

QUIZALOFOP-P-ETİL HERBİSİTİNİN
ALLIUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Evrım Suna ARIKAN

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ağustos 2006

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

QUIZALOFOP-P-ETİL HERBİSİTİNİN
ALLIUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK ETKİLERİ

Evrım Suna ARIKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

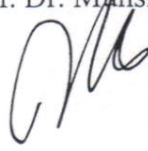
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman
Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

AFYONKARAHİSAR
2006

Evrin Suna ARIKAN'ın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "Quizalofop-P-Etil Herbisitinin *Allium cepa* L. Kök Ucu Meristem Hücreleri Üzerine Sitogenetik Etkileri" başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

24/08/2006

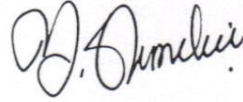
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mahsin KONUK (Afyon Kocatepe Üniversitesi)
(Başkan)



Jüri Uyesi : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ (Afyon Kocatepe Üniversitesi)
(Danışman)



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ (Hacettepe Üniversitesi)



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun Gün
ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

QUIZALOFOP-P-ETİL HERBİSİTİNİN *ALLIUM CEPA* L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOGENETİK ETKİLERİ

Evrin Suna ARIKAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu araştırmada, *Allium cepa* L.'nın kök uçları üzerine quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin toksik ve sitotoksik etkileri incelenmiştir. QPE herbisitinin farklı konsantrasyonları ve maruz kalma sürelerinin kök büyümesi, mitotik indeks, anafaz-telofaz kromozom aberasyonları ve interfazda mikronükleus oluşumu üzerine etkileri belirlenmiştir. Kontrol uygulamaları distile suda gerçekleştirilmiştir. Tüm denemelerde, 24 saat için distile suda homojen köklenmiş soğanlar kullanılmıştır. *Allium* kök büyümesi inhibisyonu testinde, QPE herbisitinin etkili konsantrasyon (EC_{50}) değeri yaklaşık 1.5 ppm olarak bulunmuştur. Sitotoksikite testinde, soğanlar distile su (kontrol) ve QPE herbisitinin EC_{50} değeri (1.5 ppm), EC_{50} değerinin yarısı ($EC_{50}/2=0.75$ ppm) ve EC_{50} değerinin iki katı ($2 \times EC_{50}=3$ ppm) konsantrasyonlarında 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle büyütülmüştür. Bu uygulamaları takiben, mikroskopik incelemeler için kök ucu örneklerinden preparatlar hazırlanmıştır. QPE herbisit konsantrasyonunun artmasıyla mitotik indeks önemli düzeyde azalmıştır ($P<0.05$). QPE herbisiti anafaz-telofaz kromozom aberasyonlarını farklı oranlarda teşvik etmiştir. Bu aberasyonlar yapışıklık (%38.57), köprüler (%28.42), vagrant kromozomlar (%16.67), c-anafazlar (%14.10), multipolarlık (%1.60) ve fragmentler (%0.64) olarak belirlenmiştir. Yapışıklık kontrol uygulamalarında gözlenmezken, diğer konsantrasyonlara göre 3 ppm'de önemli düzeyde artmıştır.

Köprüler, vagrant kromozomlar ve c-anafazlar kontrole göre 0.75 ve 1.5 ppm’de önemli düzeyde artmıştır. Toplam kromozom aberasyonlarındaki artma kontrole göre tüm konsantrasyonlarda önemli düzeyde bulunmuştur. İnterfazda mikronükleus oluşumu bakımından her konsantrasyonda süreler arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur. Her konsantrasyonda tüm sürelerin ortalamasına göre mikronükleus oluşumu yalnızca 3 ppm’de önemli düzeyde artmıştır.

2006, 67

Anahtar Kelimeler: *Allium cepa*, quizalofop-P-etil herbisiti, kök büyümesi, etkili konsantrasyon, mitotik indeks, kromozom aberasyonları, mikronükleus

ABSTRACT

Ms.Sc

CYTOGENETIC EFFECTS OF QUIZALOFOP-P-ETHYL HERBICIDE ON THE ROOT MERISTEM CELLS OF *ALLIUM CEPA* L.

Evrin Suna ARIKAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Mustafa YILDIZ

In this research, toxic and cytotoxic effects of quizalofop-P-ethyl (QPE) on root tips of *Allium cepa* L. were investigated. The effects of different concentrations of QPE herbicide and exposure times on root growth, mitotic index, anaphase-telophase chromosome aberrations, and formation of micronuclei at interphase were determined. The control treatments were performed in distilled water. In all treatments, the onions which homogeneously rooted in distilled water for 24 h were used. In *Allium* root growth inhibition test, effective concentration (EC_{50}) value of QPE herbicide was found approximately 1.5 ppm. In cytotoxicity test, onions were grown at distilled water (control), and at EC_{50} (1.5 ppm), half of the EC_{50} ($EC_{50}/2=0.75$ ppm), double the EC_{50} ($2\times EC_{50}=3$ ppm) concentrations of QPE herbicide for 24, 48, 72 and 96 h. Following these treatments, the slides were prepared from the root tip samples for microscopical investigations. Mitotic index was significantly decreased by increasing the concentration of QPE herbicide ($P<0.05$). QPE herbicide induced anaphase-telophase chromosome aberrations in different ratios. These aberrations were detected such as stickness (%38.57), bridges (%28.42), vagrant chromosomes (%16.67), c-anaphase (%14.10), multipolarity (%1.60) and fragments (%0.64). Stickness was significantly increased at 3 ppm compared to other concentrations, while no stickness was observed at control treatments. Bridges, vagrant chromosomes and c-anaphases were significantly increased at 0.75 and 1.5 ppm compared to control. The

increment in total chromosome aberrations were found at significant level in all concentrations compared to control. According to the micronuclei formation at interphase, differences among periods in each concentration were found insignificant. The micronuclei formation was significantly increased at only 3 ppm according to the means of all periods in each concentration.

2006, 67

Key words: *Allium cepa*, quizalofop-P-ethyl herbicide, root growth, effective concentration, mitotic index, chromosome aberrations, micronuclei

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 <i>Allium cepa</i> L.'nın Sistematigi ve Kromozom Morfolojisi.....	4
2.2 Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	5
2.3 Pestisitlerin Kullanımı	7
2.4 Organizmalarda Pestisitlere Karşı Adaptasyon ve Dayanıklılık.....	8
2.5 Çevresel Kirleticilerin Etkilerinin Belirlenmesinde Kullanılan Test Sistemleri.....	9
2.5.1 Bitki Genetik Biyotestlerinin Avantajları	13
2.6 Pestisitlerin Sitogenetik Etkileri	16
3. MATERYAL VE METOT.....	23
3.1 MATERYAL	23
3.1.1 Bitki Materyali	23
3.1.2 Herbisit Materyali.....	23
3.2 METOT	24
3.2.1 Test Materyalinin Hazırlanması	24
3.2.2 Etkili Konsantrasyon (EC ₅₀) Değeri ve Test Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	24
3.2.3 Kromozom Aberasyon Testi	25
3.2.3.1 Fiksasyon, Hidroliz, Boyama ve Daimi Preparasyon.....	26
3.2.4 Mikroskopik Analizler.....	27
3.2.5 Verilerin İstatistikî Analizleri	28
4. BULGULAR	29
4.1 <i>Allium cepa</i> Kök Büyümesi İnhibisyonu Testi.....	29
4.2 Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Mitotik İndeks Üzerine Etkisi.....	31

4.3 <i>Allium cepa</i> Kök Ucu Meristem Hücrelerinde Kromozom Aberasyonları Üzerine Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Etkisi.....	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
5.1 Quizalofop-P-Etil Herbisitinin <i>Allium cepa</i> Kök Büyümesi Üzerine Etkisi	42
5.2 Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Mitotik İndeks Üzerine Etkisi.....	45
5.3 <i>Allium cepa</i> Kök Ucu Meristem Hücrelerinde Kromozom Aberasyonları Üzerine Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Etkisi.....	48
KAYNAKLAR.....	54
TEŞEKKÜR	66
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
2,4-DB	2-(2,4-Dichlorophenoxy)-butric acid
2,3,6-TBA	2,3,6-trichlorobenzoic acid
DNOC	2-Methyl-4,6-dinitrophenol
Dinoseb-DNBP	2-tert-butyl-4,6-dinitrophenol
MCPA	4-Chlor-2-methyl phenoxy acetic acid
MCPB	4-(4 Chlor-2-methyl phenoxy)-butric acid
DNA	Deoksribo nükleik asit
dH ₂ O	Distile su
EC ₅₀	Etkili konsantrasyon
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
SCE	Kardeş kromatid değişimi
kg	Kilogram
L	Litre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ppm	Milyonda bir kısım
MI	Mitotik indeks
M	Molarite
EPTC	N, N-Dipropyl-thiolethyl-carbamat
nm	Nanometre
LD ₅₀	Ortalama letal doz
QPE	Quizalofop-P-etil
SH	Standart hata

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Quizalofop-P-etil'in yapısal formülü	23
Şekil 3.2 Kök şapkası, meristem ve kardeş (F1) hücre bölgelerini gösteren <i>Allium cepa</i> kökünün boyuna kesitinin fotomikrografı.....	27
Şekil 4.1 Quizalofop-P-etil herbisitinin farklı konsantrasyonlarının <i>Allium cepa</i> kök büyümesi üzerine etkisi	29
Şekil 4.2 <i>Allium cepa</i> kök büyüme inhibisyonu testine göre belirlenen quizalofop-P-etil'in EC ₅₀ değeri	30
Şekil 4.3 Quizalofop-P-etil konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinin mitotik indeksindeki değişim.....	33
Şekil 4.4 QPE herbisitinin <i>Allium cepa</i> kök ucu meristem hücrelerinde teşvik ettiği kromozom aberasyonları.	37
Şekil 4.4 (Devam) QPE herbisitinin <i>Allium cepa</i> kök ucu meristem hücrelerinde teşvik ettiği kromozom aberasyonları	38
Şekil 4.5 Quizalofop-P-etil herbisitinin farklı uygulama konsantrasyonu ve süresinin <i>Allium cepa</i> kök ucu meristem hücrelerinin toplam kromozom aberasyonları üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.6 QPE herbisitinin <i>Allium cepa</i> kök ucu meristem hücrelerinde teşvik ettiği mikronükleus oluşumu	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Allium cepa</i> L.'nin mitotik metafaz kromozom morfolojisi	4
Çizelge 2.2 Bazı çevresel kirleticilerin sitotoksik, sitogenetik ve mutajenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan test materyalleri.....	10
Çizelge 2.2 (Devamı) Bazı çevresel kirleticilerin sitotoksik, sitogenetik ve mutajenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan test materyalleri	11
Çizelge 4.1 Quizalofop-P-etil herbisitinin <i>Allium cepa</i> kök büyümesi üzerine etkisi	30
Çizelge 4.2 Quizalofop-P-etil herbisitinin <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinin mitoz bölünmesi üzerine etkisi	32
Çizelge 4.3 Kontrol, QPE konsantrasyonları ile süre etkileşiminde <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde belirlenen kromozom aberasyon tipleri ve oranları.....	34
Çizelge 4.4 QPE herbisitinin <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde neden olduğu anafaz-telofaz kromozom aberasyonları	36
Çizelge 4.5 Quizalofop-P-etil herbisitinin farklı uygulama konsantrasyonu ve süresinin <i>Allium cepa</i> kök ucu meristem hücrelerinde mikronükleus oluşumu üzerine etkisi	41
Çizelge 5.2 Farklı çalışmalara ait mitotik indeks hesaplamalarında kullanılan preparat adetleri ve bu preparatlarda incelenen toplam hücre sayıları	46

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun sürekli olarak atık ürünler oluşturmaları ve özellikle son yıllardaki hızlı endüstriyel gelişim, çevre kirliliği açısından potansiyel tehlikeyi arttırmaktadır. Biyolojik çeşitlilik ve insan sağlığı, zirai mücadelede kullanılan pestisitlerden dolayı ciddi tehlike altında bulunmaktadır (Saxena et al. 2005). Pestisit terimi kısaca “pest” adı verilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan madde anlamına gelmektedir. Pestisitler evsel atıklar, endüstriyel atıklar ve tarımsal mücadelelerde ortama karışan ve zor parçalanan maddelerdir. Pestisitler karbon, hidrojen ve klor içerdiklerinden “klorlu hidrokarbonlar” olarak da tanımlanırlar. Pestisitler; herbisit, insektisit, fungusit, rodentisit, akarisit, bakterisit, avisit, nematosit olarak kullanılmaktadır (Harte et al. 1991). Tarımsal savaşım yöntemlerinden en fazla kullanılanı tarım ilaçlarının (pestisitler) kullanıldığı kimyasal savaşımdır. Çünkü kimyasal savaşım yüksek etkinliğe sahip, hızlı sonuç veren, toksin salgılayan organizmalardan ürünü koruyabilen, bilinçli ve kontrollü kullanıldığında ekonomik olan önemli bir savaşımdır (De Waard et al. 1993, Ragsdale 1994). Tarımsal savaşım; bitkilerin hastalık, zararlı ve yabancı otların etkilerinden ekonomik ölçüler içinde korunması, ürünün ve kalitenin artırılmasıdır. Tarımsal savaşım, bir yandan ürün ve kalitenin artırılması, diğer yandan ekonomik yönü hedeflenmektedir. Bu amaca ulaşabilmek için tarımsal savaşımın entegre savaş (entegre zararlı yönetimi) görüşüne uygun olarak yürütülmesi gerekmektedir. Entegre zararlı yönetimi dendiğinde ise tarımsal savaşımda bilinen tüm yöntemlerden yararlanan, insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri en az olanların uygulanmasına yönelik çalışmalar anlaşılmaktadır. Kimyasal analitik tekniklerle su ve topraktaki “pestisit” içeriğinin denetimi Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı ve bazı bağımsız araştırma enstitüleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Perelra and Hostettler 1993).

Türkiye’de gelişmiş ülkelere göre genel olarak daha az pestisit tüketilmesine karşın, en yoğun tüketilen pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır. Gelişmekte olan ülkelere her yıl on bin kişi tarım ilacından zehirlenerek ölmekte ve 400.000 kişi de hastalanmaktadır (Bora ve Özaktan

1998). Pestisitler ağız, deri ve solunum yoluyla vücuda girmekte ve doğrudan ya da dolaylı olarak etkiler oluşturabilmektedir. Birçok araştırmacı, pestisitlerin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduklarını göstermiştir (Smaka-Kincl et al. 1996, Rank and Nielsen 1998, Steinkellner et al. 1998, Kong and Ma 1999, Pavlica et al. 2000, El-Shahaby et al. 2003, Evseeva et al. 2003, Chandra et al. 2005). Kullanılan 100 pestisit bileşenini kapsayan test kimyasallarının %59'unun gen mutasyonu, %83'ünün kromozomal hasar ve %71'inin DNA hasarında etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak %10'unun tüm testlerde negatif sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Bolognesi and Morasso 2000).

Yabancı otların kontrolünde kullanılan bütün kimyasal maddelere de "herbisit" denilmektedir. Kültürü yapılan bitkiler arasında yetişen yabancı otların çok fazla olmasından dolayı herbisit uygulamalarına ihtiyaç vardır. Yabancı otlarla zamanında gerekli savaşım yapılmaz ise yüksek oranda kalite ve verim kaybı ortaya çıkmaktadır (Özer vd. 1997). Bu kimyasallar, kirli çevreden besin elementlerini absorplayan ve besin zincirinde ilk sırayı alan bitkiler tarafından insanlara toksik ajan vektörleri olarak etki eden mutajenik ve karsinojenik ajanlara dönüştürülebilmektedir (Marcano et al. 2004).

Kimyasalların sitotoksik aktiviteleri *Allium cepa* (Fiskesjö 1985, Smaka-Kincl et al. 1996, Rank et al. 2002, Marcano et al. 2004, Fatima et al. 2005, Patra et al. 2005), *Vicia faba* (Cotelle et al. 1999), *Arabidopsis thaliana* (Menke et al. 2001) ve *Hordeum vulgare* (Nicoloff and Kappas 1987) gibi farklı bitki sistemleri ile analiz edilmektedir. Özellikle *Allium* testi, çeşitli kimyasalların sitotoksik ve/veya genotoksik etkilerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır (Fiskesjö 1985, Smaka-Kincl et al. 1996, Rank et al. 2002, Marcano et al. 2004, Fatima et al. 2005, Patra et al. 2005).

Bu araştırmada, kimyasal yapısına göre organik herbisitlerin fenoksi bileşikleri grubundan olan quizalofop-P-etil (quizalofop-P-ethyl=QPE) herbisitinin *Allium cepa* kök büyümesi inhibisyonu testi ile etkili konsantrasyon değeri (EC₅₀) belirlenmiş, farklı konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin sitogenetik açıdan

mitotik indeks, anafaz telofaz kromozom aberasyonları ve interfazda mikronükleus oluşumları üzerine etkisi incelenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 *Allium cepa* L.'nın Sistematığı ve Kromozom Morfolojisi

Çevresel kirleticilerin toksik etkilerinin sitogenetik açıdan değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan *Allium cepa* L. sistematik olarak şu şekilde sınıflandırılmıştır:

Alem (=Regnum)	: <i>Plantae</i> – Bitkiler
Alt alem (=Subregnum)	: <i>Tracheobionta</i> – Vasküler bitkiler
Süper Bölüm (=Super divisio)	: <i>Spermatophyta</i> – Tohumlu bitkiler
Bölüm (=Divisio)	: <i>Magnoliophyta</i> – Çiçekli bitkiler
Sınıf (=Classis)	: <i>Liliopsida</i> – Monokotiledonlar
Alt sınıf (=Subclassis)	: <i>Liliidae</i>
Takım (=Ordo)	: <i>Liliales</i>
Familya (=Familia)	: <i>Liliaceae</i> – Zambakgiller
Cins (=Genus)	: <i>Allium</i> L. – Soğan
Tür (=Species)	: <i>Allium cepa</i> L. – Mutfak soğanı

Allium cepa L.'nın kromozom sayısı $2n=16$ 'dır. Kromozom morfolojisine bakıldığında 6 metasentrik ve 2 submetasentrik kromozomu görülmektedir. Subtelosentrik ve akrosentrik kromozom bulunmamaktadır. Kromozomların morfolojik özellikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir (www.bab.com.tr/sito.html).

Çizelge 2.1 *Allium cepa* L.'nın mitotik metafaz kromozom morfolojisi

Morfolojik Özellikleri						
No	Uzun kol (μm)	Kısa kol (μm)	Toplam uzunluk (μm)	Kol oranı	Yüzde (%)	Kromozom şekilleri
1	11.70	9.10	20.80	1.29	14.16	Metasentrik
2	11.11	9.13	20.23	1.22	13.78	Metasentrik
3	10.64	8.98	19.63	1.19	13.36	Metasentrik
4	13.02	6.13	19.14	2.12	13.03	Submetasentrik
5	9.65	8.84	18.48	1.09	12.58	Metasentrik
6	9.86	8.04	17.90	1.23	12.19	Metasentrik
7	8.65	8.43	17.08	1.03	11.63	Metasentrik
8	8.79	4.83	13.62	1.82	9.27	Submetasentrik

2.2 Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisit terimi kısaca “pest” adı verilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan madde anlamına gelmektedir (Harte et al. 1991). Pestisitler zararlı gruplarına göre herbisitler (yabancı ot öldürücüler), insektisitler (böcek öldürücüler), fungusitler (mantar öldürücüler), akarisitler (akar öldürücüler), rodentisitler (kemirici öldürücüler), mollusitler (salyangoz öldürücüler), nematositler (nematod öldürücüler), afisitler (yaprak biti öldürücüler), avisitler (kuş öldürücüler), bakterisitler (bakteri öldürücüler), nematisitler (yuvarlak kurt öldürücüler) olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Harte et al. 1991, Akman 2000, Anonim 2001). Bu sınıflandırmada çevreye verdiği zarara göre diğer pestisitlerin toplamından daha fazla zarar veren grup herbisitlerdir (Topbaş vd. 1998). Araştırmamızda kullandığımız quizalofop-P-etil bir herbisit olduğundan herbisitlerin sınıflandırılmasına yer verilmiştir. Kimyasal yapılarına göre herbisitler inorganik ve organik olarak iki gruba ayrılmaktadır (Özer vd. 1997):

a) **İnorganik herbisit bileşikleri:** Bu grup, çok az selektif özellik gösterdiklerinden günümüzde genellikle önemini yitirmiş durumdadır. Kalsiyumsiyanamid, sodyum tetraborat, sodyum klorat, bakır sülfat ve demir (II) sülfat inorganik herbisitlerdir.

b) **Organik herbisit bileşikleri:** Yaygın olarak kullanılan organik kökenli herbisit bileşikleri şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

- 1) **Alifatik asitler:** Dalapon, Glyphosat, TCA
- 2) **Amidler ve tiyoamidler:** Alachlor, Carbetamid, Chlorthiamid, Diphenamid, Napropamid, Pentanachlor, Propachlor, Propyzamid, Propanil
- 3) **Benzoik asitler:** Chloramben, Dicamba, 2,3,6-TBA
- 4) **Bipiridiliumlar:** Diquat, Paraquat
- 5) **Karbamatlar:** Asulam, Barban, Chlorpropham, Cycloate, EPTC, Molinate, Phenmedipham, Propham, Thiobencarp, Vernalate

- 6) **Dinitroanilinler:** Butralin, Ethalfluralin, Nitratin, Oryzalin, Penoxalin, Perdimethalin, Trifluralin
- 7) **Nitril bileşikleri:** Bromoxynil, Dichlobenil, İoxynil
- 8) **Dinirtofenoller:** Dinosebacetat, Dinoseb-DNBP, DNOC
- 9) **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
- 10) **Diazinler:** Maleic hydrazide, Pyrazon
- 11) **Triazinler:** Atrazin, Cyanazin, Cyprazin, Methoprotryn, Metamitron, Prometryn, Propazin, Simazin, Terbumeton, Terbutilazin, Trietazin, Isomethiozin, Metribuzin
- 12) **Üre bileşikleri:** Chlortoluron, Cycluron, Diuron, Isoproturon, Linuron, Metoxuron, Monolinuron, Monuron, Fluometuron, Metabenzthiazuron
- 13) **Urasil grubu bileşikler:** Bromacil, Terbacil, Lenacil
- 14) **Diğer organik herbisitler:** Amitrol-aminotriazol, Fenac, Picloram, Bromfenoxim, Flurenol, Chlorfenprop-methyl

Bu araştırmada kullanılan quizalofop-P-etil herbisitinin kullanımı ve biyolojik etkileri şu şekilde açıklanmaktadır (www.herbicides.en.ec21.com):

Quizalofop-P-etil kullanımı: Quizalofop-P-etil fide çıkışı sonrası (post-emergence) uygulanan seçici bir fenoksi herbisittir. Patates, soya fasulyesi, şeker kamışı, fındık, sebzeler, pamuk ve keten içerisindeki tek yıllık ve çok yıllık yabancı otların kontrolünde kullanılmaktadır. Bileşik, yaprak yüzeyi vasıtasıyla absorbe edilir ve tüm bitki boyunca ilerler. Gövde ve kökün aktif büyüme bölgelerinde birikir. Quizalofop ve quizalofop etil bileşikleri quizalofop-P ve quizalofop-P-etil bileşiklerinden tamamen farklıdır. Quizalofop-P-etil herbisiti yeni bir bileşik olduğundan toksisitesi veya çevresel karakteristikleri hakkında çok az bilgi mevcuttur (www.herbicides.en.ec21.com).

Quizalofop-P-etilin akut toksisitesi: Oral yolla quizalofop-P-etile maruz kalındığında çok az toksik olan bir bileşiktir. Bileşiğin oral LD₅₀ değeri erkek ratlarda 1,210 mg/kg ve dişi ratlarda 1,182 mg/kg'dır. Fareler bileşikten biraz

daha az etkilenebilmektedirler. Quizalofop-P-etilin erkek fareler için LD₅₀ değeri 1,753 mg/kg ve dişi fareler için 1,805 mg/kg'dır. Solunum üzerine bileşiğin toksisitesi hakkında bir bilgi mevcut değildir. Quizalofop-P-etil deriyi tahriş edici değildir (www.herbicides.en.ec21.com).

Quizalofop-P-etilin kronik toksisitesi: Ratlarla 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 (www.herbicides.en.ec21.com).

Quizalofop-P-etil'in ekolojik etkileri: Yeşilbaş ördekler ve bıldırcınlarla yapılan testler, quizalofop-P-etil herbisitinin bu organizmalara karşı toksik olmadığını göstermiştir. Quizalofop-P-etil arılara 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 (www.herbicides.en.ec21.com).

2.3 Pestisitlerin Kullanımı

Pestisitlerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucu, zararlı organizmalarda dayanıklılık oluşturabilme riskleri ve kalıntılar yoluyla insan sağlığına ve çevreye olan olumsuz etkileri kesinlikle göz ardı edilmemelidir. Söz konusu riskler nedeniyle, özellikle gelişmiş ülkelerde pestisitler daha bilinçli ve kontrollü kullanılmaktadır. Bunu sağlayabilmek için Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde birçok yasa çıkarılmış, resmi örgütler kadar sivil toplum örgütleri de bu yönde söz sahibi duruma gelmişlerdir (Gullino and Kuijpers 1994, Ragsdale and Sisler 1994).

Modern tarımsal savaşımında, pestisitlerin çevreye zarar vermeyecek düzeyde ve gerçekten gerekli olduğunda kullanılması benimsenmiştir. Gelişmiş ülkelerde pestisitler “düşük risk” ya da “doğa dostu” olarak sınıflandırılmıştır. Örneğin,

ABD Çevre Koruma Örgütü (Environmental Protection Agency, EPA), pestisitlerin hem ruhsatlandırılmasını kolaylaştırmış hem de kullanılmalarını teşvik etmeye başlamıştır (EPA 1999a, b). Diğer yandan, gelişmiş ülkelere pestisit kullanılmadan modern anlamda bitkisel ürün yetiştirmenin olanaksız olduğunun bilinmesinin yanı sıra pestisit kullanımının sürekli artırılması ile verimin sürekli artmayacağı da bilinmektedir. Bu nedenle, maliyetleri yükseltmemek için gereksiz ilaçlamalardan kaçınılmaktadır. Bu uygulamalarda, sivil toplum örgütlerinin ve tüketicilerin etkisi de önemli olmuştur. Örneğin, Avrupa ülkelerinde fungusit kullanımı patatesten %30 ve elmada %20 azaltılmasına karşın verimde bir düşüş gözlenmemiştir (Gullino and Kuijpers 1994).

Pestisitlerin gerek çevre, gerek sağlık ve gerekse ekonomik açıdan getirebilecekleri olumsuzluklar gelişmiş ülkelerde gayet iyi bilinmektedir. Bu nedenle, bir yandan pestisitleri çok bilinçli ve kontrollü kullanırlarken, diğer yandan da riskli pestisitlerin kullanımlarını sınırlamak ya da tamamen durdurmak yönüne gidilmektedir (Anonim 2004).

2.4 Organizmalarda Pestisitlere Karşı Adaptasyon ve Dayanıklılık

Pestisitlerin insan sağlığı ve çevreye olan olumsuz etkilerinin yanı sıra piyasa ömrünü belirleyen en önemli olay, pestisitlere karşı organizmalardaki duyarlılık azalışıdır. Bir pestisite organizmaların duyarlılığı azaldıkça, o pestisitin etkinliği de azalmaktadır. Bu nedenle, uygulayıcılar istenilen etkinliği elde edebilmek için devamlı dozu arttırmaktadır. Artan dozlara paralel olarak çevrede pestisit kalıntıları giderek artmaktadır (Delen ve Tosun 1996).

Pestisitlere duyarlılık azalışı “adaptasyon (adaptation)” ve “dayanıklılık” (resistance=dirençlilik) yollarıyla olmaktadır. Adaptasyon ile duyarlılığın azalması, bir organizmanın genetik yapısında değişiklik olmaksızın bir kimyasal maddeye uyum göstermesinin bir sonucudur. Dayanıklılıkta (direnç) ise organizmanın duyarlılığının azalması, genetik yapısındaki bir değişiklik

sonucudur. Buna göre, adaptasyonda söz konusu pestisit kullanımının durdurulmasıyla organizma yavaş yavaş tekrar eski duyarlılığını kazanabilir. Dayanıklılık ise bir mutasyondur ve genelde geri dönüşümü yoktur. Pestisitlerin bir ölçüde bilinçsiz ve kontrolsüz kullanıldığı Türkiye gibi ülkelerde dayanıklılık kadar adaptasyon da ekonomik açıdan önem taşımaktadır. Dayanıklılığın ortaya çıkışına en fazla etki eden faktörlerin başında, pestisit dayanıklılık açısından riski ile pestisitlerin kullanım biçimi gelmektedir. Bilinçsiz ve kontrolsüz kullanım, duyarlılık azalışlarının daha hızlı ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Delen ve Tosun 1996).

2.5 Çevresel Kirleticilerin Etkilerinin Belirlenmesinde Kullanılan Test Sistemleri

Çevresel kirleticilerin mutajenik aktiviteleri farklı bitki sistemleri ile analiz edilmektedir (Çizelge 2.2). Diğer taraftan, tarımda ve diğer birçok sahada kullanılan pestisitlerin genetik etkilerinin belirlenmesi için farklı organizmalarda farklı mutajenite testleri de uygulanmaktadır. Bunlar *Drosophila*'da en fazla kullanılan eşeye bağlı letalite testi (Kilbey et al. 1984), mayalarda *Saccharomyces cerevisiae* genotoksiste testi (Buschini et al. 2003), bakterilerde *Salmonella* mutajenite testi (Mamber et al. 1993) ve *Bacillus subtilis* tamir testi (Silva et al. 2006), hayvanlarda rat, fare, hamster kemik iliği mikronükleus testi (Ono et al. 2006) ve insan lenfosit hücre kültürlerinde kardeş kromatit değişimi (SCE) (Sivikova et al. 2005) testleridir.

Çevresel kirleticilerin mutajenik etkilerinin değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılan bazı bitki türleri *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana*, *Crepis capillaris*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana*, *Pisum sativum*, *Tradescantia* clone 4430, *Vicia faba* ve *Zea mays*'ı içerdiği bildirilmiştir (Grant 1994). Kromozom aberasyonları için hem *Allium cepa* hem de *Vicia faba* kromozom aberasyon testleri sınırsız ve kısa sürede kullanılabilir veri tabanına sahiptir.

Çizelge 2.2 Bazı çevresel kirleticilerin sitotoksik, sitogenetik ve mutajenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan test materyalleri

Kullanılan kimyasallar ve çevresel kirleticiler	Kullanılan test materyali	Kaynaklar
Organik etil cıva klorür, etil cıva klorür ve fenil cıva asetat karışımı, inorganik cıva klorür fungusitleri	<i>Allium cepa</i>	Nandi 1984
Benzen hekza klorür, Lindane, Aldrin, Heptachlor, Endrin pestisitleri	<i>Lens culinaris</i> , <i>Licopersicon esculenta</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>P. Arvense</i>	Jain and Sarbhoy 1987
Krom	<i>Allium cepa</i>	Liu et al. 1992
Kompleks karışımlar	<i>Allium cepa</i>	Rank and Nielsen 1993
Etil metanosülfonat, Azidoglycerol, <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrosoarea, Sodyum azid(NaN_3), Maleic hidrazide	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gichner et al. 1994
Azidoglycerol, <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrosoarea, Sodyum azid (NaN_3), Maleic hidrazide	<i>Vicia faba</i>	Kanaya et al. 1994
Azidoglycerol, <i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrosoarea, Sodyum azid (NaN_3), Maleic hidrazide	<i>Tradescantia</i>	Ma et al. 1994
Atık su	<i>Allium cepa</i>	Nielsen and Rank 1994
Endüstriyel atık su	<i>Allium cepa</i>	Rank and Nielsen 1994
Kadmiyum	<i>Hordeum vulgare</i>	Zhang and Yang 1994
Çevresel kirleticiler	<i>Allium cepa</i> , <i>Vicia faba</i>	Ma et al. 1995
Atık su, yüzey ve toprak suyu	<i>Allium cepa</i>	Smaka-Kincl 1996
Tiber Nehri sedimentlerinin ağır metal içeriği	<i>Vicia faba</i>	Minissi and Lombi 1997
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrosoarea, Maleic hidrazide, Sodyum azid, Etil metanosülfonat	<i>Allium cepa</i>	Rank and Nielsen 1997
Atık su tortusu	<i>Allium cepa</i>	Rank and Nielsen 1998
Ağır metaller	<i>Tradescantia</i> , <i>Allium cepa</i> , <i>Vicia faba</i>	Steinkellner 1998
Atık su ile sulanmış toprak örnekleri	<i>Tradescantia</i> , <i>Allium cepa</i>	Cabrera and Rodriguez 1999
Cypermethrin, Fenvelerate insektisitleri	<i>Allium cepa</i>	Chauhan 1999
Endüstri bölgesinde kirlenmiş toprak	<i>Allium</i> , <i>Vicia</i> , <i>Tradescantia</i>	Cotelle et al. 1999
Kanalizasyon suyu, Endüstriyel atık sular	<i>Allium cepa</i>	Grover 1999
Pestisit (metolachlor, atrazine, extrazine ve 2,4-D) ile kirlenmiş toprak ve su örnekleri	<i>Allium cepa</i> , <i>Tradescantia</i>	Kong and Ma 1999
Polietilen terephthalate içine şişelenmiş ticari mineral su	<i>Allium cepa</i>	Evandri et al. 2000

Çizelge 2.2 (Devamı) Bazı çevresel kirleticilerin sitotoksik, sitogenetik ve mutajenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan test materyalleri

Kullanılan kimyasallar ve çevresel kirleticiler	Kullanılan test materyali	Kaynaklar
Fosforik alçıtaşı deposu atık suyu	<i>Allium cepa</i>	Pavlica et al. 2000
Çevresel mutajenler	<i>Pisum sativum</i>	Grant and Owens 2001
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrosourea, Metil metanosülfonat, Mitomycin C, Radiomimetic bleomycin, Maleic hydrazide	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Menke 2001
Neem bitkisinin sulu ekstraktları	<i>Allium cepa</i>	Soliman 2001
Atık su	<i>Allium cepa</i>	Amin 2002
Cıva klorür, metolachlor, 4-nitroquinoline- <i>N</i> -oksit (4-NQO)	<i>Allium cepa</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Hydra attenuata</i>	Arkhipchuk and Garanko 2002
2,4-D, Butachlor	<i>Allium cepa</i>	Ateeq et al. 2002
Kadmiyum	<i>Allium cepa</i>	Marcano et al. 2002
Maleic hydrazide, Acridine ve di(2-ethylhexyl) phthalate (DEPH)	<i>Allium cepa</i>	Rank et al. 2002
İyonize radyasyon	<i>Pisum sativum</i>	Zaka et al. 2002
Çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	<i>Nigella sativa</i> <i>Triticum aestivum</i>	El-Ghamery 2003
Endüstriyel atık su, Kanalizasyon suyu	<i>Allium cepa</i>	El-Shahaby et al. 2003
Radyum üretme endüstrisinden atık su örnekleri	<i>Allium schenoprasum</i>	Evseeva et al. 2003
Alüminyum, Paraquat, Metil cıva klorür	<i>Allium cepa</i> , <i>Hordeum vulgare</i>	Patra et al. 2003
Hidrat sülfür dioksit	<i>Allium sativum</i> , <i>Vicia faba</i>	Yi and Meng 2003
Spermidin, Spermin, Cyclohexylamine	<i>Triticum monococcum</i> L., <i>T. durum</i> Desf., <i>T. aestivum</i> L.	Ismailoglu et al. 2004
İki endüstrinin tehlikeli toprak atıkları	<i>Allium cepa</i>	Chandra et al. 2005
Atık sudaki toksik ağır metaller	<i>Allium cepa</i>	Fatima et al. 2005
Kurşun	<i>Lens culinaris</i> Medik.	Kıran and Şahin 2005
Metil cıva klorür, Etil metanosülfonat, Maleic hydrazide	<i>Allium cepa</i>	Patra et al. 2005
Cypermethrin	<i>Allium sativum</i>	Saxena et al. 2005

Mutajenlerin belirlenmesi için bitki biyotestleri uzun yıllardan beri kullanılmakta olup; sitogenetik aberasyonlar ve gen mutasyonlarına neden olan çevresel kimyasalların izlenmesi ve denetlenmesi için çok kullanışlı sistemlerdir (Nilan and Vig 1976, Constantin and Owens 1982, Grant 1992). *Allium* testi, çeşitli maddelerin sitotoksik ve/veya genotoksik etkilerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek yapılı bitkiler kromozomlarının boyutlarından dolayı sitolojik analizler için uygundur (Fiskesjö, 1985). *Allium* köklerinin hassaslığı, büyük ihtimalle diploid tamamlayıcısının total uzunluğunun en fazla ve metasentrik kromozomlarının çok sayıda olmasından kaynaklanmaktadır (Ma et al. 1995). *Allium* testi kullanılması kolay ve ucuz bir testtir ve özellikle memeli test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir (El-Shabhaby et al. 2003). Süratli test yapmak, toksisiteyi ve ortamdaki kirlilik seviyelerini belirlemek için standart bir yöntem olarak dikkate alınmaktadır.

Allium testinin sonuçları, ortamdaki canlı organizmalar için direkt veya indirekt riskleri temsil eden belirli sitotoksik/genotoksik veya mutajenik maddelerin varlığını işaret edebilir. *Allium* testinde büyümedeki gerileme genellikle toksisite ve temel kromozom aberasyonları ise genotoksikite ile açıklanmaktadır (Kovalchuk et al. 1998). Bununla birlikte, kromozom aberasyonlarının varlığı büyüme inhibisyonu ile iç içe olaylardır (Fiskesjö 1985).

Çevresel kirleticilerin (atık sular, pestisitler, herbisitler vb.) toksik ve genotoksik etkileri, yaygın olarak kullanılan *Allium* kök büyümesi inhibisyonu testi ile belirlenen etkili konsantrasyon ve farklı uygulama süreleri temelinde mitotik indeks, mitotik anormallikler, kromozom aberasyonları ve mikronükleus oluşumları ile belirlenebilmektedir. Mitotik indeksteki azalma, kontrole göre %22'nin altına düşerse letal etki (Antonsie-wiez 1990), %50'nin altına düşerse subletal etki (Panda and Sahu 1985) değeri olarak kabul edilmektedir. Bu değerler, sitotoksik sınır değerleridir (Sharma 1983). Bitkilerde ve hayvanlarda gözlenen kromozom aberasyonları, kardeş kromatid değişimleri ve mikronükleus oluşumları, kimyasalların DNA ile etkileşime girdiklerini ve hasara neden

olduklarını göstermektedir (Saxena et al. 2005). Kromozom aberasyonları ve mikronükleus analizleri genotoksisitenin değerlendirilmesi için son derece güvenilir analizler olarak gösterilmektedir (Rieger et al. 1990, Angelis et al. 2000, Panda et al. 2002, Patra et al. 2003).

Doğal su ve yeraltı suyunun kalitesi veya kirli suların kirlilik seviyesi fiziksel/kimyasal, saprobiyolojik, radyobiolojik, sitogenetik ve genotoksik etkilerle belirlenmektedir (Rank and Nielsen 1998, Amin 2002). Sitogenetik testler, maddelerin farklı sürelerde uygulanan çeşitli konsantrasyonlarının zararlı etkilerinin teşhis edilmesi ve organizmalar üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için uygundur (Kumar et al. 1991, De-Serres 1992). Bu testler, test organizmaları üzerine zararlı etkileri bakımından önemli veriler sağlamakta ve kirlilik ölçüsünün biyodenetimi yanında, doğal çevrelerdeki organizmalar üzerine bütün toksik ve mutajenik maddelerin kombine etkilerinin değerlendirilmesi için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Al-Sabti 1989).

Genotoksisite testleri mutasyon ve kromozom aberasyonları olarak iki kategoriye ayrılabilir. 1984 yılında, çevresel kimyasalların mutajenik ve karsinojenik potansiyelleriyle birlikte belirlenmesi için Kimyasal Güvenlik Üzerine Uluslararası Program (IPCS) kapsamında bitki genetik sistemleri üzerine ortaklaşa bir çalışma tamamlanmıştır (Ashby et al. 1988). Bu çalışmada, mutasyon testi için *Arabidopsis thaliana* klorofil ve embriyo testleri (Redei 1982) ve *Tradescantia* clone 4430 stamen hair testi (Vant't Hof and Schairer 1982) ile sitogenetik testlerde *Tradescantia* clone 4430 mikronükleus testi ve *Vicia faba*'da kromozom aberasyonu testi (Kihlman and Anderson 1984) kullanılmıştır.

2.5.1 Bitki Genetik Biyotestlerinin Avantajları

Yüksek yapılı bitkiler, çevresel kimyasalların sitotoksik (hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan etkileri), sitogenetik (kromozomlar üzerindeki etkileri) ve mutajenik (genetik değişime neden olan etkileri) etkilerinin mükemmel bir göstergesidir. Bu bağlamda yüksek yapılı bitkiler, kimyasalların kullanımı veya çevresel kirliliğin neden olduğu muhtemel genetik hasarın

belirlenmesinde birinci sırada yer alan alternatif test sistemleri olarak deneysel çalışmalarda özgül avantajlara sahiptir. Yani, bitki köklerinin meristematik mitotik hücreleri çevresel kirleticilerin “klastojenite”sinin (kromozom kırılması ve/veya buna bağlı olarak kromozom parçalarındaki kayıp, artma ya da düzensizliklerin olması) belirlenmesi için uygun bir sitogenetik materyaldir (Ma et al. 1995).

Çevresel kimyasalların veya kirleticilerin test edilmesi ve izlenmesi için yüksek bitki genetik testlerinin kullanılmasının bazı avantajları mevcuttur. Diğer taraftan, birçok bitkinin hayat döngüsünün bakteri, maya ve *Drosophila*’dan daha uzun olması ve bitkiler ve hayvanlar arasında temel farmakokinetik ve biyokimyasal farklılıkların bulunması bitki sistemlerinin kullanılmasına bazı sınırlamalar getirmektedir. Hayvan ve bitki hücreleri arasındaki farklılıklar bitki genotoksisite testlerinin genel olarak kabulünde bir eksikliğe neden olur. Bakteri, *Drosophila*, *Neurospora* ve maya gibi bazı memeli olmayan sistemlerin genotoksisite testlerinin kabul görmesine rağmen, bitki genotoksisite testlerinin verileri insana göre yorumlanmak istendiğinde bir yerde sınırlanmaktadır. Buna karşın, bazı kimyasalların genetik anormallikler bakımından karşılaştırmalı sonuçları bitki ve hayvan sistemlerinde belirlenmiştir (Grant et al. 1981). Örneğin, pestisitlerin sitogenetik etkilerinin incelenmesinde, bitki ve hayvan sistemlerinde hem kromozomal anormallikler hem de c-mitoz sıklığı arasında mükemmel bir korelasyonun olduğu gösterilmiştir (Grant 1978). *Allium cepa*’da ve V79 Chinese hamster fibroblast hücrelerine uygulanmış olan 2,4-D sonuçları, kromozom aberasyonlarının teşvik edilmesinde bu iki testin benzer olduğunu göstermiştir (Pavlica et al. 1991). Benzer olarak, 12 adet kimyasalın insan lenfositlerinde ve *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde kardeş kromatid değişimlerini (SCE) teşvik etmesi kıyaslandığında, *Vicia faba*’daki SCE oranının insan lenfositlerindeki kadar yüksek bulunmamasına rağmen, teşvik edilen SCE oranları hemen hemen yakın bulunmuştur. Bu sonuç, *Vicia faba* kromozomlarının aynı mutajene karşı insan lenfositleri kadar hassas olduğunu belirtmektedir (Xing and Zhang 1990). Bitki genotoksisite testleri mutajen tarama programlarında memeli ve memeli olmayan hayvan testlerine alternatif sağlamaktadır (Grant 1986). Bitki genetik test

sonuçları, mutasyon ve kansere neden olabilen ajanlardan korunabilmek için önemli bir katkı sağlayabilir (Grant 1994).

Pestisitlerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi için pestisitler tarafından teşvik edilen aşağıdaki değişiklikler göz önüne alınmaktadır (<http://www.icsu-scope.org>):

- 1) Kromozom aberasyonları olarak isimlendirilen kromozom veya kromatidlerde meydana gelen yapısal değişiklikler (kırıklar, delesyonlar, gaplar, inversiyonlar, translokasyonlar, ringler) ve diğer bozukluklar (yapışıklık, kümeleşme, aşınmalar),
- 2) Mitotik veya mayotik bölünmelerde bozukluklar (iğ ipliği inaktivasyonu, c-mitoz, non-disjunction), poliploid veya anöploid hücrelerle sonuçlanan anafaz esnasında meydana gelen kromozom dağılımındaki düzensizlikler,
- 3) Somatik krossing over ve kardeş kromatid değişimi (SCE) gibi rekombinasyonel olaylar,
- 4) Verimsizlik ve embriyonik ölüm,
- 5) Polen tanelerinde veya yavrularda eksprese edilen ortaya çıkan üretici hücrelerde meydana gelen mutasyonlar olarak ifade edilmektedir.

Çevresel kirleticilerin test edilmesi ve izlenmesinde yüksek yapılı bitki genetik biyotestlerinin avantajları şu şekilde sıralanmıştır (Grant 1994):

- 1) Ökaryot canlılar olan bitkiler, insanlara benzer kromozom yapısına sahiptirler. Mitoz ve mayoz geçirirler ve mutasyona uğrarlar.
- 2) Teknisyenlere bitki testleri ile ilgili çok hızlı eğitim verilebilir. Diğer test sistemlerine göre ucuz ve kültürü kolay yapılabilir.
- 3) Bazı bitkiler (örneğin: *Arabidopsis*) vejetasyonlarını kısa zamanda tamamlamaktadır.
- 4) Testler çevresel şartlar, pH, sıcaklığın geniş aralıklarında gerçekleştirilebilir. Bitkiler, tek bir haploid ve diploid bitkiden rejenere edilebilir.

- 5) Bitki genetik testleri tek bir kimyasaldan kompleks karışımlara kadar genotoksitenin değerlendirilmesi için kullanılabilir.
- 6) Bitki genetik testleri mutajenik kirleticilerin *in situ* denetlenmesi için kullanılabilir.
- 7) Yıllardır kullanılmakta olan bitki genetik testleri son derece güvenilirdir. Bitki genetik testleri çevresel kimyasalların test edilmesi ve denetlenmesi için mutagenizasyon araştırmalarında kullanılabilirlikleri kanıtlanmıştır.
- 8) Birçok kimyasal için genotoksite sonuçları mevcuttur ve böylece farklı testler arasında karşılaştırmalar yapılabilir.
- 9) Çalışmalar memeli sitogenetik testleri ile pozitif bir korelasyon göstermektedir.
- 10) Bitkiler mutajenik metabolitlerin (promutajenler) belirlenmesinde mikrobiyal testlerle birleştirilebilir.
- 11) Test etmenlerinin karsinogenitelerinin belirlenmesi için bitki genetik testleri yüksek hassasiyet göstermektedir.

2.6 Pestisitlerin Sitogenetik Etkileri

Pestisitlerin sürekli artan kullanımı çevresel kirliliğin araştırılması için bir uyarı olmuştur. Tarla bitkilerini geliştirmek ve gıda sağlamak amacıyla zirai kimyasalların gittikçe artan kullanımına gelecekte de devam edilecektir. İnsanlar çeşitli zirai mutajenler, karsinogenler ve klastojenlere maruz kalmaktadırlar. Bu yüzden önemli çevresel kirleticilerin genotoksik potansiyellerinin nispi düzeyinin bilinmesi önemlidir. Herbisitler yanlış kullanıldıklarında besin zinciri yoluyla yüksek yapılı bitkileri ve dolayısıyla insan dahil birçok organizmayı olumsuz etkilemektedir. Uygulandıkları ortamda bozunmadan uzun süre kalmaları ve organizmalarda birikmeleri, herbisitlerin zararlı etkilerinin genellikle geç çıkmasına neden olmakla birlikte tarım ürünlerinin tüketilmesi sonucu ölüm vakalarına da rastlanmıştır (Vural 1984). İçme suyu olarak kullanılan atık sular, doğal sular ve yüzey sularının genotoksitesi, sucul organizmalar ve insanlar üzerinde genetik hasar ve kanser riski açısından önemli bir problemdir (Rank and Nielsen 1998, Grover and Kaur 1999, El-Shahaby et al. 2003).

Farklı test bitkileri ile çevresel kimyasalların genotoksitesini test etmek için yapılan çalışmalarda kirleticilerin farklı konsantrasyon ve sürelerindeki uygulamalarda mitotik indeksin (gözlenen tüm mitotik hücreler $\times$ 100/gözlenen tüm hücreler) azaldığı ve kromozom aberasyonlarının (yapışıklık, köprüler, köprü+fragment, vagrant kromozomlar, c-metafaz, c-anafaz, multipolar anafaz, fragment, mikronükleus vb.) arttığı belirlenmiştir.

Tridemorph fungusitinin *Allium cepa* meristem hücrelerinde mitozu baskıladığı ve bu etkinin konsantrasyon ve süreye bağlı olarak arttığı gözlenmiştir (Cortes et al. 1982). Bu fungusitin güçlü bir c-mitoz ajanı olduğu ve buna ilaveten, multipolar anafaz, kromozom kontraksiyonu, anormal kromozom dağılımı ve mikronükleus oluşumlarına da neden olduğu bildirilmiştir (Cortes et al. 1982).

Rank ve Nielsen (1997), *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU), maleic hydrazide (MH), sodium azide (NaN_3) ve ethyl methanesulfonate (EMS) kimyasallarının genotoksik etkilerini *Allium* anafaz-telofaz kromozom aberasyon testi ile belirlemiştir. Bütün kimyasallar, kromozom aberasyonlarını istatistiki olarak önemli düzeyde teşvik etmişlerdir. Pozitif etkiyle en düşük dozların sıralaması şu şekildedir: NaN_3 (0.3 ppm) < MH (1 ppm) < MNU (41 ppm) < EMS (100 ppm). *Allium* testinde MH, MNU, NaN_3 ve EMS için bulunan değerler aynı kimyasalların kullanıldığı diğer bitki (*Arabidopsis*, *Vicia*, *Tradescantia*) testlerinde bulunan değerlerle kıyaslanmış, MH ve MNU için sonuçlar aynı oranda bulunurken, NaN_3 ve EMS değerleri *Allium* testinde daha düşük oranda bulunmuştur. *Allium* testinde, mutajenite testinde pozitif kontrol olarak kullanılan MMS (metil metanosülfonat)'nin kromozom aberasyonlarınının teşvikinde EMS'den on kat daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaya göre maleic hydrazide'in mutajenik ve klastojenik etkileri teşvik eden konsantrasyonlarda toksik olmayan yüksek reaktif alkilasyon etmeni olduğu bildirilmiştir (Rank and Nielsen 1997).

Alfa-siyano pyrethroid insektisitlerinden cypermethrin (CYP) ve fenvalerate (FEN) insektisitlerinin ticari formülasyonlarının sitogenetik etkileri *Allium cepa* kök meristem hücrelerinde değerlendirilmiştir (Chauhan et al. 1999). *Allium* kök büyümesi testi ile EC₅₀ değerleri CYP için 10 mg/L ve FEN için 14 mg/L belirlenmiş ve test konsantrasyonları olarak EC₅₀ değeri, yarısı ve iki katı kullanılmıştır. Her iki bileşik, konsantrasyona bağlı olarak mitotik indeksi önemli düzeyde inhibe etmiş ve kromozom aberasyonlarını 6 ve 24 saat uygulamalarında teşvik etmiştir. Her iki bileşikle teşvik edilen aberasyonların tipleri, CYP uygulamasında gözlenen kromozomların eşit olmayan dağılımı (non-disjunction) ve mikronükleuslu hücrelerin teşviki dışında hemen hemen benzer bulunmuştur. CYP'ye maruz bırakılan hücrelerdeki aberant hücrelerin sıklığı FEN'e maruz bırakılan hücrelerdekinden daha fazla olduğundan daha toksik bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarla uyumlu olan bu incelemeler alfa-siyano pyrethroid insektisitlerin genotoksik etkilerinin birincil mekanizmasının iğ ipliği hasarı olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte, kromozom kırıklarının yüzdesi bu bileşiklerin klastojenik potansiyelini belirtmektedir (Chauhan et al. 1999).

Bir biyopestisit olarak kullanılan Azadirachtin *Meliaceae* familyasından *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) bitkisinden elde edilmektedir (Schmutterer and Ascher 1987). Azadirachtin'in yaprak, tohum çekirdeği ve tohum kabuğu sulu ekstraktlarının farklı konsantrasyonları, *Allium cepa* kök meristemlerinin mitotik aktivitesini 24 ve 48 saat uygulamalarında inhibe etmiştir (Soliman 2001). Neem bileşenlerinin DNA sentezini (DNA/nükleoprotein dengesi) etkilediği ve ardından mitotik inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Neem tohum kabuğu ekstraktının hücre bölünmesini inhibe etme yeteneği en az iken, tohum çekirdeği ekstraktının daha çok etkili olduğu bulunmuştur. Faz indeks verilerinin analizi, tüm muamelelerin ortalama profaz yüzdesini azalttığı, metafaz ve ana-telofazların yüzdelarını kontroldekilere göre arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca ekstraktlar, *Allium cepa*'nın bölünmeyen hücrelerinde interfaz safhasında gözlenen mikronükleus ve multinükleus hücreleri ile bölünen hücrelerinde gözlenen köprüler, yapışıklık, düzenlenmemiş (non-kongresyon) metafaz, vagrant, poliploidi ve düzensiz ana-telofaz gibi farklı kromozom aberasyonlarına neden olmuştur. Köprüler bölünen

hücrelerde en sık görülen aberasyon tipidir. Neem tohum çekirdeği ekstraktının, neem yaprak ekstraktı ve neem tohum kabuğu ekstraktından daha fazla kromozom aberasyonlarına neden olduğu kanıtlanmıştır. Bundan dolayı, neem ekstraktlarının daha dikkatli bir şekilde test edilene kadar dahili tıbbi amaçlarla da kullanılmaması gerekmektedir. İnsan sağlığı için farklı test sistemlerinde genetik toksikolojik etkilerinin çok daha ciddi değerlendirilmesi gerekmektedir (Soliman 2001).

Chauhan vd. (2001), *Allium sativum* ile yaptıkları çalışmada kullanılan isoproturon herbisitinin test konsantrasyonlarını, herbisitinin EC_{50} değerini belirleyerek seçmişlerdir. Kök uçları 6 ve 24 saat için farklı isoproturon konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve EC_{50} değeri kök büyümesi için 70.8 ppm olarak belirlenmiştir. İsopturon herbisiti, kök büyümesinde gecikmeye neden olmasının yanında, köklerde sertleşme ve renk solukluğu gibi morfolojik değişikliklere de neden olmuştur. *Allium sativum* kök uçlarının, EC_{50} değerini de içeren çeşitli isoproturon konsantrasyonlarına (35-280 ppm) maruz bırakılması konsantrasyona bağlı olarak 6 ve 24 saatlik uygulamalarda mitotik indeksi önemli düzeyde azaltmış, mitotik aberasyonlar ve kromozom kırıklarını da teşvik etmiştir (Chauhan et al. 2001).

Amin (2002), ürünlerin kültüre alınması için ıslah edilen alanların sulanmasında sıradan taze suyla tam bir seyreltmeden sonra yeni atık suyun kullanımına bakış açısı sağlamak amacıyla atık su örneklerinin genotoksitesini *Allium cepa* kromozom aberasyonu analiziyle incelemiştir. Fabrikadan alınan işlenmiş ve işlenmemiş atık su örnekleri ve seyreltik çözeltilerinin mitotik indeksi azalttığı ve bölünen ve bölünmeyen hücrelerin aberasyon oranını kontrole göre önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Her iki atık su örneğinin de (işlenmiş ve işlenmemiş) DNA ve proteinlerle etkileşimleri aracılığıyla kromozom aberasyonlarını teşvik ederek kromozom yapısal bozukluklara ve/veya hücre hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Amin 2002).

Pentachlorophenol (PCP), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ve 2-chloro-2,6-diethyl-N-(butoximethyl) acetanilid (butachlor)'in genotoksitesi test edilmiş ve c-mitoz, yapışıklık, kromozom kırıkları ve mitotik indeks (MI) belirlenmiştir (Ateeq et al. 2002). 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarında (5-20 ppm) çengel uç, c-tümörleri ve kırılan kökler gibi 2,4-D'ye özgü morfolojik değişiklikler saptanmıştır. Bu anormallikler, PCP ve butachlor uygulanmış gruplarda belirlenmemiştir. Bununla birlikte, PCP'nin yüksek konsantrasyonlarında kök dejenere olmuştur. Mitotik indeks 2,4-D için %14.32 ve PCP için %19.53 iken butachlor için belirlenen oran (%71.6) kontrol değerine yakın bulunmuştur. Tüm kimyasallar kromozom aberasyonlarını önemli seviyede teşvik etmiştir ($P<0.05$). En yüksek kromozom aberasyon frekansı (%11.90) 3 ppm PCP'de gözlenmiştir. Fazla sayıdaki c-anafazları, butachlorun potansiyel iğ iplikleri inhibitörü olarak etki ettiğini gösterirken kırıklar, köprüler, yapışmalar ve vagrantlar (lagard) potansiyel bir klastojen olarak gösterilen PCP'de çok sıklıkla rastlanan aberasyonlardır (Ateeq et al. 2002).

Nehir suyu ve atık suların toksisite taramasında ve çevresel denetlemede standart bir metod olarak önerilen *Allium* testi, Sandup bölgesinde Shawa, Meet El Akrad, Telbana ve Bergay yerleşim yerlerinden toplanan su örneklerinin toksisitesini değerlendirmek için kullanılmıştır (El-Shahaby et al. 2003). Sitotoksite seviyesinin *in situ* izlenmesi için meristem hücrelerindeki mitotik bölünmenin inhibisyonu ve genotoksiteyi test etmek için mitotik hücrelerdeki kromozom aberasyonları ve interfaz hücrelerindeki mikronükleus varlığı analiz edilmiştir. Kontrole göre kanalizasyon suları, önemli düzeyde kromozom aberasyonu ve mikronükleus oluşumlarına neden olmuştur. Soğan kök ucu meristeminde aberant metafaz, anafaz ve telofaz hücreleri, atık su örneklerinin yüksek derecede mutajenik olduğunu göstermektedir (El-Shahaby et al. 2003).

Atrazine, ortamda uzun süre yıkılmadan kalan, insan sağlığı ve ekolojik riskleri nedeniyle çalışılan, uluslararası revizyon programına konu olmuş seçici bir triazine herbisitidir. Atrazine herbisitinin *Allium cepa* kök meristem hücrelerinde konsantrasyonun artışına bağlı olarak somatik kromozom aberasyonlarının toplam

sayısında bir artmaya neden olduğu, ancak bu artmanın sadece en yüksek test konsantrasyonunda (5 µg/L) önemli düzeyde olduğu bildirilmiştir (Bolle et al. 2004). Bu çalışmada, yapısal kromozom hasarları analizinde, öncül lezyonlar olarak kromozom kırıklarının teşvik edildiği ve kromozom kırığı içeren hücrelerin yüzdesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Kromozom kırıklarında artma, 1 ve 5 µg/L test konsantrasyonlarında önemli düzeyde belirlenmiştir (Bolle et al. 2004).

Depolama sırasında sebze tomurcuklarının büyüme düzenleyicisi olan maleic hidrazide herbisitinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücreleri üzerine etkisi araştırılmıştır (Marcano et al. 2004). Kimyasalla teşvik edilen *Allium cepa* kök uçlarında, farklı uygulama süresi (0, 4, 8, 12, 24 ve 48 sa) ve konsantrasyonlarında (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} ve 10^{-3} M) meydana gelen mitotoksik ve klastojenik etkiler belirlenmiştir. Maleic hidrazide'in konsantrasyonu ve uygulama süresinin artışıyla birlikte mitotik indekste bir inhibisyon gözlenmiştir. Tüm konsantrasyonlarda 12 iki saat ve üzerindeki uygulama periyotlarında yapışıklık, anafaz köprüleri, kromozom kırıkları ve mikronükleus tipi kromozom anormalliklerinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Marcano et al. 2004).

Avenoxan herbisitinin *Allium cepa*'nın mayotik kromozomları ve polen verimsizliği üzerine sitogenetik etkileri çalışılmıştır (Kaymak and Muranli 2005). *Allium cepa* kök ucu meristemleri avenoxan herbisitinin %0.1, %0.2, %0.4'lük konsantrasyonlarına 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle maruz bırakıldığında, kontrole göre tüm uygulamalarda anormal hücrelerin sayısında belirgin bir şekilde artma belirlenmiştir. Herbisit ile teşvik edilen anormallikler yapışıklık, köprüler, lagardlar, univalentler, quadrivalentler ve mikronükleustur. Avenoxan herbisitinin polen verimsizliğine de neden olduğu ve bu verimsizliğin kromozom aberasyonlarındaki artışla paralel olduğu bildirilmiştir (Kaymak and Muranli 2005).

Quercetin, serbest radikallerin temizlenmesi ve antioksidan aktivitesi gibi birçok kimyasal ve biyolojik aktiviteye sahip yaygın bir bitki flavonoididir. Mastrangelo

vd. (2006), atrazine ile teşvik edilen kromozom kırıklarına karşı quercetin'in koruma sağlayıp sağlayamayacağını araştırmışlardır. *Allium cepa* testinde, quercetin'in 0.1-20 µg/mL konsantrasyonları toksisite veya klastojenik etkiye neden olmamıştır. Daha sonra 2.5, 5.0 ve 7.5 µg/L atrazinin klastojenitesi üzerine 0.5 ve 5 µg/mL quercetin'in etkileri değerlendirilmiştir. 0.5 µg/mL quercetin 7.5 µg/L atrazine ile teşvik edilen toplam aberasyonların sıklığını önemli düzeyde azaltırken, quercetin'in her iki konsantrasyonu da 7.5 µg/L atrazine ile teşvik edilen fragmentlerin sıklığını önemli düzeyde azaltmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, quercetin gibi bitki flavonoidlerinin atrazinin genotoksik etkilerine karşı koruma sağlayabileceğini göstermektedir (Mastrangelo et al. 2006).

Bu araştırmada, quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin toksik ve sitotoksik etkileri incelenmiştir:

- a) *Allium cepa* kök büyümesi inhibisyonu testi ile etkili konsantrasyon değeri (EC_{50}) belirlenmiştir.
- b) Kontrol (distile su), QPE herbisitinin $EC_{50}/2$, EC_{50} ve $2 \times EC_{50}$ konsantrasyonlarında 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle büyütülen *Allium cepa*'nın kök ucu meristem hücrelerinde mitotik indeks, kromozom aberasyonları ve mikronükleus oluşumları değerlendirilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 MATERİYAL

3.1.1 Bitki Materyali

Bu araştırmada, ticari olarak satılan *Allium cepa* L. (mutfak soğanı) ($2n=16$) kullanılmıştır. Kolay ve ucuz elde edilmesi, her zaman kök oluşturma yeteneğine sahip olması ve dolayısıyla kök ucu meristem bölgesinden mitotik hücre elde edilebilmesi, kromozom sayısının az ve kromozom boyutlarının büyük olması nedeniyle kimyasalların toksik etkilerinin belirlenmesi için birçok araştırmada kullanılmıştır. Diğer taraftan, bir kimyasalın olumsuz etkisini belirlemede memeli test sistemleriyle de büyük bir korelasyon göstermesi nedeniyle bu araştırmada *Allium cepa* bitki materyali olarak seçilmiştir.

3.1.2 Herbisit Materyali

Bu araştırmada, organik bir herbisit olan quizalofop-P-etil (quizalofop-P-ethyl) fenoksi bileşiği kullanılmıştır. Bu herbisite ilişkin bazı bilgiler aşağıda verilmiştir (www.herbicides.en.ec21.com).

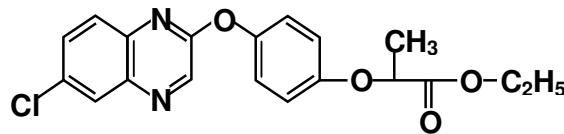
Ticari adı: Ticari olarak quizalofop-P-etil içeren ürünlerin ticari adları Assure II, Pilot Super, Targa D+ ve Targa Super'dir. Bileşiğin benazolin ve clopyralid gibi diğer herbisitlerle formülasyonları bulunmaktadır.

Sinonimleri: Quizalofop ethyl ester; DPX-Y6202; EXP-3864; FBC-32197; ethyl (R)-2-[4-[(6-chloro-2-quinoxalinyloxy]phenoxy] propionate

CAS No: 100646-51-3

Molekül ağırlığı: 372.80 g/mol

Kimyasal ve Yapısal formülü: $C_{19}H_{17}ClN_2O_4$



Şekil 3.1 Quizalofop-P-etil'in yapısal formülü (www.herbicides.en.ec21.com)

3.2 METOT

3.2.1 Test Materyalinin Hazırlanması

Soğanlar kullanılmadan önce serin, kuru ve havalandırılan ortamda muhafaza edilmiştir. Denemelerde yaklaşık 25-30 mm çapında ve 3-5 g ağırlığında soğanlar kullanılmıştır. Köklendirme denemelerinden önce soğanların tabana yakın dış kabukları soyulmuş ve kök primordiyalarına zarar verilmeksizin kuru kökler dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

3.2.2 Etkili Konsantrasyon (EC₅₀) Değeri ve Test Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Quizalofop-P-etil herbisitinin sitogenetik etkilerinin çalışılmasında kullanılacak etkili konsantrasyon (EC₅₀) değeri ve buna bağlı diğer test konsantrasyonlarının (EC₅₀/2 ve 2×EC₅₀) belirlenmesinde *Allium* kök büyümesi inhibisyonu testi kullanılmıştır. 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) 96 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Her 24 saatte bir çözeltiler yenilenmiştir. Denemeler, 22±2°C sıcaklıkta ve laboratuvarın direkt güneş ışığı almayan kısmında gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve herbisit gruplarının her biri için homojen köklenmiş 5'er soğan kullanılmıştır. Etkili konsantrasyon (EC₅₀) değeri bulununcaya kadar aşağıdaki denemeler gerçekleştirilmiştir:

I. Deneme:

a) Kontrol:

dH₂O (24 sa)→dH₂O (96 sa)

b) Herbisit uygulamaları:

dH₂O (24 sa)→Quizalofop-P-etil [5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 ppm (96 sa)]

II. Deneme:

a) Kontrol:

dH₂O (24 sa)→ dH₂O (96 sa)

b) Herbisit uygulamaları:

dH₂O (24 sa)→Quizalofop-P-etil [1.0, 3.0, 5.0, 7.0 ve 10 ppm (96 sa)]

III. Deneme:

a) Kontrol:

dH₂O (24 sa)→ dH₂O (96 sa)

b) Herbisit uygulamaları:

dH₂O (24 sa)→ Quizalofop-P-etil [1.0, 1.25, 1.50, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0 ppm (96 sa)]

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 × 10 kök). Ortalama kök uzunluğunu kontrole göre %50 azaltan konsantrasyon değeri etkili konsantrasyon (EC₅₀) değeri olarak tanımlanmıştır. Birinci denemede kullanılan konsantrasyonlarda kök uzunluğu ortalama değerlerinin, kontrolün yarısı kadar bile olmamasından dolayı konsantrasyonlar azaltılarak denemeler tekrar edilmiştir. Üçüncü deneme sonunda yaklaşık etkili konsantrasyon (EC₅₀) değeri olarak belirlenen 1.5 ppm'in uygulandığı soğanlarda kök uzunluğunun kontrol uygulamasına göre yaklaşık %50 azaldığı belirlenmiştir.

3.2.3 Kromozom Aberasyon Testi

Allium cepa'nın kök ucu meristem hücrelerinin hücre döngüsünün 24 saat olduğu bildirilmiştir (Kihlman 1971). Bu durum dikkate alınarak, mitotik indeks ve kromozom aberasyonları için herbisit uygulama süreleri 24, 48, 72 ve 96 sa olarak seçilmiştir. Distile suda 24 saat süreyle bekletilen soğanlardan homojen uzunluktaki köklere sahip soğanlar, etkili konsantrasyon (EC₅₀=1.5 ppm), yarısı (EC₅₀/2=0.75 ppm) ve iki katı (2×EC₅₀=3 ppm) olan herbisit konsantrasyonlarına 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Her süre için ayrı bir kontrol

grubu hazırlanmıştır. Distile su ile hazırlanan herbisit çözeltileri 48, 72 ve 96 saatlik uygulamalarda her 24 saat sonunda yenilenmiştir. Her muamele için 6'şar adet soğan kullanılmıştır. Uygulamalar sonunda, en zayıf kök gelişimi gösteren bir soğan uzaklaştırılmış ve fiksasyon, boyama ve daimi preparasyon için kalan 5 soğanın kök uçlarından örnekleme yapılmış ve her soğana ait kökler ayrı bir tüpe konulmuştur. Soğandaki en yüksek mitoz sıklığının sabah saat 6:00 ile 9:00 arasında elde edilmesinden dolayı (Sharma 1983) kök ucu materyallerinin örnekleme sabah saat 7:00-8:00 arasında tamamlanmıştır.

3.2.3.1 Fiksasyon, Hidroliz, Boyama ve Daimi Preparasyon

Fiksasyon

Her bir uygulama süresi sonunda soğan kök ucundan itibaren yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda kesilen materyaller Carnoy's fiksatifine (3 kısım %95'lik etanol : 1 kısım glasiyal asetik asit) alınarak 24 saat +4°C'de tespit edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra kökler kullanılıncaya kadar %70'lik alkol içerisinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Hidroliz

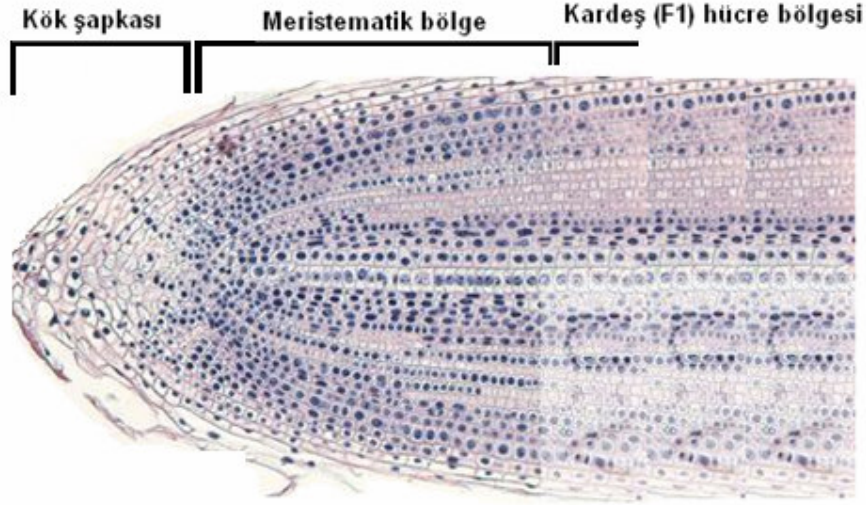
Meristem dokusu hücrelerini birbirlerinden ayırıp mikroskopik incelemelerde hücrelerin daha iyi gözlenebilmelerini sağlamak amacıyla kökler %70'lik alkol içerisinde çıkartıldıktan sonra 1N HCl içerisinde alınarak 60°C sıcaklıktaki su banyosunda 7 dakika hidroliz edilmiştir.

Boyama

Hidroliz işleminden sonra kökler dH₂O içerisinde alınarak, her 5 dakikada bir suyu yenilenmek üzere, 15 dakika için bekletilmiştir. Buradaki amaç HCl'nin etkisini durdurmaktır. Daha sonra kökler bazik fuksin ile hazırlanmış Feulgen boyası içine alınarak oda sıcaklığında bir saat boyanmıştır (Elçi 1994).

Daimi Preparasyon

Boyanmış olan kök lam üzerine alınmıştır. Boyanmanın en yoğun olduğu yaklaşık 1-2 mm uzunluğundaki kök ucu dokusu kesilmiş ve geriye kalan kısım atılmıştır. Kök gelişimini sağlayan mitotik bölünmelerin olduğu meristematik bölge kök şapkası ile F₁ kardeş hücreleri arasındadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Kök şapkası, meristem ve kardeş (F1) hücre bölgelerini gösteren *Allium cepa* kökünün boyuna kesitinin fotomikrografı (Ma et al. 1995'den değiştirilerek)

Yaklaşık 1-2 mm'lik kök ucu üzerine %45'lik glasiyal asetik asit damlatılmış ve sonra üzerine lamel kapatılarak ezme-yayma preparat yapılmıştır. Preparatlar alkol değiş tokuşu yöntemiyle kanada balzamu kullanılarak daimi peraparat haline getirilmiştir (Elçi 1994).

3.2.4 Mikroskobik Analizler

Daimi preparatlar herbisit konsantrasyonu ve maruz kalma süresi temelinde her muamele için 5 soğan olacak şekilde kodlanmıştır. Olympus marka mikroskopta 100X büyütmede incelenmiştir. Mikroskobik analizler; mitotik indeks, anafaz ve telofazdaki kromozom aberasyonları ile interfaz hücrelerindeki mikronükleusların belirlenmesini içermektedir. Kök ucu meristem hücrelerine ait mitotik indeksin belirlenmesinde, her uygulama için hazırlanan 5 preparatın her birinde 1000'in

üzerinde hücre olmak üzere toplam yaklaşık 5000-6000 hücre içinde bölünen hücreler sayılırken ($MI = \text{mitotik hücre sayısı} \times 100 / \text{toplam hücre sayısı}$), aynı anda her preparat için 1000'in üzerinde gözlenen tüm interfaz hücrelerinde de mikronükleus oluşumları belirlenmiştir. Mitotik indeks hesaplamalarından sonra, preparatların incelenmesine yeniden başlanmış ve bu sefer kromozom aberasyonları her preparatta 100 anafaz veya telofaz hücresi olmak üzere her uygulamada toplam 500 anafaz veya telofaz hücresi incelenerek belirlenmiştir. Anafaz-telofaz hücrelerinde belirlenen kromozom aberasyonları şunlardır: Yapışıklık, köprüler, vagrant kromozomlar, c-anafaz, multipolarlık ve fragment oluşumları. Belirlenen kromozom aberasyonları ve mikronükleus oluşumları 10×100 büyütmede Kodak CX-6630 dijital fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

3.2.5 Verilerin İstatistikî Analizleri

Biyolojik testlerin her birinden elde edilen verilere varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve SPSS v. 10.0 paket programı kullanılarak istatistikî analizler yapılmıştır. Veri ortalamaları arasındaki önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıklar, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 *Allium cepa* Kök Büyümesi İnhibisyonu Testi

Toksisite testi denemelerinde, *Allium cepa*'nın kök büyümesi inhibisyonunu belirlemek için quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin sırasıyla 5-50, 1-10 ve 1-3 ppm konsantrasyon serileri kullanılmıştır. Birinci (5-50 ppm) ve ikinci (1-10 ppm) seri denemelerde 5 ppm ve üzerinde kök büyümesi gözlenmemiştir. Bir gün süreyle distile suda köklendirilen soğanların kök uzunluğu ile bir gün köklendirildikten sonra 96 saat süreyle 5 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda bekletilen soğanların kök uzunluğu arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Kontrol grubu olarak kullanılan distile sudaki büyümeye göre %50 azalmanın olduğu konsantrasyona 1-3 ppm aralığında ulaşılmıştır. Bu konsantrasyon aralığındaki denemeye ait köklenmiş soğanlara ait görüntü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Quizalofop-P-etil herbisitinin farklı konsantrasyonlarının *Allium cepa* kök büyümesi üzerine etkisi

QPE konsantrasyonlarının bir fonksiyonu olarak % kök büyümesinin doza tepkisi Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Kök büyümesinin yaklaşık %50 azalmasına neden olan QPE konsantrasyonu (EC_{50}), 1.5 ppm veya log 0.176 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, mitotik indeks, mikronükleus ve anafaz-telofaz kromozom aberasyon tiplerinin belirlenmesi için herbisit konsantrasyonları EC_{50} değeri (1.5 ppm), yarısı (0.75 ppm) ve iki katı (3 ppm) olarak alınmıştır.

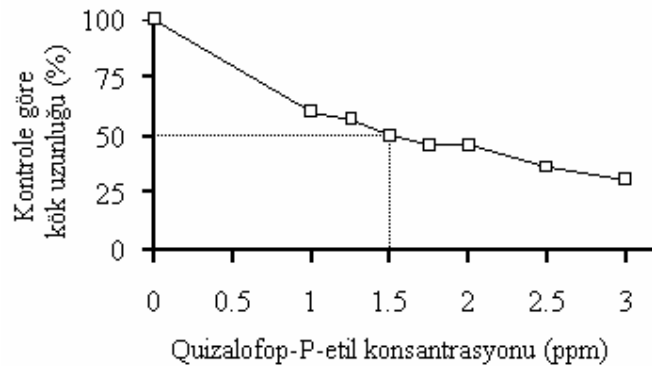
QPE konsantrasyonu uygulamalarında kök uzunluğu kontrole göre önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmıştır (Çizelge 4.1). Kök uzunluğu bakımından, uygulanan 1-1.25 ppm arasındaki ve 1.75-2 ppm arasındaki farklar önemsizdir.

Çizelge 4.1 Quizalofop-P-etil herbisitinin *Allium cepa* kök büyümesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (ppm)	Kök uzunluğu (cm) ($X \pm SH$)**	Kontrole göre kök uzunluğu (%)	Kontrole göre azalma (%)
0	5.34 $\pm$ 0.18 a*	100	-
1	3.19 $\pm$ 0.04 b	59.66	40.34
1.25	3.02 $\pm$ 0.05 b	56.63	43.37
1.5	2.75 $\pm$ 0.06 c	51.50	48.50
1.75	2.42 $\pm$ 0.11 d	45.22	54.78
2	2.42 $\pm$ 0.06 d	45.32	54.68
2.5	1.92 $\pm$ 0.05 e	35.91	64.09
3	1.62 $\pm$ 0.08 f	30.38	69.67

* Sütundaki farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre ortalamalar arasındaki farkın önemli düzeyde olduğunu ifade etmektedir ($P<0.05$).

** $X \pm SH$ = Ortalama $\pm$ Standart Hata



Şekil 4.2 *Allium cepa* kök büyüme inhibisyonu testine göre belirlenen quizalofop-P-etil'in EC_{50} değeri

4.2 Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Mitotik İndeks Üzerine Etkisi

Allium cepa kök ucu meristem hücrelerinin mitotik indeksi üzerine kontrol (dH₂O) ve quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin farklı konsantrasyonları [0.75, 1.5 ve 3 ppm) ile bu konsantrasyonlara maruz kalma sürelerinin (24, 48, 72 ve 96 saat) etkisi incelenmiştir.

Kontrol grubu ve QPE herbisiti konsantrasyonlarında tüm uygulama sürelerine ait mitotik indeks değerlerinin (%) ortalaması, konsantrasyonun artmasına bağlı olarak mitotik indeksin önemli düzeyde ($P<0.05$) azaldığını göstermiştir (Çizelge 4.2). Mitotik indeks değerleri, herbisit konsantrasyonunun artışına göre sırasıyla %9.40 (kontrol), %7.46 (0.75 ppm), %6.39 (1.5 ppm) ve %4.01 (3 ppm) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Kontrol grubunda büyütülen kök meristemlerinin mitotik indeks değerleri %8.43'ten 10.37'ye aralanmıştır (ortalama %9.40). Kontrolde 48 ve 96 saat arasındaki mitotik indeks değeri önemli düzeyde iken, diğer süreler arasındaki farklar önemsizdir (Çizelge 4.2).

QPE herbisitinin 0.75 ppm konsantrasyonunda mitotik indeks değerleri, %5.84'ten 8.66'ya aralanmıştır (ortalama %7.46). Mitotik indeks değerleri arasındaki fark 24 ve 48 saat arasında önemsizdir. Bu sürelerle göre 72 saatte mitotik indeks değeri önemli düzeyde artarken, 96 saatte önemli düzeyde azalmıştır (Çizelge 4.2).

QPE herbisitinin 1.5 ppm konsantrasyonunda mitotik indeks değerleri, %5.04'ten 7.86'ya aralanmıştır (ortalama %6.39). Mitotik indeks değerleri arasındaki fark 24-48 saat ve 72-96 sa arasında önemsizken, 24 ve 48 saate göre 72 ve 96 saatte önemli düzeyde azalmıştır (Çizelge 4.2).

QPE herbisitinin 3 ppm konsantrasyonunda mitotik indeks değerleri, %2.19'dan 7.01'e aralanmıştır (ortalama %4.01). En yüksek mitotik indeks değeri (%7.01)

48 saatte saptanmıştır. Bu süredeki değer, diğer sürelerle göre karşılaştırıldığında önemli düzeyde yüksektir. Diğer taraftan 24, 72 ve 96 saat arasındaki farklar önemsizdir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Quizalofop-P-etil herbisitinin *Allium cepa* kök ucu hücrelerinin mitoz bölünmesi üzerine etkisi

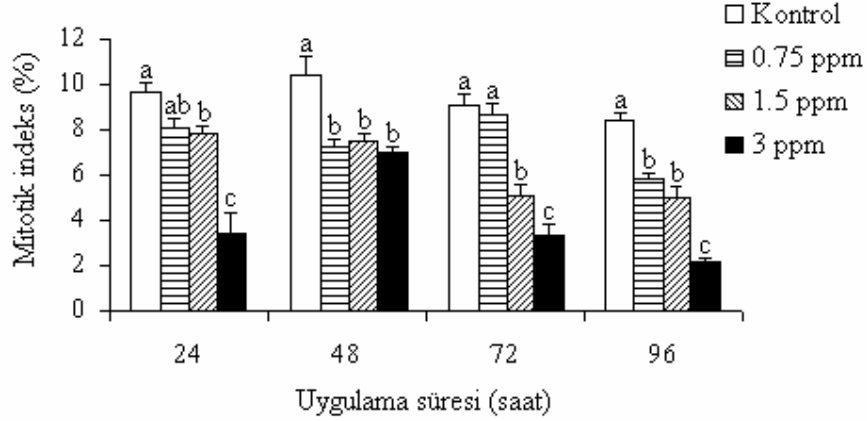
Uygulama		İncelenen toplam hücre sayısı	Bölünen toplam hücre sayısı	Mitotik indeks (MI) (%) (X $\pm$ SH)**
Konsantrasyon (ppm)	Süre (saat)			
Kontrol	24	5670	550	9.70 $\pm$ 0.37 ab*
	48	5731	597	10.37 $\pm$ 0.92 a
	72	5568	508	9.12 $\pm$ 0.46 ab
	96	6038	510	8.43 $\pm$ 0.26 b
Ortalama				9.40 $\pm$ 0.31 A*
0.75	24	5599	454	8.09 $\pm$ 0.41 a
	48	5485	399	7.27 $\pm$ 0.32 a
	72	5600	485	8.66 $\pm$ 0.43 b
	96	5491	321	5.84 $\pm$ 0.22 c
Ortalama				7.46 $\pm$ 0.29 B
1.5	24	5989	467	7.86 $\pm$ 0.33 a
	48	5712	431	7.52 $\pm$ 0.36 a
	72	5416	280	5.15 $\pm$ 0.44 b
	96	5372	271	5.04 $\pm$ 0.47 b
Ortalama				6.39 $\pm$ 0.35 C
3	24	5662	199	3.48 $\pm$ 0.86 a
	48	5614	397	7.01 $\pm$ 0.26 b
	72	5378	180	3.35 $\pm$ 0.51 a
	96	5309	116	2.19 $\pm$ 0.16 a
Ortalama				4.01 $\pm$ 0.48 D

*Sütunlardaki farklı büyük veya küçük harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeyde farkın olduğunu ifade etmektedir (P<0.05).

** X $\pm$ SH = Ortalama $\pm$ Standart Hata

Kök büyümesinin %50 azalmasına neden olan 1.5 ppm (EC₅₀) herbisit konsantrasyonunda mitotik indeks değeri kontrole göre (%) 24, 48, 72 ve 96 saatte önemli düzeyde (P<0.05) azalmıştır (Şekil 4.3). Buna ilaveten, 0.75 ppm ile 1.5 ppm arasında mitotik indeksteki azalma yalnızca 72 saatte önemli düzeydedir. Tüm sürelerde mitotik indeks değerlerinin önemli düzeyde azalmasına neden olan konsantrasyon 3 ppm olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, mitotik indeksteki azalma 24 ve 72 saat sürelerinde kontrole göre yalnızca 0.75 ppm'de önemsiz

bulunmuştur. Tüm herbisit konsantrasyonları arasındaki toplam mitotik indeks bakımından fark yalnızca 48 saatte önemsizdir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Quizalofop-P-etil konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak *Allium cepa* kök ucu hücrelerinin mitotik indeksindeki değişim

4.3 *Allium cepa* Kök Ucu Meristem Hücrelerinde Kromozom Aberasyonları Üzerine Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Etkisi

Quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde neden olduğu bazı anafaz-telofaz kromozom aberasyonları belirlenmiştir. Anafaz-telofaz kromozom aberasyonları, normal anafaz ve telofaz hücreleri ile farklı aberasyon tiplerini içeren anafaz ve telofaz hücreleri sayılarak belirlenmiştir. Bu sayım, her uygulama süresi ve konsantrasyonu için toplam 500 anafaz-telofaz hücresinde yapılırken, 72 ve 96 saatin 3 ppm uygulamalarında sırasıyla 324 ve 69 anafaz-telofaz hücresinde yapılmıştır. Çünkü bu değerler, bu uygulamalara ait preparatların tamamında en fazla belirlenen anafaz-telofaz hücre sayısıdır. *Allium cepa* anafaz-telofaz kromozom aberasyonu testine ait veriler Çizelge 4.3'te verilmiştir.

QPE herbisitinin etkisine bağlı olarak gözlenen anafaz-telofaz kromozom aberasyonları yapışıklık, köprüler, vagrant kromozomlar, c-anafaz, multipolarlık

Çizelge 4.3 Kontrol, QPE konsantrasyonları ile süre etkileşiminde *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde belirlenen kromozom aberasyon tipleri ve oranları

Uygulama		Sayılan hücre	Kromozom Aberasyonları					
Süre (saat)	Konsantrasyon (ppm)		Yapışıklık	Köprü	Vagrant	c-Anafaz	Multipolarlık	Fragment
24	Kontrol	500	0	11	3	2	0	0
	0.75	500	13	18	8	11	3	0
	1.5	500	23	16	20	9	1	1
	3	500	31	26	22	23	0	1
48	Kontrol	500	0	8	0	3	1	1
	0.75	500	22	27	6	6	4	0
	1.5	500	25	19	7	17	1	0
	3	500	54	21	13	13	0	0
72	Kontrol	500	0	9	1	2	0	0
	0.75	500	23	12	12	7	3	0
	1.5	500	23	20	13	13	0	0
	3	324	68	6	11	2	0	1
96	Kontrol	500	0	6	4	2	1	1
	0.75	500	30	33	15	4	0	1
	1.5	500	25	32	21	16	1	0
	3	69	24	2	0	2	0	0
		Toplam	361	266	156	132	15	6
Aberasyon oranı (%)			38.57	28.42	16.67	14.10	1.60	0.64

ve fragment oluşumlarıdır (Çizelge 4.3). Kontrol ve QPE konsantrasyonları ile süre etkileşiminde, her aberasyon tipinin % oranı, bir aberasyon tipine ait verilerin toplamının tüm aberasyon tiplerine ait verilerin toplamına oranı olarak hesaplanmıştır. Buna göre yüksek oranda belirlenen kromozom aberasyonları; yapışıklık (%38.57), köprüler (%28.42), vagrant kromozomlar (%16.67) ve c-anafaz (%14.10) olarak belirlenmiştir. Buna karşın, multipolarlık (%1.60) ve fragment oluşumları (%0.64) daha düşük oranda saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Anafaz-telofaz kromozom aberasyonları arasında en yüksek oranda gözlenen “yapışıklık”tır (Şekil 4.4a). Kontrol uygulamasında yapışıklık belirlenmezken, tüm herbisit konsantrasyonu ve sürelerinde yapışıklık belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Her konsantrasyonda tüm süreler dikkate alındığında, 0.75 ve 1.5 ppm arasında yapışıklık oranındaki fark önemsizken, bu konsantrasyonlara göre yapışıklık oranı 3 ppm’de önemli düzeyde artmıştır (Çizelge 4.4).

Allium cepa kök uçlarında yapışıklıktan sonra en fazla gözlenen diğer anafaz-telofaz kromozom aberasyonu “köprüler”dir (Şekil 4.4b, c, d, e). Her konsantrasyonda tüm süreler dikkate alındığında, köprü oluşumları kontrole göre 0.75 ve 1.5 ppm’de önemli düzeyde artmış; fakat kontrol ile 3 ppm arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.4).

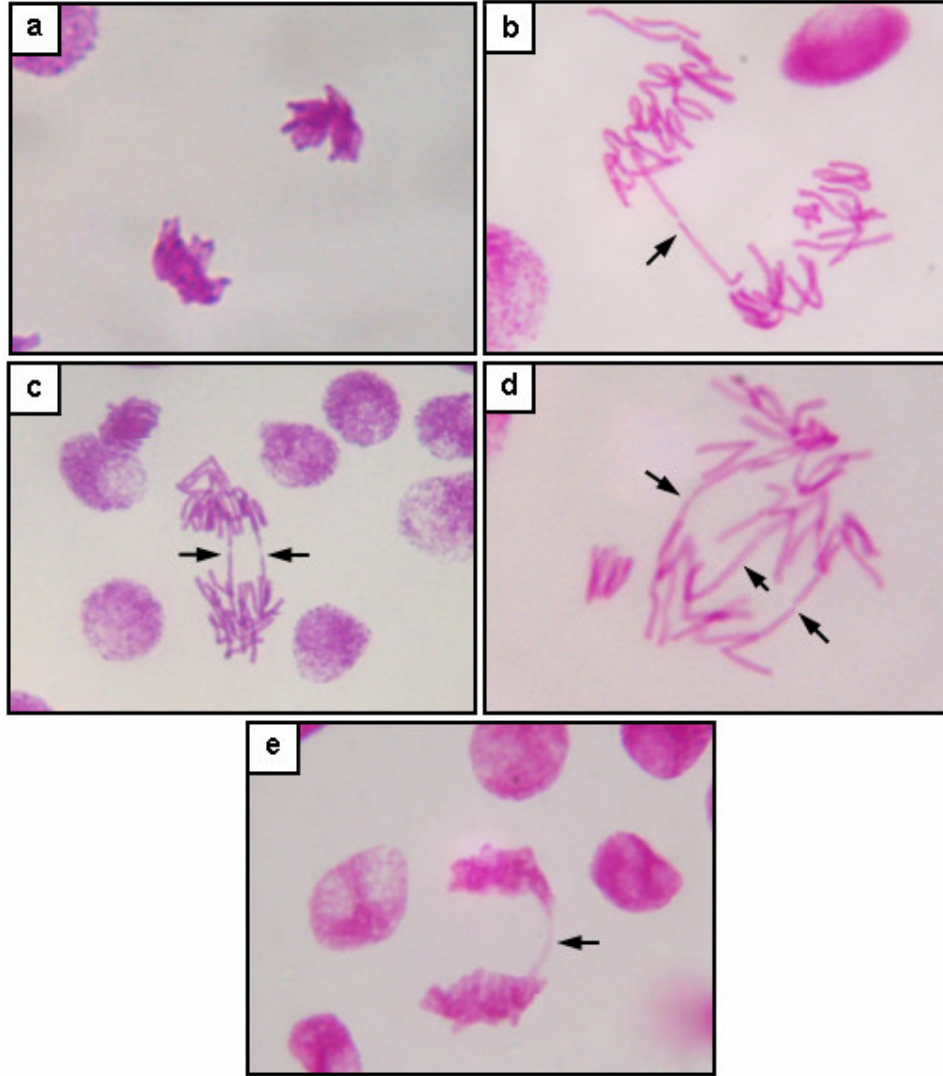
Allium cepa kök uçlarında köprü oluşumlarından sonra en fazla gözlenen ve konsantrasyon artışına bağlı olarak istatistiksel önem testine göre benzerlik gösteren diğer anafaz-telofaz kromozom aberasyonları “vagrant kromozomlar” (Şekil 4.4f, g) ve “c-anafaz” (Şekil 4.4h) aberasyonlarıdır (Çizelge 4.4). Her konsantrasyonda tüm süreler dikkate alındığında, bu aberasyonlar kontrole göre diğer konsantrasyonlarda önemli düzeyde daha fazla belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu aberasyonların en fazla gözlemlendiği konsantrasyon 1.5 ppm olup; bu konsantrasyondaki oranlar 0.75 ppm’dekinden önemli düzeyde fazla iken, 3 ppm ile arasındaki fark önemsizdir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 QPE herbisitinin *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde neden olduğu anafaz-telofaz kromozom aberasyonları

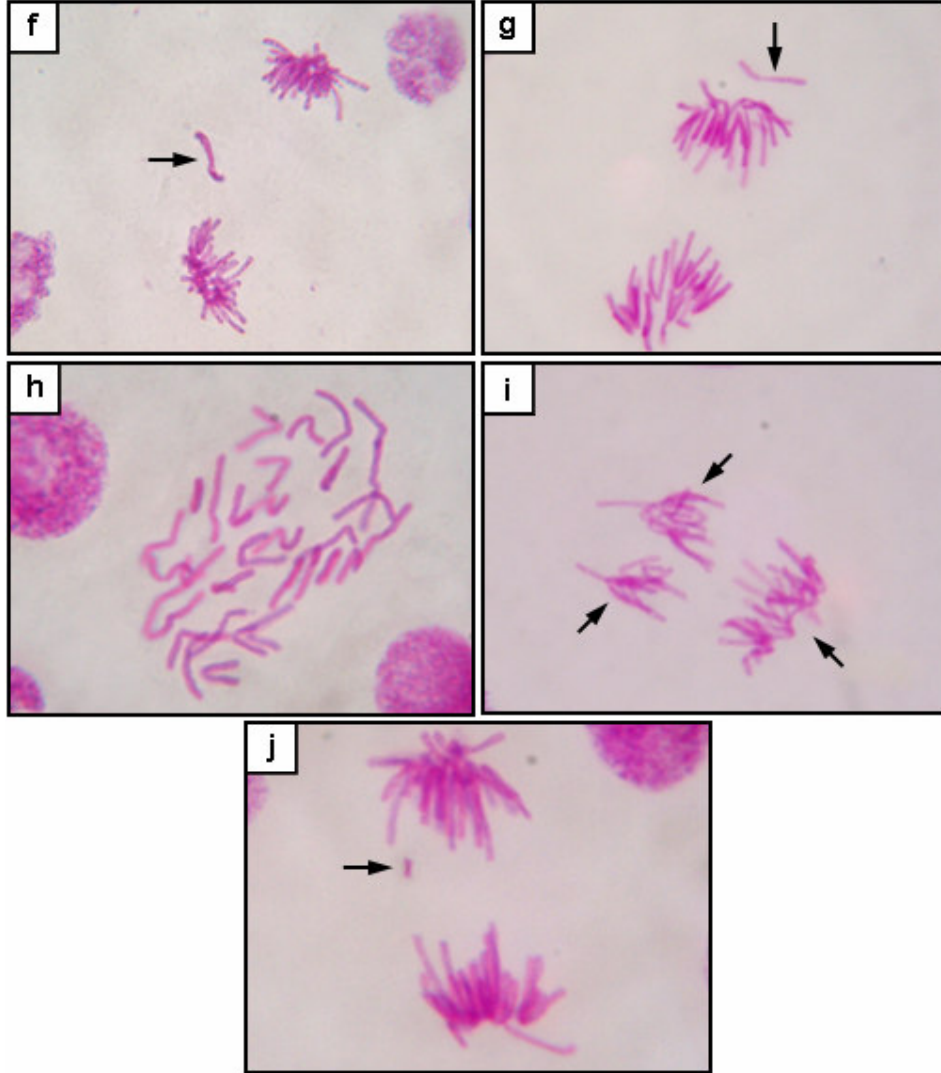
Uygulama		İncelenen hücre sayısı	Anafaz-Telofaz Kromozom Aberasyon Oranları						Toplam aberasyonlar (%) (X ± SH)**
Konsantrasyon (ppm)	Süre (saat)		Yapışıklık	Köprü	Vagrant	c-Anafaz	Multipolarlık	Fragment	
Kontrol	24	500	-	2.20	0.60	0.40	-	-	3.20 ± 0.37 a
	48	500	-	1.60	-	0.60	0.20	0.20	2.60 ± 0.51 a
	72	500	-	1.80	0.20	0.40	-	-	2.40 ± 0.40 a
	96	500	-	1.20	0.80	0.40	0.20	0.20	2.80 ± 0.37 a
Ortalama			-	1.70 ± 0.16 A	0.40 ± 0.13 A	0.45 ± 0.14 A	0.10 ± 0.07 A	0.10 ± 0.07 A	2.75 ± 0.20 A
0.75	24	500	2.60	3.60	1.60	2.20	0.60	-	10.60 ± 1.96 a
	48	500	4.40	5.40	1.20	1.20	0.80	-	13.00 ± 0.45 a
	72	500	4.60	2.40	2.40	1.40	0.60	-	11.40 ± 0.51 a
	96	500	6.00	6.60	3.00	0.80	-	0.20	16.60 ± 0.87 b
Ortalama			4.40 ± 0.38 A*	4.50 ± 0.49 B	2.05 ± 0.27 B	1.40 ± 0.24 B	0.50 ± 0.15 B	0.05 ± 0.05 A	12.90 ± 0.74 B
1.5	24	500	3.80	3.60	4.00	1.80	0.20	0.20	13.60 ± 0.65 a
	48	500	5.00	3.80	1.40	3.40	0.20	-	13.80 ± 1.39 a
	72	500	4.60	4.00	2.60	2.60	-	-	13.80 ± 0.86 a
	96	500	5.00	6.40	4.20	3.20	0.20	-	19.00 ± 1.14 b
Ortalama			4.60 ± 0.24 A	4.45 ± 0.39 B	3.05 ± 0.36 C	2.75 ± 0.28 C	0.15 ± 0.08 A	0.05 ± 0.05 A	15.05 ± 0.72 B
3	24	500	6.20	5.20	4.40	4.60	-	0.20	20.60 ± 2.01 a
	48	500	10.80	4.00	2.60	2.60	-	-	20.00 ± 1.22 a
	72	324	13.60	1.20	2.20	0.40	-	0.20	27.04 ± 1.35 b
	96	69	4.80	0.40	-	0.40	-	-	39.47 ± 1.59 c
Ortalama			8.85 ± 0.89 B	2.70 ± 0.55 A	2.30 ± 0.45 BC	2.00 ± 0.45 BC	-	0.10 ± 0.07 A	26.78 ± 1.94 C

* Sütunlardaki farklı büyük veya küçük harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeyde farkın olduğunu ifade etmektedir (P<0.05).

** X ± SH = Ortalama ± Standart Hata



Şekil 4.4 QPE herbisitinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde teşvik ettiği kromozom aberasyonları. a) Yapışıklık; b) Anafazda tekli köprü; c) Anafazda ikili köprü; d) Anafazda üçlü köprü; e) Telofazda tekli köprü.



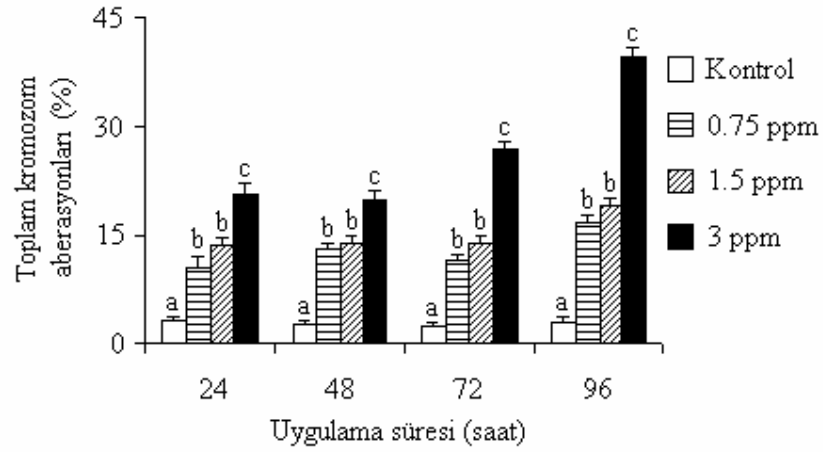
Şekil 4.4 (Devam) QPE herbisitinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde teşvik ettiği kromozom aberasyonları. f) Vagrant (geri kalmış kromozom) g) Vagrant (ileri gitmiş kromozom); h) c-Anafaz; i) Multipolar; j) Fragment.

Allium cepa kök uçlarında düşük oranda gözlenen “multipolar” oluşumları (Şekil 4.4i), 3 ppm’in hiçbir uygulama süresinde gözlenmemiştir. Her konsantrasyonda tüm süreler dikkate alındığında, kontrol ile 1.5 ppm arasında fark belirlenmezken, bu konsantrasyonlara göre 0.75 ppm’de belirlenen multipolarlık oranı önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Kontrol ve herbisit konsantrasyonu uygulamalarında en düşük oranda belirlenen kromozom aberasyonu “fragment” oluşumlarıdır (Şekil 4.4j). Her konsantrasyonda tüm süreler dikkate alındığında, konsantrasyonun artmasına bağlı olarak fragment oluşum oranları arasındaki fark önemsizdir (Çizelge 4.4).

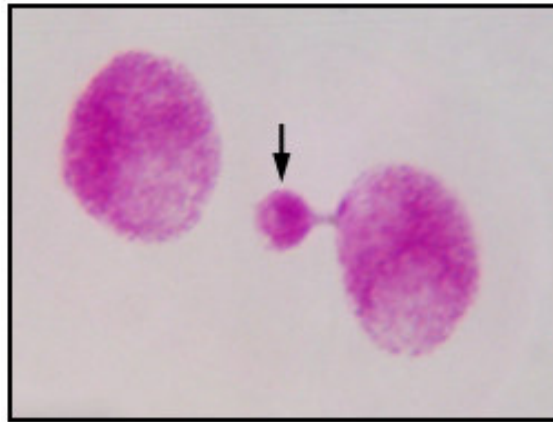
Kromozom aberasyonları (%), her konsantrasyonda sürenin artışına bağlı olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4): Kontrol uygulamasında kromozom aberasyonları (%) bakımından farklı uygulama süreleri arasında belirlenen fark önemsizdir. QPE herbisitinin 0.75 ve 1.5 ppm konsantrasyonlarında kromozom aberasyonlarındaki önemli düzeydeki ilk artma, diğer sürelerle göre 96 saatte belirlenirken, 3 ppm’de 72 saatte belirlenmiştir. Buna ilaveten, 3 ppm’de 96 saat uygulamasında 72 saate göre kromozom aberasyonlarında önemli düzeyde artış saptanmıştır. Diğer taraftan, her konsantrasyonun tüm sürelerinin kromozom aberasyonlarının ortalamasına bakıldığında, kontrole göre herbisit konsantrasyonlarında kromozom aberasyonları (%) önemli düzeyde artarken, konsantrasyonlar arasındaki önemli düzeydeki fark 0.75 ve 1.5 ppm’e göre 3 ppm’de belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

QPE herbisitinin her bir uygulama süresinde konsantrasyonun artışına bağlı olarak kromozom aberasyonlarındaki değişimler benzerdir (Şekil 4.5). Kontrole göre tüm herbisit konsantrasyonlarında önemli düzeyde artma belirlenmiştir ($P < 0.05$). Buna karşılık, 0.75 ve 1.5 ppm herbisit konsantrasyonu arasındaki fark önemsizken, diğer konsantrasyonlara göre 3 ppm’de kromozom aberasyonlarındaki artma önemli düzeydedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Quizalofop-P-etil herbisitinin farklı uygulama konsantrasyonu ve süresinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinin toplam kromozom aberasyonları üzerine etkisi

İnterfazda belirlenen kromozom aberasyonu ise “mikronükleus” oluşumudur (Şekil 4.6). Kontrol ve QPE konsantrasyonlarında, uygulama süreleri arasındaki fark önemsizdir (Çizelge 4.5). Buna karşın, her konsantrasyonda tüm sürelerin ortalaması dikkate alındığında kontrol, 0.75 ve 1.5 ppm arasındaki fark önemsizken, önemli düzeydeki tek fark kontrole göre 3 ppm uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.5).



Şekil 4.6 QPE herbisitinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde teşvik ettiği mikronükleus oluşumu

Çizelge 4.5 Quizalofop-P-etil herbisitinin farklı uygulama konsantrasyonu ve süresinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

Uygulama		İncelenen	Mikronükleus (%)
Konsantrasyon (ppm)	Süre (saat)	interfaz hücre sayısı	(X $\pm$ SH)**
Kontrol	24	5120	0.020 $\pm$ 0.020 a*
	48	5145	0.020 $\pm$ 0.020 a
	72	5522	0.057 $\pm$ 0.023 a
	96	5463	0.038 $\pm$ 0.023 a
		Ortalama	0.034 $\pm$ 0.007 A
0.75	24	5134	0.097 $\pm$ 0.075 a
	48	5086	-
	72	5281	0.058 $\pm$ 0.039 a
	96	5265	0.098 $\pm$ 0.044 a
		Ortalama	0.063 $\pm$ 0.024 A
1.5	24	5060	0.058 $\pm$ 0.024 a
	48	5115	0.124 $\pm$ 0.085 a
	72	5136	0.039 $\pm$ 0.024 a
	96	5198	0.020 $\pm$ 0.020 a
		Ortalama	0.060 $\pm$ 0.024 A
3	24	5528	0.257 $\pm$ 0.234 a
	48	5170	0.260 $\pm$ 0.167 a
	72	5101	0.113 $\pm$ 0.036 a
	96	5193	0.094 $\pm$ 0.061 a
		Ortalama	0.178 $\pm$ 0.070 B

* Sütunlardaki aynı küçük veya büyük harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre ortalamalar arasında önemli düzeyde farkın olmadığını göstermektedir.

** X $\pm$ SH = Ortalama $\pm$ Standart Hata

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Allium cepa'da çevresel kimyasalların toksisite ve genotoksitesini belirlemek için bazı parametreler kullanılmaktadır. Bu parametreler; çimlenme oranı, ortalama kök uzunluğu (24 veya 48 saat uygulamadan sonra), mitotik indeks, faz indeksi (toplam profaz veya metafaz veya anafaz veya telofaz×100/toplam mitotik hücre sayısı), anafaz köprülerinin sıklığı, kromozom fragmentlerinin sıklığı, gözlenen diğer mitotik anormallikler ve mikronükleus sıklığıdır. Ancak çevresel kirleticilerin toksik etkilerini belirlemek için bu parametrelerden bazılarının değerlendirilmesinin yeterli olacağı bildirilmiştir (<http://biology.hamline.edu/bio/Courses/3060cellbio06/Lab/Project%204/tox.htm>). Bu nedenle bu araştırma kapsamında QPE herbisitinin toksik ve sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla ortalama kök uzunluğu, mitotik indeks, anafaz-telofaz kromozom aberasyonları ve mikronükleus oluşumlarının sıklığı gibi parametreler kullanılmıştır.

5.1 Quizalofop-P-Etil Herbisitinin *Allium cepa* Kök Büyümesi Üzerine Etkisi

Allium cepa çevresel kirleticilerin zararlı etkilerine karşı oldukça duyarlı bir bitkidir. *Allium* testi, çevresel tehlikelere neden olan kimyasallar, kirleticiler için hızlı ve ucuz bir tarama yöntemidir ve diğer test sistemleri ile de karşılaştırılabilir sonuçlar sağlamaktadır. Makroskobik ve mikroskobik etkileri arasında iyi bir korelasyon olduğu ve makroskobik etkisinin (kök büyümesinin inhibisyonu) oldukça duyarlı bir parametre olduğu bildirilmiştir (Fiskeşjö 1985). Hücre bölünmesinin inhibisyonu kök büyümesi inhibisyonuna neden olduğundan, mitotik indeks ile kök büyüme oranı arasında bir ilişki vardır (Liu et al. 1992).

Araştırmada, quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen *Allium cepa* kök büyümesi inhibisyonu denemeleri, direkt güneş ışığından uzakta gerçekleştirilmiştir. Çünkü köklerdeki hücre bölünmesi oranındaki değişimi minimuma indirmek için köklerin direkt güneş ışığından korunması gerektiği bildirilmiştir (Evans et al. 1957). Bunun yanı sıra, çalışmamızın toksisite ve genotoksite denemelerinde 24 saat süreyle distile suda köklendirilmiş soğanlar kullanılmıştır. Benzer olarak, kök büyümesi inhibisyonu

alışmalarında bitki materyalleri kimyasallarla muameleden önce 24 veya 48 saat süreyle distile suda köklendirilmiştir (Fiskeşj 1988, Liu et al. 1992, Rank and Nielsen 1997, Grisolia et al. 2005). Buna karşın, Yzbaşıglu (2001), kontrol ile kimyasal uygulamalar arasında kesin bir karşılaştırmanın yapılabilmesi bakımından distile suda kklendirilmeden direkt farklı herbisit konsantrasyonlarına maruz bırakılarak kök büyümesi inhibisyonu testinin yapılması gerekliliğini vurgulamıştır. Araştırmamızda, kök primordiyalarının herhangi bir nedenle zarar görmüş olma ihtimalini ortadan kaldırmak ve olası dormansi durumlarını göz ardı etmemek için farklı QPE konsantrasyonları ile muamele etmeden önce, distile suda 24 saat süreyle homojen olarak köklenmiş soğanların herbisit uygulamalarına maruz bırakılması sağlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, soğanda önceden varolan kurumuş kökler, kök primordiyalarına zarar vermeden uzaklaştırılmış (Grover and Kaur 1999, Soliman 2001) ve muhtemelen dormansi faktörü dikkate alınarak bir yıl önce hasat edilen soğanlar, bir yıl sonra toksisite ve genotoksisite çalışmalarında kullanılmıştır (Rank ve Nielsen 1997).

QPE herbisitinin sitogenetik etkilerinin belirlenmesinden önce, *Allium* kök büyümesi inhibisyonu testi ile etkili konsantrasyon değeri (EC_{50} , kontrole göre kök uzunluğunun %50 azalmasına neden olan konsantrasyon) belirlenmiştir. Çünkü *Allium cepa*'nın kromozomları ve hücre bölünmesi üzerinde çevresel kirleticilerin toksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde “etkili konsantrasyon değeri”nin belirlenmesinin önemli olduğu bildirilmiştir (Fiskeşjo 1985). *Allium* genotoksisite testlerinde kullanılan en yüksek konsantrasyonların EC_{50} değerinin aşağısında olduğu ve en düşük konsantrasyonun hiç toksik etkiye sahip olmadığı veya çok düşük toksik etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Rank 1997). Araştırmamızda kullanılan QPE herbisitinin EC_{50} değeri yaklaşık 1.5 ppm olarak belirlenmiş ve daha sonraki mitotik indeks ve kromozom aberasyonları çalışmalarında bu değerin yanı sıra yarısı ($EC_{50}/2 = 0.75$ ppm) ve iki katı ($EC_{50} \times 2 = 3$ ppm) kullanılmıştır. Benzer birçok araştırmada, genotoksik çalışmalarda kullanılmak üzere çevresel kirleticilerin konsantrasyonlarının belirlenmesi için EC_{50} değeri saptanmıştır (Nielsen and Rank 1994, Rank and Nielsen 1998,

Chauhan et al. 1999, Yüzbaşıoğlu 2001, Ateeq et al. 2002, Saxena et al. 2005, Yıldız vd. 2006). Bu çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve yaklaşık EC₅₀ değerleri Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Bazı çevresel kirleticilerin *Allium cepa* toksisite testi ile belirlenen EC₅₀ değerleri

Kimyasallar	EC ₅₀ Değerleri	Kaynaklar
Danimarka	<u>%</u>	
Belediye atık suyu	100<	
Kimya fabrikası 1	70	
Kimya fabrikası 2	100<	
Kimya fabrikası 3	66	
Kimya fabrikası 4	44	
Metal fabrikası 1	100<	Nielsen and Rank 1994
Metal fabrikası 2	100<	
Petrokimya fabrikası 1	14	
Petrokimya fabrikası 2	100<	
Kağıt fabrikası 1	0.6	
Kağıt fabrikası 2	100<	
Boya fabrikası 1	100<	
Boya fabrikası 2	100<	
	<u>ppm</u>	
Danimarka		
Uygulama fabrikası 1		
1993/1994 sezonu	2850	
1994/1995 sezonu	21720	
1995/1996 sezonu	8.60	
Uygulama fabrikası 2		Rank and Nielsen 1998
1993/1994 sezonu	2590	
1994/1995 sezonu	2400	
1995/1996 sezonu	4430	
Uygulama fabrikası 3		
1993/1994 sezonu	310	
1994/1995 sezonu	230	
1995/1996 sezonu	1000	
Cypermethrin insektisiti	10	Chauhan et al. 1999
Fenvalerate insektisiti	14.25	
Racer herbisiti	80	Yüzbaşıoğlu 2001
Illoxan herbisiti	150	
Pentachlorophenol	0.73	Ateeq et al. 2002
Butachlor	5.13	
Cypermethrin insektisiti	8	Saxena et al. 2005
Borik asit	1150	Yıldız vd. 2006
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	0.05	
Bakır(II)sülfat pentahidrat	1.5	
Kobalt(II)klorür heksahidrat	5.5	
Quizalofop-P-etil	1.5	

Çizelgeye göre araştırmamızda kullanılan ve 1.5 ppm gibi çok düşük konsantrasyonda %50 azalmaya neden olması ile son derece toksik olarak görünen QPE herbisitinin, pentachlorophenol (0.73 ppm) ve 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (0.05 ppm)'e göre daha az toksik iken bakır(II)sülfat pentahidrat ile aynı derecede toksik bir ajan olduğu görülmektedir. Fenoksitereyağ asit bileşiklerinden olan illoxanın EC₅₀ değeri QPE herbisitinin EC₅₀ değerinin 100 katı olup, aynı gruptan olan QPE herbisiti daha toksik bir bileşik olarak belirlenmiştir. Kimyasalların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde EC₅₀ değerinin kullanılmasının yanı sıra, yarısı, dörtte biri, sekizde biri, iki katı, dört katı gibi değerler de kullanılmıştır (Chauhan et al. 1999, Saxena et al. 2005). Buna karşın, kimyasalın EC₅₀ değerine bağımlı kalmaksızın farklı konsantrasyonların uygulandığı çalışmalar da mevcuttur (Pavlica et al. 2000, El-Ghamery et al. 2003, Yi and Meng 2003, Chandra et al. 2005).

5.2 Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Mitotik İndeks Üzerine Etkisi

Bu araştırmada, kontrol (distile su) ve quizalofop-P-etil (QPE) herbisitinin farklı konsantrasyonları (0.75, 1.5 ve 3 ppm) ile maruz kalma sürelerinin (24, 48, 72 ve 96 saat) mitotik indeks üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan birçok genotoksisite çalışmalarında, test edilen çevresel kirleticilerin olumsuz etkilerini saptamak için farklı konsantrasyonların yanı sıra farklı süreler (4, 6, 8, 12, 24, 48 ve/veya 72 saat) kullanılmıştır (Zhang and Yang 1994, Rank and Nielsen 1997, El-Ghamery et al. 2000, Patra et al. 2003, Marcano et al. 2004, Chandra et al. 2005). *Allium cepa*'nın kök ucu meristem hücrelerinin hücre döngüsünün 24 saat (Kihlman 1971) veya yaklaşık 20 saat (Grant et al. 1981) olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada ise bir hücre döngüsünün 24 saatte tamamlandığı göz önüne alınarak 24 saat distile suda köklenmiş soğanlar, farklı QPE konsantrasyonlarına 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle maruz bırakılmışlardır.

Sitotoksisite, mitotik indekste bir azalma olarak tanımlanmaktadır (Smaka-Kincl et al. 1996). Mitotik indeks (MI), hücre bölünme frekansını tahmin etmeye izin veren bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Marcano et al. 2004).

Bu araştırmada, tüm uygulama konsantrasyonları ve sürelerinde büyütülmüş *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerine ait mitotik indeks, her uygulama için hazırlanan 5 preparatta toplam yaklaşık 5000-6000 hücre içinde bölünen hücreler sayılarak hesaplanmıştır. Her preparatta sayılan 1000'nin üzerindeki hücrenin o uygulamayı temsil edeceği dşnlmştır. Mitotik indeks için araştırmamızda sayıldığı kadar yaklaşık aynı sayıda hücre sayımları yapılan çalışmalara rastlanırken (Rank et al. 2002, Chauhan et al. 2002, Saxena et al. 2005), preparat başına farklı sayıda hücre sayımı yapılan çalışmalara da rastlanılmıştır (izelge 5. 2).

Çizelge 5.2 Farklı çalışmalara ait mitotik indeks hesaplamalarında kullanılan preparat adetleri ve bu preparatlarda incelenen toplam hücre sayıları

Preparat sayısı	İncelenen toplam hücre sayısı	Kaynaklar
5	Gözlenen hücrelerin tamamı	El-Ghamery et al. 2003
4	8000	Smaka-Kincl et al. 1996
10	7000	Yi and Meng 2003
10	5000	Ateeq et al. 2002
6	5000	Patra et al. 2003
10	5000	Patra et al. 2005
5	4000-5000	Chandra et al. 2005
5	2000	Kovalchuk et al. 1998

Bu araştırmada, QPE herbisiti konsantrasyonlarında, tüm uygulama sürelerine ait mitotik indeks değerlerinin (%) ortalaması dikkate alındığında konsantrasyonun artmasına bağlı olarak mitotik indeksin önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bulgularımız ışığında, konsantrasyon ve sürenin mitotik indeks üzerine etkisi önemli düzeyde olup, konsantrasyonun etkisi maruz kalma süresinin etkisinden 1.68 kez daha yüksek bulunmuştur. Yani, kök ucunun yüksek herbisit konsantrasyonuna (3 ppm) kısa süreli (24 saat) maruz kalması ile belirlenen MI %3.48 iken, düşük herbisit konsantrasyonuna (0.75 ppm) uzun süreli (96 saat) maruz kalması ile belirlenen MI'in %5.84'e çıkması, 3 ppm (24 saat) uygulamasının daha zararlı olduğunu göstermektedir. Benzer sonuç, *Allium cepa*'nın kök ucu meristemine uygulanan maleic hydrazide'in 10^{-3} M (2 saat) ve 10^{-6} M (48 saat) uygulamaları arasında belirlenmiştir (Marcano et al. 2004). Birçok araştırıcı, herbisitin hücrelere nüfuz olmasıyla birlikte kritik bir

konsantrasyona ulaştığında aktif formda kaldığını ve birbirini takip eden hücre döngüleri sırasında lezyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir (Ribas et al. 1996, Rank and Nielsen 1997, Alvarez-Moya et al. 2001, Rank et al. 2002, Marcano et al. 2004). Araştırmamızda, mitotik indeksin konsantrasyona bağımlı önemli düzeydeki inhibisyonu, QPE herbisitinin sahip olduğu sitotoksik potansiyelin bir etkisi olarak değerlendirilebilir. Diğer taraftan, cerasan, agrosan ve mercuric chloride fungusitleri (Nandi 1985), cypermethrin ve fenvalerate insektisitleri (Chauhan et al. 1999), pentachlorophenol, 2,4-D, butachlor (Ateeq et al. 2002) ve maleic hydrazide herbisitlerinin (Marcano et al. 2004) *Allium cepa* kök meristem hücrelerinin mitotik indeksini konsantrasyonun artmasına bağlı olarak azalttığını bildirmişlerdir. Mitotik indeks inhibisyonunun;

- a) G₁ fazının bloke olmasıyla DNA sentezinin baskılanması (Schneiderman et al. 1971, El-Ghamery et al. 2000),
- b) S fazının süresindeki artış (Webster and Davidson 1969, MacLeod 1969),
- c) Hücrenin mitozu girmesini engelleyen G₂ fazının bloke olması (Van't Hoff 1968, Bruneri 1971, El-Ghamery et al. 2000),
- d) Çevresel kimyasalların biyolojik sistemin DNA/protein sentezi üzerindeki etkisi (Badr and Ibrahim 1987, Chauhan et al. 1998),
- e) Uzamış bir G₂ periyodu veya DNA sentezinin baskılanmasıyla mitozun interfazda bloke edilmesi (Badr and Ibrahim 1987),
- f) Herbisit DNA nükleotidleri ile etkileşime geçmesi ve bu nedenle, DNA sentezinin (DNA/nükleoprotein dengesi) inhibe olması (Soliman, 2001) gibi nedenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Bu olaylar, muhtemelen mitozun ilerlemesi için gerekli olan ATP miktarının düşmesine neden olan karbohidrat metabolizması ve solunum işlevlerinin aynı anda çalışmamasından da kaynaklanmaktadır (Andrews et al. 1983, Topaktaş and Rencüzoğulları 1996).

Test organizmalarında mitotik indeksin kontrolün %22'sinin altına düşmesi letal etkiye neden olurken (Antonsie-wiez 1990), genellikle %50'sinin altına düşmesi

subletal etkiye (Panda and Sahu 1985) neden olmaktadır ve bu değer sitotoksik sınır değeri olarak adlandırılmaktadır (Sharma 1983). Araştırmamızda, 48 saat uygulamasında mitotik indeks kontrole (%10.37) göre 0.75 (%7.27), 1.5 (%7.52) ve 3 ppm (%7.01) konsantrasyonlarda önemli düzeyde azalmasına rağmen bu değerler, kontrolün sırasıyla %70.11, 72.52 ve 67.60'ını ifade ettiğinden herhangi bir subletal ya da letal etkinin olmadığını göstermektedir. Bunun yanı sıra 24, 72 ve 96 saat sürelerde, kontrole göre yalnızca 3 ppm konsantrasyonda uygulamasında subletal etki belirlenmiştir. Bu etkiye ait % oranlar; 24 saat için %35.87, 72 saat için %36.73 ve 96 saat için %25.98 olarak belirlenmiştir. Uygulanan en yüksek herbisit konsantrasyonu olan 3 ppm'in, tüm sürelerde mitotik indeks değerlerini diğer konsantrasyonlara göre önemli düzeyde azaltmasına rağmen hücre bölünmesini tamamen inhibe etmediği belirlenmiştir. Soğan kök meristemine ait mitotik indeksteki azalma, çevresel kirleticilerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde hızlı ve güvenilir veriler sağlayabilmektedir. Yavaş yavaş ya da ani meydana gelen çevresel kirlenmenin denetlenmesinde mitotik inseksin son derece duyarlı olduğu bilinmektedir (Smaka-Kincl et al. 1996).

5.3 *Allium cepa* Kök Ucu Meristem Hücrelerinde Kromozom Aberasyonları zerine Quizalofop-P-Etil Herbisitinin Etkisi

Bu araştırmada, *Allium cepa* kök ucu meristem hücreleri üzerine quizalofop-p-etil (QPE) herbisitinin farklı konsantrasyon ve sürelerinin sitotoksik etkileri incelenmiştir. Sitotoksisite c-mitoz, multipolar anafazlar, yapışıklık ve vagrant kromozomlu hücrelerin fraksiyonunda bir artış olarak tanımlanmaktadır (Fiskesjö 1995). Araştırmamızda, QPE herbisitinin sitotoksik etkisine bağlı olarak anafazda yapışıklık, köprüler, vagrant kromozomlar, c-anafaz, multipolarlık ve fragment oluşumları, interfazda ise mikronükleus oluşumu olmak üzere toplam 7 tip aberasyon değerlendirilmiştir.

Klasik *Allium* kromozom aberasyon testi, çevresel klastojenlerin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan bir testtir. *Allium* test sistemi kolışisin etkisini belirlemek amacıyla ilk defa Levan (1938) tarafından yapılmış ve o zamandan bu yana çok

fazla ilgi görmüştür. Çevresel kirleticilerin olumsuz etkilerinin analizleri, kromozom aberasyonlarının tipleri ve sıklığı gibi sitolojik parametreler kullanılarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinin çevresel kirleticilerin sitotoksik ve/veya genotoksik etkilerinin belirlenmesi için önemli bir sitogenetik materyal olduğu bildirilmiştir (Nielsen and Rank 1994, Ma et al. 1995, Fiskesjö 1997, Topaktaş and Rencüzoğulları 1996, Pavlica et al. 1998, Chauhan et al. 1999a, Cotellet et al. 1999, Kong and Ma 1999, Soliman 2001, Amin 2002, El-Shahaby et al. 2003, Saxena et al. 2005). Yapılan çalışmalarda; yapışıklık, köprüler, köprü+fragment, vagrant kromozomlar, c-metafaz, c-anafaz, multipolar anafaz, fragment, mikronükleus, multinükleus ve poliploidi en sıklıkla gözlenen kromozom aberasyonlarıdır. Araştırmamızda belirlenen anafaz-telofaz kromozom aberasyonları yapışıklık, köprüler, vagrant kromozomlar, c-anafaz, multipolarlık, fragment ve interfazda belirlenen mikronükleus oluşumlarıdır.

Bu araştırmada, QPE herbisitinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde ana-telofazda meydana getirdiği en sık rastlanan kromozom aberasyonu “yapışıklık”tır (%38.57). Darlington ve Mc Leish (1951), yapışıklığın kromozomal DNA’nın parçalanması veya depolimerizasyonundan dolayı olabileceğini ileri sürmüştür. Yapışıklık, inter-kromozomal kromatin fibrillerin dolaşmasının sonucu olarak kromozomlar arasında subkromatid bağlantıların oluşmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Mc Gill et al. 1974, Chauhan et al. 1986). Yapışık kromozomlar, kimyasalların toksik etkilerini yansıtmakta ve genellikle geri dönüşümsüz olup, muhtemelen hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Liu et al. 1992). Pestisitlerin de dahil olduğu çeşitli çevresel kimyasalların etkilerinin araştırıldığı birçok araştırmada en sık gözlenen kromozom aberasyonunun yapışıklık olduğu bildirilmiştir (Chauhan et al. 1999, El-Ghamery et al. 2000, Ateeq et al. 2002, Amin 2002, Rank et al. 2002, Chandra et al. 2005, Saxena et al. 2005).

QPE herbisitinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde ana-telofazda teşvik ettiği “köprü oluşumları” sıklıkla gözlenen bir diğer kromozom aberasyon tipidir (%28.42). Köprülerin kromozomların kırılması ve yeniden bir araya gelmesi ile

oluştugu bildirilmiştir (Soliman 2001). Kromozomların yapışması kromatidlerin birbirlerinden ayrılmasını engellemekte ve köprülerle birbirlerine bağlı kalmalarına neden olmaktadır (Kabarity et al. 1974, Badr et al. 1992). Yapışık köprülerin, replikasyon enzimlerinin kusurlu olması veya aktivasyonunun az olması yüzünden kromozomların tamamlanmamış replikasyonunun (Sinha 1979) veya telomerik heterokromatinin DNA sekanslarının geç replikasyonunun bir sonucu olabileceği bildirilmiştir (De-Faria and Jaworska 1972, Bennet, 1977). Eğer nükleus bölünmeye hazır olduğunda heterokromatin blokları DNA replikasyonunu tamamlamadıysa köprü oluşumları meydana gelebilir (Kaltsikes et al. 1984). Araştırmamızda, ana-telofazda gözlenen köprüler genellikle tekli olmakla birlikte, ikili ve üçlü köprülere de rastlanmıştır. İkili ve üçlü köprülerin eşit olmayan kutuplaşma veya disentrik kromozomlar sonucu ya da kromozom kırıkları veya parçalanma ile terminalizasyonda başarısızlık nedeniyle olduğu da bildirilmektedir (Prakash et al. 1988). Cypermethrin ve fenvalerate insektisitleri (Chauhan et al. 1999), maleic hydrazide herbisiti (Marcano et al. 2004), cerasan, agrosan GN ve phenyl mercuric chloride fungusitlerinin (Nandi 1985) *Allium cepa*'da, benzene hexa chloride, lindane, aldrin, heptachlor ve endrin pestisitlerinin (Jain and Sarbhoy 1987) *Lens* ve *Pisum*'da mitoz bölünme esnasında köprülere neden olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan, fragment(leri) içermeyen ve sıklıkla gözlenen köprü oluşumlarının muhtemelen kromoproteinlerin çapraz bağlanmasının bir sonucu olarak sadece kromozom yapışıklığına işaret edebileceğini ve bunun da gerçek bir kromozom aberasyonu olmadığı ileri sürülmüştür (Kong and Ma 1999). Aynı araştırmacılar, tek başına gözlenen fragmentlerin sıklığının kromozom hasarına bir gösterge olarak kullanılabileceğine işaret etmişlerdir.

QPE herbisitinin uygulandığı *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde ana-telofazda %16.67 oranında vagrant kromozomlar (geri kalmış veya ileri gitmiş kromozomlar) gözlenmiştir. Vagrant kromozomların varlığı, kardeş hücrelere farklı sayıda kromozomların ayrılmasına ve bunu takiben interfazdaki eşit olmayan boyutta veya düzensiz şekildeki nükleuslu kardeş hücrelerin oluşmasına neden olmaktadır (El-Ghamery et al. 2003). Triazine herbisitinin (Badr 1983),

kadmiumun (Zhang and Yang 1994), maleic hydrazide herbisitinin (Rank and Nielsen 1997), cypermethrin ve fenverelate insektisitlerinin (Chauhan 1999) vagrant kromozomların sayısını önemli düzeyde arttırdığı bildirilmiştir.

Araştırmamızda, *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde QPE herbisitinin konsantrasyon ve süreye bağımlı olarak teşvik ettiği ana-telofaz kromozom aberasyonları içerisinde c-anafazın oranı %14.10 olarak bulunmuştur. C-metafaz ve c-anafazı kapsayan c-mitoz, hücrede iğ ipliklerinin inaktivasyonunu takiben yoğunlaşmış kromozomların rasgele dağılması olarak tanımlanmış kolşisin mitozudur (Levan 1938). Kolşisin etkisine benzer olarak, muhtemelen QPE herbisiti hücrede mikrotübüllerin polimerizasyonunu inhibe ederek c-anafaz oluşumlarına neden olmuştur. Pestisitlerin de dahil olduğu çeşitli çevresel kimyasalların, hücre bölünmesi esnasında iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyerek c-mitoza neden olduğu birçok araştırmada bildirilmiştir (Liu et al. 1992, Kovalchuk et al. 1998, Chauhan et al. 1999, Amin 2002, Rank et al. 2002, Saxena et al. 2005).

QPE herbisitinin etkisine bağlı olarak *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde “multipolar anafaz” gözlenmiştir. Multipolarlık, sentriolün birden daha fazla bölünmesi yüzünden ikiden daha fazla kutbun oluşmasıyla açıklanmıştır (Jain and Sarbhoy 1987). Multipolarlık kutupların pozisyonu ve sayısı ile belirlenmektedir (Kumar et al. 1978). Benzene hexa chloride, lindane, endrin pestisitlerinin (Jain and Sarbhoy 1987), toprak radyoaktivitesinin (Kovalchuk 1998), atık suyun (Pavlica et al. 2000), cypermethrine ve fenvalerate insektisitlerinin (Saxena et al. 2005) bitki kök hücrelerinde multipolar oluşumlara neden olduğu bildirilmiştir.

QPE herbisiti %0.64 gibi çok düşük oranda “fragment” oluşumuna neden olmuştur. Fragmentlerin kromozom ve kromatidlerde meydana gelen kırılmalardan meydana geldiği (Prakash et al. 1988, Yi and Meng 2003) ve muhtemel mutajenitenin bir sonucu olabileceği bildirilmiştir (Fiskesjö 1997). Bavistin ve deltan fungusitlerinin (Prakash et al. 1988), sodyum bisülfid ve

sodyum sülfid karışımlarının (Yi and Meng 2003) ve atrazine herbisitinin (Bolle et al. 2004) kullanılmasıyla hücrelerde fragment oluşumları gözlenmiştir.

Araştırmamızda, ana-telofaz hücrelerinde kromozom aberasyonlarını belirlemenin yanı sıra interfaz hücrelerinde mikronükleus oluşumları da değerlendirilmiştir. Kontrol ve QPE herbisiti konsantrasyonlarında sürenin artışına bağlı olarak mikronükleus oluşumları önemsiz bulunmuştur. Mikronükleus oluşumundaki önemli düzeydeki etki diğer konsantrasyonlara göre 3 ppm'de belirlenmiş olmasına rağmen, tüm konsantrasyon ve sürelerin toplamında belirlenen mikronükleus oluşumu çok düşüktür (%0.34). *Allium cepa* testlerinde uygulama süreleri için 24 saatlik periyotlar seçilmişse, hücrelerde mikronükleus taraması tavsiye edilmemiş ve köprüler, fragmentler ve vagrant kromozomlar gibi anafaz aberasyonları analiz ediliyorsa mikronükleus taramasının gereksiz olduğu, çünkü eğer hücre hasardan kurtulabiliyorsa bu aberasyonların hücre döngüsünde mikronükleusa dönüştükleri bildirilmiştir (Rank and Nielsen 1993). Çalışmamıza benzer olarak, interfaz hücrelerinde sayılan mikronükleus oluşumlarının sıklığı, ana-telofaz hücrelerinde sayılan kromozom aberasyonlarıyla karşılaştırıldığında klastojenite hakkında hiçbir ilave bilgi sağlamadığı belirtilmiştir (Rank and Nielsen 1997). Vagrant kromozomlar veya fragmentlerin sitoplazmada çözüldükleri veya yavaş yavaş kümeleştikleri, ardından nüklear membranla çevrilerek mikronükleus şeklini aldıkları, bu yüzden interfazda birkaç tane hücrede mikronükleus gözlendiği rapor edilmiştir (El-Ghamery et al. 2003). Mikronükleusun genellikle anafazda kromozomların anormal ayrılmasına neden olan iğ ipliği hasarı veya kromozom kırıkları/fragmentler yüzünden meydana geldiği (Amer and Mikhael 1972, Dash *et al.*, 1988, Grover and Kaur 1999), önceden oluşmuş multipolar telofazdan orijinlenebildiği (Amer and Farah 1974), iğ ipliği aparatında meydana gelen bir aksamanın sonucu olabildiği (Stroev 1970) ve özellikle radyasyonlar tarafından oluşturulan anormallikler arasında en baskın bir tip olduğu (Amer ve Mikhael 1972) bildirilmiştir. Mikronükleus gerçek bir mutasyon etkisinin göstergesi olarak düşünülmektedir (Auerbach 1962).

Bu araştırmada, *Allium cepa* kök uğlarına uygulanan QPE herbisitinin toksik ve sitotoksik etkileri, diğer ęalıřmalarda kullanılan biręok ęevresel kirleticinin etkisine benzemektedir. *Allium cepa* toksisite ve sitotoksisite testleri, ęok düşük konsantrasyonda bile derece toksik olan QPE herbisitinin kullanımının insan sağlığını tehdit ettiğini ve bu bağlamda, herbisit uygulamalarında ne kadar dikkat edilmesi gerektiğini bir kez daha ortaya koymuştur. ęevresel kirleticilerin etkilerinin basit ve ucuz bir yöntem olan *Allium* testi ile değerlendirilmesinin, kullanıma sunulacak ya da kullanımda olan pestisitlerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi açısından önemli bir test olduğunu göstermektedir.

Günümüzde kullanılan sentetik pestisitlerin zararlı etkileri bilinmektedir. Son derece toksik olduğu bilinen sentetik pestisitlerin zorunlu kullanımları durumunda hedef organizmaların ve konsantrasyonlarının ęok iyi belirlenmesi gerekmektedir. Diğer taraftan, daha az zararlı olduğu bildirilen biyopestisitlerin kullanımı yaygınlaştırılmalı, fakat biyopestisitlerin olası zararlı etkilerinin de olabileceği düşünülerek bunlarla ilgili ęalıřmalara ağırlık verilmesi gerekmektedir. Biyopestisitler hedef olmayan faydalı organizmalara karşı düşük toksisiteli, ęabuk paręalanan, mutajen olmayan, seçici görünen ve ekosistemde minimum zarara yol ağan maddeler olarak bilinmektedir (Raizada et al. 2001). Raizada vd. (2001), bir biyopestisit olan “azadirachtin” biyopestisitinin önerilen dozlarda kullanıldığında memelilere karşı güvenilir olduğunu göstermiş olmasına rağmen, organizmalar üzerinde fizyolojik ve toksikolojik etkilerinin yanı sıra doğadaki kalıcılığı ile ilgili ęalıřmaların yapılmasının uygun olacağını bildirmiştir. Sonuç olarak, hiçbir ęevresel kirleticinin kullanılmadığı, ęevresel kirliliğin olmadığı ve insan sağlığının tehdit edilmediği organik tarımın teşvik edilmesi ve yaygınlaştırılması daha da önemlidir.

KAYNAKLAR

- Akman, Y., 2000, “Çevre kirliliği”, Çevre Biyolojisi, 144-167, Ankara.
- Al-Sabti, K., 1989, “Allium test for air and water borne pollution control”, Cytobios, Vol.58, pp.71-78.
- Alvarez, M.C., Santerre, L.A., Zuniga, G.G., Torres, B.O., Padilla, C.E. and Feria, V.A., 2001, “Evaluation of genotoxic activity of maleic hydrazide, ethyl methane sulfonate, and N-nitroso diethylamine in *Tradescantia*”, Salud Publica Mex, Vol.43, pp.563-569.
- Amin, A., 2002, “Cytotoxicity testing of sewage water treatment using *Allium cepa* chromosome aberrations assay”, Pakistan Journal of Biological Sciences, Vol.5, pp.1184-1888.
- Angelis, K.J., McGuffie, M., Menke, M. and Schubert, I., 2000, “Adaptation to alkylating damage in DNA measured by comet assay”, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol.36, pp.146-150.
- Andrews, M.D., Basart, J.P., Lamb, R.C. and Becker, R.H., 1983, “High-resolution radio and X-ray observations of the supernova remnant W28”, Astrophysical Journal, Part 1, Vol.266, pp.684-688.
- Anonim, 2001, “Devlet Planlama Teşkilatı Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı Kimya Sanayi Komisyonu Raporu”, Ankara.
- Anonim, 2004, “Avrupa Perakendecileri Ürün Çalışma Grubunun İyi Tarım Teknikleri Uygulamaları (EUREPGAP), Akdeniz Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği”, ARGE Dış İlişkileri Şube Müdürlüğü, pp.36.
- Antonsie-wiez, D., 1990, “Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Leda krin”, Folia Histochemica et Cytobiologica, Vol.26, pp.79-96.
- Arkhipchuk, V.V. and Garanko, N.N., 2002, “A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity”, Environmental Toxicology, Vol.17, pp.187-194.
- Ashby, J., De Serres F.J, Shelby, M.D., Margolin, B.H., Ishidate, M. and Becking, G.C., 1988, “Evaluation of short-term tests for carcinogens”, Report on the International Programme on Chemical Safety’s Collaborative Study on *in vivo* assays, Vols.I/II, Cambridge University Press, Cambridge.
- 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

- Auerbach, C., 1962, "Mutation: An introduction to research on mutagenesis", Part I. Methods, Oliver and Boyd, Edinburgh, pp. 49-50.
- Badr, A., 1983, "Mitodepressive and chromotoxic activities of two herbicides in *Allium cepa*", Cytologia, Vol.48, pp.451-457.
- Badr, A. and Ibrahim, A.G., 1987, "Effect of herbicide glean on mitosis chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems", Cytologia, Vol.52, pp.293-302.
- Badr, A., Ghareeb, A. and El-Din, H.M., 1992, "Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *V. faba* roots", Egyptian Journal of Applied Science, Vol.7, pp.457-468.
- Bennet, M.D., 1977, "Heterochromatin, aberrant endosperm nuclei and grain shriveling in wheat-rye genotypes", Heredity, Vol.39, pp.411-419.
- 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.
- Bolle, P., Mastrangelo, S., Tucci, P. and Evandri, M.G., 2004, "Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test", Vol.43, pp.137-141.
- Bolognesi, C. and Morasso, G., 2000, "Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers", Trends in Food Science and Technology, Vol.11, pp.182-187.
- Bora, T. ve Özaktan, H., 1988, "Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş", Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Bruneri, 1971, "Synthesis of DNA and mitosis in relation to cell differentiation in the roots of *Vicia faba* and *Lactuca sativa*", Cytologia, Vol.36, pp.229-247.
- Cabrera, G.L. and Rodriguez, D.M.G., 1999, "Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays", Mutation Research, Vol.426, pp.207-210.
- Chandra, S., Chauhan, L.K.S., Murthy, R.C., Saxena, P.N., Pande, P.N. and Gupta, S.K., 2005, "Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium cepa*", Science of the Total Environment, Vol.347, pp.46-52.
- Chauhan, L.K.S., Dikshith, T.S.S. and Sundararaman, V., 1986, "Effect of deltamethrin on plant cells. I. Cytological effects of deltamethrin on the root meristem cells of *Allium cepa*", Mutation Research, Vol.171, pp.25-30.
- Chauhan, L.K.S., Saxena, P.N., Sundararaman, V. and Gupta, S.K., 1998, "Diuron induced cytological and ultrastructural alterations in the root meristem cells

- of *Allium cepa*", Pesticide Biochemistry and Physiology, Vol.62, pp.152-163.
- Chauhan, L.K.S., Saxena, P.N. and Gupta, S.K., 1999, "Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*", Environmental and Experimental Botany, Vol.42, pp.181-189.
- Chauhan, S.P., Magann, E.F. and Carroll, C.S., 2001, "Mode of delivery for the morbidly obese with prior cesarean delivery: Vaginal versus repeat cesarean section", American Journal of Obstetrics and Gynecology, Vol.185, pp.349-354.
- Chauhan, B.K., Reed, N.A., Zhang, W., Duncan, M.K., Kilimann, M. and Cvekl, A., 2002, "Identification of genes downstream of Pax6 in the mouse lens using cDNA microarrays", Journal of Biological Sciences, Vol.277, pp.11539-11548.
- Constantine, M.J. and Owens, E.T., 1982, "Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays, A report of the US Environmental Protection Agency Genotox Program", Mutation Research, Vol.99, pp.1-12.
- Cortes, J.L., Pham, X.Y. and Tounsi, A., 1982 "Mass effects in weak decays of heavy particles", The American Physical Society, Vol.25, pp.188-194.
- Cotelle, S., Masfaraud, J.F. and Ferard, J.F., 1999, "Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays", Mutation Research, Vol.426, pp.167-171.
- Darlington, C.D. and McLesih, L., 1951, "Action of maleic hydrazide on the cell", Nature, Vol.167, pp.407-408.
- Dash, S., Panda, K.K. and Panda, B.B., 1988, "Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay", Mutation Research, Vol.203, pp.11-21.
- De-Faria, L. and Jaworska, H., 1972, "The relation between the chromosome size gradient and the sequence of DNA replication in rye", Hereditas, Vol.70, pp. 39-58.
- De Kergommeaux, D.J., Grant, W.F. and Sandhu, S.S., 1983, "Clastogenic and physiological responses of chromosomes to nine pesticides in *Vicia faba in vivo* root tip assay system", Mutation Research, Vol.124, pp.69-84.
- De Serres, F.J., 1992, "Development of a specific-locus assay in the *ad-3* region of two-component heterokaryons of *Neurospora*: a review", Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol.20, pp.225-245.
- De Waard, M.A., Georgopoulos, S.G., Hollaman, D.W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N.N. and Schwinin, F.J., 1993, "Chemical control of plant

diseases: Problem and prospects”, Annual Review of Phytopathology, Vol.31, pp.403-421.

Delen, N. ve Tosun, N., 1996, “Fungisitlere dayanıklılığı önleyici stratejiler. II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu”, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 18-20 Ekim, pp.239-244

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A., 2005, “Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları”, TMMOB Ziraat Mühendisleri 6. Teknik Kongresi, 3-7 Ocak, Ankara.

Demirci, M. ve Nemli, Y., 1997, “*In vitro* testlerle trifluralin’e karşı *Setaria verticillata* (L.) P.B.’nin dayanıklılığın saptanmasına yönelik bazı çalışmalar”, Türkiye II. Herboloji Kongresi, 1-4 Eylül, İzmir ve Ayvalık, pp.73-80.

Elçi, Ş., 1994, “Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri”, Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi yayınları, Elazığ.

El-Ghamery, A.A., El-Nahas, A.I. and Mansour, M.M., 2000, “The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*”, Cytologia, Vol.55, pp.209-215.

El-Ghamery, A.A., El-Kholy, M.A. and El-Yousser, A., 2003, “Evaluation of cytological effects of Zn^{2+} in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L.”, Mutation Research, Vol.537, pp.29-41.

El-Shabhab, O.A., Abdel Migid, H.M., Soliman, M.I. and Mashaly, I.A., 2003, “Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay”, Pakistan Journal of Biological Sciences, Vol.6, pp.23-28.

EPA, 1999a, “Summary of OPP Reduced-Risk Pesticides Initiative”, US EPA, pp.2.

EPA, 1999b, “First Year 1999 Work Plan”, US EPA, pp.4.

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.

Evandri, M.G., Tucci, P. and Bolle, P., 2000, “Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: A cytogenetic approach with *Allium cepa*”, Food Additives and Contaminants, Vol.17, pp.1037-1045.

- Evseeva, T.I., Geras'kin, S.A. and Shuktomova, I.I., 2003, "Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test", Journal of Environmental Radioactivity, Vol.68, pp.235-248.
- Fatima, R.A. and Ahmad, M., 2005, "Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater", Science of the Total Environment, Vol.346, pp.256-273.
- Fiskesjö, G., 1985, "The *Allium* test as a standard in environmental monitoring", Hereditas, Vol.102, pp.99-112.
- Fiskesjö, G., 1997, "*Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters", Plants for environmental studies, CRC Press, LLC-New York, pp.308- 333.
- 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.
- Ginchner, T., Veleminsky, J. and Pospisil, P., 1985, "Screening of compounds for antimutagenic properties towards dimethylnitrosamine-induced mutagenicity in *Arabidopsis thaliana*", Biologia Plantarum., Vol.27, pp.417-423.
- Gichner, T., Lopez, G.C., Wagner, E.D. and Plewa, M.J., 1994, "Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylenediamine isomers and the antimutagenic mechanism of diethyldithiocarbamate and ammonium *meta*-vanadate", Mutation Research, Vol.306, pp.165-172.
- Gullino, M. L. and Kuijpers, L.A.M., 1994, "Social and political implication of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe", Annual Review of Phytopathology, Vol.32, pp.559-579.
- Grant, W.F., 1978, "Chromosome aberrations in plants as a monitoring system" Environmental Health Perspectives, Vol.27, pp.37-43.
- Grant, V., 1981, "Plant Speciation", Columbia University Press, New York.
- Grant, W.F., 1982, "Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program", Mutation Research, Vol.99, pp.273-291.
- Grant, W.F., 1994, "The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens", Mutation Research, Vol.310, pp.175-185.

- Grant, W.F. and Owens, E.T., 2001, "Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens", *Mutation Research*, Vol.488, pp.93-118.
- 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.
- Harte, J., Holdren, C., Schneider, C. and Shirley, C., 1991, "Toxics A to Z, A guide to everyday pollution hazards", University of California Press.
- Ismailoğlu, I., Ünal, M. and Palavan-Ünsal, N., 2004, "Effects of spermidine, spermin and cyclohexylamine on mitotic activity of 2X, 4X and 6X wheats", *Journal of Cell and Molecular Biology*, Vol.3, pp.83-88.
- Jain, A.K. and Sarbhoy, R.K., 1987, "Cytogenetical studies on the effect of some chlorinated pesticides I. effect on somatic chromosomes of *Lens* and *Pisum*", *Cytologia*, Vol.52, pp.47-53.
- Kabarity, A., El-Bayoumi, A.S. and Habib, A.A., 1974, "Effect of morphine sulphate on mitosis of *Allium cepa* root tips", *Biologia Plantarum*, Vol.16, pp. 275-282.
- Kaltsikes, P.J., 1984, "Breeding vegetable varieties resistant to diseases", *Proc. 3rd Meeting on Protected Vegetables and Flowers*, May 9-11, Heraklion, Crete, p.60. (Abstract).
- Kanaya, N., Gill, B.S., Grover, I.S., Murin, A., Osiecka, R., Sandhu, S.S. and Andersson, H.C., "*Vicia faba* chromosomal aberration assay", *Mutation Research*, Vol.310, pp.231-247.
- Kaymak, F. and Muranli, F.D., 2005, "The cytogenetic effects of Avenoxan on *Allium cepa* and its relation with pollen sterility", *Acta Biologia Hungarica*, Vol.56, pp.313-321.
- Kihlman, B.A., 1971, "Root tips for studying the effects of chemicals on chromosomes", In: Hollaender, A., (Ed.), *Chemical Mutagens*, Plenum Press, New York, pp.489-514.
- Kihlman, B.A. and Andersson, H.C., 1984, "Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges", In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (Eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp.531-554.
- Kilbey, B.J., Legator, M., Nicholson, W. and Ramel, C., 1984, "*Handbook of Mutagenicity Test Procedures*", 2nd edition, Amsterdam, Elsevier.

- Kong, M.S. and Ma, T.H., 1999, "Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays", *Mutation Research*, Vol.426, pp.221-228.
- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Telyuk, P., Hohn, B. and Kovalchuk, L., 1998, "The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident", *Mutation Research*, Vol.415, pp.47-57.
- Kumar, P., Leela, K., Laxminarayan, P. and Nigam, J., 1978, "Induction of multipolar spindle in *Allium sativum*", *Cytobios*, Vol.22, pp.41-45.
- Kumar, G. and Singh, R.P., 1991, "Sushila Nitrate assimilation and biomass production in *Sesamum indicum* L seedlings in a lead enriched environment", *Water Air Soil Pollution*, Vol.66, pp.163-171.
- 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.
- Levan, A., 1938, "The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*", *Hereditas*, Vol.24, pp.471-486.
- Ma, T.H., Cabrera, G.L., Cebulska-Wasilewska, A., Chen, R., Loarca, F., Vanderberg, A.L. and Salamone, M.F., 1994, "Tradescantia stamen hair mutation bioassay", *Mutation Research*, Vol.310, pp.211-220.
- 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*, Vol.334, pp.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.
- Marcano, L., Carruyo, I., Del Campo, A. and Montiel, X., 2002, "Effect of Cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: An ultrastructural study", *Environmental Research Section A*, Vol.88, pp.30-35.
- Marcano, L., Carruyo, I., Del Campo, A. and Montiel, X., 2004, "Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L.", *Environmental Research*, Vol.94, pp.221-226.
- Mastrangelo, S., Tomassetti, M., Carratu, M.R., Evandri, M.G. and Bolle, P., 2006, "Quercetin reduces chromosome aberrations induced by atrazine in the *Allium cepa* test", *Environmental Molecular Mutagenesis*, Vol.47, pp.254-259.

- McGill, M., Pathak, S. and Hsu T.C., 1974, "Effect of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness", *Chromosoma* 47, 157-167.
- MacLeod, R.M., 1969, "Influence of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone", *Endocrinology*, Vol.85, pp.916-923.
- Mearns, J., Dunn, J. and Lees-Haley, P.R., 1994, "Psychological effects of organophosphate pesticides: A review and call for research by psychologists", *Journal of Clinical Psychology*, Vol.50, pp.286-294.
- Menke, M., Chen, I., Angelis, K.J. and Schubert, I., 2001, "DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins", *Mutation Research*, Vol.493, pp.87-93.
- Minissi, S. and Lombi, E., 1997, "Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments", *Mutation Research*, Vol.393, pp.17-21.
- Nandi, S., 1985, "Studies on the cytogenetic effect of some mercuric fungicides", *Cytologia*, Vol.50, pp.921-926.
- Nicoloff, H. and Kappas, A., 1987, "Binomial induced mitotic disturbances in *Hordeum vulgare*", *Mutation Research*, Vol.38, pp.53-70.
- Nielsen, M.H. and Rank, J., 1994, "Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test", *Hereditas*, Vol.121, pp.249-254.
- Nilan, R.A. and Vig, B.K., 1976, "Plant test systems for detection of chemicals mutagens", In: Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*, Plenum New York, Vol.4, pp.143-170.
- 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.
- Özer, Z., Kadioğlu, İ., Önen, H. ve Tursun, N., 1997, "Herboloji", *Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları*, No: 20, Kitaplar serisi no: 10.
- 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 fensulfotion", *Cytobios*, Vol.42, pp.147-155.
- Panda, B.B. and Sahu, U.K., 2002, "Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfotion", *Cytobios*, Vol.42, pp.147-155.

- Patra, J., Sahoo, M.K. and Panda, B.B., 2003, "Persistence and prevention of aluminium-and paraquat-induced adaptive response to methyl mercuric chloride in plant cells in vivo", *Mutation Research*, Vol.538, pp.56-61.
- Patra, J., Sahoo, M.K. and Panda, B.B., 2005, "Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa*", *Mutation Research*, Vol.581, pp.173-180.
- Pavlica, P., Papes, D. and Nagy, B., 1991, "2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells", *Mutat Research*, Vol.263, pp.77-81.
- Pavlica, K., Holman, D. and Thorpe, R., 1998, "The manager as a practical author of learning", *Career Development International*, Vol.7, pp.300-307.
- Pavlica, P., Besendorfer, V., Rosa, J. and Papes, D., 2000, "The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak *Quercus robur* L.) and shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*)", *Chemosphere*, Vol.41, pp.1519-1527.
- Perelra, W.E. and Hostettler, F.D., 1993, "Nonpoint source contamination of the Mississippi River and its tributaries by herbicides", *Environmental Science and Technology*, Vol.27, pp.1542-1552.
- Prakash, N.S., Lakshmi, N. and Harini, I., 1988, "Cytological effects of agricultural chemicals II. Effects of fungicides "bavistin" and "deltan" on chilli (*Capsicum annuum* L.)", *Cytologia*, Vol.53, pp.709-715.
- Ragsdale, N.N. and Sisler, H.D., 1994, "Social and political implication of managing plant disease in the United States", *Annual Review of Phytopathology*, Vol.32, pp.545-557.
- 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., 1994, "Evaluation of *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater", *Mutation Res.*, Vol.312, pp.17-24.
- Rank, J., 1997, "Determination of sample concentrations for the *Allium* anaphase-telophase aberration assay", *Mutation Research*, Vol.379, pp.96.
- Rank, J., 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", *Mutation Research*, Vol.390, pp.121-127.

- Rank, J. and Nielsen, M.H., 1998, "Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay", Mutation Research, Vol.418, pp.13-119.
- Rank, J., Lopez, L.C., Nielsen, M.H. and Moretton, J., 2002, "Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEPH in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories", Hereditas, Vol.136, pp.13-18.
- Redei, G.P., 1982, "Mutagen assay with *Arabidopsis*: a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program", Mutation Research, Vol.99, pp.243-255.
- Ribas, G., Surrallés, J. and Marcos, R., 1996, "Maleic hydrazide in cultured human lymphocytes", Mutagenesis, Vol.11, pp.221-226.
- Rieger, R., Michaelis, A. and Takehisa, S., 1990, "On adaptive responses in plant meristems cells in vivo: Protection against induction of chromatid aberration", In: G. Obe, A.T. Natarajan (Eds.), Chromosomal Aberrations: Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag, Berlin, pp.163-179.
- Rupa, D.S., Reddy, P.P. and Reddi, O.S., 1991, "Clastogenic effect of pesticides in peripheral lymphocytes of cotton-field workers", Mutation Research, Vol.261, pp.177-180.
- 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, Vol.216, pp.244-252.
- Sharma, C.B.S.R., 1983, "Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals", Current Science, Vol.52, pp.1000-1002.
- Schmutterer, H. and Ascher, K.R.S., 1987, "Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants", Proc. 3rd Int. Neem Conf. (Nairobi, 1986), GTZ, Eschborn, Germany, pp.703.
- Schneiderman N, Pearl L, Wilson W, Metcalf F, Moore JW, Swadlow HA., 1971, "Stimulus control in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as a function of different intensities of intracranial stimulation", Journal of Comparative Physiology, Vol.76(2), pp.175-86.
- 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.
- 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.

- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M. and Toman, M.J., 1996, "The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure", *Mutation Research*, Vol.368, pp.171-179.
- Soliman, M.I., 2001, "Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss.) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay", *Journal of Biological Sciences*, Vol.1, pp.1021-1027.
- Steenland, K., Jenkins, B., Ames, R.G., O'Malley, M., Chrislip, D. and Russo, J., 1994, "Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning", *American Journal of Public Health*, Vol.84, pp.731-736.
- Steinkellner, H., Kong, M.S., Helma, C., Ecker, S., Ma, T.H., Horak, O., Kundi, M. and Knasmüller, S., 1998, "Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol.31, pp.183-191.
- Stroev, V.S., 1970, "Cytogenetic activity of the herbicides atrazine, chloroisopropenyl carbamate and paraquat", *Genetica*, Vol.6, pp.31-37.
- Topaktaş, M. and Rencüzoğulları, E., 1996, "Genotoxic effects of marshall in *Allium cepa* L.", *Turkish Journal of Botany*, Vol.20, pp.481-487.
- Topbaş, M.T., Brohi, A.R. ve Karaman, M.R., 1998, "Çevre kirliliği, T.C. Çevre Bakanlığı Yayınları", Ankara.
- Uludağ, A., Nemli, Y. ve Rubin, B., 2001, "Yabani yulafta (*Avena sterilis*) cladinafopa dayanıklılık üzerinde çalışmalar", *Türkiye III. Herboloji Kongresi*, 9-12 Ekim 2001 Ankara, s.1.
- Uludağ, A., 2003, "Doğu Akdeniz Bölgesi'nde buğday tarlalarındaki yabani yulafta (*Avena sterilis*) bazı graministlere oluşturduğu dayanıklılık üzerinde araştırmalar", *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilimdalı, Doktora Tezi*, 129 s.
- Van't Hoff, J., 1968, "The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase exised root meristems *Experimental Cell Research*, 51: 167-176.
- Van't Hof, L. and Schairer, L.A., 1982, "*Tradescantia* assay system for gaseous mutagens report of the US Environmental Protection Agency GeneTox Program", *Mutation Research*, Vol.99, pp.303-315.
- Vorobjev, I.A., Liang, H., Wright, W.H. and Berns, M.W., 1993, "Optical trapping for chromosome manipulation: A wavelength dependence of induced chromosome bridges", *Biophysical Society*, Vol.64, pp.533-538.
- Vural, N., 1984, "Toksikoloji", *Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yay. No. 56*, Ankara.

- Webster, P.L. and Davidson, D., 1969, "Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and Indol-3yl-acetic acid in *Vicia faba* roots" Journal of Experimental Botany, Vol., pp.671-685.
- Xing, W.J. and Zhang, Z.L., 1990, "A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens", Mutation Research, Vol.241, pp.109-113.
- Yi, H. and Meng, Z, 2003, "Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*", Mutation Research, Vol.537, pp.109-1124.
- Yildiz, M., Arikan, E.S. and Terzi, H., 2006, "Farklı Kimyasal Maddelerin Etkili Konsantrasyonlarının *Allium* Kök İnhibisyon Testi ile Belirlenmesi", 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran, Kuşadası/Aydın.
- Yüzbaşıoğlu, D., 2001, "Illoxan ve Racer herbisitlerinin *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitoz bölünmeye ve kromozomlara etkileri", Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zaka, R., Chenal, C. and Misset, M.T., 2002, "Study of external low irradiation dose effects on induction of chromosome aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem", Mutation Research, Vol.517, pp.87-99.
- Zhang, Y. and Yang, X., 1994, "The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*", Mutation Research, Vol.312, pp.121-126.
- <http://www.bab.com.tr/sito.html>, 20.05.2006
- <http://www.herbicides.en.ec21.com>, 26.05.2006
- <http://www.icsu-scope.org>, 21.05.2006
- <http://www.un.org.tr/fao>, 19.05.2006
- <http://biology.hamline.edu/bio/Courses/3060cellbio06/Lab/Project%204/tox.htm>, 20.05.2006

TEŞEKKÜR

Araştırmamın konusunu belirleyen, deneysel çalışmalarımı yönlendiren ve yazım aşamasında tezimi hiç yılmadan titizlikle okuyan, ayrıca her konuda yardımlarını esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a, deneysel çalışmalar ve yazımın her aşamasında yardımlarıyla sürekli yanımda olan çok değerli arkadaşım, tez yoldaşım yüksek lisans öğrencisi Sayın Hakan TERZİ'ye, bizlere her konuda destek sağlayan dekanımız Sayın Prof. Dr. Muhsin KONUK'a ve istatistiksel değerlendirme aşamasındaki yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Yüksel TERZİ'ye çok teşekkür ederim.

Sadece bu tez araştırması değil, hayatımın her noktasında en büyük desteğim olan, benim hayat ışığım annem Sayın Av.Hülya ARIKAN'a çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Evrim Suna ARIKAN

Doğum Yeri : Afyonkarahisar

Doğum Tarihi : 12.11.1980

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : Afyon Süper Lisesi

Lisans : 1999-2003 Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat
Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce (2005 Mart ÜDS: 63.75)

Yayınlar : Yayınlanmış uluslararası bir makalesi, çeşitli ulusal kongrelerde sunulmuş 4 adet poster bildirisi bulunmaktadır. Ayrıca, ulusal ve uluslararası 4 kongreye de dinleyici olarak katılmıştır.

Kurslar : DNA Markörleri ve Bitki Islahında Kullanımı Kursu'na katılmıştır (19 -20 Ocak 2006 Adana)