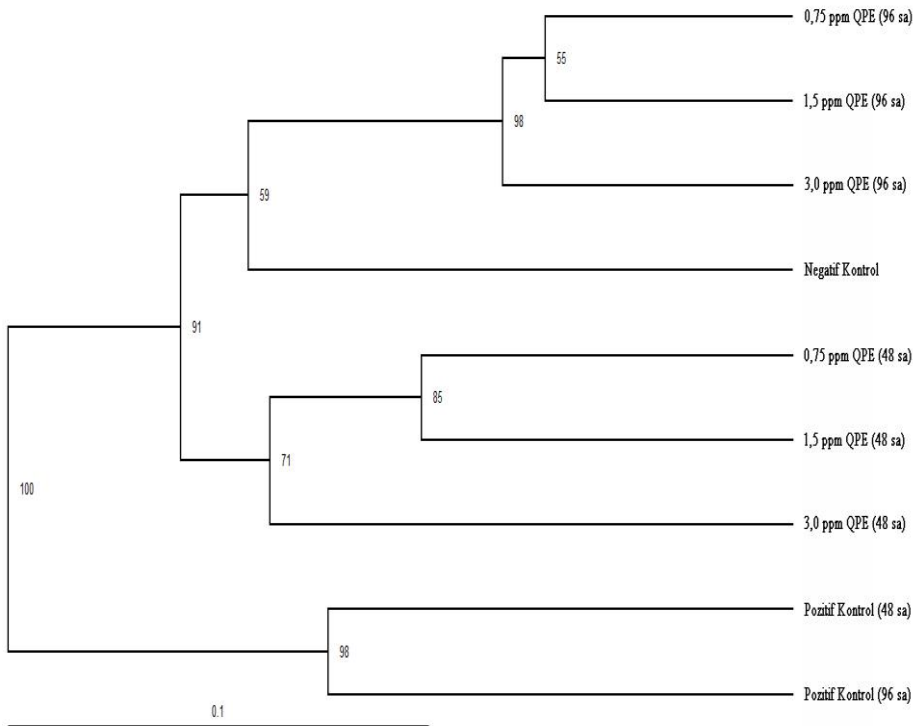
Şekil 4.7 48 saat süreyle uygulanan QPE herbisit uygulamaları için 9 primerle elde edilen RAPD verilerinin FreeTree programında elde edilen ve FreeView paket programı ile çizilen UPGMA dendogramı

[Not: Çatallardaki rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir ve dendogramın alt köşesindeki çizgi genetik benzerlik skalasıdır].



Şekil 4.8 96 saat süreyle uygulanan QPE herbisit uygulamaları için 9 primerle elde edilen RAPD verilerinin FreeTree programında elde edilen ve FreeView paket programı ile çizilen UPGMA dendogramı

[Not: Çatallardaki rakamlar bootstrapt değerlerini göstermektedir ve dendorgamın alt köşesindeki çizgi genetik benzerlik skalasıdır].



Şekil 4.9 48 ve 96 saat süreli QPE herbisit uygulamaları için 9 primerle elde edilen RAPD verilerinin FreeTree programında elde edilen ve FreeView paket programı ile çizilen UPGMA dendogramı

[Not: Çatallardaki rakamlar bootstrapt değerlerini göstermektedir ve dendorgamın alt köşesindeki çizgi genetik benzerlik skalasıdır].

4.4.4 Genomik Kalıp Kararlılığı (GTS, %)

RAPD profillerinde belirlenen değişikliklerin nitel bir ölçütünü gösteren genomik kalıp DNA kararlılığı (*genomic template stability*, GTS, %) değerleri test edilen her bir 9 primer için ayrı ayrı hesaplanmıştır ve uygulama grupları için belirlenen ortalama GTS değerleri Çizelge 4.6’de verilmiştir. Negatif kontrole göre (% 100’e sabitlenmiş) GTS değerlerindeki en fazla azalma pozitif kontrol uygulamasının 48 (% 62,3) ve 96 (% 59,4) saat uygulamaları için belirlenmiştir. 48 saat QPE herbisiti uygulamaları arasında GTS değerindeki en fazla azalma 1.5 ppm QPE herbisiti uygulaması (% 67,3) için belirlenmiştir. Bununla birlikte, 96 saat QPE herbisiti uygulamalarındaki GTS değerlerindeki değişim doza bağımlı olarak azalmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 48 ve 96 saat sürelerle uygulanan farklı konsantrasyonlardaki QPE herbisitinin soğanda 9 RAPD primeri için hesaplanmış genomik kalıp kararlılık değerleri (GTS, %). [NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, 10 ppm metil metansulfonat]

	48 saat					96 saat			
	NK	PK	QPE (ppm)			PK	QPE (ppm)		
			0,75	1,5	3		0,75	1,5	3
OPA01	100,0	80,0	100,0	80,0	100,0	70,0	90,0	90,0	90,0
OPA02	100,0	38,5	38,5	30,8	46,2	46,2	38,5	30,8	30,8
OPA03	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	85,7	100,0	100,0	100,0
OPA04	100,0	90,9	72,7	45,5	54,5	54,5	81,8	63,6	81,8
OPA10	100,0	23,1	30,8	38,5	38,5	30,8	53,8	46,2	38,5
OPB01	100,0	67,1	64,3	57,1	85,7	42,9	100,0	100,0	92,9
OPB05	100,0	75,0	91,7	91,7	91,7	83,3	91,7	100,0	91,7
OPB06	100,0	12,5	50,0	62,5	25,0	37,5	50,0	37,5	37,5
OPB07	100,0	83,3	100,0	100,0	100,0	83,3	100,0	100,0	100,0
Ortalama	100,0	62,3	72,0	67,3	71,3	59,4	78,4	74,2	73,7

4.5 Kök Büyümesi, Toplam Çözünür Protein İçeriği, Comet Skorları ve RAPD Profil Parametrelerindeki Değişimlerin Karşılaştırılması

Negatif kontrol parametreleri % 100'e sabitlendikten sonra, negatif kontrole göre kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği, comet skorları ve RAPD profil parametrelerindeki oransal değişimler Çizelge 4.7'de özetlenmiştir. 48 ve 96 saat QPE uygulamalarında belirgin bir kök büyüme inhibisyonu belirlenmiştir. Bununla birlikte, 48 saat 0.75, 1.5 ve 3.0 ppm QPE herbisiti uygulamalarında hesaplanan kök uzunluklarındaki negatif kontrole göre % oranları sırasıyla % 20, % 18, % 12 şeklinde hesaplanmıştır. Aynı QPE herbisiti konsantrasyonları için 96 saat uygulamasında negatif kontrole göre hesaplanmış olan kök uzunluk oranları ise sırasıyla % 90, % 68 ve % 57 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, 48 ve 96 saat pozitif kontrol uygulamalarında kök büyümesi aynı süre QPE herbisiti uygulamaları ile karşılaştırıldığında en yüksek seviyede inhibisyon göstermiştir. Bulgularımıza göre, 48 saat QPE herbisiti uygulamalarında toplam çözünür protein içeriğinde azalma belirlenmişken, 96 saat uygulamalarında doza bağımlı olarak toplam çözünür protein içeriğinde artma belirlenmiştir. Comet ile belirlenen DNA hasar seviyeleri 48 ve 96 saat QPE herbisiti uygulamalarında negatif kontrole göre oransal olarak artmakla birlikte 48 saat uygulamasında belirlenen artışlar (% 228-286) 96 saat uygulamasından (% 172-261) daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, 48 ve 96 saat süreyle uygulanan pozitif kontrol grupları için comet ile belirlenen DNA hasar seviyeleri negatif kontrole göre % 493 ve % 549 oransal artış göstermiştir. Negatif kontrole göre RAPD profillerindeki değişimler değerlendirildiğinde 48 saat QPE uygulamasında en fazla oransal değişim 1.5 ppm QPE (% 67,3) için belirlenmişken, 96 saat uygulaması için 3.0 ppm (% 73,7) uygulaması için belirlenmiştir. RAPD ile belirlenen GTS seviyeleri 48 ve 96 saat QPE herbisiti uygulamalarında negatif kontrole göre oransal olarak azalmakla birlikte 48 saat uygulamasında belirlenen azalmalar (% 67-72) 96 saat uygulamasından (% 74-78) daha fazla bulunmuştur.

Çizelge 4.7 48 ve 96 saat sürelerle uygulanan farklı konsantrasyonlardaki QPE herbisitinin soğanda kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği, comet skorları ve RAPD profilleri (GTS) parametrelerinde negatif kontrollerine göre (%100'e sabitlenmiş) değişimler. [NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol, 10 ppm metil metansulfonat]

%100'e sabitlenmiş negatif kontrollerine göre parametrelerdeki % değişimler				
Uygulamalar	Kök uzunluğu	Protein içeriği	Comet skorları	RAPD profilleri
48 saat				
NK	100,00	100,00	100,00	100,00
0,75 ppm QPE	19,58	87,09	228,07	72,00
1,50 ppm QPE	17,92	82,69	285,96	67,33
3,00 ppm QPE	11,86	90,12	273,68	71,28
PK	9,42	122,13	492,98	62,26
96 saat				
NK	100,00	100,00	100,00	100,00
0,75 ppm QPE	90,89	103,25	172,31	78,42
1,50 ppm QPE	68,15	102,85	261,54	74,23
3,00 ppm QPE	56,63	109,91	261,54	73,67
PK	32,60	157,04	549,23	59,35

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Allium cepa L. çevresel kirleticilerin muhtemel toksisite ve genotoksisite özelliklerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir bitki biyotest organizmasıdır (Fsikejö 1988). 24 saat distile suda köklendirilen *Allium cepa* ile test edilen toksik veya genotoksik ajanların; ortalama kök uzunluğuna, mitotik indeks seviyesine, anafaz köprülerinin sıklığına, kromozom fragmentleri sıklığına, mitotik anormalliklerin sıklığına ve mikronükleus sıklığına olan etkileri araştırılmaktadır (Fsikejö 1988; Panda and Sahu 1985; Fiskesjö 1995; Grover and Kaur 1999). Bununla birlikte, genotoksik potansiyele sahip UV, ağır metal veya pestisit gibi etmenlerin doğrudan veya dolaylı olarak genotoksik etkilerinin belirlenmesinde tek hücre jel elektroforezi (comet assay) ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) gibi moleküler teknikler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Atienzar *et al.* 1999; Yıldız *et al.* 2009). Bu araştırma kapsamında, quizalofop-P-ethyl (QPE) herbisitinin toksik ve genotoksik etkileri *Allium cepa*'da kök inhibisyon testi, kök dokusu toplam çözünür protein içeriğindeki değişimlerin belirlenmesi, kök dokusu nükleus DNA'sındaki hasar seviyesinin comet assayle belirlenmesi ve RAPD tekniği kullanarak genomik DNA içeriğindeki değişimlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Allium testi, çevresel tehlikeye neden olan kimyasallar, kirleticiler için hızlı ve ucuz bir tarama yöntemidir ve diğer organizmalarla yapılan test sistemleri ile de karşılaştırılabilir sonuçlar sağlamaktadır. Çevresel kirleticilerin *Allium* kök büyümesinde inhibisyon etkisi ile mitotik indeks seviyesi gibi mikroskobik etkileri arasında iyi bir paralellik olduğu bildirilmiştir (Fiskesjö 1985). Araştırmamızda, QPE herbisitinin toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen *Allium* kök büyümesi, güneş ışığından uzakta ve 24 saat süreyle distile suda köklendirilmiş soğanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Güneş ışığı kök büyümesinde inhibisyona neden olduğu, bu nedenle de deney düzeneğinin gölge ortamında yapılması gereği vurgulanmıştır (Evans *et al.* 1957). Ayrıca, standart köklenmeyi sağlamak, kök primordiyalarının herhangi bir nedenle zarar görmüş olma ihtimalini ortadan kaldırmak ve olası dormansi durumlarını göz ardı etmemek için 24 veya 48 saat süresince distile su ile köklendirilmiş soğanların kullanılması *Allium* testler için yaygın bir uygulamadır (Fiskesjö 1988; Liu *et al.* 1992; Rank and Nielsen 1997; Grover and Kaur 1999). Araştırmamızda, distile suda 24 saat süreyle homojen olarak köklenmiş soğanlar

herbisit uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Negatif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, 48 ve 96 saat süreyle 1.5 ve 3.0 ppm uygulanan QPE herbisiti *Allium* kök büyümesini önemli oranda inhibe etmiştir. Çalışmamızda, negatif kontrol gruplarına göre, QPE herbisiti uygulamaları arasında en fazla kök inhibisyonu (her iki süre için %56) 3.0 ppm uygulaması için belirlenmiştir. Bununla birlikte, 48 ve 96 saat denemelerinde en yüksek *Allium* kök inhibisyon değerleri 10 ppm metil metansulfanat (pozitif kontrol) uygulama grubunda elde edilmiştir. Herbisit (2,4-D, dikamba, QPE, vb.) veya ağır metal (kurşun, kadmiyum, cıva, vb.) gibi toksik kimyasallara maruz kalmış biyotest bitkilerinde kök gelişiminin önemli düzeyde engellendiğine yönelik araştırma raporları mevcuttur (Atienzer *et al.* 1999; Liu *et al.* 2005; Yıldız and Arıkan 2008; Cenkcı *et al.* 2009, Bozdağ 2009).

Çevresel kirleticilere maruz kalmış organizmaların nükleik asit ve protein içeriklerinde değişimler olabilir ve biyosentez metabolizmasındaki değişiklikler kirleticilerin belirlenmesine yönelik bir markör olarak kullanılabilir (Singh and Tewari 2003). Yapmış olduğumuz literatür araştırmasına göre, quizalofop-P-ethyl herbisitinin bitki toplam çözünür protein içeriğine olan etkileri ile ilgili bir araştırma raporu mevcut değildir. Bununla birlikte, 2,4-D ve dikamba gibi herbisitlerin bitkilerde protein içeriğini arttırabildiği veya azaltabildiği bildirilmiştir (Bozdağ 2009). Protein içeriğindeki bu azalma ve artışların herbisit çeşidine, herbisit oranına, uygulandığı dokuya, çoğalma fazına bağlı olabileceği vurgulanmıştır (Duffard *et al.* 1993; Blanco *et al.* 1997; Fonseca *et al.* 2008; Peixoto *et al.* 2008). Araştırmamızda, negatif kontrol grubu 48 saat uygulamasında toplam çözünür protein içeriği 96 saat uygulamasına göre daha yüksek çıkmıştır. Bu durumun süreye bağımlı olarak *Allium* köklerinin toplam çözünür protein içeriğinde değişikliklerin olabileceğini bildirilmiştir. Kadmiyum ağır metalinin sarımsakta (*Allium sativum*) protein içeriğine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kontrol grubu sarımsak kök dokularında toplam çözünür protein içeriğinin süreye bağlı olarak azalma ve artmaların olabileceği gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2005). Sonuçlarımıza göre, QPE stres süresinin artmasıyla protein içeriğinde negatif kontrol grubuna göre belirgin bir artış belirlenmiştir, diğer bir ifadeyle 96 saat stres uygulamasında sentezlenmiş olan protein miktarı 48 saatte belirlenmiş olana göre daha fazla bulunmuştur. Oksidatif stres altında fitoşelatinler ve metallotioninler gibi şok proteinlerin sentezinde belirgin artışlar olabileceği bildirilmiştir (Grill *et al.* 1985; Ma

et al. 2003). Bour *et al.* (1977) pikloram, tebuthiuron ve 2,4-D'nin bitkilerde protein içeriğini azalttığını, glyphosate herbisitinin ise arttırdığını rapor etmiştir.

Herbisitlerin bitki ve hayvan hücrelerindeki genotoksik etki mekanizmaları genelde tam olarak bilinmemektedir (Gonzales *et al.* 2005). Bununla birlikte, 2,4-D ve dikamba gibi fenoksi grubu herbisitlerin ökaryotik hücrelerde peroksizom içeriğini önemli oranda arttırdığı bildirilmiştir (Lundgren *et al.* 1987; Espandiari *et al.* 1995). Literatürde, QPE herbisitinin sitogenetik etkileri üzerine ilgili bir araştırma raporu mevcutken (Yildiz and Arıkan 2008) bu herbisit DNA molekülünde hasar oluşturup oluşturmadığı ile ilgili bir bilgi birikimi yeterli değildir. QPE herbisiti *Allium* kök hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak toplam kromozomal aberasyonları ve mikronükleus oluşumlarını arttırdığı bildirilmiştir (Yildiz and Arıkan 2008). Comet assay, geniş bir spektrumda DNA hasarının belirlenmesi için kullanılan oldukça hassas bir genotoksisite testidir (Fairbairn *et al.* 1995; Anderson *et al.* 1994). Hasarlı ve hasarsız ökaryotik çekirdeklerin bir elektriksel alanda agaroz jeldeki göçlerinin ölçülmesi ile gerçekleştirilen alkali comet assay; tek ve çift iplik DNA kırıkları, abazik bölgeler, tamamlanmamış DNA onarım bölgeleri ve genomik DNA'daki yapısal değişiklikler belirlenmektedir (Fairbairn *et al.* 1995; Singh *et al.* 1988; Tice *et al.* 2000). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, tek iplik DNA kırıklarını belirleyen orta alkali comet assay (pH 12.3) *Lupinus luteus* L. (Rucinska *et al.* 2004) *Nicotiana tabacum* L. (Gichner *et al.* 2003, 2004, 2008), *Allium cepa* (Yildiz *et al.* 2009) ve *Phaseolus vulgaris* (Bozdağ 2009) bitki türleri kök dokularında çevresel kirleticilerin genotoksik etkilerini takip etmekte başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Çalışmamızda, 48 ve 96 saat süreyle 0.75, 1.5 ve 3.0 ppm konsantrasyonlarda uygulanan QPE herbisiti negatif kontrole göre *Allium* kök nükleuslarında DNA tek iplik kırıklarına neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, uygulama konsantrasyonları ve süreleri arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda QPE teşvikli DNA tek iplik kırıklarının seviyeleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P < 0.05$). Bununla birlikte, pozitif kontrol uygulaması *Allium* kök dokusu nükleuslarında QPE herbisiti uygulamalarına göre daha fazla tek iplik DNA kırıklarına neden olmuştur.

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) genotoksik potansiyele sahip kimyasalların DNA üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasında biyomarkör olarak

kullanılabilmektedir (Savva 1996). RAPD tekniği koşullar iyi ayarlandıktan sonra güvenilebilir ve tekrarlanabilir bir moleküler yöntemdir (Atienzar and Jha 2006). Genotoksinlerin DNA üzerinde dolaylı veya doğrudan neden oldukları nokta mutasyonları, büyük kromozomal düzenlemeler, DNA köprüleri, DNA iplik kırılmaları, apürinik ve apürimidinik bölgelerin oluşumları gibi DNA’da oluşan hasar ve mutasyonların seviyeleri hakkında RAPD tekniği kullanılarak bilgi alınabilir (Atienzar *et al.* 1999). UV radyasyonu (Atienzar *et al.* 1999), benzo[a]pyrene (Castano and Becceril 2004), oksinik herbisitler (Bozdağ 2009) ve ağır metaller (Enan 2006; Liu *et al.* 2007; Cenkci *et al.* 2009, 2010) gibi bazı DNA hasar ajanları tarafından uyarılan genomik DNA tahribatları RAPD tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde çalışılmıştır. Mevcut çalışmada, farklı sürelerde uygulanan düşük konsantrasyonlardaki QPE herbisitinin *Allium* kök dokusu genomik DNA’larında uyardığı DNA değişikliklerinin seviyesi RAPD tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. QPE herbisitinin teşvik ettiği DNA değişiklik seviyesinden emin olmak için iyi bir DNA hasar ajanı olan metil metansulfonat pozitif kontrol olarak analizlerde kullanılmıştır.

Çalışmamızda, negatif kontrol RAPD profillerine göre farklı QPE konsantrasyonları tarafından uyarılmış olan DNA tahribatı (DNA hasarı ve/veya mutasyonlar) RAPD profillerinde normal DNA bantlarının kaybolması ve/veya yeni DNA bantlarının ortaya çıkması şeklinde belirlenmiştir. QPE herbisitinin *Allium cepa*’da kromozomal aberasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Yildiz and Arikan 2008). Bununla birlikte, bu araştırmada gerçekleştirilen comet assay bulguları ile QPE herbisitinin tek iplik DNA kırıklarına neden olduğu gösterilmiştir. Bantların kaybolması genomik DNA’da oksinik herbisitlerle teşvik edilmiş olan DNA hasarları (örneğin, tek iplik kırıkları, çift iplik kırıkları, modifiye bazlar, bazsız yerler, okside bazlar, DNA köprüleri, DNA–protein çapraz bağları), veya nokta ve/veya büyük kromozomal düzenlemeleri içine alan mutasyonlardan kaynaklanabilir (Atienzar *et al.* 1999). PCR reaksiyonu sırasında, genomik DNA’nın hasarlı bölgelerine primer bağlanması gerçekleşmemiş veya hasarlı kalıp DNA bölgesi ile karşılaşmış *Taq* DNA polimeraz enzimi reaksiyonu terk etmesiyle bant kaybı gerçekleşmiş olabilir (Atienzar and Jha 2006). Yeni PCR bantlarının ortaya çıkması genellikle nokta mutasyonu ile yeni primer bağlanma yerlerinin oluşması veya iki primer bağlanma yerini yakınlaştıran ya da uzaklaştıran

homolog rekombinasyonlar ve/veya delesyon/insersiyonların varlığını göstermektedir (Atienzar *et al.* 1999; Atienzar and Jha 2006). Çalışmamızda, 48 saat uygulama süresi için olan QPE herbisiti uygulama dozları arasında en fazla DNA bandı değişimi 1.5 ppm QPE uygulamasında belirlenmişken, 96 saat uygulamalarında doz artışı ile birlikte RAPD profillerindeki DNA bandı değişimi de artmıştır. Bununla birlikte, 48 ve 96 saat uygulama süreleri için elde edilen RAPD sonuçları arasında kaybolan bantlar/yeni oluşan bantlar açısından farklılıklar tespit edilmiştir. RAPD bulgularına göre, 48 saat uygulama süresi için belirlenen toplam RAPD bandı sayısındaki değişimler 96 saat uygulama süresi için belirlenenden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, tüm QPE herbisiti uygulamalarında belirlenen DNA hasar seviyeleri pozitif kontrollerine göre düşük çıkmıştır.

Çalışmamızda, RAPD bulgularını kullanarak elde ettiğimiz genetik uzaklık değerlerine göre, soğan köklerinde en fazla DNA hasarı pozitif kontrol uygulamaları (48 ve 96 saat) için belirlenmiştir. 48 saat sürede gerçekleştirilen 1.5 ppm QPE uygulaması, tüm QPE herbisiti uygulamaları arasında negatif kontrole genetik olarak en uzak (0.676) grubu oluşturmuştur. RAPD gibi moleküler markörlerin nümerik analiz yöntemi kullanılarak genomik DNA'lar için oluşturulan dendogram (genetik ilişkinin ağaçlandırılarak gösterilmesi), moleküler bitki sistematğinde (türler arası, tür içi veya popülasyonlar içi ve arası) etkin bir metodolojidir (Zhiyi and Haowen 2004). Bu yöntem, farklı dozlarda genotoksinlerce uyarılmış bitkilerin gruplandırılmasında da kullanılmaktadır (Cenkci *et al.* 2009, 2010) RAPD bulgularımızdan elde ettiğimiz dendogram, negatif kontrol, pozitif kontrol (48 ve 96 saat), 48 saat QPE (0.75, 1.5 ve 3 ppm) herbisiti ve 96 saat QPE herbisiti (0.75, 1.5 ve 3 ppm) uygulamalarını birbirlerinden kesin olarak ayırarak gruplamıştır.

RAPD veya AFLP (çoğalmış fragment uzunluk polimorizm) gibi moleküler markör teknikler mikronükleus veya comet assay gibi klasik genotoksisite testleri kadar hassas yöntemlerdir (Labra *et al.* 2003). Moleküler markör teknikleri mutasyonların yanı sıra henüz mutasyonlara dönüşmemiş geçici DNA hasarlarını bile belirleyebilmektedir (Savva 1998). Ayrıca, RAPD profillerinde kaybolan veya yeni ortaya çıkan DNA bantları ileri aşamalarda sekanslanarak DNA lezyonları hakkında daha detaylı bilgilerin

elde edilmesi mümkündür (Gupta and Sarin 2009). Birden fazla toksisite ve genotoksisite testi ile genotoksinlerin organizma üzerindeki etkilerini aynı anda belirlemek verilerin değerlendirilmesinde oldukça önemlidir (Depledge 1994). RAPD profillerindeki genotoksinlerle teşvik edilmiş değişiklikler genomik kalıp kararlılığındaki (GTS, %) değişimleri yansıtır. Kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği, klorofil pigment içeriği, enzim aktiviteleri gibi biyolojik cevap parametrelerinde genotoksin-teşvikli değişimler genomik kalıp kararlılığı ile karşılaştırılabilir (Atienzar *et al.* 1999; Liu *et al.* 2005, 2007; Xue-mei *et al.* 2006; Cenkci *et al.* 2010). Genomik kalıp kararlılığı, DNA hasar seviyesi, DNA replikasyonu ve DNA onarım etkinliği ile ilgilidir. DNA’da meydana gelmiş bir hasar mutasyona dönüşmeden onarılabilir. Genotoksinlerle muamele edilmiş organizmalarda meydana gelen hasarların onarımı ile ilgili mekanizmaların aktif hale geçmesi belirli bir süre gerektirebilir. Bu süre içinde DNA iplik kırıkları gibi DNA hasarlarında önemli artışlar ve devamında onarım mekanizmasının devreye girmesiyle DNA hasar seviyesinde azalmalar belirlenebilir (Cavallo *et al.* 2003). Bu nedenle, hasar seviyesinin yüksek çıkması genomik kalıp kararlılığını tam olarak yansıtmayabilir (Atienzar and Jha 2006).

Araştırmamızda, negatif kontrol verileri % 100’e sabitlendikten sonra farklı sürelerde ve farklı konsantrasyonlarda QPE herbisiti ile muamele edilmiş *Allium*’ların kök inhibisyon, toplam çözünür protein içeriği, tek iplik DNA kırık seviyesi ve RAPD profillerindeki değişimlerin yüzdesi belirlenmiştir. 48 saat uygulamalarında, kök inhibisyonu, toplam çözünür protein içeriği ve RAPD profil değişimlerinde genel olarak azalmalar belirlenmişken, tek iplik DNA kırıklarına ait parametrelerin değişiminde artma belirlenmiştir. Farklı dozlarda QPE herbisiti uygulaması sonrası kök inhibisyonu, toplam çözünür protein içeriği, DNA kırık seviyesi ve RAPD profillerindeki değişimlerin ortalamaları sırasıyla % 15, 87, 262 ve 70 olarak belirlenmiştir. Bu durumda, test edilen parametreler hassaslıklarına göre sıralandığında kök inhibisyonu > comet assay > RAPD profilleri > toplam çözünür protein içeriği sıralaması belirlenmiştir. Bununla birlikte, 96 saat uygulamalarında, kök inhibisyonu ve RAPD profil değişimlerinde genel olarak azalmalar belirlenmişken, toplam çözünür protein içeriği ve comet assay parametre değişiminde artışlar belirlenmiştir. 96 saat uygulamasında farklı dozlarda QPE herbisiti uygulaması sonrası kök inhibisyonu,

toplam çözüdür protein içeriği, DNA kırık seviyesi ve RAPD profillerindeki değişimlerin ortalamaları sırasıyla % 72, 105, 231 ve 75 olarak belirlenmiştir. 96 saat için test edilen parametreler hassaslıklarına göre sıralandığında 48 saat için belirlenen sıralama (comet assay > kök inhibisyonu > RAPD profilleri > toplam çözüdür protein içeriği) elde edilmiştir.

Sonuç olarak, negatif kontrole göre, QPE herbisit uygulaması *Allium cepa* L.'da kök inhibisyonuna, protein ve DNA içeriğinde değişimlere, comet assayle belirlenen DNA kırıkları seviyesinde artışa ve RAPD profillerinde polimorfizme neden olmuştur. Elde edilen bulgular, QPE herbisitinin genotoksik etkiye sahip bir kimyasal madde olduğunu göstermiştir. Ayrıca, farklı sürelerde genotoksik ajanlara maruz kalan bitkilerde farklı seviyelerde genotoksik etkilerin ortaya çıkabileceği değerlendirmesi yapılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Açık, L., Küçükkaarslan, A. ve Çelebi, A. 2001. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının antibiyotik duyarlılıkları, Plazmit Profilleri ve RAPD-PCR Analizleri, Gazi Üniversitesi Fen Bil Ens. Dergisi, 14/1: 163-169.
- Aguilar, C., Borrull, F., Marce, R. M. 1997. Determination of pesticides in environmental waters by solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry dedection, Journal of Chromatography, Jan., Vol. 771, pp. 221-231.
- Ahmed, M. T., Saad, M., M., Mabrouk, S.S. 1998. Resudues of some chlorinated hydrocarbon pesticides in rain water, soil and ground water, and their influence on some soil microorganisms, Environment International, Apr., Vol. 24, pp. 665-670.
- Al-Najjar, N. R., Soliman, A. S. 1982. Cytological effects of herbicides I. Effect of 2,4-D and 2, 4, 5-T on meiotic cells of wheat and two related species. Cytologia 47: 53- 61.
- Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J. and Schmezer, P. 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. Mutation Research, 307, 261-71.
- Antonsie-wiez, D. 1990. Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of ledakrin. Folia Histochemica Et Cytobiologica, 26, 79-96
- Arnheim and Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy, Assoc. Rev. Biochem., 61: 132-156.
- Atamanalp, M. ve Yanık, T. 2001. Pestisitlerin Cyprinidae'lere Toksik Etkileri, E.Ü.Su Ürünleri Dergisi, Vol.18, pp. 555-563.
- Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N. and Ahmad, W. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test, Mutation Research, Vol.514, pp. 105-113.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N. and Depledge, M.H. 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in

- Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 2275–2282.
- Atienzar, F.A. and Jha, A.N. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. Mutation Research, 613, 76-102.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution, New York.
- Baltacı V, Aygun N, Akyol D, Karakaya A.E, Sardas S. 1998. Chromosomal aberrations and alkaline comet assay in families with habitual abortion. Mutat Res. 417: 47-55.
- Başıbüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R. and Quicke, D.L.J. 2000. Phylogenetic systematics, A practical guide to theory and practice, Önder Matbaa, Sivas, Turkey.
- Barbour, M. 1996. California landscapes before the invaders. In; Lovich, J.E., Randall, J. and Kelly M.D. (eds.). Proceedings of the California Exotic Pest Plant Council Symposium. Vol. 2, 5-9.
- Baur, J.R., R.W. Bovey, and E.C. Holt. 1977. Effect of Herbicides on Production and Protein Levels in Pasture Grasses Agron J. 69:846-851.
- Bilaloğlu, R. 1984. Stomp ve hyvar X'in *Allium cepa* L.'de oluşturdukları mitotik etkiler ve kromozomal değişimler. C.Ü. Fen Bilimleri Dergisi. Cilt: 6, Sayı 2: 53 - 70.
- Blanco, A.M., Nieves, N., Sanchez, M., Borroto, C.G., Castillo, R., Gonzalez, J.L., Escalona, M., Baez, E. and Hernandez, Z. 1997. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51, 153–158.
- Bozdağ, A. 2009. 2,4-D ve Dikamba Herbisitlerinin Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Köklerindeki Genotoksik Etkilerinin RAPD ve Comet Assaylerle Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, AKU Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

- Buschini, A., Poli, P. and Rossi, C. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones, *Mutagenesis*, Vol.18, pp.25-36.
- Caetano-Annoles, G., Bassam, B.J., Greshoff, P.M. 1991. High Resolution Dna Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary oligonucleotide primers, *biotechnology*, 9: 553-557.
- Castañó, A. and Becerril, C. 2004. In vitro assessment of DNA damage after short- and long-term exposure to benzo(a)pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line, *Mutat. Res.* 552.141-151.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Setini, A., Chianese, C., Piegari, P., Perniconi, B. and Iavicoli S. 2003. Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure. *Toxicology in Vitro* 17: 603–607.
- Cenkci, S., Yildiz, M., Cigerci, I.H., Konuk, M. and Bozdag, A. 2009. Toxic chemicals–induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere*, 76, 900–906.
- Cenkci, S., Cigerci İ.H., Yildiz, M., Özay, C., Bozdag, A. and Terzi, H. 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 467-473.
- Chau, A. S. U., Afghan, B. K. 1982. *Analysis of pesticides in water*, CRC Pres Inc., Florida, 82.
- Chauhan, L. K. S., Saxena, P. N. and Gupta, S. K. 1999. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Alium cepa*. *Enviromental and Experimental Botany* 42: 181-189.
- Collins, A., Dusinska, M. and Franklin, M. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 139-46.
- Collins A.R. 2002. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol* 203: 163-177.
- Collins A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261.

- Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G., Maestri, E. and Marmoroli, N. 1998. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere*, 37, 2739-2749.
- Conway, G.R. and Pretty, J.N. 1991. *Unwelcome Harvest, Agriculture and Pollution*, Earthscan, London.
- Crocker, B.H. 1959. Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid on mitosis in *Allium cepa*. *Botanical Gazette* 114; 274- 283.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H., 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7, 52-54.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. and Burçak, A. 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalış sorunları. TMMOB, Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005. Cilt-2, s: 629-648.
- Depledge, M.H. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C. and Leonzio, C. (Eds.), *Non-destructive Biomarkers in Vertebrates*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 271–295.
- Doxey, D. 1949. The Effect of Isopropyl Phenyl Carbamate on Mitosis in Rye (*Secala cereale*) and Onion (*Allium cepa*). *Annals Botany* 13; 329- 335.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Duffard, A.M.E., Peretti, A.F., Cantarini, S.C. and Duffard, R. 1993. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester on chick liver. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, 204-211.
- Enan, M.R. 2006. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43, 147-154.
- Erdogru, Ö., Covaci, A. and Schepens, P. 2005. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaraş, Turkey, *Environment International*, Mar., Vol. 31, pp. 703–711.

- Espandiari, P., Thomas, V.A., Glauert, H.P., O'Brien, M., Noonan, D. and Robertson, L.W. 1995. The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) is a peroxisome proliferator in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 26, 85-90.
- Evans, H.J., Meary, G.J. and Tomkinson, S.N., 1957, "The use of colchicine as an indicator of mitotic rate in broad bean root meristem", *Journal of Genetics*, Vol.55, pp.487-502.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.
- Faust, F., Kassie, F. and Knasmüller, S. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 566, 209-29.
- Fiskesjö, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, Vol.102, pp.99-112.
- Fiskesjö, G. 1988. The *Allium* test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, Vol.197(2), pp.243-260.
- Fiskesjö, G. 1995. *Allium* test. Methods in molecular biology. In vitro toxicity testing protocols, Vol.43, pp.119 – 127.
- Fonseca, M.B., Gluszcak, L., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Gonçalves, F.F. and Loro, V.L. 2008. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69, 416-420.
- Gal, E., Aires, P., Chamarro, E., Esplagas, S. 1992. Photochemical degradation of parathion in aqueous solution, *Water Resources*, 126 (7): 911-915.
- Gedikli, S. 2001. Kayseri İli İçme Sularında Organoklorlu Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Geyikçi, F. 1999. Orta Karadeniz Bölgesindeki Yüzey ve Kaynak Sularında Pestisit Kirliliği ve İçme Suyu Kalitesinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Gichner, T. and Plewa, M.J. 1998. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation Research*, 401, 143-152.

- Gichner, T. 2003. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco. Cellular and a cellular comet assays. *Mutation Research*, 535, 187–193.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J. and Demnerová K. 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research*, 559, 49-57.
- Gichner, T., Znidar, I. and Szakova, J. 2008. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research*, 652, 186–190.
- Gonzales, N.V., Soloneski, S., Reigosa, M.A. and Larramendy, M.L. 2005. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 19, 289-297.
- Grant, W.F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens, *Mutation Research*, Vol.310, pp.175-185.
- Grill, E., Winnacker E.L., Zenk M.H. 1985. Phytochelatins; the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. 230:674–6.
- Gunther, E. and Nasta, A. 1972. Vergleich der Wirkung eines Carbamatherbizids und von Colchicin auf die Mitose van *Allium cepa* und *Hordeum vulgare* Theoret Appl. Genetics 42: 310- 313.
- Grover, I.S. and Kaur, S., 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium cepa* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research*, Vol.426, pp.183-188.
- Gutrie, F. E. and Perry, J. J. 1980. *Introduction to Environmental Toxicology*, Elsevier, North Holland, 80.
- Gupta, M. and Sarin, N.B. 2009. Heavy metal induced DNA changes in aquatic macrophytes: Random amplified polymorphic DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker. *Journal of Environmental Sciences* 21: 686–690.

- Güncan, A. 1985. Yabancı Otlar ve Mücadelesi Ders Notları. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Van.
- Gürçan, T. 2001. Tarımsal İlaç Kalıntıları ve Önemi, Dünya Gıda Dergisi, Mayıs, 67-72.
- Haktanır, K. ve Arcak, S. 1998. A.Ü.Z.F Çevre Kirliliği Ders Kitabı (457), yayın no:1503.
- Harte, J., Holdren, C., Schneider, C. and Shirley, C. 1991. Toxics A to Z, A guide to everyday pollution hazards, Universal of California Press.
- Hartmann, A., Agurell, E. and Beevers, C. 2003. 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis, 18, 45-51
- Heap, I. 2007. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Annual Report Internet.
- Herbicide Classification of the Weed Science Society of America. 1997. Weed technology : A Journal of the Weed Science Society of America, 11, 384-393.
- Hillis, D.M. and Mortiz, C. 1990. Molecular Systematics, Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA.
- Kilbey, B.J., Legator, M., Nicholson, W. and Ramel, C. 1984. Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd edition, Amsterdam, Elsevier.
- Kovalchuk, O., Titiv, V., Hohn, B. and Kovalchuk., I. 2001. A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. Nature Biotechnology, 19, 568-572.
- Labra, M., Fabio, T.D., Grassi, F. and Regondi, S.M.G. 2003. AFLP analysis as biomarker of exposure to organic and inorganic genotoxic substances in plants. Chemosphere, 52, 1183–1188.
- Liu, D., Jiang, W. and Li, M., 1992. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*, Hereditas, Vol.117, pp.23-29.
- Liu, W., Li, P.J., Qi, X.M., Zhou, Q.X., Zheng, L., Sun, T.H. and Yang, Y.S. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. Chemosphere, 61, 158-167.

- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P. and Sun, T. 2007. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 67, 1155–1163.
- Lundgren, B., Meijer, J. and De Pierre, J.W. 1987. Induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases and proliferation of peroxisomes and mitochondria in mouse liver after dietary exposure to pchlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Biochemical and Pharmacology*, 36, 815–821.
- Lynch, M. and Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure wheat. RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
- Ma, M., Lau, P.S., Jia, Y.T., Tsang, W.K., Lam, S.K.S., Tam, N.F.Y. and Wong, Y.S. 2003. The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metaltolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Sci*, 164:51–60.
- Ma, T.H., Xu, Z.D., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E.V., Arreola, G.A. and Zhang, H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334, 185-195.
- Mamber, S.W., Kolek, B., Brookshire, K.W., Bonner, D.P. and Fung-Tomc, J. 1993. Activity of quinolones in the Ames Salmonella TA102 mutagenicity test and other bacterial genotoxicity assays, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.37, pp.213-217.
- Mathieu-Daude, F., Ralph, D., McClelland, M. 1997. Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA, ed. Taylor, G.R., CRS Pres, Boca Raton, New York.
- Menzer, R. E. 1991. Water and Soil Pollutants. In Casarett and Doull's Toxicology, Fourth Edition. Amdur, M. O., Doull, J. And Klaassen, C. D., Eds. Pergamon Pres, New York, NY, 5-22.
- Moller, P. 2006a. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res* 612: 84-104.
- Moller, P. 2006b. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98: 336-345.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction, Cold Spring Harbor Symp., 51: 263-273.
- Nicese, F.P., J.I. Hormaza and McGranahan, G.H. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica*, 101: 199–206
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Ono, H., Tamura, H., Yamashita, Y., Tamura, K. and Iwakura, K. 2006. In vitro chromosome aberration test and in vivo micronucleus test of Ca-type Garcinia extract, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, Vol.47, pp.80-84.
- Olive, P. L., Banath, J. P. and Durand, R. E. 1990. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “comet” assay. *Radiation Research*, 122, 86-94.
- Olive, P.L. 1999. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol* 75: 395-405.
- Östling, O. and Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Özer, Z., Kadioğlu, İ., Önen, H. ve Tursun, N. 1997. *Herboloji*, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 20, Kitaplar serisi no:10.
- Öztürk, S. 1997. *Tarım ilaçları*. Ak Basımevi, İstanbul, 551 s.
- Page, RDM. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357–358.
- Panda, B.B. and Sahu, U.K., 1985. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfotien. *Cytobios*, Vol.42, pp.147-155.
- Pavlíček, A., Hrdá, Š. and Flegr, J. 1999. FreeTree – freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/jackknife analysis of the trees robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praha)* 45: 97–99.

- Peixoto, F.P., Gomes-Laranjo, J., Vicente, J.A. and Madeira, V.M.C. 2008. Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1125-1133.
- Pfossen, A., Amon, A., Lelley, T. and Heberle-Bors, E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 21, 387-393.
- Prokop, M. and Veverka, K. 2003. Influence of droplet spectra on the efficiency of contact and systemic herbicides. *Plant, Soil and Environment / Czech Academy of Agricultural Sciences*, 49, (2), 75-80.
- Rafalski, J.A., Tingey, S. and Williams, J.G.K. 1991. RAPD Markers-A New Technology for Genetic Mapping and Plant Breeding, *AgBiotech News and Information*, 3: 645-648.
- Rafalski, A., Tingey, S.V. and Williams, J.G.K. 1994. RAPD Markers *Plant Molecular Biology Manual*, 114: 1-8.
- Rank, J. and Nielsen, M.H., 1993. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, Vol.118, pp.49-53.
- Rank, J. and Nielsen, M.H. 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 390: 121-127.
- Rao, B. V., Rao, B.G.S. and Sharma, C.B.S.R. 1988. Cytological Effects of Herbicides and Insecticides on *Allium cepa* Root Meristems. *Cytologia* 53: 255- 261.
- Ruciniska, R., Sobkowiak, R. and Gwozdz E.A. 2004. Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 519-528.
- Ryan, G.F. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science*, 18: 614- 616.
- Saiki, R K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239: 487-491.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

- Sardas, S., Walker, D., Akyol, D. and Karakaya, A.E. 1995. Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 335: 213-217.
- Sardas, S., Aygun, N. and Karakaya, A.E. 1997. Genotoxicity studies on professional hair colorists exposed to oxidation hair dyes. *Mutat Res* 27: 153-161.
- Savva, D., Castellani, S., Mattei, N., Renzoni, A. and Walker C.H. 1994. The use of PCR and DNA fingerprints to detect the genotoxic effects of environmental chemicals, in: S.P. Varnavas (Ed.), *Environmental Contamination, Proceedings of the 6th International Conference, Delphi, Greece, CEP Consultants, Edinburgh*, pp. 105-110.
- Savva, D. 1996. DNA fingerprinting as a biomarker assay in ecotoxicology. *Toxicol. Ecotoxicol. News. Rev.* 3: 110-114.
- Savva, D. 1998. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41, 103-106.
- Saxena, P.N., Chauhan, L.K.S. and Gupta, S.K. 2005. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: Spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*, 216: 244-252.
- Silva, M.M., Vergani, C.E., Giampaolo, E.T., Neppelenbroek, K.H., Spolidorio, D.M. and Machado, A.L. 2006. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures, *Int. J. Prosthodont.*, Vol.19, pp.288-293.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-91.
- Singh, P.K. and Tewari, R.K. 2003. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biotechnology*, 24, 107– 112.
- Sivikova, K., Holeckova, B. and Dianovsky, J. 2005. Chromosome damage induced by benzene after the use of conventional and FISH chromosome painting, *Neoplasma*, Vol.52, pp.79-84.

- Sterling, T.M. and Hall, J.C. 1997. Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. In: Herbicide activity toxicology. Biochemistry and Molecular Biology R.M. Roe (Ed). IOS Press.
- Tice, R.R., Andrews, P. W. and Singh, N. P. 1990. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. Basic Life Sciences, 53, 291-301.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35, 206-221.
- Tingey, S., Rafalski, J.A., Williams, J.G.K. 1992. Genetic Analysis with RAPD Markers, Joint Plant Breeding Symposia Series, Application of RAPD Technology to Plant Breeding, 3-8, Minnesota.
- Wang, J., Lu, Y. and Shen, G. 2007. Combined effects of cadmium and butachlor on soil enzyme activities and microbial community structure. Environmental Geology, 51, 1221-1228.
- Waugh, R. and Poweil, W. 1992. Using RAPD Markers for Crop Improvement, Focus, 10: 186-191.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmet, M., Kneen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD Markers, Joint Plant Breeding Symposia Series, Application of RAPD Technology to Plant Breeding, 12-17, Minnesota.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18, 7213-7218.
- Welsh, J. and Petersen, C. 1991. Polymorphisms Generated by Arbitrarily Primed PCR in the Mouse: Application to Strain Identification and Genetic Mapping, Nucleic Acids Research, 19: 303-306.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.
- Wolf, H.D., Blust, R. and Backelijau, T. 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. Mutation Research, 566, 249-262.

- Wurl, O. and Obbard, J. P. 2005. Chlorinated pesticides and PCBs in the sea-surface microlayer and seawater samples of Singapore, Marine Pollution Bulletin, in pres.
- Xue-mei, Q.I., Pei-jun, L., Wan, L., Li-jingly, X. 2006. Multiple biomarkers response in maize (*Zea mays* L.) during exposure to copper. Journal of Environmental Sciences 18, 1182-1188.
- Yildiz, M. and Arikan, E.S. 2008. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. Caryologia, 61, 45-52.
- Yildiz, M., Cigerci, İ.H., Konuk, M., Fidan, A.F. and Terzi, H. 2009. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere, 75, 934–938.
- Yu, K, Deynze, A.V, Pauls, K.P, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis, Glick, B.R, Thompson, J.E. 1993. Methods in Plant Molecular Biotechnology and Biotechnology, CRS Press, 287-299, Florida, USA.
- Zhang, H., Jiang, Y., He, Z., Ma, M., 2005. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). Journal of Plant Physiology 162, 977—984.
- Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 58, 96-103.

İnternet Kaynakları:

1. <http://www.ercanbora.info/projeler/bilimsel/herbisit>(06.10.2009)
2. <http://ipmworld.umn.edu/chapters/whitacreherb.htm> (29.10.2009)
3. <http://www.hracglobal.com/> (27.10.2009)
4. <http://extoxnet.orst.edu/pips/quizalof.htm> (08.03.2009)
5. <http://www.science.siu.edu/plantbiology> (23.08.2009)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Savaş YEŞİLBAŞ
Doğum Yeri : İstanbul/Bakırköy
Doğum Tarihi : 30.10.1984
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :İstanbul Bakırköy Yahya Kemal Beyatlı Lisesi, 2001
Lisans :Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, 2007

Yüksek Lisans:

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Yayınları:

1. Yıldız, M., Cenkci, S., Bozdağ, A., **Yeşilbaş, S.**, Kargıoğlu, M. Türkiye Endemiği ve Tehlike Altında olan *Limonium effusum*'un (Plumbaginaceae) Tohum Çimlenmesi Üzerine Tuzluluk, Sıcaklık ve Işığın Etkisi. Türkiye III. Tohumculuk Kongresi. Kapadokya, 25-28 Haziran 2008.