

**2,4-D ve DİKAMBA HERBİSİTLERİNİN FASULYE
(*Phaseolus vulgaris* L.) KÖKLERİNDEKİ GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN RAPD ve COMET ASSAYLERLE
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ahmet BOZDAĞ**

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

KASIM 2009

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**2,4-D ve DİKAMBA HERBİSİTLERİNİN FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)
KÖKLERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN RAPD ve COMET
ASSAYLERLE BELİRLENMESİ**

Ahmet BOZDAĞ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KASIM 2009

ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ danışmanlığında, Ahmet BOZDAĞ tarafından hazırlanan “2,4-D ve Dikamba Herbisitlerinin Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Köklerindeki Genotoksik Etkilerinin RAPD ve Comet Assaylerle Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca .../.../200.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir

Unvanı	Adı, Soyadı	İmza
--------	-------------	------

Jüri Başkanı	Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA	
--------------	------------------------------	--

Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Mustafa YILDIZ	
------------	------------------------------	--

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

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

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Herbisitler ve Sınıflandırması	4
2.2 Oksinik Herbisitler	8
2.2.1 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)	12
2.2.2 3,6-Dikloro-2-metoksibenzoik asit (Dikamba)	14
2.3 Genotoksisite ve İzlenmesi	15
2.3.1 Tek Hücre Jel Elektrophorez (Comet) Assay	16
2.3.2 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Tekniği (RAPD)	18
2.4 2,4-D ve Dikamba Genotoksisitesi	21
3. MATERYAL ve METOT	24
3.1 Bitki Materyali	24
3.2 Bitki Büyüme Koşulları	24
3.3 Kök Büyümesi ve EC ₅₀ Değeri	25
3.4 Kök Uçları Toplam Çözünür Protein İçeriğinin Belirlenmesi	25
3.4.1 Toplam Çözünür Proteinlerin İzolasyonu	25
3.4.2 Toplam Çözünür Protein İçeriğinin Hesaplanması	26
3.5 Tek Hücre Jel Elektrophorezi	27
3.5.1 Kök Nukleuslarının İzolasyonu	27
3.5.2 Alkali Comet Assay	27
3.6 RAPD Tekniği	28
3.6.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler	28
3.6.2 DNA İzolasyon Prosedürü	28
3.6.3 DNA Miktarı ve Kalitesinin Spektrofotometrik Yöntemle Tayini	29
3.6.4 PCR Karışımı Hazırlama	30

3.6.5 PCR Döngüleri	30
3.6.6 Agaroz Jel Elektroforezi	30
3.6.7 RAPD Ürünlerinin Rakamsal Analizi	31
3.6.8 Genomik Kalıp Kararlılığının (GTS, %) Hesaplanması	32
3.7 İstatistiksel Analizler	32
4. BULGULAR	33
4.1 2,4-D ve Dikamba'nın Kök Büyümesi Üzerine Etkisi	33
4.2 Dikamba ve 2,4-D'nin Toplam Çözünür Protein İçeriğine Etkisi	33
4.3 Comet Assay Analizi	35
4.4 RAPD Analizleri	36
4.4.1 Genomik DNA Ekstraksiyonu	36
4.4.2 RAPD Profilleri	37
4.4.3 Genomik Kalıp Kararlılığı (GTS, %)	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR	63
6.1 İnternet Kaynakları	76
7. ÖZGEÇMİŞ	77

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

2,4-D ve DİKAMBA HERBİSİTLERİNİN FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) KÖKLERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN RAPD VE COMET ASSAYLERLE BELİRLENMESİ

Ahmet BOZDAĞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ

Mevcut çalışma, fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) fidelerinin kök dokusunda iki oksinik herbisit [2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 3,6-dikloro-2-metoksibenzoik asitin (dikamba)] genotoksik potansiyelinin belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. İki günlük fasulye fideleri, distile su (negatif kontrol), pozitif kontrol (10 ppm MMS), 2,4-D ve dikambanın öldürücü olmayan konsantrasyonlarına (0.1, 0.2 ve 0.3 ppm) 96 sa süreyle maruz bırakılmıştır. Kök büyümesi, toplam çözüner protein seviyesi bireysel hücrelerdeki DNA hasarı (comet assay) ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) assayi genotoksitenin dört son noktası olarak kullanılmıştır. Kök büyümesi testi ile 2,4-D ve dikamba için EC₅₀ değerleri sırasıyla 0.17 ve 0.24 ppm olarak belirlenmiştir. Fasulye fidesi kök dokusu toplam çözünebilir protein içeriği negatif kontrole göre pozitif kontrol ve dikamba uygulamalarında (0.2 ve 0.3 ppm) önemli düzeyde azalırken, 2,4-D uygulamalarında (0.2 ve 0.3 ppm) artmıştır. 2,4-D ve dikamba için fasulye kök ucu meristem hücrelerinin nükleuslarında doza bağımlı tek iplik DNA kırıkları comet assayle belirlenmiştir. Negatif kontrol grubuna göre, uygulama gruplarında RAPD bantlarının kaybolması ve yeni bantların ortaya çıkmasıyla RAPD polimorfizmi belirlenmiştir. RAPD profillerinin diagnostik ve numerik analizleri 2,4-D ve dikambanın doza bağımlı genotoksisteyi teşvik ettiğini açıkça göstermiştir. Genotoksik etkinin belirlenmesinde incelenen parametreler hassasiyetlerine göre comet assay > kök büyümesi > RAPD profilleri > total çözünebilir protein içeriği şeklinde sıralanmıştır.

2009, 78 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Phaseolus vulgaris*, 2,4-D, Dikamba, Comet Assay, RAPD, Genotoksisite

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF 2,4-D AND DICAMBA HERBICIDES IN BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) ROOTS BY RAPD AND COMET ASSAYS

Ahmet BOZDAĞ

Afyon Kocatepe University

Institutes of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Süleyman CENKÇİ

The present study was undertaken to evaluate genotoxic potential of two auxinic herbicides; 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in the root tissue of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Two-day old bean seedlings were exposed to distilled water (negative control), methyl methanesulfonate (MMS, positive control) and three sublethal concentrations (0.1, 0.2 and 0.3 ppm) of 2,4-D and dicamba for 96 h. The root growth, total soluble protein content, DNA damage in individual cells (comet assay) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles were used as endpoints of genotoxicity. 2,4-D and dicamba EC₅₀ values of root growth were calculated as 0.17 and 0.24 ppm, respectively. Total soluble protein content in the root tissue of the seedlings was significantly decreased at MMS treatment and at high concentrations (0.2 and 0.3 ppm) of dicamba, while 0.2 and 0.3 ppm 2,4-D treatments increased the protein content ($P \leq 0.05$). Dose-dependent single strand DNA breaks in the root nuclei of bean seedlings were determined for 2,4-D and dicamba as revealed by comet assay. In comparison to negative control, RAPD polymorphisms became evident as disappearance and/or appearance of RAPD bands in treated seedlings. The diagnostic and phonetic numerical analyses of RAPD profiles obviously indicated dose-dependent genotoxicity induced by 2,4-D and dicamba. According to sensitivity of parameters to

2,4-D and dicamba toxicity, the above indicator rank in the following order: comet assay > root growth > RAPD profiles > total soluble protein content.

2009, 78 Pages

Key words: *Phaseolus vulgaris*, 2,4-D, Dicamba, Comet Assay, RAPD, Genotoxicity.

TEŞEKKÜR

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

Tez çalışmalarım süresince yanımda olan ve manevi desteğini hissettiğim yüksek lisans arkadaşım Sayın Savaş YEŞİLBAŞ'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, doktora öğrencisi Sayın Hakan TERZİ ve yüksek lisans öğrencisi Behiye URUŐAK'a teşekkür ederim.

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

Ahmet BOZDAĞ
AFYONKARAHİSAR, Kasım 2009

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1. Simgeler

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

2. Kısaltmalar

2,4-D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
A→G	Adenin→Guanin
BSA	Bovin serum albumin
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
Dikamba	3,6-dikloro-2-metoksi benzoik asit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EtOH	Etil alkol
G+C	Guanin+Sitozin
GTS	Genomik kalıp kararlılığı
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
MMS	Methyl methano sulfonate
NK	Negatif kontrol
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PK	Pozitif kontrol
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trikloro asetik asit
UV	Ultraviyole ışık
βME	β- merkaptoetanol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Oksinik herbisitlerin kimyasal şekilleri	11
Şekil 4.1	2,4-D ve dikamba uygulamalarının fasulyede kök büyümesi üzerine etkisi	34
Şekil 4.2	2,4-D (A) ve dikamba (B) stresi altındaki fasulye fidelerinde etkin konsantrasyon (EC ₅₀) değerleri	34
Şekil 4.3	2,4-D ve dikamba uygulamalarının fasulye köklerinde toplam çözümlü protein içeriğine etkisi	35
Şekil 4.4	2,4-D ve dikamba uygulamalarının fasulye kök hücrelerinde comet assayle belirlenen DNA hasar seviyesi	36
Şekil 4.5	2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye fide köklerinden ekstre edilen yaklaşık 200 ng genomik DNA	38
Şekil 4.6	2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye genomik DNA'larından OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05 ve OPA06 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	39
Şekil 4.7	2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye genomik DNA'larından OPA07, OPA08, OPA09, OPA10, OPA11 ve OPA12 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	40
Şekil 4.8	2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye genomik DNA'larından OPA13, OPA17, OPA20, OPB01, OPB04 ve OPB10 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	41
Şekil 4.9	2,4-D ve dikamba uygulamalarının fasulye fidelerinde oluşturduğu genetik polimorfizmi gösteren dendrogram	53
Şekil 4.10	2,4-D ve dikamba'nın fasulye fidelerinde kök büyümesi, toplam çözümlü protein içeriği, comet assayle belirlenen DNA hasar seviyesi ve RAPD profilleri (GTS) parametrelerinde negatif kontrole göre (%100'e sabitlenmiş) değişimler	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Herbisit amaçlı kullanılan oksinik herbisitler	10
Çizelge 3.1	RAPD-PCR reaksiyonlarında test edilen primerler, sekansları ve GC yüzdeleri	31
Çizelge 4.1	Uygulama grubu fide köklerinden spektrofotometre ile belirlenen genomik DNA miktar ve saflığı	37
Çizelge 4.2	Her bir uygulama örneği için 18 primerle belirlenen DNA bantların ebatları ve negatif kontrole (NK) göre, 2,4-D ve dikamba uygulamalarında mevcut “1” ve kayıp “0” bantlar	42
Çizelge 4.3	RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, primer sekansları, her bir primerle elde edilmiş DNA ebat aralığı, negatif kontrolde elde edilen DNA bant sayısı, monomorfik ve polimorfik DNA bant sayıları	47
Çizelge 4.4	Negatif kontrol (NK) RAPD profillerinde belirlenen DNA bant sayıları, ve negatif kontrole göre uygulama gruplarında belirlenen yeni oluşan (+) ve kaybolmuş (-) DNA bantlarının UVIssoft görüntü analiz program ile belirlenen moleküler ebatları	48
Çizelge 4.5	RAPD bulgularına göre 2,4-D ve dikamba grupları arasında POPGENE v1.3 paket programında hesaplanmış olan (Nei, 1978) genetik benzerlik katsayıları	52
Çizelge 4.6	2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye fidelerinde 15 RAPD primeri için hesaplanmış genomik kalıp kararlılık değerleri	54

1. GİRİŞ

Tarım ürünlerini hastalık, zararlı ve yabancı otlardan korumak amacıyla birçok kimyasal bileşik kullanılmaktadır. Kimyasal mücadelenin neden olduğu sorunlar bilinmesine karşın, pestisit kullanımı hızlı ve etkili sonuç vermesi gibi nedenlerden dolayı popülaritesini halen korumaktadır. Tarım topraklarının ve yeraltı su kaynaklarının, kullanılan pestisitler tarafından kirletilmesi önemli bir çevre sorununa neden olmaktadır. Özellikle son zamanlarda pestisit kullanımındaki hızlı artış, bu sorunun daha fazla şiddetlenmesine yol açmaktadır. Bu kimyasal maddelerin faydalarının yanı sıra çeşitli nedenlerle doğrudan maruz kalma veya yanlış kullanımları sonucu çevrede toksik seviyelerde birikmesi tüm ekosistemde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Ekosistemin su, hava, toprak ve canlılar gibi bütün öğeleri birbiriyle ilişkili olduğundan dolayı, tarımda kullanılan pestisitler su ve toprak başta olmak üzere bütün abiyotik ortamı kirletmektedir.

Günümüzde birçok herbisit ve insektisit yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Oksinik herbisitlerden 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 3,6-dikloro-2-metoksibenzoik asit (dikamba), geniş yapraklı otlar ve ağaçlarla beraber büyümesi istenilmeyen bitkilerin kontrol edilmesi veya öldürülmesi amacıyla kullanılmaktadır (Ateeq *et al.* 2005). Son yıllarda bu oksinik herbisitler önemli çevresel kirleticiler haline gelmiştir. Çevrede yüksek miktarda bu herbisitlerin birikimi bitki, hayvan ve dolayısıyla insan gibi birçok organizmanın genetik materyalinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Filkowski *et al.* 2003).

Genetik materyalin korunmuş yapısı nedeniyle, genotoksisite testlerinde birçok bitki türünün kullanımı mümkündür (Maluszynska and Juchimiuk 2005). Yerleşik organizmalar olarak bitkiler, diğer organizmalara oranla daha fazla miktarda kirleticiye sürekli şekilde maruz kalmaktadır (Sriussadaporn *et al.* 2003). Bu nedenle, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris* ve *Zea mays* gibi birçok bitki türü, son yıllarda çevresel kirleticilerin genotoksik etkilerinin gösterilmesinde birer biyo-indikatör olarak kullanılmaktadır. Fasulye, soya fasulyesi ve mercimek gibi baklagillerin 2,4-D ve dikamba oksinik herbisitlerine karşı

hassas oldukları bilinmektedir (Moyer *et al.* 1992). Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) tek yıllık, diploid ($2n=22$) otsu bir bitkidir ve toksikolojinin biyokimyasal ve fizyolojik analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Enan 2006; Cencki *et al.* 2009).

Toksik kimyasal maddeler canlı hücrelerin DNA'ları ile etkileşime girebilmekte ve bu nedenle DNA baz modifikasyonları, zincir kırıkları, depürinasyon ve çapraz bağlanmalar gibi genotoksik etkilere neden olmaktadır. DNA bütünlüğünün derecesi genotoksisitenin hassas bir göstergesi ve çevrenin izlenmesinde etkili bir biyomarkör olarak ileri sürülmektedir (Shugart 1990). Son zamanlarda, moleküler biyolojideki gelişmeler genotoksikoloji alanında DNA analizleri için seçici ve duyarlı birkaç testin gelişmesine neden olmuştur. Comet assay ökaryotik hücrelerde DNA hasarının analizi için güçlü bir genetik test olarak kullanılmaktadır (Tice *et al.* 2000). Comet assay; DNA tek ve çift sarmal kırıkları, abazik bölgeler, tamamlanmamış DNA tamir bölgeleri ve genomik DNA'daki yapısal değişiklikler gibi birçok DNA hasarının saptanmasında kullanılan hassas bir genotoksisite testidir. Alkalin comet assayde, tek ve çift zincirli DNA kırıkları ve alkali-değişken bölgeler belirlenmekte ve DNA göçlerinin boyutu hücredeki DNA hasarlarını göstermektedir (Singh *et al.* 1988). Williams *et al.* (1990) ve Welsh ve McClelland (1990) tarafından geliştirilen rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) testi, PCR kullanılarak genomik DNA'nın rastgele fragmentlerinin çoğaltılmasını kapsayan etkili bir tekniktir. Türlerin sınıflandırılması, genetik haritalama ve filogeni alanlarındaki kullanımına ek olarak bu teknik bakteri, hayvan ve bitki hücrelerinde DNA hasarı ve mutasyonların (örneğin yeniden düzenleme, nokta mutasyon, DNA ve ploidi değişikliklerine küçük eklenti ya da delesyonlar) belirlenmesinde yeni bir biyomarkör olarak kullanılmaktadır (Atienzar *et al.* 1999; Cencki *et al.* 2009).

Bu çalışmada; (a) 2,4-D ve dikambanın öldürücü olmayan konsantrasyonlarında (0.1-0.3 ppm) fasulye fide köklerinde teşvik edilen DNA hasarlarının RAPD ve comet assaylerle karşılaştırmalı olarak belirlenmesi, (b) 2,4-D ve dikambanın kök büyümesi ve kök dokusuna ait total çözünebilir protein içeriğine etkisinin belirlenmesi ve (c) negatif ve pozitif kontrol gruplarına göre uygulama gruplarında genomik kalıp kararlılığı

(RAPD profilleri), comet skorları, kök gelişimi ve kök dokusu total protein içeriği parametrelerindeki değişimlerin kıyaslanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Herbisitler ve Sınıflandırılması

Zirai alanlarda tarımı yapılan bitkilerin kullandığı ışığa, besin maddesine, suya ortak olan, dolayısıyla tarım üretimini ve kalitesini düşüren bitkilere “yabancı ot”, bu otların öldürülmesi veya gelişmesinin sınırlandırılmasında kullanılan tarımsal kimyasallara ise “herbisit” adı verilmektedir. Herbisitlerin içinde etkinlik gösteren kimyasal maddeler “aktif madde” olarak nitelendirilir. Ticari herbisit preparatlarında, aktif maddenin bitkiler tarafından daha kolay alınması ve etkinliğinin artırılması için “dolgu maddesi” bulundurulur (Günca 1985).

Hedef bitkiler, kullanım şekilleri, kimyasal yapıları ve etki mekanizmalarına göre herbisitleri gruplandırmak mümkündür. Etkiledikleri bitki çeşitlerine göre herbisitler iki gruba ayrılabilir. Ayrım göstermeden uygulandığı alandaki tüm bitki türlerini etkileyen herbisit *seçici olmayan* (non-selective), kullanıldığı ortamdaki belirli bitki türleri için toksik, diğerlerine etki etmeyen herbisit *seçici* (selective) olarak tanımlanır. Bununla birlikte, seçici herbisitlerin yüksek oranda veya tavsiye edilenden fazlasının kullanımı hedefte olmayan tarım bitkilerinde zararlara yol açar (Calvino *et al.* 2002). Herbisitler, bitkideki etki yeri ve kullanılma şekline göre üç gruba ayrılır. Birincisi, sadece temas ettikleri bitki doku ve organlara zarar veren *temas* (contact) herbisitlerdir. İkincisi, vasküler sistemle tüm bitkiye yayılarak bitkinin tamamına zarar veren *bütüncül* (systemic) herbisitlerdir (Prokop and Veverka 2003). Üçüncüsü, *kök sistemini veya çimlenmeyi etkileyen* herbisitlerdir. Toprağa karıştırılan arsenik içerikli herbisitler istenmeyen bitki tohumlarını yok ederler (Juska 1961). Kimyasal yapılarına göre herbisitler, *organik bileşikli* (klorofenoksi bileşikleri, dinitrofenoller, bipyridil bileşikleri, karbamatlar, ilaveli üreler, triazinler, amidler vb.) ve *inorganik bileşikli herbisitler* (amonyum sülfat, amonyum sülfamat, amonyum tiyosiyanat, kalsiyum siyanamid, bakır sülfat vb.) şeklinde iki gruba ayrılır. İnorganik herbisitler zararlı otlarla mücadele etmek için geliştirilen ilk herbisitlerdir (İnt. Kay. 1). 1896 yılında ilk defa bakır sülfat buğday tarlalarındaki yabancı otlarla mücadele amacı ile kullanılmıştır. 1960’lı yıllarda ise arsenik içerikli inorganik herbisitler yaygın olarak kullanılmış olsa da bu kimyasalların hedefsiz olarak tüm canlılara zarar vermesi nedeni ile günümüzde

zorunlu olmadıkça kullanılmamaktadır (İnt. Kay. 1). 1940'lı yıllardan bu yana ticari olarak kullanılan organik herbisitler 31 farklı yapısal grupta temsil edilmektedir. Amerika Ot Bilim Topluluğu (Herbicide Classification of the Weed Science Society of America, 1997) ve Herbisit Dirençlilik Aksiyon Komitesi (Herbicide Resistance Action Committee, HRAC) kriterleri organik herbisitlerin sınıflandırmasında kullanılmaktadır (İnt. Kay. 2). Bu kuruluşların kullandığı herbisitler etki mekanizmalarına göre aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır:

A. Asetil CoA karboksilaz inhibitörleri (diclofop, fluazifop, sethoxydim, quizalofop-P-ethyl, clethodim): Asetil CoA karboksilaz enzim aktivitesini inhibe ederek lipid biyosentezini durduran herbisitlerdir. Bu gruptaki herbisitler, ksilem ve floem ile tüm bitki dokularına taşınarak hücrelerde büyüme ve metabolik işlevler için gerekli olan önemli membran lipidlerinin biyosentezini durdururlar. Bilinen semptomları büyümenin durması ve bitki büyüme noktalarındaki dokuların ölmesidir (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

B. Asetolaktat sentetaz inhibitörleri (glyphosate, halosulfuron, imazethapyr, oxasulfuron, sulfometuron): Yaprak ve toprağa uygulanabilen bu tip herbisitler, asetolaktat sentetaz gibi amino asit sentezinde önemli görevi olan enzimlerin çalışmasını bloke ederler. Semptomları, büyümenin durması ve semptoma bağlı olarak bitkilerde kritik öneme sahip proteinlerin üretiminin durmasıdır (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

C1, C2 ve C3. Fotosentez inhibitörleri (atrazine, hexazinone, amicarbazone, bromacil, pyrazon, chlorobromuron, bromofenoxim): Çoğunlukla toprağa uygulanan ve bazen de yapraktan uygulanabilen herbisitlerdir. Transpirasyon sistemini kullanarak doğrudan ksilem boruları ile yapraklara taşıyıp hücrelerin fotosentez bölgesinde birikirler. Bu herbisitler Fotosistem II elektron sistemini bloke eder. Yüksek enerjili ve hasar verici ürünlerin oluşumuyla klorofil ve beraberinde yaprak dokusu tahrip olur. Semptomları nekrotik lekelerle sonuçlanan klorotik (sarı) yaprakların oluşumudur (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

D. Fotosistem-I-elektron sapması (paraquat ve diquat): Paraquat en yaygın kullanılan herbisitlerdendir. Seçici olmayan bu herbisit, temas ettiği yeşil dokulara hızlı bir şekilde zarar verir. Toprakta köklerle alınımı ve dokulara taşınımı yoktur. Bu herbisit yapraklarda fotosentezi engeller. Işığa maruz kalan bitkilerde fotosistem I'deki elektronları kendine bağlar (indirgenmiş-paraquat) ve ortamdaki moleküler oksijene taşıyarak reaktif oksijen oluşumuna neden olur. Oksitlenmiş paraquat fotosistem I'den tekrar elektron tutarak bunları oksijene taşımaya devam eder. Dolayısıyla, fotosistem I'de elektron akışını durdurarak fotosentezi engeller (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

E. Protoporfibrinojen oksidaz (PPO) inhibisyonu (lactofen, oxadiazon, pentoxazone): Bu grup herbisitler, singlet oksijen oluşumuna neden olarak hücre membran lipitlerinin yapısına zarar verir. Yapraklarda bronzlaşma gözlenir. Apoptozis ve hücre ölümü sonunda bitki ölür (Barbour 1996).

F1, F2 ve F3. Karotenoid sentez inhibitörleri (norflurazon, fluridone, amitrol, clomazone, mesotrione): Bu herbisitler toprağa uygulanır ve bitki kökleri ile emildikten sonra ksilemde taşınarak bitki yapraklarına iletilir. Phytoen desaturaz aşamasında veya bilinmeyen bir mekanizma ile hücrelerde karotenoid sentezini engelleyerek klorofil pigmentlerini fotooksidasyondan korunmasız bırakırlar. Bu durum yaprakların rengini kaybetmesine neden olur. Semptomları albino veya ağarmış yaprak görünümüdür (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

G. 5-enolpürüvilkimik-3-fosfat (EPSP) sentetaz inhibitörü (glyphosate ve sulfosate): Bu enzim, fosfoenolpiruvatı şikimik-3-fosfata dönüştüren şikimik asit yolunun önemli anahtar enzimlerindendir. Şikimik asit yolu bitkilerde birçok aromatik bileşiğin üretim yoludur. Bitkilerin yaklaşık olarak %35 kuru ağırlığı bu yol üzerinden üretilen kimyasallardan oluşur. Bu enzim hayvanlarda olmadığından EPSP'yi inhibe eden herbisitler insanlara zarar vermez. Dünyaca ünlü olan Roundup herbisitinin etken maddesi glyphosate, bitkilerde şikimik asit yolunu kapatarak aromatik amino asitlerin ve aromatik kimyasalların bitkide sentezlenmesini engeller. Genetik mühendisliği uygulamaları ile bu herbisite dirençli tahıl bitkilerinin geliştirilmesi sonucu, Roundup

üreticisi aynı zamanda kendi herbisitine dirençli genetiği değiştirilmiş organizmaların tohumlarını da pazarlamaktadır (Barbour 1996; İnt. Kay. 2; Int. Kay. 3).

I. Dihidropteroat sentetaz inhibitörü (asulam): Bu herbisit (asulam) folik asit sentezinde önemli bir enzim olan dihidropteroat sentetazın çalışmasını engeller. Folik asit pürinlerin, pirimidinlerin ve bazı amino asitlerin metil grubunu temin ettiği için, eksikliğinde nükleik asit sentezi ile birlikte bazı amino asitlerin sentezi bitkilerde durur (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

K1, K2 ve K3. Hücre bölünmesi inhibitörleri (trifluralin, DCPA, dithiopyr, oryzalin, pronamide, pendimethalin, napropamide): Toprak ve yapraklardan uygulanır. Bitkideki taşınırlığı zayıftır. Kök veya yeni filizlenen tomurcuklardan emilir. Etkin yerleri bitkiye girdikleri bölgelerdir. Bu herbisitler mikrotübüllerin birleşmesini, mikrotübüllerin organizasyonunu ve mitozu engeller. Semptomları büyümenin durması ve kök uçlarının şişmesidir (Barbour 1996; İnt. Kay. 2; İnt. Kay. 4)

L. Selüloz sentez inhibitörleri (dichlobenil, isoxaben, quinclorac): Bu herbisitlerin çalışma mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, selüloz yapısına glikozun katılmasını engeller. Böylelikle, bitki hücre oluşumunu ve hücre uzaması gibi hücre gelişim engellenir (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

M. Ayırma (membran bozulması) (dinoseb, dinoterb):

N. Lipit biyosentez inhibitörleri (ACCaz'dan farklı) (EPTC, cycloate, pebulate, molinate): Lipit biyosentezini ACCaz'dan farklı olarak engelleyen herbisitlerdir. Bunlar, malonil CoA oluşumunu engelleyerek mum, suberin ve kütin gibi karmaşık bitki lipitlerinin sentezini durdurur. Herbisit uygulaması topraktan yapılır, bitkiye köklerinden girer ve ksilem borularından fidelerin büyüme uçlarına kadar ulaşır. Büyüme durdurması ve yaprakların bükülmesi sayılabilecek bazı semptomlardır (Barbour 1996; İnt. Kay. 2; İnt. Kay. 4).

O. İndol asetik asit benzerleri (sentetik oksinler) (2,4-D, MCPP, dicamba, triclopyr): Genelde yapraklara uygulanır. Sistemiktir yani tüm dokulara yayılır. Doğal oksinleri taklit eder. Anormal büyümeye, bitkilerde iletim dokularının hasar görmesine ve yaralanmasına neden olur. Bu herbisitlerin semptomları yaprak ve gövdede bükülme ve doku bozukluklarıdır (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

P. Oksin taşınım inhibitörleri (naptalam ve diflufenzopyr-Na): Bu herbisitler bitki dokuları arasında oksin taşınmasını engelleyerek oksinin bitkilerde kök oluşumu, hücre bölünmesini teşvik gibi fonksiyonlarından yoksun bırakır. (Gardner and Semple 1989; İnt. Kay. 2).

Z. Bilinmeyenler. (Flamprop-M-methyl, /-isopropyl, difenzoquat dazomet): Bu tip herbisitler yukarıda tarif edilen mekanizmalardan farklı veya benzer bir etki şekli ortaya koymadan zararlı bitkileri öldürmede veya büyümelerini kısıtlamada kullanılan herbisitlerdir (Barbour 1996; İnt. Kay. 2).

2.2 Oksinik Herbisitler

“Auxin” kavramı Yunanca’da büyümek veya artmak anlamlarına gelen “auxano” kelimesinden türetilmiştir. Oksinler fitohormon veya bitki hormonu olarak da adlandırılan bitki büyüme maddeleri ve morfojenlerin bir sınıfını oluşturmaktadır. Oksinlerin bitki büyümesindeki rolü ilk defa Hollandalı bilim adamı Frits Went tarafından 1926’da gösterilmiştir. İndol asetik asit (IAA) bitkilerde doğal olarak bulunan oksin grubu bitki büyüme düzenleyicisidir. 4-klorindol-3-asetik asit (4-Cl-IAA), indol-3-bütirik asit (IBA) ve 2-fenilasetik asit (PAA) bilinen diğer doğal oksinlerdir. İndol-3-asetik asit triptofan amino asidinden indol-3-pürivik asit metabolik yolundan üretilmektedir. IAA üretiminde birçok alternatif metabolik yolun olması, bitkilerde oksinin her durumda sentezlenebildiğini göstermektedir. Oksinler bitki meristemlerinde, genç yapraklarda, gelişmekte olan meyve ve tohumlarda üretildikten sonra etki göstereceği bitki doku ve organlara polar taşınım veya floem boruları ile taşınırlar. Oksinin fizyolojik etkileri; hücre uzamasını teşvik, doku kültüründe

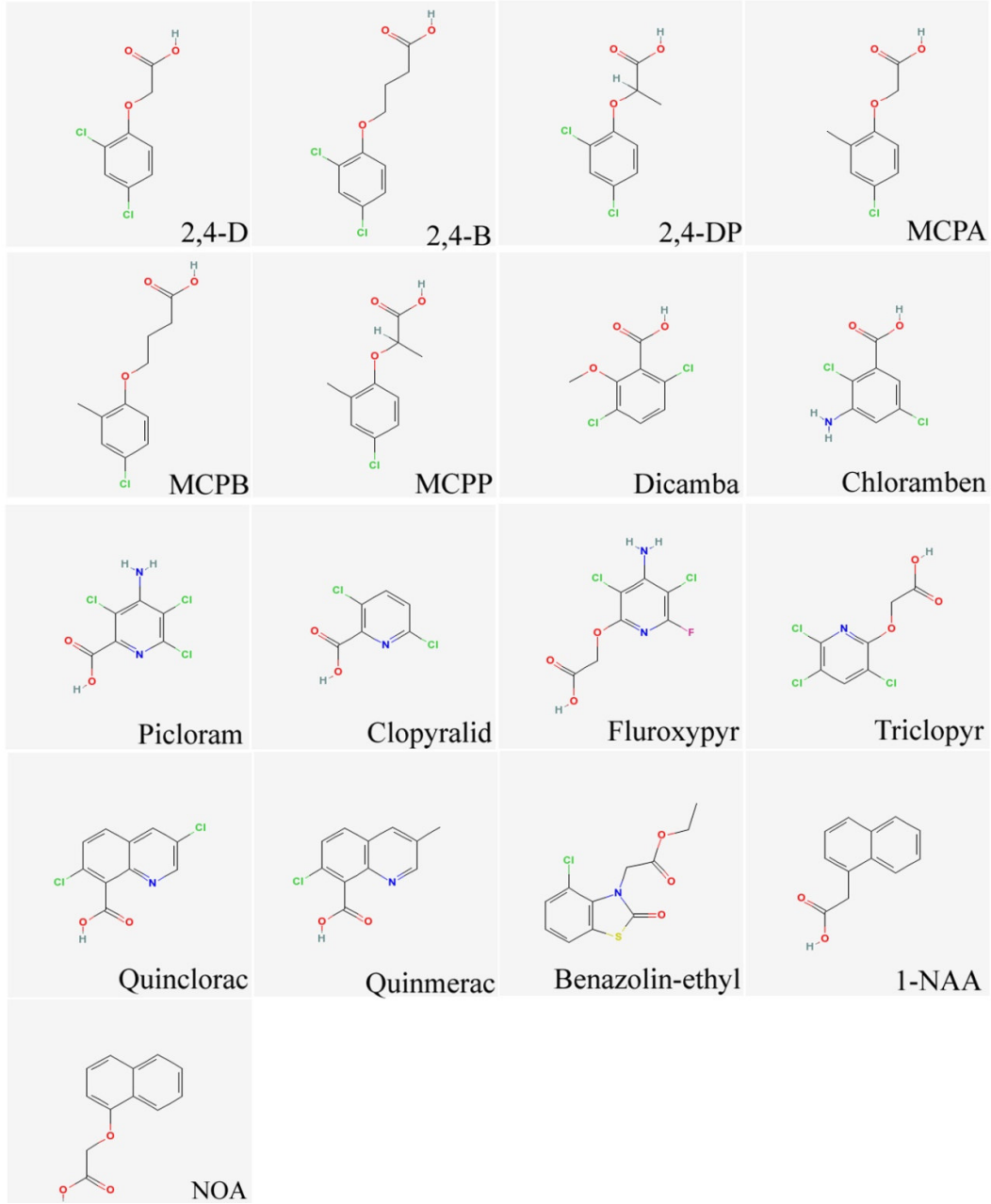
kambiyum hücre bölünmesini sitokininlerle birlikte teşvik, floem ve ksilem farklılaşmasını uyarma, doku kültüründe gövde çeliklerinde kök oluşumunu teşvik, koltuk altı tomurcuklarında büyümeyi engelleme, dokularda fazla oksin birikimi ile birlikte büyüme engelleyicisi etilenin sentezini teşvik, bazı bitkilerde meyve gelişimini teşvik, meyve olgunlaşmasını geciktirme ve doku kültüründe çiçeklenmenin teşviki şeklinde kısaca sıralanabilir. Ayrıca, oksinler bitkilerde fototropizma (ışığa yönelim), gravitropizma (yerçekimine yönelim) ve tigmotropizmayı (dokunmaya bağlı yönelim) teşvik etmektedir (Salisbury and Ross 1992; Taiz and Zeiger 2006).

IAA'nın bitkilerde çok az miktarda bulunması, izolasyon sonrası ışık gibi farklı çevresel şartlarda hızlı bozunması, IAA oksidaz enzimi ile bitkilerde doğal olarak parçalanabilmesi gibi etmenler, sentetik oksinlerin kimyasal olarak sentezlenmesini teşvik etmiştir. Sentetik oksinlerin bitkilerde degradasyonu için tam bir metabolizma mevcut değildir (Salisbury and Ross 1992). Sentetik oksinlerin eksojen "dışsal" olarak bitkilere verilmesini kapsayan iki önemli uygulama alanı vardır. İlkinde, bitki doku kültürü tekniği kullanılarak *in vitro* yöntemlerle bitki rejenerasyonu ve diğer doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak eksojen oksin kullanımıdır (Babaoğlu ve ark. 2004). İkincisi ise, sentetik oksinlerin tarımda zararlı bitkilerin yok edilmesinde herbisit olarak kullanımıdır. *Oksinik herbisit* tarımda herbisit amaçlı kullanılan büyüme düzenleyicisi veya herbisit özellikli bitki büyüme düzenleyicisidir (Sterling and Hall 1997). Oksinik herbisit olarak kullanılan oksinlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması Çizelge 2.1'de, bu kimyasalların şekilleri Şekil 2.1'de verilmiştir (İnt. Kay. 5). Oksinik herbisitler doğal oksinleri taklit eden büyüme düzenleyicisi özellikli kimyasallardır. Fenoksiasetik asit grubu oksinik herbisitler ilk defa 1940'lı yıllarda kullanılmaya başlamıştır. Özellikle yapılarında bulundukları bir veya daha fazla halojen element (klor veya fluor) fenoksiasetik asit ve esterlerinin fizyolojik aktivitesini çok fazla arttırmaktadır. Tarımsal üretimde zararlı otlardan kaynaklanan kayıpları önlemede önemli olan fenoksiasetik asit grubu oksinik herbisitlere 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve 2,4-D'nin esterleştirilmiş formları olan 2,4-B, 2,4-DP, MCPA, MCPB ve MCPP (Çizelge 2.1) örnek verilebilir. Oksinik herbisitlerin benzoik asit (dicamba, chloramben ve TBA), propiyonik asit (picloram, clopyralid, fluxypyr ve triclopyr) ve quinolin karboksilik asit türevlerinin (quinclorac ve

quinmerac) herbisit olarak kullanılması ise 1950-1960'lı yıllara rastlar (Çizelge 2.1; IARC 1977). Naftalen asetik asit (NAA) bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılmasına rağmen, bilinen bir herbisit kullanımı yoktur.

Çizelge 2.1 Herbisit amaçlı kullanılan oksinik herbisitler [not: karışıklığı önlemek için kimyasallar İngilizce ifade edilmiştir, Çizelge İnt. Kay. 2'den geliştirilmiştir]

Kimyasal Ailesi	Aktif madde	Kısaltması
Fenoksikarboksilik asit	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D
	4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid	2,4-B
	2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid	2,4-DP
	2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid	MCPA
	4-(4-chloro-o-tolyloxy)butyric acid	MCPB
	methylchlorophenoxypropionic acid	MCPP
Benzoik asit	2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid	Dicamba
	3-amino-2,5-dichlorobenzoic acid	Chloramben
	Terbutylazine	TBA
Pyridine carboxylic acid	4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid	Picloram
	3,6-dichloro-2-pyridinecarboxylic acid	Clopyralid
	2-(4-amino-3,5-dichloro-6-fluoropyridin-2-yl)oxyacetic acid	Fluroxypyr
	2-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl)oxyacetic acid	Triclopyr
Quinoline carboxylic acid	3,7-dichloroquinoline-8-carboxylic acid	Quinclorac
	7-chloro-3-methylquinoline-8-carboxylic acid	Quinmerac
Naphthalene acids	2-naphthalen-1-ylacetic acid	1-NAA
Naphtoxy acids	2-naphthalen-1-yloxyacetic acid	NOA
Diğer	Ethyl 2-(4-chloro-2-oxo-1,3-benzothiazol-3-yl) acetate	Benazolin-ethyl



Şekil 2.1 Oksinik herbisitlerin kimyasal şekilleri İnt. Kay. 5'den geliştirilmiştir (not: kimyasalların açık adları için Çizelge 2.1'e bakınız).

2.2.1 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)

Zimmerman ve Hitchcock (1942) tarafından 1942 yılında bitki büyüme regülatörü olarak rapor edilen ve geniş yapraklı bitkilerde seçici etki gösteren 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) klorofenoksi bileşikleri grubundandır. İlk keşfedildiğinden bu yana dünya çapında en yaygın olarak kullanılan herbisit olan 2,4-D, sadece Amerika'da yıllık 30 milyon kg kullanılmaktadır (Burnside 1996; Cox 1999). Serbest asit, tuz ve amin formları bulunan 2,4-D'nin serbest asit formu oda şartlarında hızlı buharlaşma eğiliminde olduğundan ticari olarak kullanılamaz. 2,4-D genelde amin ve ester tuzları şeklinde kullanılır. Her iki formda geniş yapraklı yabancı otlara etkilidir; ancak ester formu daha uçucu olduğundan karışık bitki tarımının yapıldığı alanlarda rüzgar yardımıyla taşınarak diğer kültür bitkilerine zarar verebilir. Ester formları, geniş alanlarda hububat tarımı yapılan tarım alanlarında tercih edilir. Amin formları daha az etkili olmakla birlikte, uçucu olmamaları sebebiyle karışık tarım yapılan alanlarda güvenle kullanılır (Tepe 1997). Fotokimyasal reaksiyonlara karşı dayanıklı olan 2,4-D, *bütüncül* etki gösteren *seçici* (selective) bir herbisittir (Fairchild *et al.* 1997). Ticari olarak çok farklı markalarda üretilen 2,4-D ve benzerleri genelde kendi adları ile satılır. 2,4-D bitki yapraklarına püskürtme yöntemi ile verilir ve stomalardan yaprak dokusu içine emilir. Bitki yapraklarına alınmış olan 2,4-D floem borularından tüm bitkiye yayılarak bütüncül etki gösterir (Fairchild *et al.* 1997).

Monokotil bitkilere göre dikotil bitkiler 2,4-D gibi oksinik herbisitlere daha hassastır. Oksinik herbisitler bu özelliklerinden dolayı, monokotil bitkilerle yapılan tarımda zararlı dikotil bitkilerin mücadelesinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Dikotil ve monokotil bitkiler arasında morfolojik ve herbisit metabolizması bakımından farklılıkların varlığı hassaslık ve toleranslılığı ortaya çıkarır (Sterling and Hall 1997). Dikotil bitkilerde oksinik herbisit uygulamasından sonra floem dokusunun hasar görmesi sonucu anormal hücre çoğalması gerçekleşir. Monokotillerin morfolojik farklılığı ise bu oksinik herbisitlere toleranslılığı ortaya çıkarır. Monokotillerde koruyucu sklerenkima dokusu ile çevrilmiş floem, demetler şeklinde dağınık ve serpiştirilmiş biçimde olmasından dolayı oksinik herbisitlere toleranslılık ortaya çıkar (Boutin *et al.* 2004). Ayrıca, vasküler demetlerde kambiyum ve perisikl bulunmayışı,

genç yaprak ve gövdede ek meristem dokular bulunması monokotillerin oksinik herbisit toleranslılığını kuvvetlendirir (Sterling and Hall 1997). Monokotil türlerde oksinik herbisitlerin hidrolizinin kısmen gerçekleşmesi, dikotil türlerde ise herbisit moleküllerinin geri dönüşümlü herbisit-protein komplekslerini oluşturarak herbisit aktivitesine devam ettirmesi monokotil ve dikotil bitkiler arasında farklılığı ortaya koyan bir başka etmendır (Boutin *et al.* 2004)

1940'lı yıllardan beri 2,4-D'nin tarımda yaygın olarak kullanılmasına rağmen çevresel ve insan üzerine etkisi ile ilgili bilgiler yetersizdir (IARC 1977, 1983, 1986, 1987). 2,4-D oksinlerin taklidini yaparak bitkilerde büyümeye katkı sağlarken, memelilerde ve diğer türlerde taklidini yaptığı herhangi bir hormonal aktivite bilinmemektedir (Osterloh *et al.* 1983). Dünya sağlık örgütüne göre içme sularında izin verilen maksimum 2,4-D miktarı 30 µg/L'dir (WHO 1998). Kanada İçme Suyu Rehberine göre ise bu miktar 100 µg/L'dir (Canadian Drinking Water Guidelines 2002). Diğer ülkelerin bu konuda belirlediği bir sınır olmamakla birlikte genelde Kanada İçme Suları Rehberine atıf yapılmaktadır. Tarım arazileri sulama sularında ise maksimum 2,4-D miktarının 0.006 µg/L, diğer bir ifade ile tespit sınırlarının altında olması gerektiği bildirilmiştir (Canadian Drinking Water Guidelines 2002).

Yıllık dünya tüketimi milyon kilogramlarla ifade edilen 2,4-D, sadece hedefi olan yabani otlara zarar vermemektedir. Bilinçli veya bilinçsiz bir şekilde kullanılan 2,4-D toprağa, içme suyuna, su kaynaklarına, buharlaşan ester formları ile birlikte havayı kirletmektedir. 2,4-D'nin önemli bir çevresel kirletici olduğu ve canlıların sağlığını tehdit ettiği ile ilgili araştırma raporları mevcuttur. 2,4-D hedef organizmalarda büyüme hızını düşürür, üreme problemlerine neden olur, canlı davranışlarında ve görünüşünde değişikliklere neden olur ve sonunda hedefini öldürür. Kuzey Amerika sulak alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmaya göre 2,4-D ile birlikte en az 7-8 pestisit sularda önemli miktarda biriktiğini göstermiştir (Donald *et al.* 1999). Kanada'da gerçekleştirilen bir başka çalışma, % 60'ı başta 2,4-D olmak üzere nehir suyu örneklerinin birçok herbisitle kirlendiğini göstermiştir (Forsyth *et al.* 1997). 2,4-D'nin bazı hayvanlar üzerinde negatif etkileri de rapor edilmiştir. 2,4-D'nin farelerde doğum oranını azalttığı, anormal yavruların olduğu bildirilmiştir (Duffard *et al.* 1996). 2,4-D'nin suda yaşayan

hayvanlar üzerinde toksik etkileri rapor edilmiştir. Wang *et al.* (1994) balıklarda 2,4-D birikiminin ciddi boyutlarda olduğunu vurgulanmıştır. 2,4-D'nin bir parçalanma ürünü olan 2,4-diklorofenol bileşiğinin solucanlarda 2,4-D'nin kendisine göre en az 15 kat daha toksik olduğu rapor edilmiştir (Roberts and Dorough 1984).

Klorofenoksi bileşiklerinin insanlarda sistematik toksisite oluşturulmasıyla ilgili başlıca belirti iştah kaybıdır. 2,4-D toksisitesinin öldürücü sonuçları gözlenen birçok raporda böbreklerin bozulması, idrar asitliği, elektrolit dengesizliği ve bunların sonucunda oluşan doku ve organ bozukluklarıdır (Keller *et al.* 1994; Flanagan *et al.* 1990). Diğer klorofenoksi bileşiklerde benzer semptomlara rastlansa da aynı değildir. 2,4-D yutan kişilerde birkaç saat içinde kusma, ishal, baş ağrısı, zihin karışıklığı, agresif davranışlar görüldüğü rapor edilmiştir (Ftiesen *et al.* 1990; Prescott *et al.* 1979; Flanagan *et al.* 1990). Zehirlenmenin göze çarpan bir özelliği de vücut sıcaklığında ve solunum hızında artmadır. Bu semptomlar sonrası kaslarda zayıflama ve merkezi sinir sisteminde bozukluklar ortaya çıktığı da rapor edilmiştir (Flanagan *et al.* 1990).

2.2.2 3,6-Dikloro-2-metoksibenzoik asit (Dikamba)

Dikamba ilk defa USA'da 1967 yılında herbisit lisansı almıştır. Dikamba geniş yapraklı bitkilerde çimlenme öncesi veya sonrası uygulanan, seçici etki gösteren benzoik asit kimyasal ailesine dahil bir oksinik herbisittir. Dikamba, arpa, yulaf, buğday, mısır ve sorghum gibi hububatların bulunduğu tarım arazilerindeki yenice çimlenmiş geniş yapraklı zararlı otların kontrolü için kullanılan seçici bir herbisittir (Alberta Agriculture 1989). Hedef otlar genelde karabuğday, yoğurt otu, çitsarmaşığı, kanaryaotu, devedikeni, fakirotu ve kuzukulağıdır. Dikamba asit veya tuz formda farklı şekillerde ticari üretimi yapılan, katı şekli beyaz ve kahverengi arasında, suda çözünür, oksitlenmeye dayanıklı ve uçucu olmayan bir herbisittir (Ahrens 1994). Dikamba, 2,4-D ve MCPA gibi diğer oksinik herbisitler için geçerli olan yöntemlerle bitkiye zarar verir. Bu nedenle, dikamba üzerinde yapılan çalışmalar 2,4-D için olan kadar değildir. Dikambanın yüksek dozda uygulandığı bitkilerde hücre bölünmesini ve büyümeyi inhibe ettiği bildirilmiştir (Ahrens 1994). Dikamba bitki köklerinden, gövdesinden ve

yapraklarından emilerek tüm bitkiye dağılır (Caux *et al.* 1993). Tolerant bitkilerde hassaslara göre dikamba'nın bitki içindeki taşınması daha yavaştır (Ahrens 1994). Köpek, fare ve tavşanlar üzerine yapılan araştırmalarda dikambanın düşük toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (EPA 1999). İştah kaybı, kilo kaybı, deri ve göz yanmaları dikamba için insanlarda belirlenen bazı semptomlardır (EPA 1999). Daha pahalı olması nedeniyle 2,4-D'ye göre daha az kullanımı olsa da, 2,4-D ile baş edilemeyen zararlılar ile mücadelede tercih edilmektedir (Filkowski *et al.* 2003). Kanada İçme Suları Rehberine göre içme sularında izin verilen maksimum dikamba 120 µg/L, sulama sularında ise 0.006 µg/L'dir. Kanada'da yapılan bazı çalışmalara göre, tarım arazilerine yakın nehir ve göl sularında önemli ölçüde dikamba'nın varlığı bu kimyasalın önemli bir çevresel kirletici olduğunu göstermektedir (Hill *et al.* 2002; Filkowski *et al.* 2003).

2.3 Genotoksisite ve İzlenmesi

Genotoksisite, hücrenin genetik materyal bütünlüğünü etkileyen zarar verici bir etkiyi tanımlar. Genotoksik etmenler hücre DNA'sında hasara veya genetik mutasyonlara neden olan mutajenik veya kanserojenik olarak bilinir. Bazı kimyasallar ve belirli tip radyasyonlar genotoksik özellikli etmenlerdir. Çevresel kirleticilerin bir kısmı organizmaların genomu seviyesinde tahribatlar yaparak genom bütünlüğüne zarar verirler. Bitkiler hareketsiz organizmalardır ve çevresel kirleticilere doğrudan maruz kalmaktadır. Çevresel kimyasalların hücre yapısı veya fonksiyonunda hasar oluşturan (sitotoksik), normal kromozom davranışlarını bozan (sitogenetik) ve DNA molekülünde genetik bilginin değişmesi anlamında mutasyonlara neden olan hasarların oluşması (mutajenik) gibi sonuçların izlenmesinde ve araştırılmasında bitkiler kullanılabilir. Genotoksinlerin bitkiler üzerinde oluşturdukları etkilerin son durumları biyokimyasal (örneğin; total protein içeriği, klorofil pigment içeriği, karotenoid içeriği, ALAD enzim aktivitesi), fizyolojik (örneğin; kök ve fide büyümesi), kromozomal (mikronükleus assay, kromozomal aberasyon assayı) ve moleküler seviyede takip edilebilir (Antonsiewicz 1990; Gichner and Plewa 1998; Rank and Nielsen 1994; Conte *et al.* 1998; Atienzar *et al.* 1999; Kovalchuk *et al.* 2001; Yıldız *et al.* 2009; Cenkci *et al.* 2009). Bu bağlamda, çevresel kirliliğin neden olduğu muhtemel genetik hasarın izlenmesinde

hayvan biyotestlerine alternatif olarak *Allium cepa* (mutfak soğanı), *Arabidopsis thaliana* (tere otu), *Hordeum vulgare* (arpa), *Glycine max* (soya fasulyesi), *Tradescantia* spp. (telgraf çiçeği), *Vicia faba* (bakla), *Zea mays* (mısır) ve *Phaseolus vulgaris* (fasulye) gibi bitkiler kullanılmaktadır (Ma *et al.* 1995; Enan 2006; Liu *et al.* 2007; Cencki *et al.* 2009).

2.3.1 Tek Hücre Jel Elektforezi (Comet Assay)

İlk kez 1984 yılında Östling ve Johanson (1984) tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasarını tespit etmek üzere tek hücre jel elektforezi (*Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE*) geliştirilmiştir. Bu araştırmacılar, lam üzerinde ince bir tabaka agar jeline süspansiyon ettikleri az sayıdaki hücreyi, tuz ve deterjanlarla lizis ettikten sonra, nötral şartlarda elektforeze tabi tutmuşlardır. Kırılmış ve hafif DNA parçalarına elektforez sırasında uygulanan elektrik akımı çekirdekten hızlı göçü sağlamıştır. SCGE, hasar görmüş DNA'nın elektforez ile çekirdekten ayrılması prensibine dayanır. Eğer DNA kırık içeriyorsa; hasarlı DNA çekirdekten anoda doğru göç etmekte ve etidyum bromür gibi flüoresan bağlayıcı bir boya ile boyandıklarında hasarlı hücreler, kuyruklu yıldız (comet) benzeri görünüm almaktadır (Östling and Johanson 1984).

DNA çift iplik kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysaki DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Nötral şartlarda proteinler DNA sarmalından tam olarak uzaklaşmadığından ilerleyen yıllarda alkali şartlar altında (pH > 13) DNA tek sarmal kırılmalarının tespitine izin veren yöntemle comet assay geliştirilmiştir (Singh *et al.* 1988). Kullanılan daha güçlü alkali lizis koşulları büyük oranda (% 95) proteinleri DNA'dan uzaklaştırmaktadır. Alkali elektforez uygulaması ile alkali bölgelerin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde belirlenmesi sağlanmıştır (Singh *et al.* 1988; Tice *et al.* 1990). Böylelikle, hücrelerde mevcut olan herhangi bir seviyedeki DNA hasarı alkali comet assay kullanılarak doğrudan tespit edilmektedir. DNA hasarının analizi için güçlü bir genetik test olan comet assay, ökaryotik hücrelerde tek iplik kırıklarının yanı sıra, çift iplik

kırıkları, alkali sabit yerleri (öncelikle apürinik ve aprimidinik yerleri) tamamlanmamış kesip çıkarma onarım yerlerini ve DNA çapraz bağlantılarını da içine alan çok farklı uygulamalar için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Comet assay DNA hasarının kantitatif ölçülmesi yanında, DNA hasar/onarım tespiti ve mekanizması çalışmalarında kullanılmaktadır (Tice *et al.* 2000; Olive *et al.* 1990).

Teorik olarak comet assay tüm ökaryotik hücreler için uygulanabilir. İnsan lenfositlerinde oksidatif hasar, UV ve iyonize radyasyona duyarlılıkların incelenmesi başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Collins *et al.* 1997). Özellikle, meslekleri nedeniyle çeşitli kimyasal maddelere maruz kalan kişilerin izlenmesinde (*human biomonitoring*) comet assay yaygınca kullanılmaktadır (Collins *et al.* 1997; Faust *et al.* 2004). Comet assay genelde hayvan sistemlerinde çalışılsa da, son yıllarda genotoksinlerin bitki kökü ve yapraklarındaki genotoksik etkilerinin takibinde de kullanılmaktadır (Koppen and Verschaeve 1996; Gichner and Plewa 1998; Angelis *et al.* 1999; Menke *et al.* 2001; Yıldız *et al.* 2009).

Comet hasarlarını değerlendirmek ve tayinini yapmak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Değerlendirme tekniklerinin en basiti, hasar derecelerine göre cometleri göz ile saymak ve gruplandırmaktır (genelde 4 veya 5 sınıfta) (Olive *et al.* 1990; Anderson *et al.* 1994; Kocyığıt *et al.* 2005). Gözle görüntü analizinde göç etmiş hücreler, sıklıkla kuyruk uzunluklarına göre sınıflandırılarak ayırt edilebilmektedir. Belli bir bölgedeki DNA miktarı, o bölgedeki flüoresans yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu özellikten yararlanarak dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti gibi çeşitli comet parametreleri ölçülebilmektedir. Kuyruk momenti; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranının çarpımı olarak tanımlanmaktadır. Bunlar arasında kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık kullanılanlar olmasına rağmen, önerilen ve kullanımı gittikçe artan ölçüm parametresi hücre nükleusundan ayrılan kuyruk DNA yüzdesidir. Çünkü bu parametre cometlerin görünür kısmıdır ve DNA kırık frekansı ile doğru orantılıdır (Tice *et al.* 2000; Hartmann *et al.* 2003).

Comet assayin farklı yöntemlerle uygulanması, elde edilen sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lizis solüsyonu içeriği (tuz konsantrasyonu ve pH) ve uygulama süresi, metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle comet çalışılan laboratuvarlarda teknik optimize edilmelidir (Hartmann *et al.* 2003). Az sayıda hücreye gereksinimi, farklı ökaryotik hücre gruplarına uygulanabilmesi, hızlı ve kolay olması, hassaslığı, az maliyetli oluşu ve tekrarlanabilir sonuçlar üretmesi comet assayin avantajları olarak sayılabilir (Collins *et al.* 1997; Gichner and Plewa 1998). Prokaryotlara uygulanmaması, çekirdek izolasyonu zor olan hücrelerde uygulama zorluğu, DNA hasar ve mutasyonlar hakkında yüzeysel bilgi vermesi gibi hususlar comet assayin dezavantajları olarak belirtilebilir (Collins *et al.* 1997; Hartmann *et al.* 2003).

2.3.2 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Tekniği (RAPD)

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD*) tekniği ilk defa 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nu temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams *et al.* 1990).

RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde, nükleotid sırasında belirli bir ölçü olmadan rastgele hazırlanan primerlerin (yaklaşık 10 baz), düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfî olarak, komplementeri olan hedef bölgelere yapışması ve bu bölgelerin PCR döngüleri ile geometrik olarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Bardakçı 2001). PCR tekniğiyle çoğaltılmış bu DNA parçacıkları, elektroforez tekniğiyle agaroz jelde birbirinden ayrılırlar. Elektriksel ortamda molekül büyüklüklerine göre sıralanan DNA parçacıkları daha sonra etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık altında görünür hale getirilir (Williams *et al.* 1990; Scott *et al.* 1992; Morgan *et al.* 1993; Rothuizen and Wolferen 1994). RAPD-PCR yöntemiyle elde edilen ve agaroz jelde elektrik akımı altında tespit edilen görüntüye RAPD profili adı verilir. RAPD tekniği ile genomik DNA bazı parçaların çoğaltılması, kullanılan

primerlerin uzunluğuna, primerin G-C içeriğine ve primer dizisindeki tek bir n¼kleotidin bulunduğu yere g¼re değişiklik g¼sterir (Şahin 2005). RAPD tekniğinin basit olması ve aynı anda birkaç y¼z DNA parçasının PCR' da çoğalması, az miktarda ve d¼ş¼k kalitede DNA'nın yeterli olması ve DNA baz sırasına ilişkin ¼n bilgiye gereksinim duyulmaması bu tekniğin avantajları arasındadır (Williams *et al.* 1990). RAPD tekniğinin geniş aralıklardaki PCR ¼r¼nlerini g¼r¼nt¼lemeye imkan vermesi bu tekniğin neden daha ¼ok tercih edildiğini a¼ıklamaktadır.

RAPD tekniğinin dezavantajı ise tekrarlanabilirliğinin d¼ř¼k olması ve dominant mark¼rler vermesidir (Atienzar and Jha 2006). RAPD metodunun g¼venilirliđini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek ¼ok fakt¼r bulunmaktadır (Bowditch *et al.* 1991). Hedef DNA, MgCl₂ konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması ve PCR d¼ng¼s¼nde kullanılan tutunma (annealing) sıcaklığı tekniğini etkileyen temel değişkenlerdir. Ayrıca PCR'da oluşan ¼eliřkili sonu¼lar i¼in, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir. RAPD ¼alıřmalarında her farklı t¼r i¼in reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır (Jones *et al.* 1997). Bunun amacı ¼zg¼nl¼đ¼ ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. T¼m bunlara rağmen, RAPD eğer iyi optimize edilmiş ise g¼venli bir şekilde uygulanabilen bir tekniktir ve kullanılmaya başlandığından beri 10000'den fazla RAPD ¼alıřması yayınlanmıştır (Atienzar and Jha 2006).

RAPD bantlarının varlığı veya yokluğu ¼alıřılan ¼r¼nekler arasındaki genetik farklılıklar olarak değerlendirilir (Weising *et al.* 1995). RAPD ¼alıřmalarında PCR ile çoğaltılan DNA parçalarının bařlangı¼ sekansları kullanılmış olan primerle komplementtir ve PCR ile oluşturulan bu DNA parçalarının boyutları genellikle 0.3-3 kb aralığındadır (Fritsch and Rieseberg 1996). RAPD ile birlikte AP-PCR (Welsh and McClelland 1990) ve DAF (Caetano-Anolles *et al.* 1991) gibi diğer DNA parmakizi metotları doğrudan genom seviyesinde genetik ¼eřitliliđi g¼steren metotlardır. RAPD, genomik ¼r¼nkte ¼nyargısız bilgi temin eder ve sınırsız sayıda mark¼rler meydana getirebilir. Kısa primerlerle genomik DNA'dan rastgele DNA parçaları çoğaltan PCR temelli bir teknik olan RAPD,

türlerin sınıflandırılması (Cenkci *et al.* 2008), genetik haritalama (Reiter *et al.* 1992) ve filogeni (Landry *et al.* 1994) gibi birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çevresel kirleticilerin doğal popülasyonların yapısı üzerine etkisi hakkında çalışmalar büyük ilgi görmektedir. Genetik etkilerin bir sınıfı, kimyasallara maruz bırakma (genotoksik etkiler) sonucunda gerçekleşen DNA köprüleri, DNA kırığı ve mutasyonları içeren DNA fonksiyonu ve yapısındaki değişimleri kapsar. Bununla birlikte, genotoksik ajanların DNA ile etkileşimleri sonucunda dolaylı genetik etkilerde ortaya çıkabilir. Genotoksinlere maruz bırakılmış popülasyonlara ait RAPD profillerinde gözlenen değişiklikler hem DNA hasarı ve mutasyonlar hem de popülasyonun genetik etkilerinden kaynaklanmış olabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (Atienzar and Jha 2006). Son zamanlarda, ontogenetik ve ekotoksikolojik (Wolf *et al.* 2004; Wang *et al.* 2007) olayların değerlendirmesinde RAPD güçlü bir teknik olarak kullanılmaktadır. Moleküler ekotoksikoloji kapsamında gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, laboratuvar ortamında oluşturulan bitki veya hayvan düzeneklerinde genotoksinlerce uyarılmış DNA hasarları RAPD tekniği ile belirlenmektedir (Cenkci *et al.* 2009, 2010). 10 bazlık RAPD primerindeki tek nükleotid değişikliği, verilen kalıp DNA'nın parmakizinde önemli farklılıklara neden olmaktadır. Benzer şekilde, genomik DNA'daki tek nükleotid değişikliklerinin de DNA parmakizinde aynı etkiye sahip olması beklenir (Atienzar and Jha 2006). Teorik olarak, genomik DNA'daki tek baz değişim mutasyonlarını RAPD tespit edebilir (Welsh and McClelland 1990).

Omurgalı ve omurgasız hayvanlar (Savva *et al.* 1994), bitkiler (Liu *et al.* 2005, 2007; Enan 2006; Cenkci *et al.* 2009, 2010) ve bakterilerde (Wang *et al.* 2007) genotoksinlerin etkisi ile genomik DNA'da meydana gelen çeşitli DNA hasarı ve mutasyonların (örneğin nokta mutasyonları, DNA'daki insersiyon ve delesyonlar) belirlenebildiğini gösteren bilimsel yayınlar RAPD'in güçlü bir biyomarkör olduğunu göstermiştir.

RAPD tekniği kullanılarak genotoksik etkinin teşhisi, kontrol ve uygulama örneklerinden elde edilen RAPD profillerinin karşılaştırılmasıyla yapılır (Atienzar and Jha 2006). DNA hasarı ve mutasyonel olaylar, RAPD profillerinde yeni DNA

bantlarının oluşmasına, kontrol grubu RAPD profillerinde mevcut olan DNA bantlarının kaybolmasına ve RAPD profillerinin görünüşünde değişikliklere (DNA yoğunluğunun artması veya azalması) neden olur (Atienzar *et al.* 1999). Liu *et al.* (2005, 2007) kadmiyum kirliliğine maruz bırakılan arpa (*Hordeum vulgare*) ve pirinç (*Oryza sativa* L.) fidelerinde meydana gelen DNA değişikliklerini RAPD tekniği ile başarılı bir şekilde tespit etmiştir. Benzer bir çalışmada, 150 ve 350 mg/l konsantrasyonlarda uygulanan civa, bor, krom ve çinko toksik maddelerinin fasulye (*Phaseolus vulgaris*) fidelerinin kök ve yapraklarında meydana getirdiği DNA hasarları karşılaştırmalı olarak RAPD tekniği ile başarılı bir şekilde gösterilmiştir (Cenkci *et al.* 2009). Bunlara ilaveten, klasik fizyolojik ve biyokimyasal verilerde kontrol grubuna göre meydana gelen değişim oranları ile RAPD profillerinde meydana gelen değişimler karşılaştırılarak toksik maddelerin organizma üzerindeki etkileri kapsamlı olarak değerlendirilmektedir (Atienzar *et al.* 1999; Cenkci *et al.* 2010).

Toksik maddelerin etkisinde kontrol grubuna göre RAPD profillerindeki değişiklikler her bir primer için genomik kalıp kararlılık yüzdesi (*Genomic Template Stability; GTS %*) olarak hesaplanır (Atienzar *et al.* 1999). GTS yüzdeleri ile fide kök uzunlukları, protein içerikleri, pigment içerikleri gibi klasik fizyolojik ve biyokimyasal verilerin kontrol gruplarına göre değişim yüzdeleri karşılaştırılarak toksik maddelerin organizma üzerindeki etkileri yaygın olarak mukayese edilmektedir (Atienzar *et al.* 1999; Liu *et al.* 2005, 2007; Cenkci *et al.* 2010).

2.4 2,4-D ve Dikamba Genotoksisitesi

Çoğunluğu hayvan biyosistemleri olmak üzere, oksinik herbisitler 2,4-D ve dikambanın genotoksik etkilerini gösteren bazı çalışma raporları literatürde mevcuttur. Bu araştırmalara ait raporlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Filkowski *et al.* (2003), 2,4-D ve dikamba herbisitlerinin genetik etkilerini takip etmek amacıyla transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkisi üzerinde nokta mutasyonu ve homolog rekombinasyon üzerine çalışmalar yapmışlardır. Araştırmacılar, her iki herbisit

homolog rekombinasyon (A→G mutasyonu) frekansı üzerine önemli etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. İlginç olarak, içme suyu kabul edilebilir maksimum değerlerden çok daha düşük konsantrasyonlarda fenoksi herbisitlerin A→G mutasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte çift iplik kırıklarını (homolog rekombinasyonlar) ve nokta mutasyonlarını belirlemede bitkilerin kullanışlı olması fenoksi herbisitlerin mutajenik ve genotoksik moleküler mekanizmasını çalışmada *Arabidopsis*'in kullanılabilirliğini göstermiştir.

Farklı sürelerde ve ölümcül olmayan konsantrasyonlarda 2,4-D'nin teşvik ettiği DNA hasarı, *Clarias batrachus* eritrositlerinde alkalın comet assayle çalışılmıştır. Araştırma bulgularına göre, 2,4-D konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak eritrositlerdeki DNA hasar seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Ateeq *et al.* 2005).

Benzer bir başka çalışmada, 2,4-D tuzu ve ticari formunun genotoksik etkileri Çin hamster yumurta (Chinese Hamster Ovary, CHO) hücrelerinde kardeş kromatid değişimi (SCE) ve tek hücre jel elektroforezi assayleri (SCGE) ile araştırılmıştır. 2,4-D'nin her iki formu uygulama dozuna bağlı olarak SCE frekansında artışa neden olmuştur. 2,4-D'nin hücre çoğalma indeksini etkilemediği; fakat yüksek dozlarının mitotik indekste azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, kullanılan her iki 2,4-D formu doza bağımlı olarak SCGE (comet) assayde belirlenen DNA iplik kırıklarının artışına neden olmuştur. Araştırmacılar 2,4-D'nin memeli hücrelerinde SCE ve DNA hasarını teşvik ettiğini ve bu nedenle 2,4-D'nin insan için tehlikeli olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Gonzales *et al.* 2005).

Holland *et al.* (2002), 2,4-D genotoksitesini mikronükleus (MN) oluşumu ve mitotik indeks (MI) belirleme yöntemleriyle non-Hodgkin's lenfoma hücrelerinde çalışmışlardır. Hücelere 0.001 ve 1 mM aralığında 2,4-D 48 saat boyunca uygulanmıştır. 2,4-D, MN'de düşük bir artışa neden olmuş bununla birlikte replikatif indeks önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte mitotik indekste önemli bir değişim belirlenmemiştir.

Saf dikamba ve ticari formu olan Banvel'in genotoksik ve sitogenetik etkileri için Çin hamster yumurta (CHO) hücreleri kullanılmıştır. Uygulama yapılmış hücrelerde kardeş kromatid değişimi (SCE) frekansı, hücre döngüsü süreci ve hücre canlılık analizleri yapılmıştır. Araştırma bulgularına göre, dikambanın reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırarak DNA'ya hasar verdiği ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada, E vitamininin dikamba genotoksitesini azalttığı gözlemlenmiştir (Gonzales *et al.* 2009).

Saf dikamba ve ticari formu olan Banvel'in insan kanı lenfositlerindeki genotoksik etkileri kardeş kromatid değişimleri (SCE) ve hücre döngüsü assayleriyle çalışılmıştır. Dikamba 10-500 µg/ml konsantrasyon aralığında kullanılmıştır. 200 µg/ml dikamba ve 500 µg/ml Banvel konsantrasyonlarında, kontrol grubuna göre, SCE frekansında artış olduğu belirlenmiştir. Her iki kimyasal için mitotik aktivitede doza bağımlı inhibisyon tespit edilmiştir. Araştırmacılar dikamba herbisitinin DNA hasar ajanı olduğunu ve bu nedenle insan için tehlikeli kimyasal olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Gonzales *et al.* 2006).

Ateeq *et al.* (2002), aralarında 2,4-D'nin de bulunduğu bazı çevresel kirleticilerin *Allium cepa* kök meristemi mitoz hücrelerindeki sitogenetik etkilerini kromozom aberasyon (CA) assayle çalışmışlardır. 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarının *Allium*'da morfolojik değişimi teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada test edilen tüm 2,4-D konsantrasyonlarının (1-4 ppm) mitotik indekste azalmaya, anormal hücre düzeyinde artmaya, kırık, köprü ve C-mitozlarla belirlenen kromozom aberasyon verilerinde artmaya neden olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma bulgularıyla 2,4-D'nin klastojen (kromozomların yapısını değiştirebilen) bir kimyasal olduğu vurgulanmıştır (Ateeq *et al.* 2002). 2,4-D herbisitinin insan hepatoma (karaciğer tümör hücresi) hücrelerindeki, hücre canlılığı, apoptozis/nekrozis (doku ölümü) teşviki ve hücre döngüsü fazları üzerine etkileri araştırılmıştır (Tuschl and Schwab 2003). 2,4-D'nin mitokondriyal membran potansiyelinde oluşturduğu hasardan kaynaklanan apoptozisi teşvik ettiği belirlenmiştir. Buna ek olarak, konsantrasyon bağımlı olarak hücre döngüsünü etkilediği belirlenmiştir. Araştırmacılar mitokondriyal membran potansiyeli üzerine doğrudan bir etki oluşturarak 2,4-D'nin apoptozisi teşvik ettiği ve önemli bir sitotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali

Bu araştırmada, Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'nden temin edilmiş fasulye tohumları (*Phaseolus vulgaris* L. cv. G¼y¼n¼k-98) bitki materyali olarak kullanılmıştır.

3.2 Bitki B¼y¼me Koşulları

Fasulye tohumları %75 (v/v) etanol ile 2 dakika, daha sonra %5 sodyum hipoklorid ile 10 dakika muamele edilerek steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası tohumlar en az 3-4 defa distile su ile yıkanmıştır. Ağırlığının iki katı miktarı distile su ile nemlendirilmiş iki adet havlu peçete arasına yaklaşık 25 steril tohum yerleştirilmiştir. Buzdolabı poşetine yerleştirilen tohumlar $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ve karanlıkta bitki b¼y¼me kabininde 48 saat s¼relięine çimlendirilmeye bırakılmıştır.

Radikula uzunlukları ortalama olarak 1.5-2 cm'ye ulaşmış fasulye fideleri 10'lu gruplara ayrılmıştır. Fideler, 20 ml uygulama ç¼zeltisi ile nemlendirilmiş iki adet filtre kağıdı bulunduran vitro vent (107×94×96 mm, Duchefa Biochemica B.V. Hollanda) k¼lt¼r kaplarına yerleştirilmiştir. Fideler 0.1, 0.2 ve 0.3 ppm konsantrasyonlarda 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D; Duchefa Biochemie, Cas no; 94-75-7) ve 3,6-dikloro-2-metoksibenzoik asit (dikamba; Duchefa Biochemie, Cas no; 1918-00-9) ile 96 saat muamele edilmiştir. Bu konsantrasyonlar içme sularında maksimum kabul edilebilir 2,4-D (0.1 ppm) ve dikamba (0.12 ppm) miktarlarına g¼re seğilmiştir (Canadian Drinking Water Guidelines 2002). 10 ppm metil metans¼lfonat (MMS; Acros Organics, Cas no; 66-27-3) ç¼zeltisi pozitif kontrol (PK) ve distile su (dH₂O) ise negatif kontrol (NK) uygulamalarını oluşturmuştur. K¼k uçlarının test ç¼zeltilerine s¼rekli temasından emin olmak için, fide k¼kleri aynı uygulama ç¼zeltisi ile nemlendirilmiş filtre kağıdı parçaları ile kaplanmıştır. Uygulama yapılmış ve yapılmamış fideler iklimlendirme

kabini içinde $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 16/8 aydınlık/karanlık fotoperiyotta (ışık şiddeti yaklaşık: $55 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Sylvania Gro–Lux florasan lamba, F18W/GRO) büyütülmüştür.

Stres uygulamasının 96. saatinde (çimlenmeye bırakıldıktan 6 gün sonra) fasulye fidesi kök dokuları; kök büyümesi, toplam çözümlü protein içeriği, comet assay ve RAPD analizlerinde kullanılmıştır.

3.3 Kök Büyümesi ve EC_{50} Değeri

Uygulama sonunda fasulye fidelerinin primer kökleri milimetrik cetvel kullanılarak ölçülmüştür. Her bir deneme grubu için 30 fide kökü ölçülmüş, denemeler en az üç kez tekrarlanmıştır. Verilerin ortalamaları ve standart hataları SPSS 11.0 for Windows paket programı kullanılarak belirlenmiştir. Kök uzunluk değerlerinden çizilen grafiklerden faydalanarak 2,4-D ve dikamba için maksimal etkin konsantrasyonun yarısı (EC_{50}) olan kök büyüme değeri hesaplanmıştır. Bu çalışmada, EC_{50} değeri negatif kontrol grubu ortalama kök uzunluğu değerinin yarısı olarak kabul edilmiştir.

3.4 Kök Uçları Toplam Çözünür Protein İçeriğinin Belirlenmesi

3.4.1 Toplam Çözünür Proteinlerin İzolasyonu

Her bir uygulamaya ait yaklaşık 1 gr yaş kök dokusu toplam çözümlü protein izolasyonu için kullanılmıştır. Kök dokularından protein izolasyonu Damerval *et al.* (1986)'a göre yapılmıştır. Soğutulmuş porselen havan içerisinde sıvı azot kullanılarak kök dokusu toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen doku, % 0.07 β -merkaptöetanol (βME , Sigma, Cas no; 60–24–2) içeren asetonda hazırlanmış 5 ml %10'luk trikloro asetik asit (TCA, Sigma, Cas no; 76–03–9) çözeltisinde süspanse edildikten sonra ependorf tüplere (2 ml) alınmıştır. Tüpler -20°C 'de 1 saat inkübe edildikten sonra, 15 dakika 10000 rpm'de (4°C 'de) santrifüj (Nüve NF 800 R) edilmiştir. Proteinlerin çökmesi için -20°C 'de 1 saat bekletilen tüpler, 15 dakika 10000 rpm'de (4°C) tekrar santrifüj edilmiştir. Bu süre

sonunda süpernatant dökülmüş ve pelet üzerine asetonda hazırlanmış 0.5 mL β ME (%0.07) ilave edilerek vortekslenmiş ve üzerine 4.5 mL aynı çözeltiliden ilave edilerek tüpler en az 1 saat -20°C 'de tutulmuştur. Daha sonra tüpler 4°C 'de 15 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan peletler desikatörde kurutularak, kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

3.4.2 Toplam Çözünür Protein İçeriğinin Hesaplanması

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

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

3.5 Tek Hücre Jel Elektroforezi

3.5.1 Kök Nukleuslarının İzolasyonu

Tüm deneme grubu fidelerinin kök uçlarındaki hücelere ait nukleuslar izole edildikten sonra DNA hasar seviyesini belirlemek için alkali comet assay uygulanmıştır. Bu assayde kullanılan tüm kimyasallar Sigma'dan temin edilmiştir. Kök hücreleri nukleusları Pfosser *et al.* (1995)'e göre izole edilmiştir. Kökler, uçlarından 1 cm öteden kesilmiştir ve yaklaşık 20 mg kök ucu (25–30 fideye ait) buzda soğutulmuş 1 ml Tris-MgCl₂ tamponu (4 mM MgCl₂.6H₂O, %0.5 w/v Triton X-100, 0.2 M Tris, pH 7.5) içinde keskin bir jilet yardımıyla hızlıca doğranmıştır. Hücre nukleuslarının da bulunduğu karışım 50 µm naylon ağdan süzülerek bir ependorf tüp içerisine alınmıştır.

3.5.2 Alkali Comet Assay

Alkali comet assayinde kullanılacak her bir mikroskop lamı 50°C'de hazırlanmış %1'lik NMA (normal erime dereceli agaroz) ile kaplanarak düz bir yüzey üzerine ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. 100 µl %0.8'lik LMA (düşük erime dereceli agaroz) 37°C'de 20 µl çekirdek süspansiyonu ile karıştırılmıştır. Bu karışım lam üzerinde mevcut olan NMA katmanı üzerine damlatıldıktan sonra yayılmıştır. Lamalar 2-3 dakika buz kasetlerinin üzerinde katılaştırıldıktan sonra buzda soğutulmuş lizis çözeltisinde (1M NaCl; 30 mM NaOH, %0.5 w/v SDS, pH 12.3) 1 saat bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra lamalar, yatay jel elektroforez tankına yerleştirilerek DNA elektroforetik tamponda (30 mM NaOH ve 1.5 mM EDTA pH 12.3) (Fairbairn *et al.* 1995) bir saat boyunca DNA sarmal açılması için bekletilmiştir. Elektroforez buz üzerinde soğutulmuş tankta 25 voltajda (1V cm⁻¹) (30 dk) gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası, lamalar üç kez 0.4 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.5) nötralize edildikten sonra EtBr (etidyum bromür, 10 mg/L) ile boyanmıştır. Nukleus DNA'sı UV ışık kaynağı ile desteklenmiş olan floresan mikroskobu (OLYMPUS BX50F-3, Japonya) ile gözlenmiştir. Comet görünümleri; sayılmasında, sıfır (kuyuksuz), bir, iki, üç (farklı uzunlukta kuyruğa sahip olanlar) ve dört (tüm nukleus DNA'sının kuyruk oluşumuna katıldığı) şeklinde

sayılarak skorlanmıştır. Her bir lam için 25 rastgele seçilen nukleus analiz edilmiş ve her bir nukleusa comet sınıfına göre 0-4 arasında rakamlar verilmiştir. Her bir örneğin toplam DNA hasar seviyeleri 0-400 arasındaki “keyfi birimler (AU, arbitrary units)” arasında oluşturulmuştur. Her bir uygulama grubu için 100 adet nukleus değerlendirilerek elde edilen verilerin ortalamaları ve standart hataları hesaplanmıştır.

3.6 RAPD Tekniği

3.6.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler

DNA izolasyonunda kullanılan tüm kimyasallar Sigma’dan temin edilmiştir.

- a) CTAB-Bitki DNA izolasyon tampon çözeltisi: %2 CTAB, %1 PVP- 40.000, 20 mM 2-merkaptoetanol, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl.
- b) TE tampon çözeltisi: 10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0.
- c) Ribonükleaz A solüsyonu (10 mg/ml RNase A): 10 mg RNaz A 1.5 ml ependorf tüp içerisinde 1 ml 50 mM NaAcO (pH 5.5) çözeltisi ile çözülmüştür. Daha sonra, 10 dakika DNaz aktivitesinin tamamen yok edilmesi için sıcak su banyosunda bekletilmiş ve çalışma anına kadar -20°C’de saklanmıştır.
- d) Diğer Solüsyonlar: Saf etanol, %70 etanol, 2-propanol ve kloroform.

3.6.2 DNA İzolasyon Prosedürü

Genomik DNA izolasyonu için 300 mg taze kök dokusu kullanılmıştır. Genomik DNA, RAPD-PCR çalışmalarında yeterli olan Doyle & Doyle (1990) CTAB-DNA izolasyon prosedürünün laboratuvarımıza uyarlanması ile izole edilmiştir.

Kök dokusu, önceden soğutulmuş steril havan içerisine yerleştirilmiştir. Sıvı azot eklenerek kök dokusu hızlı ve etkin bir şekilde öğütülmüştür. Bu işlemi takiben, önceden soğutulmuş steril bir spatula ile havan içerisindeki öğütülmüş bitki örneği iki

ayrı steril 1.5 ml ependorf içine eşit miktarda aktarılmıştır. Aktarma işleminin ardından, önceden su banyosunda 60°C’de ön ısıtmaya tutulmuş CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisinden 1 ml her tüpe eklenmiştir. Ependorf tüpleri parmaklar arasında ters-düz edilerek karıştırılmış ve 60°C’deki sıcak su banyosuna alınmıştır. Daha sonra tüplere 0.4 ml kloroform eklenmiştir. Bu süre zarfında her 5 dakikada bir örnekler ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Tüpler, inkübasyon sonrası oda sıcaklığında 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, örneklerin süpernatantları dikkatlice temiz bir ependorf tüpe mikropipet yardımıyla alınmıştır. Tüplere 10 µl RNaz eklendikten sonra 60°C’de 20 dk bekletilmiştir. RNA temizleme işlemini takiben -20 °C’de önceden soğutulmuş iso-propanol son hacmin %60’ı olacak şekilde tüplere eklenmiş ve örnekler sarsılmadan her iki faz birbirine dikkatlice karıştırılmıştır. Bu aşamada iplikçik halinde ve beyaz renkli bir kütle toplanması gözlenmiştir. Örnekler 4°C’de 30 dk bekletildikten sonra 3000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş ve kalan sıvı damlaları tekrar santrifüj edildikten sonra mikropipetle alınmıştır. 1 ml %70’lik etanol ile yıkanan DNA pelletleri 4-5 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, DNA çökeltileri 0,2 ml TE tampon çözelti içinde çözüldükten sonra 24 saat 4°C’de bekletilmiştir. Genomik DNA, spektrofotometrik miktar tayini ve agaroz jel elektroforezde kontrolü yapıldıktan sonra alikotlara ayrılarak -20°C’de saklanmıştır.

3.6.3 DNA Miktarı ve Kalitesinin Spektrofotometrik Yöntemle Tayini

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

3.6.4 PCR Karışımı Hazırlama

Her bir PCR reaksiyonu 0,2 ml ince cidarlı ependorf tipi tüplerde 25 µl toplam solüsyon içerisinde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu bileşenleri ön denemelerde optimize edilmiştir. 25 µl PCR karışımı; 1x PCR tampon çözeltisi (50mM KCl, 1mM Tris-HCl; pH 8.8), 1 U *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA Polimeraz enzimi (Fermentase, Vilnius, Litvanya), 2.0 mM MgCl₂, 200 µM dNTP (50 µM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP), 10µM 10 baz dizilimli primer, 50 ng/µl genomik DNA ve steril ddH₂O ile hazırlanmıştır. Bu çalışmada toplam 40 adet 10 mer oligonükleotit primer (QIAGEN Operon GmbH, Cologne, Almanya) kullanılmıştır. Kullanılan primerler, sekansları ve GC içerikleri Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

3.6.5 PCR Döngüleri

PCR döngüleri, Uvigene (Uvitech Ltd. UK) marka ısı-döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR karışımları 94°C’de 4 dk başlangıç denatürasyonuna maruz bırakıldıktan sonra, toplamda 40 döngü olmak üzere; 94°C’de 45 sn denatürasyon (DNA zincirlerinin ayrılması), 37°C’de 45 sn annealing (primerlerin bağlanması) ve 72°C’de 60 sn polimerizasyon (zincirlerin uzaması) programı kullanılmıştır. 72°C’de 8 dk son polimerizasyon döngüsü gerçekleştirildikten sonra PCR döngüleri tamamlanmıştır. PCR örnekleri bekletilmeden veya -20°C saklandıktan sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

3.6.6 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerine 6X yükleme tamponu (10mM Tris-HCl pH 7.6, %0.03 bromofenol blue, %0.03 ksilen siyanol FF, %60 gliserol, 60mM EDTA) karıştırılmıştır. 1x TBE [Tris-HCl (10.8 g), Borik asit (5.5 g) ve EDTA (2 ml)] ile hazırlanan %1.8’lik agaroz jelle DNA örnekleri 100 bç DNA ladder (Fermentas GeneRuler 100 bç DNA Ladder Plus), 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA) ile birlikte yüklenmiştir. DNA örnekleri

yürütücü tampon çözeltisi (1xTBE) bulunan jel tankı içerisinde (BIO-RAD Wide Mini Sub-Cell GT System, İtalya) 100 voltta 120 dk yürütülmüştür. Agaroz jel daha sonra 10 µl (0.625 mg/ml) etidyum bromür eklenmiş 200 ml saf su içinde 20 dk bekletilerek boyamaya bırakılmıştır. Distile su ile durulandıktan sonra ultraviyole ışık altında renkli kamera ile agaroz jeli görüntülenmiştir. PCR ürünleri için %1.8 agaroz; genomik DNA'ların analizi için %0.8 agaroz kullanılmıştır.

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

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

3.6.7 RAPD Ürünlerinin Rakamsal Analizi

RAPD profillerindeki belirgin değişiklikler (negatif kontrole göre yeni bantların ortaya çıkması ve/veya mevcut bantların kaybolması) değerlendirilmiştir. Değerlendirmesi güç olan veya tüm örnekler için monomorfik DNA bantları üreten primerler değerlendirmeye alınmamıştır. Her bir primer için çoğalmış olan bantların varlığı “1” ve yokluğu “0” belirlenmiştir. Uygulama grupları arasındaki genetik benzerlik katsayıları

Nei (1978)'nin taraflı ölçüm metoduna göre POPGENE v 1.31 paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Kümeleme analizi gerçekleştirilmiş ve genetik benzerlik katsayısı deney çiftlerinin ağırlıksız aritmetik ortalamaları (unweighted pair group method with arithmetic means, UPGMA) kullanılarak POPGENE programında bir dendogram oluşturulmuştur.

3.6.8 Genomik Kalıp Kararlılığının (GTS, %) Hesaplanması

RAPD profillerinde gözlenen her bir değişikliğe (mevcut bantların kaybolması ve yeni bantların oluşması) +1 keyfi sayısı (arbitrary score) verilmiştir ve test edilen tüm primerler için her bir deneme grubu için ortalama hesaplanmıştır. RAPD profillerinde değişikliğin belirlenmediği veya sayılması güç skorlar üreten primerler genomik kalıp kararlılığı (GTS, Genomic Template Stability) hesaplanmasına katılmamıştır. GTS (%), $100 - (100 \cdot a/n)$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır formüldeki “a” her bir primer için DNA profillerindeki değişiklik gösteren ortalama DNA bant sayısını, “n” ise negatif kontrol grubu profilinde aynı primer için belirlenen toplam DNA bant sayısını ifade etmektedir (Atienzar *et al.* 1999; Lui *et al.* 2007). Her bir deneme grubu için tüm primerlerle hesaplanan GTS değerlerinin ortalamaları hesaplanmıştır. Her bir parametrenin hassasiyetini karşılaştırmak için, her parametredeki (kök büyümesi, toplam çözümlü protein içeriği, comet assayle belirlenen DNA hasar skorları ve GTS değerleri) değişiklikler negatif kontrole (%100'e sabitlenmiştir) göre yüzde değişimleri olarak tekrardan hesaplanmıştır.

3.7 İstatistiksel Analizler

Verilerin varyans analizi SPSS (v 15.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Kök büyümesi, toplam çözümlü protein içeriği ve comet skorlarındaki farklılıklar tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. Duncan çoklu karşılaştırma testi, negatif kontrol ve her bir uygulama arasındaki önemli düzeydeki farklılıklar ($P \leq 0.05$) ile değerlendirilmiştir.

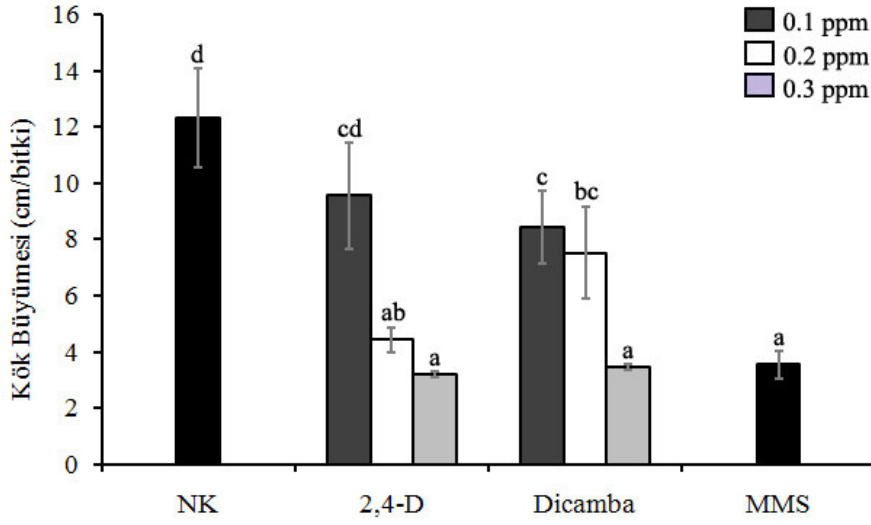
4. BULGULAR

4.1 2,4-D ve Dikamba'nın Kök Büyümesi Üzerine Etkisi

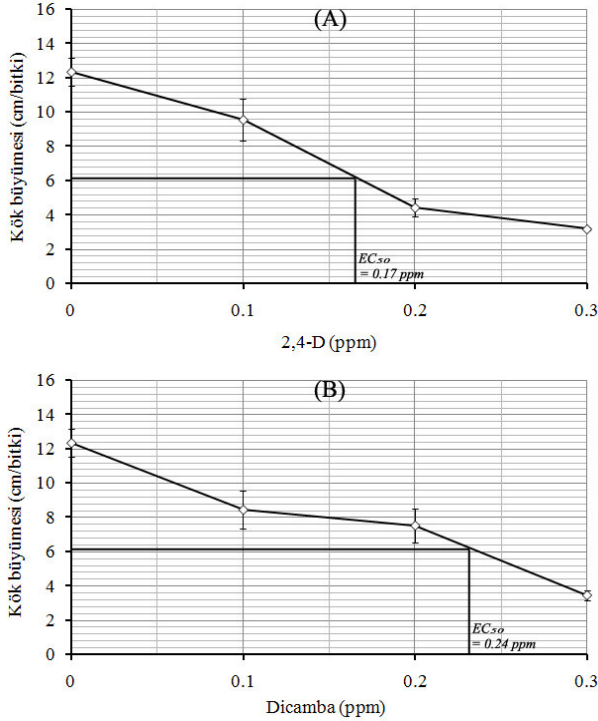
Bu araştırmada; iki günlük etiyole fasulye fideleri, negatif kontrol (NK, distile su), 10 ppm MMS (pozitif kontrol) ve 2,4-D ile dikamba herbisitlerinin farklı konsantrasyonlarında (0.1, 0.2 ve 0.3 ppm) 96 sa süreyle fotoperiyotta (16/8 sa, karanlık/ışık) ve $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de bitki büyüme kabininde büyütülmüştür. Fasulye fidelerinin kök büyümesi, NK grubuna göre MMS ve herbisit uygulamalarında (0.1 ppm 2,4-D uygulaması hariç) önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) inhibe olmuştur (şekil 4.1). Uygulama grupları arasında maksimum inhibisyonlar 0.2 ve 0.3 ppm 2,4-D (%64 ve %74), 0.3 ppm dikamba (%72) ve MMS (%71) uygulamalarında elde edilirken, bu gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P \leq 0.05$) belirlenmemiştir. 2,4-D ve dikamba konsantrasyonlarındaki bir artış fasulye fidelerinin kök büyümesini kademeli olarak inhibe etmiştir. Uygulama şartları altında, fasulye fidelerinde kök büyümesinin negatif kontrol grubuna göre $\frac{1}{2}$ oranında azaldığı etkin konsantrasyon değerleri (EC_{50}); 2,4-D için 0.17 ppm, dikamba için 0.24 ppm olarak hesaplanmıştır (şekil 4.2).

4.2 Dikamba ve 2,4-D'nin Toplam Çözünür Protein İçeriğine Etkisi

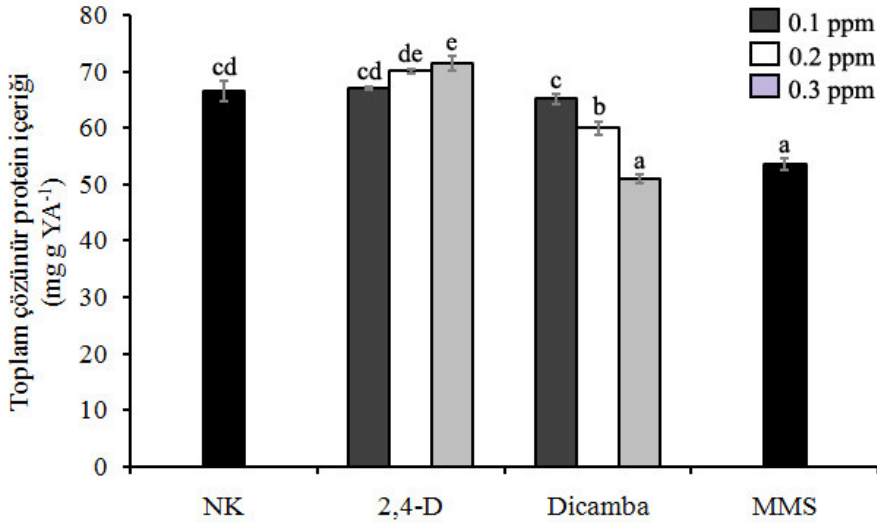
Uygulama yapılmış ve yapılmamış fasulye fideleri kök uçlarının (~1.5 cm) toplam çözünür protein içeriği Bradford (1987) yöntemine göre belirlenmiştir. Fasulye kök uçları toplam çözünür protein içeriğinde, negatif kontrol grubuna göre 0.1 ve 0.2 ppm 2,4-D ile 0.1 ppm dikamba uygulamaları arasında önemli düzeyde bir fark ($P \leq 0.05$) belirlenmemiştir. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kök uçlarında belirlenen toplam çözünür protein içeriği en yüksek 2,4-D konsantrasyonunda (0.3 ppm) önemli seviyede ($P \leq 0.05$) artmışken, MMS ve yüksek dikamba konsantrasyonlarında (0.2 ve 0.3 ppm) azalmıştır (şekil 4.3). Toplam çözünür protein içeriğindeki en yüksek inhibisyonlar 0.3 ppm dikamba (%23.5) ve MMS (%19.5) uygulamalarında elde edilmişken, 0.3 ppm 2,4-D uygulaması protein içeriğini %7.3 oranında arttırmıştır.



Şekil 4.1 2,4-D ve dikamba uygulamalarının fasulyede kök büyümesi üzerine etkisi. [NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat, $n = 30$, Ortalama değerleri gösteren barlara ait standart hata çubukları üzerindeki farklı harf(ler) veriler arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılıkları göstermektedir.]



Şekil 4.2 2,4-D (A) ve dikamba (B) stresi altındaki fasulye fidelerinde etkin konsantrasyon (EC_{50}) değerleri.

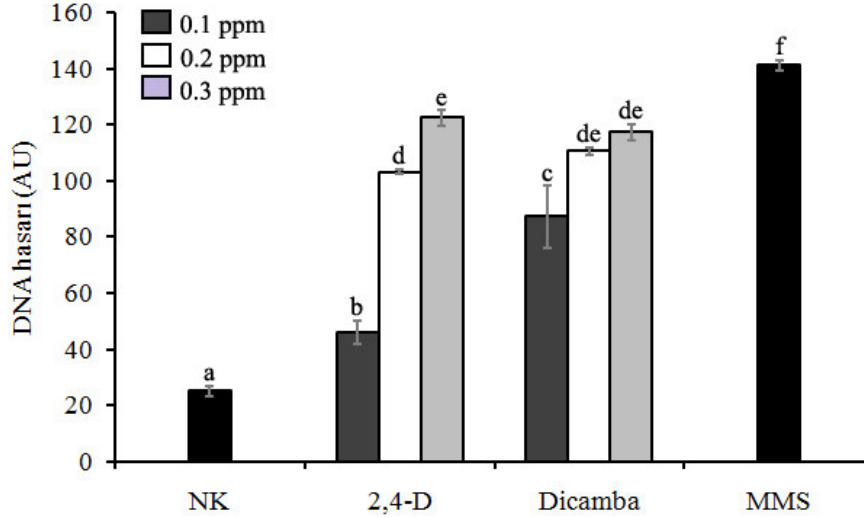


Şekil 4.3 2,4-D ve dikamba uygulamalarının fasulye köklerinde toplam çözümlü protein içeriğine etkisi. [NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat, $n = 9$, Ortalama değerleri gösteren barlara ait standart hata çubukları üzerindeki farklı harf(ler) veriler arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılıkları göstermektedir.]

4.3 Comet Assay Analizi

Uygulama yapılmış ve yapılmamış fasulye fideleri kök uçlarına ait çekirdeklere teşvik edilen DNA hasarlarını belirleyebilmek için comet assayın alkalın versiyonu kullanılmıştır. Comet assay bulgularına göre, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm uygulama gruplarında DNA hasarının önemli seviyede ($P \leq 0.5$) teşvik edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.4). Uygulama grupları arasında, hücre çekirdeklerinde en düşük DNA hasarı 0.1 ppm 2,4-D uygulamasında (46.0 ± 4.2 AU), en yüksek DNA hasarı ise MMS uygulamasında (141.3 ± 1.8 AU) belirlenmiştir. 2,4-D ve dikamba uygulamalarında konsantrasyon artışına bağlı olarak comet assayle belirlenen DNA hasarı göreceli olarak artmıştır. Bununla birlikte, 0.2 ve 0.3 ppm 2,4-D ve dikamba uygulamalarında belirlenen DNA hasarları arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar tespit edilmemiştir ($P \leq 0.5$). Bununla birlikte, herbisit uygulamaları arasında

teşvik edilmiş en yüksek DNA hasarları 0.3 ppm 2,4-D (122.7 ± 2.9 AU) ve dikamba (117.3 ± 2.9 AU) için belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 2,4-D ve dikamba uygulamalarının fasulye kök hücrelerinde comet assayle belirlenen DNA hasar seviyesi. [NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat, AU: keyfi ünite, $n = 9$, Ortalama değerleri gösteren barlara ait standart hata çubukları üzerindeki farklı harf(ler) veriler arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) farklılıkları göstermektedir.]

4.4 RAPD Analizleri

4.4.1 Genomik DNA Ekstraksiyonu

Uygulama yapılmış ve yapılmamış fasulye fideleri kök uçlarından yaklaşık 300 mg kök dokusu genomik DNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Çizelge 4.1 uygulama grupları için spektrofotometrede okunan A_{260} ve A_{280} değerlerini, DNA saflığını (A_{260}/A_{280}) ve elde edilen DNA miktarlarını ($\mu\text{g DNA / ml}$) göstermektedir.

Çizelge 4.1 Uygulama grubu fide köklerinden spektrofotometre ile belirlenen genomik DNA miktar ve saflığı

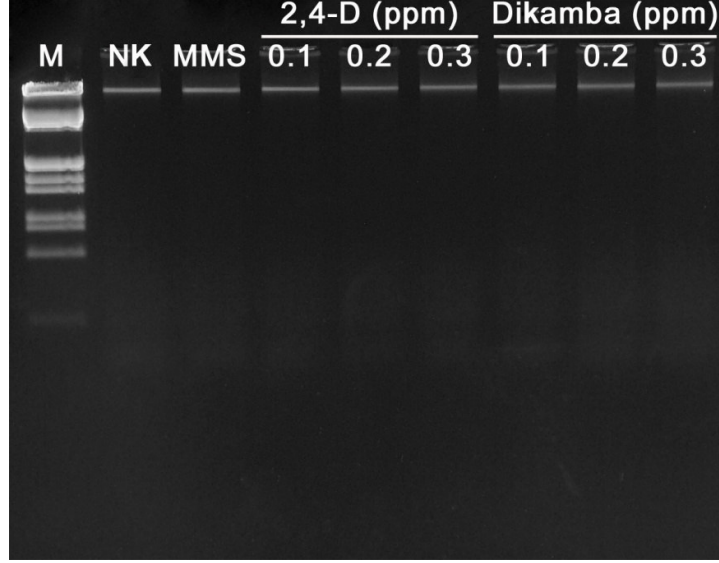
Uygulama	Konsant. (ppm)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	µg DNA/ml
dH ₂ O	0	0,058	0,031	1,87	87,0
MMS	10	0,120	0,061	1,97	180,0
	0,1	0,085	0,045	1,89	127,5
2,4-D	0,2	0,044	0,020	2,20	66,0
	0,3	0,040	0,023	1,74	60,0
	0,1	0,103	0,054	1,91	154,5
Dikamba	0,2	0,280	0,142	1,97	420,0
	0,3	0,121	0,062	1,96	181,5

Elde edilen bulgulara göre, uygulama yapılmış ve uygulama yapılmamış fidelerin 300 mg kök dokusundan ortalama olarak 160 µg/ml genomik DNA elde edilmiştir. Hesaplarımıza göre, 300 mg kök dokusundan yaklaşık 3200 adet PCR reaksiyonu kurulabilecek kadar genomik DNA izole edilmiştir. Elde edilen genomik DNA'ların saflığı (A₂₆₀/A₂₈₀) 1.73–2.2 aralığında değişmiştir (Çizelge 4.1). Hesaplanan genomik DNA miktarlarından yola çıkılarak, her bir çalışma örneği için yaklaşık 200 ng olan genomik DNA'lar, *EcoRI* ve *HindIII* ile sindirilmiş λ-DNA markörü ile birlikte %0.8 agaroz elektroforezde yürütülmüştür (Şekil 4.5). Elde edilen bulgulara göre, genomik DNA solüsyonlarının RNA'dan arındırılmış, oldukça saf ve en az 23 kilo baz çifti ebadında olduğu belirlenmiştir. Genomik DNA'lar 10 ng/µl konsantrasyon olacak şekilde double-distile suda (ddH₂O) seyreltikten sonra PCR reaksiyonu kurulumunda kullanılmıştır. PCR öncesi stok ve çalışma genomik DNA'ları -20 °C'de derin dondurucuda aliyotlara ayrılarak saklanmıştır.

4.4.2 RAPD Profilleri

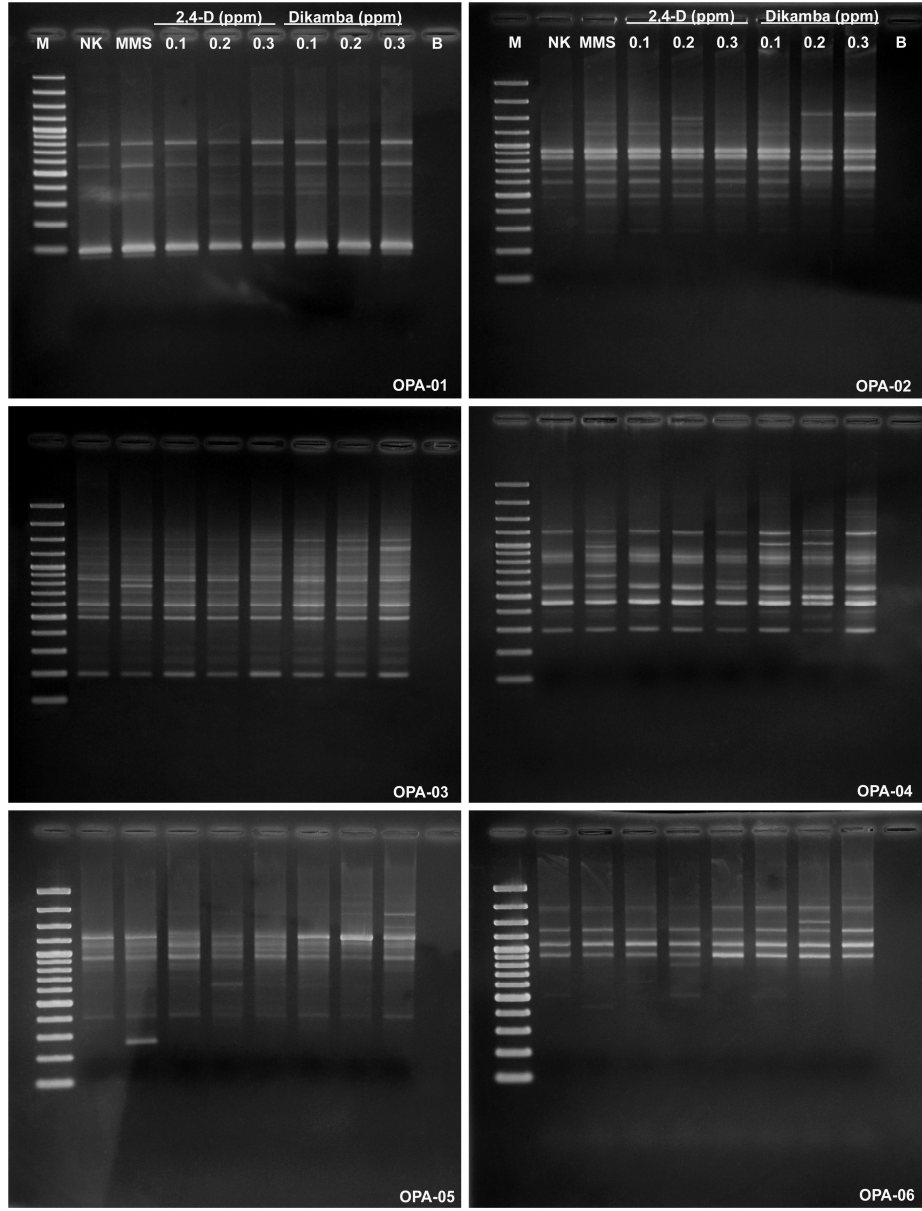
Bu araştırmada, GC oranı % 50- 70 olan Operon A (OPA) ve Operon B (OPB) serisi 40 adet primer ön denemelerde kullanılmıştır. Bu primerlerden 18 tanesi değerlendirilebilir

ve bilgi verici RAPD profilleri üretmiştir. 18 primer kullanılarak uygulama yapılmış ve yapılmamış fidelerin köklerinden elde edilen genomik DNA'lardan elde edilen RAPD profillerine ait jel görüntüleri Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

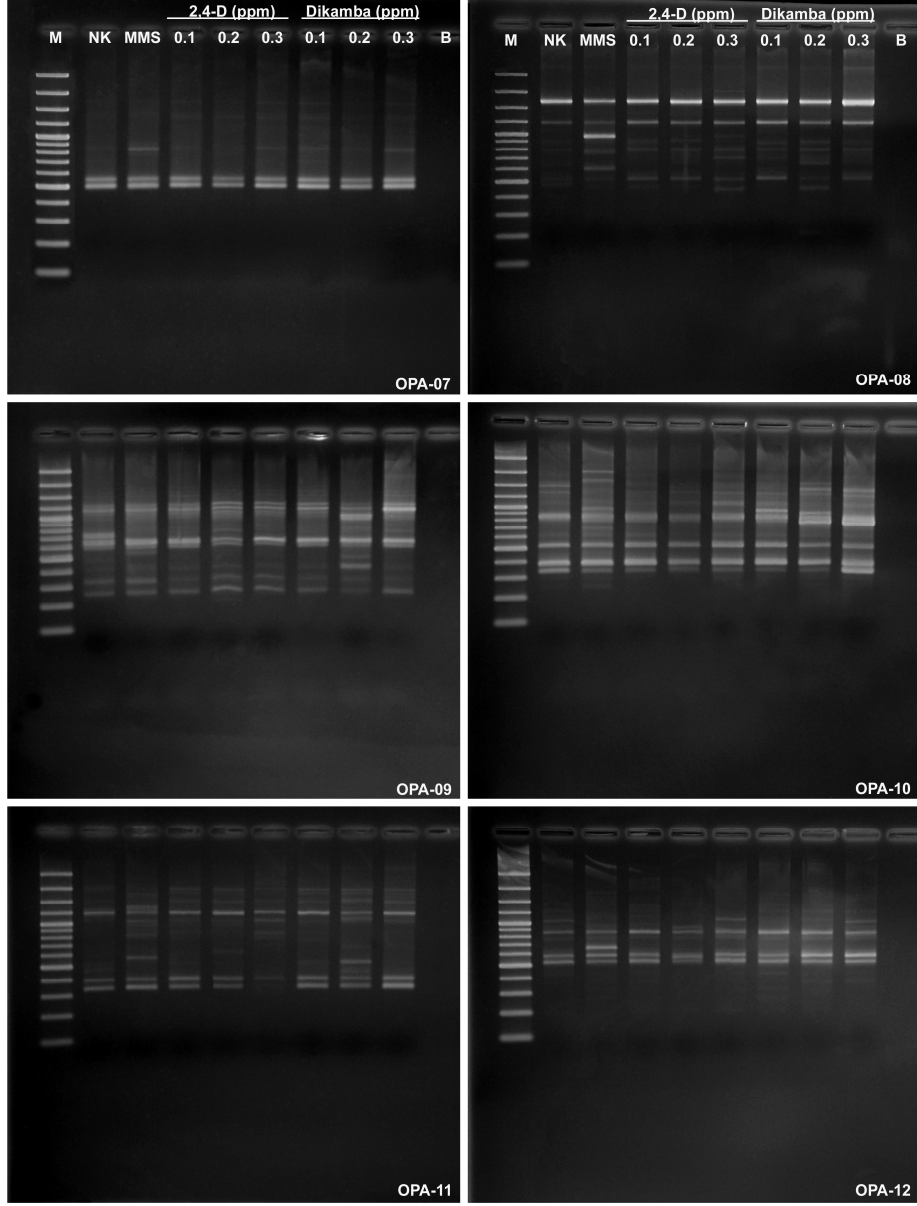


Şekil 4.5 2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye fide köklerinden ekstre edilen yaklaşık 200 ng genomik DNA. [M: *EcoRI* ve *HindIII* ile sindirilmiş λ -DNA, NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat]

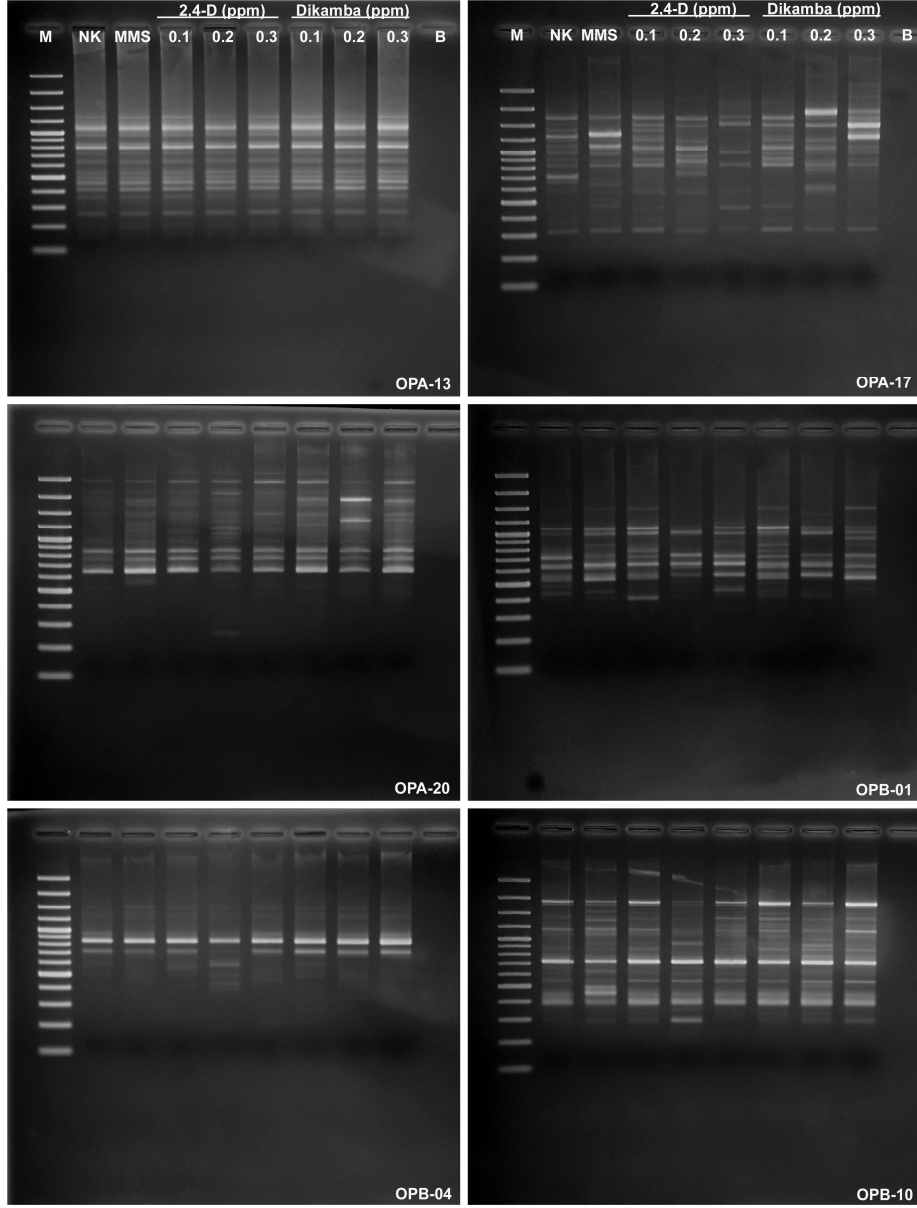
Her bir agaroz jelin birinci hattında RAPD profillerine ait DNA bantlarının moleküler ağırlığını belirlemek için 100 bç DNA ladder markörü yürütülmüştür. Bu 18 primerin kullanımıyla her bir uygulama grubunda elde edilen DNA bantlarının varlığı "1" ve yokluğu "0" Çizelge 4.2'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. RAPD sonuçlarına göre, primer OPA01 (6 DNA bandı), OPA07 (3 DNA bandı) ve OPA13 (12 DNA bandı) her bir uygulama örneğinde aynı bantları üretmiştir (Şekil 4.6, 4.7, 4.8). Bu nedenle, bu primerlere ait sonuçlar RAPD analizlerinde kullanılmamıştır.



Şekil 4.6 2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye genomik DNA'larından OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05 ve OPA06 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. [M:, GeneRuler 100 bp, Fermentas, B: Genomik DNA eklenmeyen PCR reaksiyonu, NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat]



Şekil 4.7 2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye genomik DNA'larından OPA07, OPA08, OPA09, OPA10, OPA11 ve OPA12 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. [M:, GeneRuler 100 bp, Fermentas, B: Genomik DNA eklenmeyen PCR reaksiyonu, NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansulfonat]



Şekil 4.8 2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye genomik DNA'larından OPA13, OPA17, OPA20, OPB01, OPB04 ve OPB10 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. [M:, GeneRuler 100 bp, Fermentas, B: Genomik DNA eklenmeyen PCR reaksiyonu, NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat]

Çizelge 4.2 Her bir uygulama örneği için 18 primerle belirlenen DNA bantların ebatları (BE) ve negatif kontrole (NK) göre, 2,4-D ve dikamba uygulamalarında mevcut “1” ve kayıp “0” bantlar [MMS; 10 ppm metil metansülfonat]

No	Primer	B.E.	NK	MMS	2,4-D (ppm)			Dikamba (ppm)		
					0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
1	OPA01	1965	1	1	1	1	1	1	1	1
2		1320	1	1	1	1	1	1	1	1
3		911	1	1	1	1	1	1	1	1
4		855	1	1	1	1	1	1	1	1
5		400	1	1	1	1	1	1	1	1
6		351	1	1	1	1	1	1	1	1
7	OPA02	2000	0	0	0	0	0	0	1	1
8		1831	0	0	0	1	0	0	0	0
9		1526	1	1	1	1	1	1	0	1
10		1339	1	1	1	1	1	1	0	1
11		1055	1	1	1	1	1	1	1	1
12		954	1	1	1	1	1	1	1	1
13		810	1	1	1	1	1	1	1	1
14		668	1	1	1	1	1	1	0	1
15		617	0	0	0	0	0	0	0	1
16		543	1	1	1	1	1	1	1	1
17		506	1	1	1	1	1	1	1	1
18		309	0	1	1	1	1	1	1	1
30	OPA04	2120	0	0	0	0	0	0	0	1
31		1624	0	0	0	0	0	0	0	1
32		1547	0	0	0	0	0	0	0	1
33		1173	1	1	1	1	1	1	1	1
34		1013	0	1	0	0	0	1	1	0
35		962	0	1	0	0	0	0	0	0
36		854	1	1	1	1	1	1	1	1
37		791	1	1	1	1	1	1	1	1
38		692	0	0	0	0	0	0	0	1
39		645	0	1	0	0	0	0	0	0
40		607	0	0	0	0	1	0	0	0
41		552	1	1	1	1	1	1	1	1
42		488	1	1	1	1	1	1	1	1
43		454	1	1	1	1	1	1	1	1
44		395	1	1	1	1	0	1	0	1
45		367	1	1	1	1	0	1	1	1
46		304	1	1	1	1	1	1	1	1
64		OPA08	3110	1	1	1	1	1	1	1
65	1720		0	0	0	0	1	0	0	0
66	1523		1	1	1	1	1	1	1	1
67	1047		1	1	1	1	1	1	1	1
68	846		0	1	0	0	1	0	0	0
69	772		1	0	1	1	0	1	1	1
70	685		1	1	1	1	1	1	1	1
71	614		0	0	0	0	1	0	0	0
72	575		0	0	0	0	0	0	1	0
73	512		0	1	0	0	0	0	0	0
74	442		1	1	1	1	1	1	1	1
75	381	1	1	1	0	1	0	1	0	
76	OPA09	2728	0	0	0	0	0	0	0	1
77		1636	1	1	1	1	1	0	1	0

Çizelge 4.2 Devamı

No	Primer	B.E.	NK	MMS	2,4-D (ppm)			Dikamba (ppm)		
					0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
78		1268	1	1	1	1	1	1	1	1
79		1136	1	1	1	1	1	1	1	1
80		1074	1	1	1	1	1	1	1	1
81		800	1	0	0	1	0	0	1	1
82		659	1	1	1	1	1	1	1	1
83		609	1	1	1	1	1	1	1	1
84		565	0	1	0	0	0	0	0	0
85		535	1	1	1	1	1	1	1	1
86		500	1	0	1	0	0	0	1	0
87		427	1	1	1	1	1	1	1	1
88		265	1	1	0	1	1	1	1	1
89	OPA10	2143	0	1	0	0	0	0	0	0
90		1666	0	1	0	0	0	0	0	0
91		1564	0	0	0	0	0	0	1	0
92		1472	1	0	0	0	0	0	1	1
93		1287	1	0	0	1	1	1	1	1
94		1078	1	1	1	1	1	1	1	1
95		982	0	1	0	0	0	1	0	0
96		889	0	0	0	0	0	0	1	0
97		835	1	1	1	1	1	1	1	1
98		700	0	1	0	0	0	0	0	0
99		617	1	1	1	0	1	1	1	1
100		522	1	1	1	1	1	1	1	1
101		388	1	1	1	1	1	1	1	1
102		343	1	1	1	1	1	1	1	1
103	OPA11	2000	1	0	1	1	1	1	1	1
104		1557	1	0	1	1	0	1	1	1
105		1342	0	1	0	0	0	0	0	0
106		1219	1	1	1	1	1	1	1	1
107		1046	1	1	1	1	1	1	1	1
108		889	0	0	1	0	1	0	0	0
109		823	0	1	0	0	1	0	0	0
110		592	0	1	0	1	0	0	0	0
111		545	1	0	0	1	0	1	1	0
112		462	1	0	0	0	0	0	1	0
113		400	1	1	1	1	1	1	1	1
114		351	1	1	1	1	1	1	1	1
115	OPA12	812	1	0	0	0	1	0	1	1
116		742	0	0	0	1	0	0	0	1
117		649	1	1	1	1	1	1	1	1
118		463	0	1	0	0	0	0	0	0
119		384	1	1	1	1	1	1	1	1
120		322	1	1	1	1	1	1	1	1
121	OPA17	3350	0	0	0	0	0	0	0	1
122		2724	0	0	0	0	0	0	0	1
123		1939	0	0	0	0	0	0	1	1
124		1733	1	1	1	1	1	1	1	1
125		1523	1	0	1	1	1	1	1	1
126		1409	1	0	1	0	0	0	0	0
127		1284	1	1	1	1	0	1	1	1
128		1125	1	1	1	1	0	1	1	1
129		989	1	1	1	1	1	1	1	1
130		911	1	0	1	1	0	1	0	0
131		849	1	1	1	1	1	1	1	1
132		800	0	0	0	0	0	0	1	1
133		772	0	0	0	1	0	0	0	0

Çizelge 4.2 Devamı

No	Primer	B.E.	NK	MMS	2,4-D (ppm)			Dikamba (ppm)		
					0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
134		727	1	0	0	0	0	0	0	0
135		683	1	0	0	0	0	0	0	0
136		657	0	1	0	0	0	0	1	0
137		585	1	1	1	1	1	0	0	0
138		472	0	1	0	0	1	1	0	0
139		327	1	1	1	1	1	1	1	1
140	OPA20	3300	0	0	1	1	1	1	0	1
141		2889	1	1	1	1	1	1	1	1
142		2261	1	1	1	1	1	1	1	1
143		1909	1	1	1	0	0	1	1	1
144		1879	1	1	1	0	0	1	1	1
145		1482	1	1	1	1	1	1	0	1
146		1283	0	1	0	1	1	1	1	1
147		1216	0	1	1	1	1	0	0	0
148		961	1	1	1	1	1	1	1	1
149		848	1	1	1	1	1	1	1	1
150		759	1	1	1	1	1	1	0	1
151		648	1	1	1	1	1	1	1	1
152	OPB01	1524	1	1	1	0	1	1	0	1
153		1109	1	1	1	1	1	1	1	1
154		1012	1	1	1	1	0	1	1	1
155		967	0	0	0	0	0	0	0	1
156		877	0	1	1	0	1	1	0	1
157		811	0	0	1	0	0	1	0	0
158		719	1	1	1	1	1	1	1	1
159		631	1	1	1	1	1	1	1	1
160		569	1	1	1	1	1	1	1	1
161		543	1	1	1	0	0	0	0	0
162		488	1	1	0	0	1	1	0	0
163		440	1	1	1	0	0	0	1	1
164	OPA13	1304	1	1	1	1	1	1	1	1
165		1115	1	1	1	1	1	1	1	1
166		970	1	1	1	1	1	1	1	1
167		834	1	1	1	1	1	1	1	1
168		753	1	1	1	1	1	1	1	1
169		659	1	1	1	1	1	1	1	1
170		564	1	1	1	1	1	1	1	1
171		507	1	1	1	1	1	1	1	1
172		479	1	1	1	1	1	1	1	1
173		436	1	1	1	1	1	1	1	1
174		393	1	1	1	1	1	1	1	1
175		277	1	1	1	1	1	1	1	1
176	OPB04	1555	1	1	1	1	1	1	1	1
177		1315	1	1	1	1	1	1	1	1
178		943	1	1	1	1	1	1	1	1
179		862	1	1	1	1	1	1	1	1
180		721	1	1	1	1	1	1	1	1
181		600	1	0	1	1	0	1	0	0
182		493	1	0	1	1	1	1	1	0
183		445	0	1	0	1	0	0	0	0
184		394	1	0	1	1	0	0	0	0
185	OPA07	745	1	1	1	1	1	1	1	1
186		476	1	1	1	1	1	1	1	1
187		426	1	1	1	1	1	1	1	1
188	OPB10	1870	1	1	1	1	1	1	1	1
189		1793	1	1	1	1	1	1	1	1

Çizelge 4.2 Devamı

No	Primer	B.E.	NK	MMS	2,4-D (ppm)			Dikamba (ppm)		
					0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
190		1570	1	1	1	0	0	1	0	1
191		1372	1	1	1	1	1	1	1	1
192		1217	0	0	0	1	0	1	0	0
193		1158	1	1	1	1	1	1	1	1
194		1044	1	1	1	1	1	1	1	1
195		913	0	0	0	0	1	0	1	1
196		860	1	1	1	1	0	1	1	1
197		769	0	0	0	0	0	0	1	1
198		719	1	1	1	1	1	1	1	1
199		617	1	1	1	1	1	1	1	1
200		544	1	1	1	1	1	1	1	1
201		507	0	1	0	0	0	0	1	0
202		444	1	1	1	1	1	1	1	1
203		400	1	1	1	1	1	1	1	1
204		296	0	1	1	0	1	0	1	1

Değerlendirmeye alınan 15 primer ile toplamda 998 DNA bandı çoğalmıştır ve bu bantların ebatları 182 (OPA03) ve 3350 (OPA17) baz çifti (bç) aralığında değişmiştir (Çizelge 4.3). Kontrol grubunda çoğalmış DNA bandı sayısı toplamda 127 iken, tüm uygulamalarda elde edilmiş DNA bandı toplam sayısı 183 olarak tespit edilmiştir. Her bir primer 6 (OPA12) ila 19 (OPA17) arasında DNA bandı üretmiştir. Dolayısıyla primer başına çoğalan ortalama DNA bandı sayısı 12.2 olarak hesaplanmıştır. Toplamda elde edilen 183 DNA bandının 83 tanesi monomorfik bant, geriye kalan 100 tanesi ise polimorfik DNA bandıdır. Tüm uygulama grupları için belirlenen polimorfizm ve monomorfizm yüzdeleri sırasıyla %54.6 ve %45.4 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

RAPD profilleri, uygulama yapılmamış negatif kontrol ve uygulama yapılmış (MMS, 2,4-D ve dikamba) fasulye fideleri arasında çoğalmış DNA bantlarının sayı ve ebatlarında belirgin farklılıklar (normal bir bandın kaybolması ve/veya yeni bir bandın oluşması) göstermiştir. Uygulama yapılmış fasulye fidelerinin RAPD profillerinde belirlenen bu değişiklikler tüm ayrıntılarıyla birlikte Çizelge 4.4'te verilmiştir. Yeni DNA bantlarının moleküler ebatları 281 (primer OPA05) ile 3350 (primer OPA17) baz çifti aralığında değişmiştir. Yeni bantların %61.9'u 1000 baz çiftinden küçüktür. Negatif kontrol RAPD profilleri ile karşılaştırıldığında, test edilen tüm 15 primer MMS uygulamasında 1 ila 4 yeni RAPD bandı çoğaltmıştır. Diğer taraftan, herbisitlere maruz kalan fidelerin köklerinde, 2,4-D için OPA03, OPA05, OPA06, OPA09 ve OPA10 primerleri ve dikamba için OPA11 ve OPB04 primerlerinde yeni bir DNA bandı

belirlenmemiştir (Çizelge 4.4). 2,4-D ve dikamba uygulamaları için geri kalan primerlere ait RAPD profillerinde sırasıyla 1-3 ve 1-4 yeni bant gözlenmiştir. Bununla birlikte, bazı primerler için oksinik herbisitlerin konsantrasyonundaki bir artışla yeni DNA bantlarının sayısı da artmıştır. 2,4-D için OPA08, OPA11, OPA17, OPA20 ve OPB10 primerleri ile dikamba için OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA09, OPA12 ve OPA17 primerleri ile çoğalmış olan yeni bantların sayısı 0.1 ppm konsantrasyonuna göre 0.2 ve 0.3 ppm uygulamalarında yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6–4.8). Uygulama grupları arasında en fazla yeni DNA bandı (27) MMS uygulamasında belirlenmiştir. Yeni DNA bantlarının toplam sayısı, 2,4-D ve dikamba konsantrasyonlarındaki artış ile belirgin bir şekilde artmıştır (Çizelge 4.4).

Negatif kontrol RAPD profillerinde mevcut olduğu halde uygulama gruplarında kaybolmuş bantların moleküler büyüklükleri 265 (OPA09) ve 2000 (OPA11) baz çifti aralığında belirlenmiştir. Kaybolmuş bantların büyük bir kısmı (%71.9) 1000 baz çiftinden daha küçüktür (Çizelge 4.4). Negatif kontrolde OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA20, OPB01 ve OPB10 primerleri ile belirlenen tüm RAPD bantları MMS uygulamasında da çoğalmıştır. OPA08, OPA11, OPA17, OPA20 ve OPB10 primerleri için 2,4-D konsantrasyonundaki bir artış ile kaybolan RAPD bantlarının sayısı artmıştır. Benzer şekilde, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA09, OPA12 ve OPA17 primerleri için dikamba'nın en yüksek konsantrasyonunda (0.3 ppm) kaybolan bantların sayısı düşük konsantrasyonlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Uygulama grupları arasında en fazla RAPD bandı kaybı (25 bant) 0.3 ppm 2,4-D uygulamasında belirlenmiştir. 2,4-D ve dikamba konsantrasyonundaki bir artış kaybolan bantların sayısını arttırmıştır. Özetle, toplamda en fazla RAPD bandı değişikliği (kaybolan ve yeni oluşan bantlar) MMS (45 bant) uygulamasında belirlenmiştir ve toplam DNA bandı değişikliği her iki herbisit konsantrasyonuna bağlı olarak artmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3 RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, primer sekansları, her bir primerle elde edilmiş DNA ebat aralığı, negatif kontrolde elde edilen DNA bant sayısı, monomorfik ve polimorfik DNA bant sayıları.

No	Primer Adı	Primer 5'→3' Sekans	En büyük DNA bandı	En küçük DNA bandı	Toplam çoğalmış bant	Negatif kontrol bant sayısı	Polimorfik DNA bant sayısı	Monomorfik DNA bandı sayısı	Toplam DNA bant çeşidi
1	OPA02	TGCCGAGCTG	2000	309	72	8	7	5	12
2	OPA03	AGTCAGCCAC	1461	182	82	10	1	10	11
3	OPA04	AATCGGGCTG	2120	304	79	9	10	7	17
4	OPA05	AGGGGTCTTG	1940	281	47	6	5	4	9
5	OPA06	GGTCCCTGAC	1940	440	45	6	3	5	8
6	OPA08	GTGACGTAGG	3110	381	57	7	7	5	12
7	OPA09	GGGTAACGCC	2728	265	79	11	6	7	13
8	OPA10	GTGATCGCAG	2143	343	63	8	9	5	14
9	OPA11	CAATCGCCGT	2000	351	58	8	8	4	12
10	OPA12	TCGGCGATAG	812	322	31	4	3	3	6
11	OPA17	GACCGCTTGT	3350	327	78	12	15	4	19
12	OPA20	GTTGCGATCC	3300	648	81	9	7	5	12
13	OPB01	GTTTCGCTCC	1524	440	65	9	8	4	12
14	OPB04	GGA CTGGAGT	1555	394	55	8	4	5	9
15	OPB10	CTGCTGGGAC	1870	296	106	12	7	10	17
Toplam					998	127	100	83	183
Polimorfizm					% 54,6				
Monomorfizm					% 45,4				

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

Primer	NK	MMS	2,4-D (ppm)			Dikamba (ppm)			
			0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.375	
OPA02	8	+	309	309	309;1831	309	309;2000	309;617;2000	
		-	ND	ND	ND	ND	668;1339;1526	ND	
OPA03	10	+	754	ND	ND	ND	ND	754	
		-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
OPA04	9	+	645;962;1013	ND	607	ND	1013	1013	692;1547;1624;2120
		-	ND	ND	ND	367;395	ND	395	ND
OPA05	6	+	281	ND	ND	ND	ND	1940	1524;1940
		-	ND	646	ND	646	ND	646;1078	646
OPA06	6	+	440	ND	ND	ND	ND	1440	ND
		-	500	500	ND	500	ND	500	500
OPA08	7	+	512;846	ND	ND	614;846;1720	ND	575	ND
		-	772	ND	381	772	381	ND	381
OPA09	11	+	565	ND	ND	ND	ND	ND	2728
		-	500;800	265;800	500	800	500;800	ND	1636;500
OPA10	8	+	700;982;1666;2143	ND	ND	ND	982	889;1564	ND
		-	1287;1472	1287;1472	617;1472	1472	1472	ND	ND
OPA11	8	+	592;823;1342	889	592	823;889	ND	ND	ND
		-	462;545;1557;2000	462;545	462	462;545;1557	462	ND	462;545
OPA12	4	+	463	ND	742	ND	ND	ND	742
		-	812	812	812	ND	812	ND	ND
OPA17	12	+	472;520;657	ND	772	472	472	657;800;1939	800;1939;2724;3350
		-	683;727;911;1409	683;727	683;727;1409	683;727;911;1125;1284;1409	585;683;727;1409	683;727;911;1409	585;683;727;911;1409

Çizelge 4.4 Devamı

Primer	NK	MMS	<u>2,4-D (ppm)</u>			<u>Dikamba (ppm)</u>			
			0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.375	
OPA20	9	+	1216;1283	1216;3300	1216;1283; 3300	1216;1283; 3300	1283;3300	1283	1283;3300
		-	ND	ND	1879;1909	1879;1909	ND	759;1482	ND
OPB01	9	+	877	811;877	ND	877	811;877	ND	877;967
		-	ND	488	440;488;543;1524	440;543;1012	440;543	488;543;1524	488;543
OPB04	8	+	445	ND	445	ND	ND	ND	ND
		-	394;493;600	ND	ND	394;600	394	394;600	394;493;600
OPB10	12	+	296;507	296	1217	296;913	1217	296;507;769;913	296;769;913
		-	ND	ND	1570	860;1570	ND	1570	ND
Toplam		27(+); 18(-)	7(+); 12(-)	10(+);16(-)	14(+); 25(-)	9(+);12(-)	15(+);19(-)	23(+);17(-)	
G. Top.		45	19	26	39	21	34	40	

Fasulye fidelerinin köklerinde uygulama solüsyonlarıyla teşvik edilmiş DNA polimorfizm seviyesini hesaplamak amacıyla Nei (1978) katsayılarını kullanarak benzerlik matrisini oluşturmada çok yönlü analiz yapılmıştır. Tüm primerlerle belirlenen bantların varlığı “1” ve yokluğunu “0” gösteren matris tablosu hazırlanmıştır (Çizelge 4.2). Tüm örneklerde aynı DNA bantlarını üreten OPA01, OPA07 ve OPA13 primer verileri değerlendirmede kullanılmamıştır. Tüm uygulama grupları arasındaki genetik benzerlik katsayıları POPGENE v 1.3 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki genetik benzerlik katsayıları Çizelge 4.5’te verilmiştir. Negatif kontrol grubu fidelerine göre genetik olarak en yakın (0.857) uygulama grubu 0.1 ppm 2,4-D iken MMS grubu en uzak (0.721) mesafeyi göstermiştir. Oksinik herbisit konsantrasyonu arttıkça negatif kontrol grubuna göre genetik mesafede artmıştır. Negatif kontrol grubuna göre, 0.1, 0.2 ve 0.3 ppm 2,4-D uygulamalarında belirlenen genetik benzerlik katsayıları sırasıyla 0.86, 0.82 ve 0.72 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde aynı dikamba konsantrasyonları için belirlenen genetik benzerlik katsayıları 0.84, 0.76 ve 0.73’tür. Deney grupları arasındaki genetik ilişkiyi belirleyebilmek için genetik benzerlik katsayıları UPGMA analizi ile yapılan dendogramın oluşturulması içinde kullanılmıştır (Şekil 4.9). Dendogramda uygulama yapılmış ve yapılmamış fideler iki ana küme oluşturmuştur. İlkinde, MMS uygulanmış fideler herhangi diğer bir uygulama ile grup oluşturmamış, tek başına kümelenmiştir. İkincisinde, kendi içerisinde dört farklı dallanma göstermiştir. Negatif kontrol grubu 0.1 ppm 2,4-D ile grup oluşturduktan sonra 0.1 ppm dikamba ve 0.2 ppm 2,4-D grubu ile birleşmiştir. İkinci ana grubun geri kalan iki alt grubunu 0.3 ppm 2,4-D ile 0.2 ve 0.3 ppm dikamba kümeleri oluşturmuştur. Uygulama gruplarının negatif kontrole genetik benzerliklerini gösteren değerler aynı zamanda Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

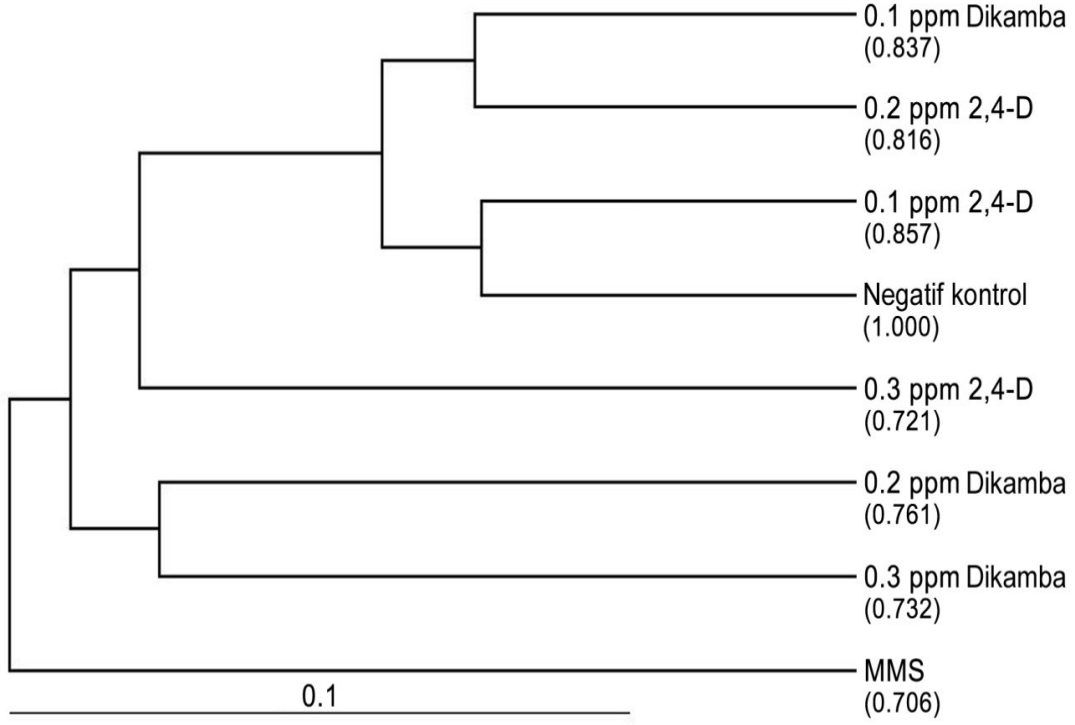
4.4.3 Genomik Kalıp Kararlılığı (GTS, %)

RAPD profillerinde belirlenen değişikliklerin nitel bir ölçüsünü gösteren genomik kalıp DNA kararlılığı (GTS,%) değerleri test edilen 15 primer için hesaplanarak Çizelge 4.6’de verilmiştir. GTS değerlerindeki en fazla azalma (%64.5) MMS uygulamasında belirlenmiştir. Bununla birlikte 2,4-D ve dikamba uygulamalarında doz artımına bağlı

olarak GTS değerleri kademeli olarak azalmıştır. 0.1, 0.2 ve 0.3 ppm 2,4-D uygulanmış fasulye fidelerinde hesaplanmış olan ortalama GTS değerleri sırasıyla %82.7, 78.8 ve 67.7 olarak belirlenmiştir. Aynı konsantrasyonlarda kullanılan dikamba herbisiti için GTS değerleri sırasıyla %79.1, 72.1 ve 67.3 olarak hesaplanmıştır (izelge 4.6). Kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği, comet assayle belirlenen DNA hasar seviyesi ve RAPD profillerinin hassaslığını karşılaştırmak amacıyla her bir parametredeki düzenlemeler kontrol değerlerinin (%100'e sabitlenmiş) yüzdesi olarak hesaplanmıştır (şekil 4.10). Bulgularımıza göre, tüm uygulamalarda fasulye fidelerine ait GTS ve kök büyüme değerleri negatif kontrolle karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde azalmıştır. Fasulye fidelerinin kök dokularındaki toplam çözünür protein içeriği MMS ve yüksek dikamba konsantrasyonlarında (0.2 ve 0.3 ppm) azalmış olmasına rağmen, 2,4-D konsantrasyonundaki bir artış toplam protein içeriğini arttırmıştır. Bununla birlikte, alkalin comet assayle belirlenen kök hücresi ekirdeklerindeki DNA hasar değerleri negatif kontrolle karşılaştırıldığında MMS ve konsantrasyona bağlı olarak artmıştır (şekil 4.10).

Çizelge 4.5 RAPD bulgularına göre 2,4-D ve dikamba grupları arasında POPGENE v1.3 paket programında hesaplanmış olan (Nei, 1978) genetik benzerlik katsayıları. [NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat]

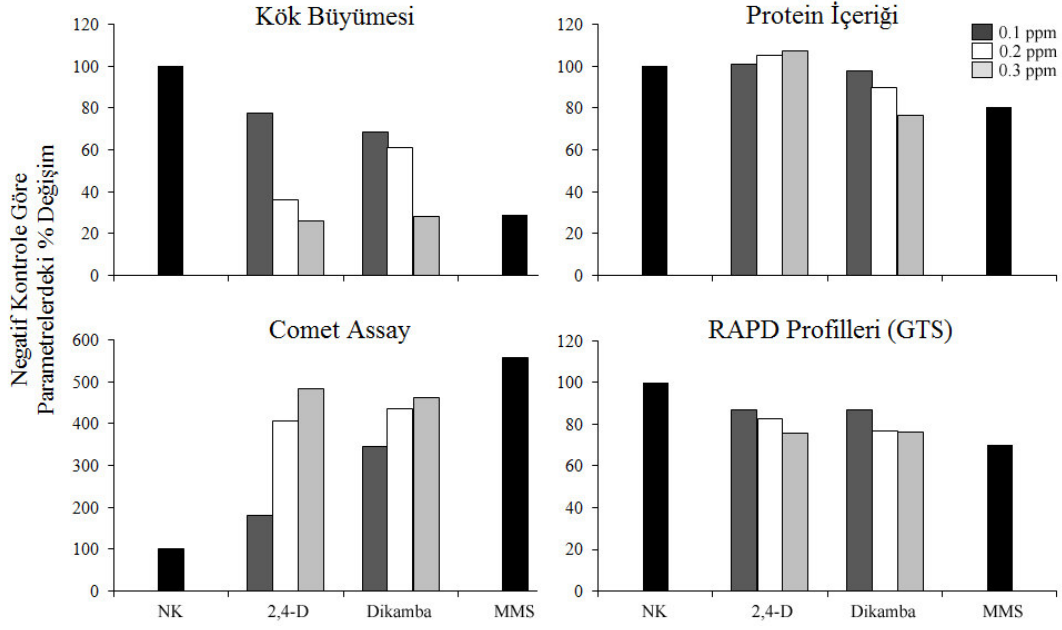
Uygulamalar		1	2	3	4	5	6	7	8
NK	1	1,00000							
MMS	2	0,70588	1,00000						
0.1 ppm 2,4-D	3	0,85714	0,7415	1,00000					
0.2 ppm 2,4-D	4	0,81618	0,69536	0,80597	1,00000				
0.3 ppm 2,4-D	5	0,72143	0,71233	0,77444	0,73529	1,00000			
0.1 ppm dikamba	6	0,83704	0,7483	0,84091	0,85496	0,75556	1,00000		
0.2 ppm dikamba	7	0,76056	0,66026	0,72535	0,70139	0,69504	0,72028	1,00000	
0.3 ppm dikamba	8	0,73154	0,66875	0,74483	0,72109	0,69178	0,75172	0,75342	1,00000



Şekil 4.9 2,4-D ve dikamba uygulamalarının fasulye fidelerinde oluşturduğu genetik polimorfizmi gösteren dendrogram. [not: parantez içerisindeki rakamlar negatif kontrole göre her bir uygulama grubu için hesaplanan genetik benzerlik katsayılarını göstermektedir, MMS:10 ppm metil metansülfonat]

Çizelge 4.6 2,4-D ve dikamba uygulanmış fasulye fidelerinde 15 RAPD primeri için hesaplanmış genomik kalıp kararlılık değerleri (GTS, %). [NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat]

	NK	MMS	2,4-D (ppm)			Dikamba (ppm)		
			0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3
OPA02	100,0	87,5	87,5	75,0	87,5	87,5	37,5	62,5
OPA03	100,0	88,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	77,8
OPA04	100,0	57,1	100,0	100,0	57,1	85,7	71,4	42,9
OPA05	100,0	90,9	90,9	100,0	90,9	100,0	72,7	72,7
OPA06	100,0	75,0	87,5	100,0	87,5	100,0	75,0	87,5
OPA08	100,0	62,5	100,0	87,5	50,0	100,0	100,0	100,0
OPA09	100,0	25,0	50,0	75,0	75,0	50,0	100,0	25,0
OPA10	100,0	50,0	83,3	83,3	91,7	83,3	83,3	100,0
OPA11	100,0	22,2	66,7	77,8	44,4	88,9	100,0	77,8
OPA12	100,0	77,8	88,9	77,8	100,0	88,9	100,0	88,9
OPA17	100,0	50,0	62,5	50,0	12,5	12,5	0,0	37,5
OPA20	100,0	83,3	83,3	58,3	58,3	83,3	75,0	83,3
OPB01	100,0	83,3	50,0	33,3	33,3	33,3	50,0	33,3
OPB04	100,0	33,3	100,0	83,3	66,7	83,3	66,7	50,0
OPB10	100,0	80,0	90,0	80,0	60,0	90,0	50,0	70,0
Ortalama	100,0	64,5	82,7	78,8	67,7	79,1	72,1	67,3



Şekil 4.10 2,4-D ve dikamba'nın fasulye fidelerinde kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği, comet assayle belirlenen DNA hasar seviyesi ve RAPD profilleri (GTS) parametrelerinde negatif kontrole göre (%100'e sabitlenmiş) değişimler. [NK: negatif kontrol, MMS: 10 ppm metil metansülfonat]

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir bitki sistemidir (Enan 2006). Fasulye hücreleri diploiddir, 11 çift kromozoma ($2n=2x=22$; $2n$ diploidi, x ise haploit kromozom sayısını ifade eder) sahiptir ve fasulye için hesaplanmış olan genom boyutu yaklaşık 637 Mbp, diğer bir ifade ile 0,66 pg/hücre'dir (Arumuganathan and Earle 1991). *Allium cepa* (Yıldız *et al.* 2009), *Arabidopsis thaliana* (Filkowski *et al.* 2003) ve *Triticum aestivum* (Wang and Zhou 2006) biyo-indikatör bitkileri gibi, *Phaseolus vulgaris* bitkisi de abiyotik faktörlerin bitkiler üzerindeki fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler etkilerini belirlemede kullanılmıştır (Enan 2006, 2007; Lizana *et al.* 2006; Cencki *et al.* 2009).

Bitki materyali olarak kullanılan Göynük-98 kültür fasulyesi (belirli laboratuvar koşulları altında) standart çimlenme, stres ajanlarına tekrarlanabilir cevaplar üretme ve genom saflığı avantajlarına sahiptir. Farklı konsantrasyonlardaki bazı toksik kimyasalların (Hg, Cr, Zn ve B) Göynük-98 fasulyesinin yaprak ve köklerinde neden olduğu genotoksik etkiler, RAPD yöntemi ile karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır (Cencki *et al.* 2009). Bu çalışmadaki bulgulara göre, toksik kimyasalların kök dokusu hücrelerinde oluşturduğu tahribatın seviyesi, yaprak dokusundan daha fazla bulunmuştur. Köklerle karşılaştırıldığında, yaprak hücreleri nükleer DNA'yı daha iyi koruyan gelişmiş bir antioksidan sistemine sahiptir (Gichner 2003). Paraquat gibi temas herbisitleri ile karşılaştırıldığında, 2,4-D ve dikamba oksinik herbisitleri sistemik herbisitlerdir yani kök veya yaprak sistemlerine uygulandıktan sonra tüm bitki dokularına taşınarak bitkinin tamamında etki gösterirler (Bussan and Dyer 1999). Bu çalışmada, dikotil bitkiler için kullanılan 2,4-D ve dikamba oksinik herbisitlerinin genotoksik etkileri Göynük-98 kültür fasulyesi kök dokusu hücrelerinde araştırılmıştır.

Genotoksinlere maruz kalmış organizmalarda bazı biyolojik süreçler olumsuz etkilenir. Büyümenin durması, protein ve nükleik asit içeriklerinde artma veya azalma, önemli enzimlerin inhibe olması, pigment içeriğindeki değişim, DNA'da hasar veya mutasyonların oluşması genotoksinlerin etkisiyle bitkilerde gerçekleşebilecek bazı önemli biyolojik cevaplardır (Cencki *et al.* 2010). DNA seviyesindeki moleküler

parametrelerle birlikte diğer biyolojik göstergelerdeki değişimlerin aynı anda belirlenmesi, genotoksin etkisinin ortaya çıkarılmasına katkı sağlar. Ekogenotoksikolojide, bir kirleticinin organizmalar üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla biyolojik göstergelerin takip edilmesi moleküler seviyede elde edilmiş verilerin yorumlanmasını kolaylaştırır (Depledge 1994; Liu *et al.* 2005). Ayrıca, moleküler ve diğer parametrelerin aynı anda belirlenmesiyle parametrelerdeki artış veya azalmalardaki oransal değişimlerin moleküler/hücresele etkileri daha iyi yorumlanabilir (Atienzar *et al.* 1999; Theodorakis *et al.* 2001, 2006). Bu tez çalışmasının amacı, 2,4-D ve dikamba'nın fasulye fidelerinin kök dokusundaki genotoksik etkilerini biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler yöntemlerle değerlendirmektir. Distile su (negatif kontrol), 10 ppm MMS (pozitif kontrol) ve öldürücü olmayan konsantrasyonlarda (0,1, 0,2 ve 0,3 ppm) 2,4-D ve dikamba genotoksitesinin dört farklı son noktasını; kök büyümesi, toplam çözümlü protein içeriği, comet assay skorları ve RAPD profillerinde oluşan değişimleri analiz etmek için kullanılmıştır.

Bu çalışmada, 2,4-D ve dikamba'nın toksik etkisi fasulye kök büyüme testi ile değerlendirilmiştir. Her iki oksinik herbisit fasulye fidelerinde kök gelişimini engellediğinden toksik bulunmuştur. Her iki oksinik herbisitinin en yüksek konsantrasyonu (0,3 ppm) düşük konsantrasyonlara (0,1 ve 0,2 ppm) göre daha toksik bulunmuştur. 2,4-D ve dikamba için kök büyümesinin yarıya indiği etkin konsantrasyon değerleri (EC₅₀) sırasıyla 0,17 ve 0,24 ppm olarak hesaplanmıştır. 2,4-D ve dikambayı da içine alan herbisitlerin dikotil bitkilerde kök büyümesini inhibe ettiği bilinen bir durumdur (Friesen and Baenziger 1964; Eliasson 1972; Ateeq *et al.* 2002). Soya fasulyesinde yapılan benzer bir çalışmada dikamba için kök büyümesini kontrol grubuna göre yarı oranda azaltan etkin konsantrasyon olarak 0,2 ppm belirlenmiştir (Pfeeger *et al.* 1991).

Organizmaların geri dönüşümlü ve dönüşümsüz metabolizmasının önemli bir göstergesi olan total çözümlü protein içeriği doğal ve ksenobiyotiklere cevap oluşturduğu bilinmektedir (Singh and Tewari 2003). Mevcut çalışmada, fasulye fidelerinin kök uçlarında toplam çözümlü protein içeriğindeki değişimler 2,4-D konsantrasyonu ile pozitif bir ilişki içinde olduğu saptanmıştır. Bunun tersine, dikamba konsantrasyonu

arttıkça fasulye kök uçlarındaki total çözümlü protein içeriği azalmıştır. Bulgularımız, total protein içeriğinin herbisit uygulaması için biyolojik bir gösterge olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan MMS uygulamasında ise dikamba uygulamasına benzer şekilde protein içeriği azalmıştır. Diğer bazı araştırmacılar; herbisit tipinin, herbisit oranının, uygulandığı dokunun, hücrelerin çoğalma fazının bitkisel veya hayvansal dokularda protein içeriğini arttırabileceği veya azaltabileceğini göstermişlerdir (Duffard *et al.* 1993; Blanco *et al.* 1997; Fonseca *et al.* 2008; Peixoto *et al.* 2008).

Oksinik herbisitlerin bitki ve hayvan hücrelerindeki genotoksik etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (Gonzales *et al.* 2005). Bununla birlikte, farelerde 2,4-D ve dikamba'nın peroksizom içeriğini önemli oranda arttırdığı bildirilmiştir (Lundgren *et al.* 1987; Espandiari *et al.* 1995). Bu tip bir aktiviteye sahip olan kimyasallar peroksimal β oksidasyonunu arttırarak hücre içi H_2O_2 ve diğer reaktif oksijen miktarlarını arttırmaktadır (Reddy *et al.* 1980, 1982). Reaktif oksijen türlerinin genetik materyal üzerinde dolaylı bir tahribat mekanizmasına sahip olduğu bitkilerde gösterilmiştir (Turrens 2003). Dikamba veya ticari formülasyonu Banvel'in bakterilerde tersinir mutasyonları ve DNA hasarını teşvik ettiği ispatlanmıştır (Lefier *et al.* 1981; Plewa *et al.* 1984). Bakteri ve hayvan sistemleri kullanılarak 2,4-D ve dikamba gibi oksinik herbisitlerin; mikronükleus oluşumunu teşvik ettiği (Holland *et al.* 2002), kromozom aberasyonlarına neden olduğu (Amer and Aly 2001), kardeş kromatid değişimlerini teşvik ettiği (Soloneski *et al.* 2007; Gonzalez *et al.* 2006), *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyona neden olduğu (Kaya *et al.* 1999) ve Ames testiyle belirlenen gen mutasyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Charles *et al.* 1999).

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, tek iplik DNA kırıklarını belirleyen orta alkali comet assay (pH 12.3) *Lupinus luteus* L. (Rucinska *et al.* 2004) *Nicotiana tabacum* L. (Gichner *et al.* 2003, 2004, 2008) ve *Allium cepa* (Yıldız *et al.* 2009) bitki türleri kök hücrelerinde çevresel kirlenmelerin genotoksik etkilerini takip etmekte başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Mevcut çalışmamızda, 2,4-D ve dikamba'nın düşük konsantrasyonlarında fasulye kök hücrelerinde önemli seviyede DNA hasarına neden olduğu etkiler alkali comet assayla belirlenmiştir. 2,4-D veya dikamba'nın tek iplik

DNA kırıklarının teşvik ettiği hayvan test sistemlerinde belirlenmiştir. 2,4-D'ye maruz kalmış Çin hamster yumurta hücreleri (Soransen *et al.* 2005; Gonzales *et al.* 2005) ve kedi balığı (*Clarias batrachus*) eritrosit hücrelerinde (Ateeq *et al.* 2005) DNA hasarının arttığı alkali comet assayle gösterilmiştir. Benzer şekilde, comet assayle dikamba'nın neden olduğu DNA hasarı, insan kanı lenfositlerinde (Gonzales *et al.* 2006) ve Çin hamster yumurta hücrelerinde (Soransen *et al.* 2005) belirlenmiştir. Literatür tarama sonuçlarına göre bitkilerde oksinik herbisitlerin genotoksik etkileri comet assayle çalışılmamıştır. Bununla birlikte, bu çalışmalarda test edilen 2,4-D ve dikamba miktarları 1 ppm ve daha yüksek dozlardır. İçme sularında izin verilen maksimum 2,4-D ve dikamba konsantrasyonları sırasıyla 0,1 ve 0,12 ppm'dir (Canadian Drinking Water Guidelines, 2002). Bu konsantrasyonlarda, 2,4-D ve dikamba fasulye kök hücrelerinde DNA hasar seviyesini 1.8 (2,4-D için) ve 4.1 kat (dikamba için) arttırarak tek iplik DNA kırıklarının teşvik etmiştir. Ayrıca, 2,4-D ve dikamba konsantrasyon artışına bağlı olarak fasulye kök hücrelerinde belirlenen DNA hasar seviyesi de artmıştır. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde 2,4-D ve dikamba'nın 0.1 ppm'den daha düşük konsantrasyonlarda bile homolog rekombinasyon ve A→G nokta mutasyon sıklığında önemli bir artışa neden olduğunu vurgulanmıştır (Filkowski *et al.* 2003). Bu araştırmacılar, içme sularında izin verilen maksimum 2,4-D ve dikamba konsantrasyonlarının *Arabidopsis thaliana*'da homolog rekombinasyonu sırasıyla 2,85 ve 2,07 kat arttırdığını rapor etmişlerdir. 2,4-D ve dikamba'nın çok düşük konsantrasyonlarda tek iplik kırıklarına neden olabileceği bu çalışmada gerçekleştirilen comet assay yöntemi ile gösterilmiştir. Ayrıca, benzer 2,4-D ve dikamba konsantrasyonlarının *Arabidopsis*'te homolog rekombinasyona ve A→G nokta mutasyonuna neden olabildiği ileri sürülmüştür (Filkowski *et al.* 2003). Dolayısıyla 2,4-D ve dikamba herbisitlerinin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde bitki test sisteminin oldukça hassas olduğu düşünülmektedir.

Eko-genotoksikolojide, biyolojik organizasyona zarar verebilecek bir toksik kimyasalın etkilerini tam olarak anlayabilmek için biyolojik organizasyonun farklı seviyelerinde (moleküler ve popülasyon seviyesi) veri toplama genotoksikiteyi belirlemede önemlidir. (Xue-mei *et al.* 2006). Ekotoksikolojide DNA parmakizi kullanışlı bir biyomarkördür (Savva 1998). Uygun şekilde optimize edildikten sonra gerçekçi, hassas ve üretken bir

assay olarak rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi geniş aralıkta DNA hasarı (DNA adductları, DNA kırıkları) ve aynı zamanda mutasyonları (nokta mutasyonları, kromozomal düzenlemeler) belirleyebilir ve bu nedenle genotoksisite ve karsinogenez çalışmalarında kullanılabilir (Atienzar and Jha 2006). Çalışmamızda, negatif kontrol RAPD profillerine göre oksinik herbisitler 2,4-D ve dikamba tarafından uyarılmış olan DNA tahribatı (DNA hasarı ve/veya mutasyonlar) RAPD profillerinde normal DNA bantlarının kaybolması ve/veya yeni DNA bantlarının ortaya çıkması şeklinde belirlenmiştir. Her iki herbisitinin konsantrasyon artışına bağlı olarak hem kaybolan hem de yeni ortaya çıkan bantların sayıları ve dolayısıyla toplamda değişen bant sayıları artmıştır. 2,4-D ve/veya dikamba'nın homolog rekombinasyona, A→G mutasyonuna, tek iplik DNA kırıklarına ve gen mutasyonuna neden olduğu önceki raporlarda bildirilmiştir (Charles *et al.* 1999; Filkowski *et al.* 2003. Ateeq *et al.* 2005; Soransen *et al.* 2005; Gonzales *et al.* 2005; Gonzales *et al.* 2006). Bantların kaybolması genomik DNA'da oksinik herbisitlerle teşvik edilmiş olan DNA hasarları (örneğin, tek iplik kırıkları, çift iplik kırıkları, modifiye bazlar, bazsız yerler, okside bazlar, DNA köprüleri, DNA-protein çapraz bağları), veya nokta ve/veya büyük kromozomal düzenlemeleri içine alan mutasyonlardan kaynaklanabilir (Atienzar *et al.* 1999). PCR reaksiyonu sırasında, genomik DNA'nın hasarlı bölgelerine primer bağlanması gerçekleşmemiş veya hasarlı kalıp DNA bölgesi ile karşılaşmış *Taq* DNA polimeraz enzimi reaksiyonu terk etmesiyle bant kaybı gerçekleşmiş olabilir (Atienzar and Jha 2006). Yeni PCR bantlarının ortaya çıkması genellikle nokta mutasyonu ile yeni primer bağlanma yerlerinin oluşması veya iki primer bağlanma yerini yakınlaştıran ya da uzaklaştıran homolog rekombinasyonlar ve/veya delesyon/insersiyonların varlığını gösterir (Atienzar *et al.* 1999; Atienzar and Jha 2006).

Genotoksisite yargıları uygulama yapılmış ve yapılmamış grupların nitel ve nicel değerlendirilmesi ile ortaya çıkarılabilir. Diyagnostik analiz (çoğalmış PCR bant yoğunluklarının azalması veya artması, kaybolan ve yeni ortaya çıkan PCR bantların değerlendirilmesi) ve numerik analiz (popülasyonun genel yapısı hakkında analiz yapma, örneğin genetik benzerlik analizi) RAPD gibi moleküler sistematik çalışmalarında iki önemli parametredir. Mevcut çalışmamızda, genotoksisitenin RAPD ile teşhis edilmesinin yanı sıra nümerik analiz uygulayarak uygulama gruplarının negatif

kontrolden genetik olarak ne kadar uzaklaştığının analizi de yapılmıştır. RAPD gibi moleküler markörlerin nümerik analiz yöntemi kullanılarak genomik DNA'lar için oluşturulan dendogram (genetik ilişkinin ağaçlandırılarak gösterilmesi), moleküler bitki sistematüğinde (türler arası, tür içi veya popülasyonlar içi ve arası) etkin bir metodolojidir (Zhiyi and Haowen 2004). Bu kapsamda, RAPD bantları bir genotip olarak değerlendirilmediğinden nümerik yöntem (nümerik analiz) genetik yöntemden (diagnostik analiz) ayrılır. Mevcut çalışmada, MMS, 2,4-D ve dikamba uygulama gruplarının negatif kontrole olan genetik benzerlik katsayıları 1.00'dan düşük çıkmıştır. Bu, uygulama gruplarındaki bitkilerin DNA'larındaki hasarın bir göstergesidir. Hesaplanan genetik benzerlik katsayılarına göre, 2,4-D ve dikamba konsantrasyonu arttıkça DNA tahribatının seviyesinde de artış belirlenmiştir. Genetik benzerlik katsayılarının kullanılmasıyla oluşturulmuş olan UPGMA dendogramında uygulama grupları arasındaki rakamsal ilişki net bir şekilde şekillendirilmiştir. En fazla tahribata neden olan MMS uygulaması (pozitif kontrol) negatif kontrol grubundan en uzakta kümelenmiştir. 2,4-D ve dikamba konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak uygulama grupları negatif (distile su) ve pozitif (MMS) uygulamaları arasında kümelenmiştir.

RAPD analizi henüz mutasyonlara dönüşmemiş geçici DNA hasarlarını bile belirleyebilen oldukça hassas bir tekniktir (Savva 1998). RAPD veya AFLP (çoğalmış fragment uzunluk polimorizm) gibi moleküler markör teknikler mikronükleus veya comet assay gibi klasik genotoksisite testleri kadar hassas tekniklerdir (Labra *et al.* 2003). Ayrıca RAPD ve AFLP'de kaybolan veya yeni DNA bantlarının ileri aşamalarda sekanslanması ile lezyonlar hakkında daha detaylı moleküler bilgilerin elde edilmesi mümkündür. Genotoksinlerin genotoksik etkilerini birden fazla genotoksisite testi ile aynı anda çalışmak genotoksinlerin etkisini tam olarak belirlemede oldukça önemlidir (Depledge 1994). RAPD veya AFLP profillerinde genotoksinlerin etkisi ile meydana gelen değişiklikler genomik kalıp kararlılığındaki değişimleri yansıtır. Büyüme, total çözünür protein içeriği, klorofil pigment içeriği, bazı önemli metabolik enzim aktivitesi gibi biyolojik parametrelerde genotoksinlerce uyarılmış değişimler genomik kalıp kararlılığı ile karşılaştırılabilir (Atienzar *et al.* 1999; Liu *et al.* 2005, 2007; Xue-mei *et al.* 2006; Cenkci *et al.* 2010). Genomik kalıp kararlılığı, DNA hasar seviyesi, replikasyon ve onarım etkinliği ile ilgilidir. DNA'da meydana gelmiş her hasarın

mutasyona dönüşmesi beklenemez. Çünkü organizmanın onarım mekanizması çoğu DNA lezyonlarını onarır. Bu nedenle, hasar seviyesi genomik kalıp bütünlüğünü tam olarak yansıtmaz (Atienzar and Jha 2006). Çalışmamızda, RAPD profillerinden belirlenen genomik kalıp kararlılığı; kök büyümesi, toplam çözünür protein içeriği ve comet assay skorları gibi rutin biyolojik verilerle karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, 2,4-D ve dikamba genotoksisitesinde kullanılan yöntemlerin hassaslık sıralaması; comet assay > kök büyümesi> RAPD profilleri> total çözünür protein içeriği şeklindedir. Comet ve RAPD assaylerle belirlenen DNA hasar seviyeleri fasulye kök hücrelerinin büyük bir kısmında genomik DNA'nın tahribata uğradığının bir göstergesidir.

Sonuç olarak, bu çalışmada çok düşük konsantrasyonlarda oksinik herbisitler 2,4-D ve dikamba'nın fasulye kök hücrelerinde genotoksik etkiye sahip olduğu comet ve RAPD assayle belirlenmiştir. Belirlenen tahribatın seviyesi 2,4-D ve dikamba konsantrasyonlarındaki bir artışla artmıştır. Ayrıca 0.1 ppm konsantrasyonunda bile oksinik herbisitlerin bitkilerde genotoksik etkiye sahip olduğunun belirlenmesi, bu tip genotoksinlerin izlenmesinde bitki sistemlerinin oldukça hassas olduğunun bir göstergesidir.

6. KAYNAKLAR

- Ahrens, W.H. 1994. Herbicide handbook, Weed Society of America, Champaign IL, pp 91-94.
- Alberta Agriculture. 1989. Guide to crop protection in Alberta 1989: Part 1, Chemical herbicides, insecticides, fungicides, rodenticides for maximum economic yield. Crop Protection Branch, Edmonton.
- Amer, S.M. and Aly F.A.E.2001. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutation Research*, 494, 1–12.
- Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J. and Schmezer, P. 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutation Research*, 307, 261-71.
- Angelis, K.J., Dušinská, M. and Collins, A.R. 1999. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*, 20, 2133-2138.
- Antonsie-wiez, D. 1990. Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of ledakrin. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 26, 79-96.
- Ateeq, B., Farah, M. A. and Ahmad, W. 2005. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 348-354.
- 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*, 514, 105-113.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N. and Depledge, M.H. 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2275–2282.

- Atienzar, F.A. and Jha, A.N. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research*, 613, 76-102.
- Babaoğlu, M., Gürel, M. and Özcan, S. (Eds). 2004. *Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları*, 374 s.
- Barbour, M. 1996. California landscapes before the invaders. In; Lovich, J.E., Randall, J. and Kelly M.D. (eds.). *Proceedings of the California Exotic Pest Plant Council Symposium*. Vol. 2, 5-9.
- Bardakçı, F. 2001. RAPD markers. *Turkish Journal of Biology*, 25, 185-196.
- Blanco, A.M., Nieves, N., Sanchez, M., Borroto, C.G., Castillo, R., Gonzalez, J.L., Escalona, M., Baez, E. and Hernandez, Z. 1997. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 153–158.
- Boutin, C., Elmegeard, N. and Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a Greenhouse Experiment: Implications for risk assessment. *Ecotoxicology*, 13, 349-369.
- Bowditch, B.M., Albrilght, D.G., Williams, J. G. K. and Braun, M. J. 1991. Use of rapd markers in comparative genome studies. *Methods in Enzymology*, Vol. 224.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Burnside, O.C. 1996. The history of 2,4-D and its impact on development of the discipline of weed science in the United States. In: Burnside OC, ed, *Biologic and economic assesment of benefits from use of phenoxy herbicide in the United States*, USDA-NA PIAP rept. No. I-PA-96, 5-15.
- Bussan, A. and Dyer, W. 1999. Herbicides and rangeland. In: Sheley, R.P. and Corvallis, J. (Eds.). *Biology and Management of Noxious Rangeland Weeds*. Oregon, Oregon State University Press: 116-132.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 9, 553–557.

- Calvino, P.A., Studdert, G.A., Abbate, P.E., Andrade, F.H. and Redolatti, M. 2002. Use of non-selective herbicides for wheat physiological and harvest maturity acceleration. *Field Crops Research*, 77, 191-199.
- Canadian Drinking Water Guidelines. 2002. Summary of Guidelines for Canadian Drinking Quality, Health Canada, April.
- Caux, P.Y., Kent, R. A., Taché, M., Grande, C., Fan, G. T. and MacDonald, D. D. 1993. Environmental fate and effects of dicamba: a Canadian perspective. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 133, 1-58.
- Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, I.H., Konuk, M. and Bozdağ, A. 2009. Toxic chemicals–induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere*, 76, 900–906.
- Cenkci, S., Ciğerci İ.H., Yıldız, M., Özay, C., Bozdağ, A. and Terzi, H. 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 467-473.
- Cenkci, S., Yıldız, M., Konuk, M. and Eren, Y. 2008. RAPD analyses of some wild *Triticum* L. and *Aegilops* L. species and wheat cultivars in Turkey. *Acta Biologica Cracoviensia. Series: Botanica*, 50, 41–48.
- Charles, J.M., Cunny, H.C., Wilson, R.D., Bus, J.S., Lawlor, T.E., Cifone, M.A., Fellows, M. and Gollapudi, B. 1999. Ames assays and unscheduled DNA synthesis assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives, *Mutation Research* 444, 207–216.
- Collins, A., Dusinska, M. and Franklin, M., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 139-46.
- Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G., Maestri, E. and Marmoroli, N. 1998. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere*, 37, 2739-2749.
- Cox, C. 1999. 2,4-D Toxicology. Part 1, *J. Pesticide Reform* 19, 14–19.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H., 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7, 52-54.

- Depledge, M.H. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C. and Leonzio, C. (Eds.), Non-destructive Biomarkers in Vertebrates. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 271–295.
- Donald, D.B., Syrgiannis, J., Hunter, F. and Weiss, G. 1999. Agricultural pesticides threaten the ecological integrity of northern prairie wetlands. *The Science of the Total Environment*, 231, 173-81.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Duffard, A.M.E., Peretti, A.F., Cantarini, S.C. and Duffard, R. 1993. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester on chick liver. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, 204-211.
- Duffard, R., Garcia, G., Rosso, S., Bortolozzi, A., Madariaga, M. and Paolo, O. 1996. Central nervous system myelin deficit in rats exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid throughout lactation. *Neurotoxicology and Teratology*, 18, 691-696.
- Eliassqn, L. 1972. Responses of *Populus tremula* to picloram and other translocated herbicides. *Physiologia Plantarum*, 27, 101–104.
- Enan, M.R. 2007. Assessment of genotoxic activity of para-nitrophenol in higher plant using arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3, 103-109.
- Enan, M.R., 2006. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43, 147-154.
- EPA. 1999. dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid): Pesticide tolerance. *Federal register* 64, 759-769.
- Espandiari, P., Thomas, V.A., Glauert, H.P., O'Brien, M., Noonan, D. and Robertson, L.W. 1995. The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) is a peroxisome proliferator in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 26, 85-90.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.

- Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Haverland, P.S. and Carlson A.R. 1997. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32, 353-357.
- Faust, F., Kassie, F. and Knasmuller, S. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 566, 209-29.
- Filkowski, J., Besplug, J., Burke, P., Kovalchuk, I. and Kovalchuk, O. 2003. Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers. *Mutation Research*, 542, 23-32
- Flanagan, R.J., Meredith, T.J. and Ruprah, M. 1990. Alkaline diuresis for acute poisoning with chlorophenoxy herbicides and ioxynil. *Lancet*, 335, 454-8
- Fonseca, M.B., Gluszcak, L., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Gonçalves, F.F. and Loro, V.L. 2008. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69, 416-420.
- Forsyth, D.J., Martin, P.A. and Shaw, G.G. 1997. Effects of herbicides on two submersed aquatic macrophytes, *Potamogeton pectinatus* L. and *Myriophyllum sibiricum* Komarov, in a prairie wetland. *Environmental Pollution*, 90, 259-268.
- Friesen, H.A. and Baenziger, H. 1964. Morphological and cytological effects of dicamba on wheat and barley. *Canadian Journal of Plant Science*, 44, 288-294.
- Fritsch, P., Rieseberg, L.H. 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: T.B. Smither, R.K. Wayne (Eds.), *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, Oxford University Press, 55-73.
- Ftiesen, E.G., Jones, G.R. and Vaughan, D. 1990. Clinical presentation and management of acute 2,4-D oral ingestion. *Drug safety: An International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience*, 5 (2), 55-90
- Gardner, G. and Semple, J.E. 1990. Inhibition of auxin transport by isoquinolinedione herbicides. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9, 161-169.
- Gichner, T. 2003. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco. Cellular and a cellular comet assays. *Mutation Research*, 535, 187-193.

- Gichner, T. and Plewa, M.J. 1998. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation Research*, 401, 143-152.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J. and Demnerová K. 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research*, 559, 49-57.
- Gichner, T., Znidar, I. and Szakova, J. 2008. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research*, 652, 186–190.
- Gonzales, N.V., Soloneski, S. and Larramendy, M.L. 2009. Dicamba-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 337-343.
- Gonzales, N.V., Soloneski, S. and Larramendy, M.L. 2006. Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells in vitro. *Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 20, 1482-1487
- Gonzales, N.V., Soloneski, S., Reigosa, M.A. and Larramendy, M.L. 2005. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 19, 289-297.
- Günçan, A. 1985. *Yabancı Otlar ve Mücadelesi Ders Notları. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Van.*
- Hartmann, A., Agurell, E. and Beevers, C. 2003. 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18, 45-51.
- Herbicide Classification of the Weed Science Society of America. 1997. *Weed technology : A Journal of the Weed Science Society of America*, 11, 384-393.
- Hill, B.D., Harker, K.N., Hasselback, P., Inbaba, D. J., Byers, S. D. and Moyer, J. R. 2002. Herbicides in Alberta Rainfall as Affected by Location, Use and Season: 1999 to 2000. *Water Quality Research Canada*, 37, 515–542.

- Holland, N.T., Duramad, P., Rothman, N., Figgs, L.W., Blair, A., Hubbard, A. and Smith, M.T. 2002. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation Research*, 521, 165-178.
- IARC. 1977. Some fumigants, the herbicides 2,4-D and 2,4,5-T, chlorinated dibenzodioxins and miscellaneous industrial chemicals IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man, 15, 1-481.
- IARC. 1983. Miscellaneous pesticides. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man, 30, 1-430.
- IARC. 1986. Some halogenated hydrocarbons and pesticide exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man, 4, 1-434.
- IARC. 1987. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs vols. 1e42. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. 7, 1-440.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van deWiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, P., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A. and Karp1, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular breeding : New Strategies in Plant Improvement*, 3, 381-390.
- Juska, F.V. 1961. Pre-emergence herbicides for crabgrass control and their effects on germination of turfgrass species. *J Store*, 9, 137-144.
- Kaya, B., Yanikoglu, A. and Marcos, R. 1999. Genotoxicity studies of the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wingspot test, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen*, 19, 305-312.
- Keller, T., Skopp, G. and Wu, M. 1994. Fatal overdose of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Forensic Science International*, 65, 13-18.
- Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H. and Erel, O. 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research*, 585 (1-2), 71-78.

- Koppen, G. and Verschaeve, L. 1996. The alkaline comet test on plant cells: A new geno-toxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Research*, 360, 193-200.
- Kovalchuk, O., Titiv, V., Hohn, B. and Kovalchuk, I. 2001. A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nature Biotechnology*, 19, 568-572.
- Labra, M., Fabio, T.D., Grassi, F. and Regondi, S.M.G. 2003. AFLP analysis as biomarker of exposure to organic and inorganic genotoxic substances in plants. *Chemosphere*, 52, 1183–1188.
- Landry, B. S., Li, R.Q., Cheung, W. Y. and Graner, R.L. 1994. Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 847–852.
- Leifer, Z., Kada, T., Mandel, M., Zeiger, E., StaVord, R. and Rosenkranz, H.S. 1981. An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. A report of the U.S. EPA's Gene-TOX Program. *Mutation Research* 87, 211–297.
- Liu, W., Li, P.J., Qi, X.M., Zhou, Q.X., Zheng, L., Sun, T.H. and Yang, Y.S. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum Vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61, 158-167.
- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P. and Sun, T. 2007. Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 67, 1155–1163.
- Lizana, C., Wentworth, M., Martinez, J.P. Villegas, D., Meneses, R., Murchie, E.H., Pastenes, C, Lercari, B., Vernieri, P., Horton, P. and Pinto, M. 2006. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress, I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 57, 685-697.
- Lundgren, B., Meijer, J. and De Pierre, J.W. 1987. Induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases and proliferation of peroxisomes and mitochondria in mouse liver after dietary exposure to pchlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Biochemical and Pharmacology*, 36, 815–821.

- Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 7, 478–484.
- Ma, T.H., Xu, Z.D., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E.V., Arreola, G.A. and Zhang, H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334, 185-195.
- Maluszynska, J. and Juchimiuk, J. 2005. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 56, 177-184.
- Menke, M., Chen, I. P., 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*, 493, 87-93.
- Morgan, U.M., Constantine, C.C., Greene, W.K. and Thompson, R.C. 1993. Rapid analysis of Giardia DNA and correlation with isoenzyme data. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 702-705.
- Moyer, J.R., Bergen, P. and Schaalje, G.B. 1992. Effect of 2,4-D and dicamba residues on following crops in conservation tillage systems. *Weed technology : A Journal of the Weed Science Society of America*, 6, 149-155.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Olive, P. L., Banath, J. P. and Durand, R. E. 1990. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “comet” assay. *Radiation Research*, 122, 86-94.
- Osterloh, J., Lotti, M. and Pond, S.M. 1983. Toxicologic studies in a fatal overdose of 2,4-D, MCP, and chlorpyrifos. *Journal of Analytical Toxicology*, 7, 125-129.
- Östling, O. and Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Peixoto, F.P, Gomes-Laranjo, J., Vicente, J.A. and Madeira, V.M.C. 2008. Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1125-1133.
- Pfeeger, T., Mc Farlane, C., Sherman, R. and Volk, G. 1991. A short-Term Bioassay for whole plant toxicity. In: Gorsuch J.W., Lower, W.R. and Lewis, M.A. (Eds.).

- Plants for Toxicity Assessment. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 355-364.
- Pfossor, A., Amon, A., Lelley, T. and Heberle-Bors, E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 21, 387-393.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Gentile, G.J. and Gentile, J.M. 1984. An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutation Research*, 136, 233-245.
- Prescott, L. F., Park, J. and Darrien, I. 1979. Treatment of severe 2,4-D and mecoprop intoxication with alkaline diuresis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 7, 111-116.
- Prokop, M. and Veverka, K. 2003. Influence of droplet spectra on the efficiency of contact and systemic herbicides. *Plant, Soil and Environment / Czech Academy of Agricultural Sciences*, 49, (2), 75-80.
- Rank, J. and Nielsen, M.N. 1994. Evaluation of *Allium cepa* anaphase- telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research*, 312, 17-24.
- Reddy, J.K., Azarnoff, D.L. and Hignite, C.E. 1980. Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature*, 283, 397-398.
- Reddy, J.K., Lalwani, N.D., Reddy, M.K. and Qureshi, S.A. 1982. Excessive accumulation of autofluorescent lipofucsin in the liver during hepatocarcinogens by methyl clofenape and other hypopolipidemic peroxisome proliferators. *Cancer Research*, 42, 259-266.
- Reiter, R. S., Williams, J.G.K., Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. and Scolnik, P.A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 1477-1481.
- Roberts, B. L. and Dorough, H.W. 1984. Relative toxicity of chemicals to the earthworm. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3, 67-78.

- Rothuizen, J. and Van Wolferen, M. 1994. Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission. *Animal Genetics*, 25, 13-18.
- Ruciniska, R., Sobkowiak, R. and Gwozdz E.A. 2004. Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 519-528.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*, 4th Edition, Belmont, California, Wadsworth Publishing.
- Savva, D., Castellani, S., Mattei, N., Renzoni, A. and Walker C.H. 1994. The use of PCR and DNA fingerprints to detect the genotoxic effects of environmental chemicals, in: S.P. Varnavas (Ed.), *Environmental Contamination, Proceedings of the 6th International Conference*, Delphi, Greece, CEP Consultants, Edinburgh, pp. 105-110.
- Savva, D. 1998. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41, 103-106.
- Scott, M. P., Heymes, K. M. and Williams, S. M. 1992. Parentage analysis using Rapid-Pcr. *Nucleic Acids Research*, 20, 54-93.
- Shugart, L. 1990. Biological monitoring: testing for genotoxicity, in: J.F. McCarthy, L.R. Shugart (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*, Lewis Publishers, Chelsea, pp. 217-227.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-91.
- Singh, P.K. and Tewari, R.K. 2003. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biology*, 24, 107– 112.
- Soloneski, S., Gonzalez, N.V., Reigosa, M.A. and Larramendy, M.L. 2007. Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro in presence of erythrocytes. *Cell Biology International* 31, 1316-1322.

- Sorensen, K.C., Stucki, J.W., Warner, R.E., Wagner, E.D. and Plewa, M.J. 2005. Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 174-81.
- Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K. and Simazaki D. 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutation Research*, 541, 31-44.
- Sterling, T.M. and Hall, J.C. 1997. Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. In: *Herbicide activity toxicology. Biochemistry and Molecular Biology* R.M. Roe (Ed). IOS Press.
- Şahin, E. 2005 Antalya yöresi kıl keçilerinde genetik polimorfizmin Rapd-Pcr yöntemiyle belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı Antalya.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*. 3rd Edition, Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland. Massachusetts, U.S.A.
- Tepe, I. 1997. Türkiye’de Tarım ve Tarım Dışı Alanlarda Sorun Olan Yabancı Otlar ve Mücadeleleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları No:32*, S, 16.
- Theodorakis, C.W., Bickham, J.W., Lamb, T., Medica, P.A. and Lyne, T.B. 2001. Integration of genotoxicity and population genetic analyses in kangaroo rats (*Dipodimys merriami*) exposed to radionuclide contamination at the Nevada test site, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 317–326.
- Theodorakis, C.W., Lee, K.L., Adams, S.M. and Law, C.B. 2006. Evidence of altered gene flow, mutation rate, and genetic diversity in redbreast sunfish from a pulp-millcontaminated river. *Environmental Science and Technology*, 40, 377–386.
- Tice, R.R., Andrews, P. W. and Singh, N. P. 1990. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sciences*, 53, 291-301.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552,335–344

- Tuschl, H. and Schwab, C. 2003. Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 385-393.
- Wang, J., Lu, Y. and Shen, G. 2007. Combined effects of cadmium and butachlor on soil enzyme activities and microbial community structure. *Environmental Geology*, 51, 1221-1228.
- Wang, M. and Zhou, Q. 2006. Effects of herbicide chlorimuron-ethyl on physiological mechanisms in wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 190-197.
- Wang, Y., Jaw, C. and Chen, Y. 1994. Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water. *Water, Air, and Soil Pollution*, 74, 397-403.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, London.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213-7218.
- WHO. 1998. Guidelines for Drinking Water Quality, second ed., Geneva.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wolf, H.D., Blust, R. and Backeljau, T. 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research*, 566, 249-262.
- Yıldız, M., Cığerci, İ.H., Konuk, M., Fidan, A.F. and Terzi, H. 2009. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, 75, 934-938.
- Xue-mei, Q., Pei-jun, L., Wan, L. and Li-jingly, X. 2006. Multiple biomarkers response in maize (*Zea mays* L.) during exposure to copper. *Journal of Environmental Science* 18, 1182-1188.
- Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 96-103.

Zimmerman, P.W. and Hitchcock A. 1942. Substituted phenoxy and benzoic growth substances and the relation of structure to physiological activity. Contrib Boyce Thompson Ins, 12, 321-343.

6.1 İnternet Kaynakları

1. <http://ipmworld.umn.edu/chapters/whitacreherb.htm> (29.10.2009)
2. <http://www.hracglobal.com/> (27.10.2009)
3. <http://gpries.myweb.uga.edu/bcmb8010/> (20.10.2009)
4. <http://www.lsuagcenter.com/MCMS/RelatedFiles/%7BC5E3E644-A39F-4A5F-9B39-066D5C915E12%7D/Griffin.WeedCourse.Chapter21.2005.pdf> (19.09.2009)
5. <http://www.chemindustry.com/> (22.09.2009)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmet BOZDAĞ
Doğum Yeri : Afyon
Doğum Tarihi : 25.05.1986
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Afyon Lisesi, 2003
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, 2007
Yüksek Lisans :

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Yayımları (SCI ve diğer)

1. Cenkci, S., Ciğerci İ.H., Yıldız, M., Özay, C., **Bozdağ, A.**, Terzi, H. Lead Contamination Reduces Chlorophyll Biosynthesis and Genomic Template Stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 67 (3), 467-473, 2010 [SCI, B].
2. Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Konuk, M., **Bozdağ, A.** Toxic Chemicals–induced Genotoxicity Detected by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings. *Chemosphere*, 76(7): 900–906, 2009 [SCI, A].
3. Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., **Bozdağ, A.**, Terzi, H. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Fidelerinde 2,4-D ve Dicamba Herbisitlerinin Genotoksik Etkilerinin Comet ve RAPD Assayleriyle Belirlenmesi. IX. Ulusal Çevre ve Ekoloji Kongresi. Nevşehir, 7-10 Ekim, 2009.
4. Cenkci, S., Ciğerci, İ.H., Yıldız, M., Özay, C., **Bozdağ, A.**, Terzi, H. *Brassica rapa* L.'da Klorofil Sentezi ve Genomik Kalıp Kararlılığı Üzerine Kurşun

Kirliliğinin Etkisi. IX. Ulusal Çevre ve Ekoloji Kongresi. Nevşehir, 7-10 Ekim, 2009.

5. Cenkci, S., Yıldız, M., **Bozdağ, A.** İnorganik Genotoksinlerle Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Fidelerinde Teşvik Edilen DNA Değişikliklerinin RAPD ile Analizi. VIII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi. Girne - Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 20-23 Ekim, 2008.
6. Yıldız, M., Cenkci, S., **Bozdağ, A.**, Yeşilbaş, S., Kargıoğlu, M. Türkiye Endemiği ve Tehlike Altında olan *Limonium effusum*'un (Plumbaginaceae) Tohum Çimlenmesi Üzerine Tuzluluk, Sıcaklık ve Işığın Etkisi. Türkiye III. Tohumculuk Kongresi. Kapadokya, 25-28 Haziran 2008.