



**BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNDEN 2,4-D VE PICLORAM'IN
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNDE *ALLIUM*
TESTİ İLE İNCELENMESİ**

Meral ÖZKUL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2016

Meral ÖZKUL tarafından hazırlanan“BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNDEN 2,4-D VE PİCLORAM’IN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNDE *ALLIUM* TESTİ İLE İLE İNCELENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Oy Birliği ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

İkinci Danışman: Öğr. Gör. Dr. Çiğdem Alev ÖZEL

Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan: Prof. Dr. Fatma ÜNAL

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Cengiz SANCAK

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 11/03/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Metin GÜRÜ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Meral ÖZKUL

11.03.2016

BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNDEN 2,4-D VE PICLORAM'IN
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜNDE *ALLIUM* TESTİ İLE
İNCELENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Meral ÖZKUL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2016

ÖZET

İyi bilinen sentetik oksinlerin başında 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve Picloram gelmektedir. 2,4-D ve Picloram, bitki doku kültürü çalışmalarında düşük konsantrasyonlarda hücre bölünmesini, köklenmeyi, hücre ve meyve gelişimini teşvik ederken, yüksek konsantrasyonlarda ise herbisit olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı *Allium cepa*'nın kök ucu hücreleri kullanılarak 2,4-D ve Picloram'ın genotoksik etkilerini incelemektir. *Allium cepa* kök uçları bitki doku kültüründe 2,4-D ve Picloram'ın 0,67; 1,34; 2,01; 2,68; 3,35 ve 4,02 mg/L'lik konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Her bir konsantrasyon ve süre için mitotik indeks, mitotik faz frekansları ve mitotik anormallikler belirlenmiştir. 2,4-D uygulamasıyla mitotik indeks 24 saatlik uygulamanın en düşük üç konsantrasyonunda (0,67; 1,34; 2,01 mg/L) anlamlı oranda artmış, yüksek konsantrasyonlarda (2,68; 3,35 ve 4,02 mg/L) ise azalmıştır. Bununla birlikte 48 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda mitotik indeks anlamlı olarak artmış yalnızca en yüksek konsantrasyonda (4,02 mg/L) düşüş göstermiştir. Picloram ise en yüksek dört konsantrasyonda (2,01; 2,68; 3,35 ve 4,02 mg/L) hem 24 hem de 48 saatlik uygulamada mitotik indeksi düşürmüştür. 2,4-D uygulaması faz frekanslarını etkilememiştir. Bununla birlikte Picloram'ın 24 saatlik uygulamasında en yüksek konsantrasyonda (4,02 mg/L) profaz frekansı anlamlı düzeyde artmış, 3,35 mg/L'lik konsantrasyonda ise telofaz frekansı önemli düzeyde azalmıştır. Her iki bitki büyüme düzenleyicisinin muamelesiyle toplam mitotik anormallikler anlamlı düzeyde artış göstermemiştir. En yaygın görülen mitotik anormallik tipleri; c-mitoz, kalgın kromozom, yapışiklık, köprü, fragment, çok kutupluluk ve poliploididir. 2,4-D ve Picloram'ın düşük konsantrasyonlarının genotoksik etkisi olmadığı görülmüştür. 2,4-D'nin 24 saat ve 48 saatlik uygulamalarında, DNA hasarının tespiti için comet testi uygulanmıştır. Comet testinde yalnızca 48 saatlik uygulamanın 4,02 mg/L'lik konsantrasyonu toksik etki göstermiş ve yeterli hücre sayısına ulaşamamıştır. Diğer konsantrasyon ve muamelelerde kontrole kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Bilim Kodu : 20316
Anahtar Kelimeler : *Allium* testi, doku kültürü, sitogenetik hasar, *in vitro*, bitki büyüme düzenleyicisi, 2,4- D, picloram
Sayfa Numarası : 80
Danışman : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
İkinci Danışman : Öğr. Gör. Dr. Çiğdem Alev ÖZEL

A STUDY ON GENOTOXIC EVALUATIONS OF 2,4-D AND PICLORAM BY
ALLIUM TEST IN PLANT TISSUE CULTURE

(M. Sc. Thesis)

Meral ÖZKUL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

March 2016

ABSTRACT

The most well known synthetic auxins include 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and picloram. While 2,4-D and picloram promote rooting, cell division, cell and fruit development in lower concentrations, they are used as herbicides in higher concentrations. The aim of this study was to examine genotoxic effects of 2,4-D and picloram by using in *Allium cepa* root tip cells. *Allium cepa* roots were treated with 0,67; 1,34; 2,01; 2,68; 3,35, and 4,02 mg/L concentrations of 2,4-D and picloram for 24 and 48 hours in tissue cultures. Mitotic indices, mitotic phase frequencies, and total abnormalities were determined for each concentration and treatment period. The mitotic index increased significantly at three lower concentrations (0,67, 1,34, 2,01 mg/L) after treatment with 2,4-D for 24 h and decreased significantly at higher concentrations (2,68; 3,35 and 4,02 mg/L). Notwithstanding, mitotic index increased significantly at all concentrations in the treatment period for 48h, and it only decreased at the highest concentration (4,02 mg/L). Picloram decreased mitotic index at four highest concentrations (2,01; 2,68; 3,35 and 4,02 mg/L) for both 24 and 48 hour treatments. Phase frequencies were not effected by 2,4-D usage. However, Picloram treatment for 24 hours showed significant increas at prophase frequency at the highest concentration (4,02 mg/L) and decreased telophase frequency at 3,35 mg/L concentration. The total percentage of mitotic aberrations did not significantly increased after the treatment with both of plant growth regulators. The most common types of mitotic abnormalities are C-mitosis, lagging chromosomes, stickiness, bridges, fragments, multi-polarity, and polyploidy. 2,4-D and picloram showed no genotoxic effect at low concentrations. On the other hand, comet assay was performed to determine the damage after using 2,4-D treatments for 24 and 48 hours. Comet assay showed only 4,02 mg/L of 2,4-D for 48 hour was toxic. However, the other concentrations did not show significant DNA damage compared to the control.

Science Code : 20316
Keywords : *Allium* test, tissue culture, cytogenetic damage, *in vitro*, plant growth regulators, 2,4-D, picloram
Page Number : 80
Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
Co-Supervisor : Öğr. Gör. Dr. Çiğdem Alev ÖZEL

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yapılmasında büyük emeği geçen, ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, araştırmanın her aşamasında her türlü desteği sağlayan ve ümitsizliğe düştüğüm anlarda bile hoşgörülü tavırlarıyla yeniden motive olmamı sağlayan çok değerli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Çiğdem Alev ÖZEL'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Yüksek Lisans tezim boyunca bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yardımları ve dostukları ile her zaman yanımda olan tüm Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi sevgili arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım. Yaşamım boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan en değerlilerim; annem Fadimana ÖZKUL'a, babam Ekrem ÖZKUL'a ve ağabeyim Faruk ÖZKUL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın bir kısmı, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 04/201402 no'lu projesiyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bitki Doku Kültürü	3
2.2. Bitki Doku Kültürünün Tarihi Gelişimi.....	3
2.3. Dünyada ve Ülkemizde Bitki Doku Kültürü.....	5
2.4. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Bitkilerin Çoğaltılmasının Aşamaları	5
2.5. Bitki Doku Kültüründe Besin Ortamının Seçimi.....	8
2.6. Bitki Doku Kültürünün Geleneksel Çoğaltma Yöntemleriyle Karşılaştırılması.....	9
2.7. Bitki Doku Kültürünün Avantajları ve Dezavantajları	10
2.8. Bitki Büyüme Düzenleyicileri	10
2.9. Türkiyede ve Dünyada BBD Kullanım Alanları.....	11
2.10. BBD'lerin Sınıflandırılması.....	13
2.10.1. Absisik asit	13
2.10.2. Etilen.....	14
2.10.3. Sitokininler	15
2.10.4. Giberellinler.....	16

	Sayfa
2.10.5. Oksinler	17
2.11. Genotoksisite Testleri	21
2.11.1. Yaygın kullanılan genotoksisite testleri	23
3. MATERYAL VE METOD	29
3.1. Materyal	29
3.2. Metot	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.1. 2,4-D (2,4- Diklorofenoksi asetik asit)	35
4.1.1. Büyüme azaltma testi	35
4.1.2. Mitotik indeks ve mitotik faz frekansları	35
4.1.3. 2,4-D'nin neden olduğu mitotik anormallik tipleri ve oranları	37
4.1.4. Comet testi sonuçları	41
4.2. Picloram	42
4.2.1. Büyüme azaltma testi	42
4.2.2. Mitotik indeks ve mitotik faz frekansları	42
4.2.3. Picloramın neden olduğu mitotik anormallik tipleri ve oranları	44
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	79

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bitki doku kültüründe önemli çalışmalar	4
Çizelge 2.2. BBD'lerin başlıca etkileri	12
Çizelge 2.3. 2,4-D' nin fiziksel ve kimyasal özellikleri	19
Çizelge 2.4. Picloramın fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	21
Çizelge 3.1. MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları	32
Çizelge 4.1. 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinin farklı konsantrasyonlarda <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik faz frekansları	36
Çizelge 4.2. 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi ile muamele edilen <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerindeki anormallik tipleri ve anormal hücre oranlarının kontrol ile karşılaştırılması.....	38
Çizelge 4.3. 2,4-D ile <i>Allium cepa</i> kök uçlarında oluşan DNA hasarı	41
Çizelge 4.4. Picloram bitki büyüme düzenleyicisinin farklı konsantrasyonlarda <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik faz frekansları	43
Çizelge 4.5. Picloram bitki büyüme düzenleyicisi ile muamele edilen <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerindeki anormallik tipleri ve anormal hücre oranlarının kontrol ile karşılaştırılması.....	44

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bitki gelişimini düzenleyicilerin sınıflandırılması	13
Şekil 2.2. Genetik hasarlar	22
Şekil 3.1. 2,4-D'nin yapısal formülü	29
Şekil 3.2. Picloram'ın yapısal formülü	30
Şekil 4.1. 2,4-D ile muamele edilen <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde mitotik indeksteki değişiklikler	37
Şekil 4.2. 2,4-D ile muamele edilen <i>Allium cepa</i> kök uçlarında kromozomal anormallik oranları	40
Şekil 4.3. Picloram ile muamele edilen <i>Allium cepa</i> kök ucu hücrelerinde mitotik indeksteki değişiklikler.....	43
Şekil 4.4. Picloram ile muamele edilen <i>Allium cepa</i> kök uçlarında kromozomal anormallik oranları	46

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. a. 2,4-D içeren MS ortamı içerisinde anormal kök gelişimi b. 2-,4-D içermeyen MS ortamı içerisindeki normal kök gelişimi	35
Resim 4.2. 2,4-D uygulaması sonucunda <i>Allium cepa</i> kök hücrelerinde görülen kromozomal anormallikler a) c-mitoz b) geri kalmış kromozom c) yapışıklık ve kromozom fragmenti d) kromozom köprüsü e) multipolarlık.....	39
Resim 4.3. 2,4-D ile muamele edilen <i>Allium cepa</i> kök uçlarında oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) hasarlı DNA.....	42
Resim 4.4. Piclorom uygulaması sonucunda <i>Allium cepa</i> kök hücrelerinde görülen kromozomal anormallikler a) çok kutupluluk b) köprü c) poliploidi d) fragment e) kalgın kromozom ve fragmet	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda verilmiştir.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram/mililitre
2,4-D	2,4- Diklorofenoksi Asetik Asit
cm	Santimetre
EC₅₀	Yarıyarıya etkili konsantrasyon
g/L	Gram/litre
K	Potasyum
kg/m²	Kilogram/metrekaare
LD₅₀	Yarıyarıya öldürücü konsantrasyon
mg/kg	Miligram/kilogram
mg/L	Miligram/litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmHg	Milimetre civa
N	Azot
°C	Santigrat derece
ppm	Milyonda bir kısım
Kısaltmalar	Açıklamalar
ABA	Absisik asit
ATP	Adenozin tri fosfat
BBD	Bitki büyüme düzenleyicisi
DNA	Deoksiribonükleik asit
GA	Giberellinler
JA	Jasmonik asit
KA	Kromozomal anormallik

Kısaltmalar	Açıklamalar
KKD	Kardeş kromatid değişimi
LMA	Düşük erime noktasına sahip agaroz
Mİ	Mitotik indeks
MN	Mikronükleus
MS	Murashige ve Skoog
NMA	Normal erime noktasına sahip agaroz
PAH	Poliaromatik hidrokarbon
RNA	Ribonükleik asit
SA	Salisilik asit
SCE	Kardeş Kromatid Değişimi
UV	Ultra viyole

1. GİRİŞ

İnsan topluluklarının tarım devriminden 1000 yıl sonra yerleşik hayata geçmesiyle birlikte tarımsal üretim başlamış olup 10 bin yıldan bu yana tarımsal üretim devam etmektedir. İnsan nüfusunun fazla olmadığı zamanlarda ilkel yöntemlerle yapılan tarımın yerini, nüfusun artışıyla birlikte yeni tarım alanlarının açılması ve verim artışı için ıslah yöntemlerinin kullanılması almıştır. Böylece bir taraftan biyo-çeşitlilik azaltılmış, diğer taraftan da yoğun kimyasallar ve gübrelerin kullanımıyla doğal denge bozulmuştur. Günümüzde geline nokta tarım alanlarının genişleme olanağı yoktur ve bu sebepten tarımsal üretimin artması, ancak birim alandan alınacak yüksek verimli ve kaliteli ürünün artması ile mümkün olacaktır. Birim alandan daha fazla miktar ve kalitede ürün eldesinde, tohumun genetik kapasitesi ile teknik ve kültürel uygulamaların yanı sıra, bitkinin yetiştirileceği ortamın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri de son derece önemlidir. Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) bu sorun için alternatif bir çözüm olarak düşünülmektedir (Morsünbül, Solmaz, Üstün ve Yonar, 2010; Başpınar, Durmuşoğlu ve Yıldırım, 2010; Bayram ve Elmacı, 2014).

Bitki büyüme düzenleyicileri önceleri tohumların çimlenmesinde, meyve, fidan ve çeliklerin köklendirilmesini sağlamak için kullanılmıştır. Daha sonra tohumdan hasata kadar geçen zamanda verim artışı, ürün kalitesinin yükseltilmesi ve bitkilerin hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığın artırılması amacıyla ülkemiz de dâhil olmak üzere tüm dünyada kullanılmaya başlanmıştır. Ancak dikkat edilmesi gereken husus diğer kimyasallarda olduğu gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin de bildirilmiş olan yazılı tavsiyeye uygun olarak kullanılmasıdır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2015).

Bitki büyüme düzenleyicileri doku kültürü ortamlarının en önemli unsurlarından biridir. Haberlandt 1902'de bitki doku kültürünün dayandığı esası oluşturacak olan totipotensi kavramını ileri sürmüştür. Bu kavrama göre her bitki hücresi ana bitkiden bağımsız olarak, uygun besin maddesi, ışık ve sıcaklık gibi çeşitli çevre koşulları sağlandığında ana bireye benzer şekilde tam bir bitki geliştirme yeteneğine sahiptir (Krikorian ve Berquam, 1969). Doku kültürü, bitkiden izole edilen herhangi bir doku parçasını (eksplant) ya da hücreleri yapay besi ortamında olarak yaşatma tekniğidir. Hücre ve dokular bölünerek kök, yaprak, sürgün, embriyo veya tam bitki geliştirirler. Bitki doku kültürü birçok ticari alanda kullanılmaktadır. Bitkilerin ıslahı ve vejetatif olarak çoğaltılması, virüsten arındırılmış

bitkilerin üretimi, yeni bitki varyetelerinin çoğaltımı, nadir ve tehlike altındaki bitkilerin korunması bunlardan bazılarıdır. Ayrıca bitki doku kültürü bitkilerin yoğun üretimine ilave olarak sekonder metabolit eldesi, transgenik bitkilerin üretimi ve doğal kaynaklardan tıbbi bileşenlerin üretiminde de kullanılmaktadır (Winkelmann ve Geier, 2006).

Bitkideki hormon etkili maddeler “bitki büyüme düzenleyicisi (BBD)” adıyla anılmaktadır. Bitkilerin yapısında bulunan veya dışardan sentetik olarak ilave edilen bu düzenleyiciler tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. BBD’ler sağlık ve çevre üzerinde bilinçsiz kullanımdan dolayı olumsuz etkilere sebep olabilmektedir. BBD’lerin insan sağlığına etkileri konusundaki çalışmalar sınırlıdır (Sauer, Robert ve Kleine-Vehn, 2013).

Sentetik olarak üretilen 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve Picloram yapısal ve işlevsel olarak oksin türevlerindedir. 2,4-D ve Picloram bitki doku kültüründe özellikle kallus indüksiyonu, doku ve organ farklılaşması için kullanılmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda bitki doku kültürü ortamı bileşenleri iken; yüksek dozlarda geniş yapraklı yabancı otlar için herbisit olarak kullanılmaktadırlar. Son yirmi yıl içinde 2,4-D ve Picloram gibi yapay oksinler tarımda yaygın olarak uygulanmaktadır (Ding, Lu, Wang, Shen ve Xiao, 2014).

Genotoksisite testleri çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların genetik materyalde hasara sebep olup olmadığını incelemek için yapılan testlerdir. Çeşitli çevresel ajanların genotoksik potansiyellerinin belirlenmesinde yaygın kullanılan genotoksisite testlerinden biri *Allium* testidir. Son yıllarda *Allium-Comet* testi de kullanılmaktadır. Hem *Allium* testi hemde *Allium-Comet* testi hassas ve güvenilir testler olarak tanımlanmaktadır.

Bu araştırmanın amacı, bitki büyüme düzenleyicilerinden olan 2,4-D ve Picloram’ın doku kültürü şartlarında *Allium cepa L.* kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme ve kromozomlar üzerine etkilerinin incelenerek genotoksik etkililerinin belirlenmesidir. Ayrıca 2,4-D’nin DNA hasarına sebep olup olmadığının comet testiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü; steril şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Bitki doku kültürü, genetik olarak aynı ve çok sayıda bitkinin *in vitro* üretimi için geliştirilmiş bir teknolojidir. Bitki doku kültür teknolojisi yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak, türler arası melezlemeler, kaybolmakta olan türlerin korunması, çoğaltılması zor olan türlerin üretimi (mikroçoğaltım), gen aktarımı, sekonder metabolit üretimi, sentetik tohum üretimi gibi uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Wang ve Ha, 2007; Pierik, 1989; Gürel, Hayta, Nartop, Bayraktar ve Fedakar, 2013; El-Hawaz, Bridges ve Adelberg, 2015).

Son yıllarda doku kültürleri çalışmalarına ilgi giderek artmıştır. Bu teknikteki gelişmeler, bitkilerde fizyoloji, biyokimya, sitoloji, genetik ve moleküler biyoloji gibi konularla ilgili problemlerin çözümünde yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte doku kültürü koşullarının genetik, kromozomal ve morfolojik varyasyonlara yol açabileceği de saptanmıştır (Heinze ve Mee, 1971; Nwauzoma ve Jaja, 2013) .

2.2. Bitki Doku Kültürünün Tarihi Gelişimi

İlk doku kültürü deneyleri, yüksek yapılı bitkilerden alınan doku parçalarında gerçekleştirilmiş ve kültüre alınan doku parçalarında kallus oluşumu ile sonuçlanmıştır. 16. yüzyılda mikroskobun bulunmasıyla ilerleyen doku kültürü tekniklerini bir Alman fizyolog, Gottlieb Haberlandt'ın *in vitro* hücre kültürü kavramını geliştirmesiyle devam etmiştir. Hannig 1904 yılında bitki hücrelerinin olgun embriyoların kültürünün yapılması fikrini ortaya atmıştır. Böylece hücrelerin bitkiden izole edildikten sonra uygun besin ortamı ve çevre şartlarına alındığında bitkiye benzer yapılar oluşturabileceği tespit edilmiştir. 1908 yılında Simon, kavak kök segmentlerinden kallus, tomurcuklar ve kökleri yeniden rejenere etmiş ve kallus kültürü temelini oluşturmuştur. 1926 yılında Fritz ilk bitki büyüme düzenleyicisi, indol asetik asiti (IAA) keşfetmiştir.

Roger J. Gautheret kallusu üretmek için çeşitli ağaç türlerinin kambiyum hücrelerinin başarılı kültürünü yapmıştır ve oksin ekleyerek kambiyal kültürlerin çoğalmasını sağlamıştır. 1934'lerde ise White, doku kültürü için besin ortamına şeker, inorganik maddeler ve vitaminlerin konulmasının, Gautheret ise steril şartlar altında çalışılmasının gerekliliğini ortaya koymuşlardır. Skoog ve Miller, oksin ve sitokininlerin değişik kombinasyonlarının, tütün kallusunda kök ve sürgün oluşumunu teşvik ettiğini tespit etmişlerdir. Bitki doku kültürlerinin gelişiminde etkili olan önemli çalışmalar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Bitki doku kültüründe önemli çalışmalar

Tarih	Çalışmalar	Araştırmacılar
1902	İlk izole edilmiş hücre kültürü	Haberlandt
1904	Olgun embriyo kültürü	Hanning
1917	Biyoteknoloji teriminin ilk kullanımı	Karl Ereky
1920	Oksinin tanımlanması	Went ve diğerleri
1922	Kök ve sürgün uçlarının laboratuvarında çoğaltımı	Kotte ve Robbins
1924	İlk embriyo kurtarma tekniği (mısır)	Dieterich
1934	İlk sürekli kök kültürleri (domates)	White
1934	İlk kallus kültürleri	Gautheret
1942	İlk kallus kültürlerinden sekonder metabolit eldesi	Gautheret
1946	Sürgün uçlarından ilk bitki eldesi	Ball
1953	DNA'nın yapısının belirlenmesi	Watson ve Crick
1954	Hücre süspansiyonlarından ilk bitki eldesi	Muir ve diğerleri
1957	İlk sitokininin tanımlanması ve organ oluşumunda sitokinin/oksin oranının öneminin ortaya konulması	Skoog ve Miller
1958	İlk somatik embriyogenesis (havuç)	Steward ve diğerleri .
1960	Enzimler kullanılarak ilk canlı protoplast izolasyonu	Cocking
1962	MS besin ortamının geliştirilmesi	Murashige ve Skoog
1965	Tek hücreden bitki rejenerasyonu	Vasil ve Hilderbrandt
1967	İlk haploid bitki üretimi	Bourgin ve Nitsch
1968	B5 ortamının geliştirilmesi	Gamborg ve diğerleri
1970	HEPA filtrelerin kullanılmaya başlanması	Power ve diğerleri
1971	Protoplastlardan ilk bitki rejenerasyonu	Nagata ve Takabe
1978	Cinsler arası ilk somatik melezleme	Melchers ve diğerleri
1983	Transgenik ilk bitkinin eldesi (tütün)	Murai ve diğerleri
1986	Transgenik ilk bitkinin tarla testleri (tütün)	-
1995	İlk rekombinant insan gıdası	Flavr Savr
2005	Uluslararası Pirinç Genom dizileme projesi kapsamında dizilenmiş genom	Rice

(Hussain, Qarshi, Nazir ve Ullah, 2012).

2.3. Dünyada ve Ülkemizde Bitki Doku Kültürü

Doku kültürü ile çoğaltımın *in vivo* koşullara göre sağladığı yararların sonucunda ilk ticari uygulamalar 1970 yılında, Hollanda, ABD gibi ülkelerde başlamıştır. 1990'lı yılların başında üç yüz adet olan ticari laboratuvarların % 87'sinde süs bitkisi çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. 2000'li yıllarda ise ticari doku laboratuvarların gelişmekte olan ülkelerde faaliyete başladığı görülmüştür. Hindistan'da 1990'lı yıllarda açılan 90 ticari laboratuvarın 32'si, yüksek maliyet, kâr edememe ve kalite testlerini yapmamları nedeniyle kapanmıştır. Son yıllarda ise tüm Dünya'da ve Türkiye'de çok sayıda şirket kurularak önemli miktarda yatırımlar yapılmıştır. Bugün Polonya, Bulgaristan, Hindistan, Tayvan, Malezya, Tayland, Küba, Costa Rica gibi birçok ülkede çok sayıdaki laboratuvarında süs bitkisi yanında tıbbi aromatik bitkilerden muza, orkidelere, meyve anaçlarına, orman ağaçlarına kadar çok sayıda bitki türünün çoğaltıldığı görülmektedir (Özzambak, 2015).

Ülkemizde ise sayıları son yıllarda hızla artan ve daha çok meyve anacı çoğaltımı üzerinde çalışan yirmi adet ticari doku kültürü laboratuvarı bulunmakta, bunlardan dört adedi diğer bitkilerle birlikte süs bitkileri çoğaltımı da yapmaktadır (Kalkınma Bakanlığı, 2015).

Ülkemizde TÜBİTAK, üniversiteler ve araştırma enstitülerinde bulunan doku kültürü laboratuvarlarında yapılan süs bitkisi çalışmalarında ise ağırlıklı olarak endemik ve tehlike altında olan türlerin mikroçoğaltımı üzerinde durulmaktadır (Özzambak, 2015).

2.4. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Bitkilerin Çoğaltılmasının Aşamaları

Doku kültüründe kültüre alınan bitki doku-organ kısmına göre meristem, embriyo, anter, protoplast kültürleri gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibariyle üç kısımda incelenir;

- 1) Somatik dokulardan rejenerasyon,
- 2) Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon,
- 3) Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon (Wang, Cui, Sun ve Dong, 2013).

Birinci tip rejenerasyon uç ve yan meristemden bitkilerin çoğaltılması şeklindedir. Elde edilen hücreler tamamen ana bitkiye benzerler. İkinci tip rejenerasyon; doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve sitokininler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları daha sonra bitkiyi veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyoyu daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması şeklindedir. Ortaya çıkan bitkilerde bazı kalıtsal veya geçici varyasyonlar oluşabilir. Son olarak, normal kromozom sayısının yarısını ihtiva eden hücrelerden de direkt veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle steril olan haploid bitkiler elde edilebilir (Babaoğlu, Gürel ve Özcan, 2002).

Doku kültürü ile çoğaltılacak her bitki türü için belirli parametrelerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunlar; eksplant kaynağı, strelizasyon, besi ortamı içeriği ve fiziksel koşullar, ışık yoğunluğu, sıcaklık, ışık-karanlık periyodu ve nemlilik ile ilgili inkübasyon koşullarının belirlenmesi, adaptasyon koşulları ve toprağa aktarma şeklindedir (Onay, Yıldırım, Pirinç, Tilkat, Çiftçi, Akdemir, Süzerer, Çalar, Binici, Akdemir, ve Kılınç, 2012).

Doku kültüründe çoğaltım her biri çok özel beslenme ve inkübasyon koşulları gerektiren temel dört aşamada yapılmaktadır (Ellialtıoğlu, 2014). Bu aşamalar sırasıyla şu şekilde gerçekleşmektedir;

Kültürlerin başlatılması

Bu aşamanın ana hedefi, büyüme miktarına bakılmaksızın takip eden aşamalarda kullanılacak steril aksenik veya enfeksiyonsuz rejenerantlar elde etmektir. Eksplantlar (sürgün uç, lateral tomurcuk, yaprak vb.) yüzeyinde bulunan bulaşıklardan arındırmak için yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra katı ya da sıvı besi ortamında, kültürleri çoğaltma metoduna uygun olarak sürekli ya da periyodik ışık altında genelde $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de sıcaklıkta inkübe edilirler (Onay ve diğerleri, 2012).

Sürgünlerin çoğaltılması

Doku kültür aşamasında sürgünlerin çoğaltılması bitkilerin sayısını belirlediği için en önemli bölümdür. Bu aşamada planlanan ya da istenilen bitki sayısını elde edebilmek için

sürgünler alt kültür ve yeniden kültürle çoğaltılır. Burada kullanılan besi ortamının fiziksel durumu, yapısı, kimyasal içeriği ve inkübasyon koşulları sürgünlerin çoğaltılmasında oldukça önemlidir (Hussain ve diğerleri, 2012).

Köklenme

Besi ortamında çoğaltılan sürgünler, bitki türüne göre değişen uzunluklarda kesilerek, oksin içeren bir besi ortamında kültüre alınarak köklendirilir. Bu aşamada, iyi bir kök sistemi oluştuktan sonra iklime alıştırmaya geçilir (Türközü, Yaşar, Ellialtıoğlu ve Yıldırım, 2014).

Adaptasyon (Alıştırma)

In vitro üretilen bitkiler direkt olarak dış ortama aktarıldıklarında, fazla miktarda su kaybettikleri için birçoğu hemen ölür. Bu nedenle rejenerasyon sonucu oluşan bitkiler kademeli olarak doğal gelişme ortamına alıştırılması gerekir. Doğal büyüme ortamına alıştırma safhasında bitkicikler modern tesislere sahip olmayan işletmede polietilen torbalarla kapatılır ve geçen zamanla birlikte torbada delikler açarak, dış ortama tedricen uyumu sağlanır veya ışık, sıcaklık ve nemin kontrol edilebildiği özel büyüme odaları veya kabinlerinde dış ortama alıştırılır. *In vitro* ortamda köklenen bitkicikler doğrudan dış ortama aktarılırsa, bu bitkilerin kutikularları gelişmediği için hemen ölürlür. Stoma fonksiyonlarının başlatılması ve fotosentezi uyarmak için, *in vitro* ortamda çoğaltılan bitkiciklerin *in vivo* ortama aktarılmadan önce mutlaka iklime alıştırılması gereklidir. Bu nedenle bu safha bütün çoğaltım sürecindeki en son ve en önemli aşamadır. Bu yüzden bu aşama ışık, sıcaklık ve nem ile ilgili koşulların optimizasyonu ile yapılmalıdır. Bu aşamadan önceki diğer bütün aşamalarda her bitki türü için kendi özel ihtiyaçları göz önüne alınmalıdır (Pasqual, Soares ve Rodrigues, 2014).

Çalışılan bitki ve bitki dokusuna göre doku kültürü çalışmalarında besiyeri ve kültür koşullarının düzeni değişiklik göstermektedir. Bununla beraber eksplantın fizyolojik durumu, doku kültürüne vereceği tepki açısından çok önemli bir role sahiptir. Örneğin, genç eksplantlar genellikle yaşlı olanlara göre daha başarılı sonuçlar verirler (Bozdoğan, İşlek, Kara ve Ezer, 2013).

Doku kültürünün başarısı, sıcaklık, pH, ışık, nem ve hormonlar, büyüme ortamının kompozisyonu gibi kültür koşullarına bağlıdır. Bitki doku kültürü toprakta bulunan bitkinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan bütün besinleri içermektedir (Öktem ve Yücel, 2012).

2.5. Bitki Doku Kültüründe Besin Ortamının Seçimi

Doku kültürü işlemlerine başlamadan önce kullanılacak uygun besin ortamlarının seçimi çok önemlidir. Birçok araştırmacı tarafından bulunan çeşitli besin ortamlarının formülasyonu mevcuttur ancak birkaç tanesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu besin ortamları aşağıda sıralanmaktadır (Alremi, Taşkın, Sönmez, Büyükalaca ve Ellialtıoğlu, 2014).

- *MS ortamı*: Tütün bitkisi için Murashige/Skoog (1962) geliştirilmiş yüksek tuz içeren bir ortamdır.
- *B5 ortamı*: Soya kallusları için Gamborg ve diğerlerinin (1968) geliştirdiği nitrat azotu yüksek bir ortamdır.
- *LS ortamı*: Linsmaieri/Skoog (1965) tarafından geliştirilmiş MS ortamının içeriğindeki organik bileşiklerden oluşmuş farklı bir versiyonudur.
- *White ortamı (WH)*: White (1963)'ın domates köklerinin kültürü için geliştirdiği düşük tuz içeren bir ortamdır.
- *NN ortamı*: Nitsch ve Nitsch (1969) tarafından anter kültürü için geliştirilmiş bir ortamdır. Besin ortamındaki tuz içeriği MS ve WH arasındadır.

Bir besin ortamında genellikle farklı doz ve kombinasyonlarından 8-9 farklı gruptan 20-30 arasından farklı komponent kullanılmaktadır. Bitki besin ortamında bulunan komponentler kullanım sıklığına göre; su, makroelementler (azot, fosfor, sodyum, magnezyum, kükürt, vb.), mikroelementler (demir, manganez, çinko, bakır, vb.), vitaminler (tiamin, nikotinik asit, vb.), amino asitler (glisin, arginin, vb.), şekerler (sakkaroz, glukoz, sukroz vb.), bitki büyüme düzenleyicileri, karbon kaynağı ve katı ortam olması durumunda bazı jelleştirme (agar, fitajel, jelatin, vb.) ajanlarından oluşmaktadır. Besi ortamının pH değeri bitkilerin büyüme ve aktivitesini önemli ölçüde etkiler. Murashige ve Skoog ortamı (MS ortamı) en kapsamlı şekilde, *in vitro* olarak çok sayıda bitki türünün üremesi için kullanılmaktadır (Hussain ve diğerleri, 2012).

2.6. Bitki Doku Kültürünün Geleneksel Çoğaltma Yöntemleriyle Karşılaştırılması

Bitki ıslahında kullanılan geleneksel yol, amaçlara uygun olarak seçilmiş ata bitkiler arasında yapılan melezlemelerle gerçekleştirilmektedir. İstenilen karakter kuruluncaya kadar birçok generasyon kendilenir ve melezlenir (Özzambak, 2015). Geleneksel ıslah yöntemi her ne kadar pek çok bitkide uygulanıyor olsa da zaman ve kaynak kullanımı bakımından dezavantajlara sahiptir. Bitki doku kültürleri ve biyoteknoloji alanlarında olan gelişmeler bu tekniklerden ıslahta doğrudan veya dolaylı olarak yararlanma imkânı doğurmuştur (Ellialtıoğlu ve Okay, 2011).

Bitki doku kültürlerinin bitki ıslahında uygulama alanları;

- Embriyo kültürü
- Tarımda hücre kültürü
- Haploit bitki üretimi
- Somaklonal varyasyon
- *In vitro* seleksiyon
- *In vitro* döllenme
- *In vitro* germplazm muhafazası
- Protoplast füzyonu
- Gen transformasyon

Bunların dışında bitki doku kültürünün ticari ve ıslah dışı uygulama alanları da mevcuttur.

- Hastaliksız bitki üretimi
- Gelişmiş ürün çeşitlerinin üretimi
- Sentetik tohum üretimi
- Sekonder metabolitlerin üretimi
- Genetik transformasyon
- Tuzluluk, kuraklık ve ısıya uyum gösterebilen bitkilerin üretilmesi (Hussain ve diğerleri, 2012).

2.7. Bitki Doku Kùltürünün Avantajları ve Dezavantajları

In vitro çoğaltım bir dizi avantajı da beraberinde getirmektedir. Bu avantajlar; yüksek çoğaltım oranlarında kısa sürede çok sayıda bitkicik elde edilmesi, mevsimden bağımsız olarak uygulanabilmesi, *in vitro* üretilen bitkilerin sıklıkla mikroorganizma kaynaklı hastalıklardan bağımsız olması ve böylece değerli genotiplerin bitki virüslerinden korunabilmesidir (Arora, 2010). Ayrıca doku kùltürü teknolojisiyle bitkilerin uzun süreli stokları oluşturulabilir. Büyümenin yavaşlatılması ve alt kùltürleme sıklığının artırılması ile kısa ve orta vadede bitkinin depolanması veya muhafazası sağlanabilir. Aynı zamanda -196°C derecede (sıvı nitrojen) dondurarak koruma (kriyoprezervasyon) işlemi uygulanarak istenilen bir zaman dilimi için bitkiler depolanabilir veya muhafaza edilebilir. Doğal habitatlarında yaşayan bitkilere kıyasla doku kùltüründe çoğaltılan bitkiler daha kontrollü bir fiziksel ve kimyasal çevreye sahiptirler. Bu sayede büyüme ve gelişmenin herhangi bir safhası rahatlıkla gözlemlenebilir ve üzerinde çalışılabilir (Neumann, Kumar ve Imani, 2009).

Ancak bitki doku kùltürünün bazı dezavantajları da vardır. Doku kùltürü sistemleri steril bir ortamda kitlesel bitki materyali üretimine yol açar. Bu nedenle, kontaminasyon veya insan hatası sebebiyle materyal yitirme riski mevcuttur. Daha da önemlisi, kùltürlerde zamanla somaklonal varyasyon artışı ile bitki materyalinin genetik bütünlüğünü kaybetme riski mevcuttur. Doku kùltürü ile plastik veya cam kaplarda yetiştirilen bitkicikler yüksek neme maruz kalırlar ve fotosentetik olarak kendi kendilerine yetecek kapasitede değillerdir. Genç bitkicikler dış ortamda su kaybına karşı çok hassastırlar. Bu yüzden kademeli olarak düşen nem ve artan ışık koşullarında yavaş yavaş dış ortama alıştırılmaları gerekmektedir (Acemi, 2011).

2.8. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Modern tarım tekniklerinin ve bitki ıslahı yöntemlerinin 20. yüzyılda uygulanmaya başlamasıyla bitkisel üretimde önemli verim artışları sağlanmıştır. Bitkilerin daha iyi ve sağlıklı verim düzeylerine erişilebilmesi için genetik yapılarının iyileştirilmesi ve çevresel faktörlerin bir araya getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, klasik bitki ıslahı çalışmalarıyla üstün verim ve kaliteye sahip birçok bitki çeşidi geliştirilerek; insanoğlunun hizmetine sunulmuş olmasına rağmen başta hastalık ve zararlı olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik

çevresel uyarılara karşı dayanıklılıkta istenildiği ölçüde sonuç alınamamıştır. Bu sorunlar değişen ekolojik koşullar altında giderek büyümekte ve tür içi melezleme, varyasyon yaratmada yetersiz kalmaktadır (Özgen, Adak, Söylemezoğlu ve Ulukan, 2000; Aksu ve Şahin-Çevik, 2015).

Bitkilerde ıslah amacıyla kullanılan biyoteknolojik uygulamalardan iyi bir şekilde yararlanabilmek için bitki büyüme düzenleyicilerinden faydalanılmaktadır (Li, Liu, Sun, Xia, Chen ve You, 2015). Doğal olarak bitkiler tarafından üretilerek oluştukları yerden bitkinin başka yerine taşınan ya da bitkiye dışardan verilen, büyüme ile buna bağlı diğer fizyolojik hareketleri kontrol eden, çok az miktarda bile etkilerini gösteren organik maddelere “Bitki Büyüme Düzenleyicileri (BBD)” adı verilir (Karakuş ve Köker, 2007).

2.9. Türkiyede ve Dünyada BBD Kullanım Alanları

Bitki Büyüme Düzenleyicilerin (BBD) bilinmesi ilk olarak 19. yüzyıl sonlarındadır. Bu geçen zaman içerisinde bitki fizyolojisi konularında yapılan çalışmalar, BBD'lerin bitki büyüme ve gelişmesindeki önemli rollerini ortaya koymuştur. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, BBD'lerin bitkisel üretimde kullanılması verimi artırmak, kaliteli ürünlerin oluşmasını sağlamak, bitkilerin hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığını arttırmak ve daha iyi depolama imkânları sağlayarak ürünlerin yurt dışına satış şansını artırmaktadır. Bundan dolayı BBD'lerin doğal olanlarından daha etkin sentetik olanlarıda üretilmiştir. Bitki gelişim düzenleyicilerinin (özellikle sentetik olanları), bitkilerde kalıntı bırakması, bu maddelerin kullanımında sınırlama getirmiştir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 2012; Karakuş ve Köker, 2007).

Etilen %23'lük oranla dünyada en yaygın kullanılan birinci bitkisel hormon olurken, oksin %20 ile ikinci, Gibberellinler %17 ile üçüncü sırada yer almaktadır. Sitokinin ve absisik asit ise dünyada henüz yaygın olarak kullanılmayan doğal BBD'ler arasında yer almaktadır. Türkiye'de ise %27'lik oranla oksin ilk sırada kullanılırken, gibberellinler ve sitokininler %7 ile ikinci sırada yer almaktadır (Kumlay ve Eryiğit, 2011; Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2015).

BBD'ler başlangıçta tohum çimlenmesi meyvelerin, fidan ve çeltiklerin köklendirilmesinde kullanılırken daha sonraları tohumdan hasata hatta pazara sunuluncaya

kadar geçen devrede birçok yerde kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; çelikle çoğaltmada, tohumun çimlenme gücünün artırılması, bitkilerin çiçek açmasının teşvik edilmesi veya geciktirilmesi, soğuğa dayanıklılığın artırılması, meyve tohumunun artırılması, meyve iriliğinin artırılması, periyodisitenin azaltılması, meyve olgunluğunun erkene alınması veya geciktirilmesi, meyve kalitesinin iyileştirilmesi, hasadın kolaylaştırılması, meyve muhafaza süresinin uzatılması, meyve renginin iyileştirilmesi, meyve ve yaprak dökümlerinin kontrolü, doku kültürü çalışmaları, ıslah çalışmaları, bitkilerin hastalık ve zararlılara dayanıklılığının artırılması, yabancı ot kontrolü şeklinde sıralanabilmektedir (Karakuş ve Köker, 2007).

Bitki gelişim düzenleyicilerinin fizyolojik etkileri; bitkinin türüne, hormonun derişimine, çevresel faktörlere, bitkinin yaşına ve etki ettiği yapıya bağlı olarak değişmektedir. Başlıca fizyolojik etkileri; hücre bölünmesi, uzaması, genişlemesi, gen ifadesi, transkripsiyon seviyeleri, morfogenez, tohum ve tomurcuk dormansisi, embriyo gelişimi, tohum çimlenmesi, çiçeklenme, büyüme, meyva oluşumu, gelişimi ve olgunlaşması, kloroplast gelişimi, klorofil sentezi, partenokarpik meyva oluşumu, apikal dormansi, nükleik asit, protein ve enzim sentezi, enzim aktivasyonu, kök oluşumu, senesens, kambiyal aktivite, absisyon, strese adaptasyon ve osmoregülasyondur (Sabovljević, Vujičić, ve Sabovljević, 2014; Uçkan, Soydabaş ve Özbek, 2014). En çok kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin başlıca etkileri Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. BBD’lerin başlıca etkileri

Özellikler	Oksin	Gibberellin	Sitokinin	ABA	Etilen
Çimlenme	0	+	+	-	0
Hücre bölünmesi	+	+	++	-	-
Hücre uzaması	+	+	(?)	-	-
Uzun gün bitkisinde çiçeklenme	+	+	0	-	0
Taşıma	+	+	+	-	(?)
Assimilat oluşumu, depolama	(?)	(?)	+	+	-
Gözeneklerin açılması	0	0	+	-	(?)
Yaşlanma	-	-	--	+	+
Yaprak dökümü	-	-	-	+	0
Tomurcukların kış uykusu	0	-	-	+	0

+ = Teşvik; - = Engelleme; 0 = Etkisiz; (?) = Etki ya belirlenememiş ya da türlere göre farklı etki

2.10. BBD'lerin Sınıflandırılması

BBD'lerin bir kısmı bitkilerde gelişmeyi teşvik ederken diğer bir kısmı ise engelleyici etkide bulunur (Aksoy ve Yaşar, 1994; Güteryüz, 1982). Büyüme ve gelişmeyi uyaran veya hızlandıran büyüme düzenleyicilerine stimülatör (teşvik edici), geciktiren veya durduranlara ise retardant (inhibitör, engelleyici) denilmektedir (Awad ve Taha, 1976). Günümüzde BBD'ler tarımda doku kültüründeki pek çok uygulamadan tohumların çimlendirilmesine kadar birçok alanda kullanılmaktadır (Lakzadeh, Mir-Mahmoodi ve Jalilnezhad, 2015).

BBD'ler doğal olarak bitki içinde üretilmesine rağmen, sentetik olarak da bakteri ve mantarlar tarafından üretilmektedir (Lakzadeh ve diğerleri, 2015). Sentetik yollarla üretilen birçok bitki büyüme düzenleyicileri bulunmaktadır. En çok kullanılanları sırasıyla; oksinler, gibberelinler, sitokininler, absisik asitler ve etilendir (Şekil 2.1). Bunlara ek olarak son zamanlarda oligosakkarinler, brassinosteroidler, jasmonatlar, salicylatlar ve poliaminler gibi bitki büyümesine ve gelişmesine çeşitli boyutlarda etki eden bileşikler de geliştirilmiştir. Ancak bazı araştırmacılar bunların tam olarak bitki büyüme düzenleyicisi işlevini yerine getiremediğini bildirmişlerdir (Bulak, Walkiewicz ve Brzezińska, 2014).



Şekil 2.1. Bitki gelişimini düzenleyicilerin sınıflandırılması (Campbell ve Reece, 2010)

2.10.1. Absisik asit

Absisik asit (ABA) su eksikliği gibi çevresel streslere yanıt veren, yosun ve eğrelti otlarında keşfedilen bitki gelişim düzenleyicisidir. Birçok mantar türü ikincil metabolit olarak ABA üretirler ve alglerin tüm sınıf ve şubelerinde bulunur. Bitki abiyotik ve biyotik

stres yanıtlarına ek olarak, tek yıllık bitkilerde tohum, iki ve çok yıllık bitkilerde ise tomurcuk ve yumru gibi depo organlarında büyümeyi engeller. Aynı zamanda tohumların erken çimlenmesinin engellenmesinden de sorumludur (Cutler, Rodriguez, Finkelstein ve Abrams, 2010).

Büyümeyi teşvik edicilerle ABA'nın uygun oranlarda bulunmasıyla bitkilerdeki büyüme ve gelişme istenilen boyutlara ulaştırılabilir. Bitkilerde büyüme ve gelişme döneminde büyümeyi teşvik eden bitki büyüme düzenleyicileri aktif rol oynarken, olgunlaşma veya büyümenin sonuna doğru meyve ve yaprak dökümü esnasında ABA etkili duruma geçerek büyüme kontrol altına alınmaktadır (Morsünbül ve diğerleri, 2010).

Absisik asitin sentez yerleriyle ilgili olarak ayrıntılı bilgi olmamasına rağmen, muhtemelen olgun yaprakların kloroplastlarında sentezlendiği ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalar kloroplastların absisik asit içerdiğini göstermiştir. Kurak şartlar altında yapraklar, stomanın kapanmasını uyararak absisik asit sentezlerler. Absisik asitin görevi su stresi durumunda bitkinin su kaybetmesini engellemek için stomaya kapanma sinyali vermektir. Tohum gelişmesi üzerine farklı fitohormonlar etki edebilir. Birçok tohumda embriyo gelişiminin ilk aşamasında sitokin oranı oldukça yüksektir. Tohum hızlı büyüme basamağına girdiğinde sitokin miktarı düşer, gibberellik asit ve indol asetik asit miktarı yükselir. Embriyogenesizin ilk aşamasında çok az miktarda absisik asit bulunmasına karşın son aşamada gibberellik asit ve indol asetik asit miktarı düşer ve absisik asit miktarı artar (Özen ve Onay, 2003).

2.10.2. Etilen

Basit bir bileşik olan etilenin (C_2H_4) bitkinin kendisi tarafından üretilen gaz formunda olan tek bitki gelişim düzenleyicisidir. Tüm bilinen bitki büyüme düzenleyicilerinden etilen basit bir yapıya sahiptir. Yüksek yapılı bitkilerin tüm dokularında üretilmektedir (Wang ve diğerleri, 2013).

Etilen bazı bitkilerde genellikle çiçeklenmeyi engellerken; bazı bitkilerde ise çiçeklenmeyi uyarır. Yapraklarda senesens ve absiyonu hızlandırır. Etilen, dikotil ve gymnospermlerde dalların ve yaprakların epinastisine neden olur. Meyvacılıkta meyve olgunlaşmasını hızlandırmak için kullanılır. Dikotillerde kök, gövde ve yaprak büyümesine engel olur.

Hücre bölünmesi kontrolünde, savunma genlerinin ifadesinin uyarılmasında, yaprak ve meyve absisyonunda ve programlı hücre ölümünde önemli bir rol oynayan, tomurcuk ve çiçek oluşumunun engellenmesinde, solunumda, tohum dinlenmesinde, yaşlanma ve olgunlaşmada etkili olan bir hormondur (Kocaçalışkan, 2008).

Etilen gaz halinde olduğundan dolayı sadece uygulanan bitkiyi değil etrafındaki bitkileride etkilemektedir. Örneğin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış muzlar bir araya getirilirse, olgunlaşmamış olanların olgunlaşmış muzlarla temasından dolayı çabuk olgunlaştıkları görülür. Bu özelliğinden dolayı etilen hasat sonrası olgunlaşmayı teşvik etmek amacıyla kullanılmaktadır (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

2.10.3. Sitokininler

Sitokininler, oksin ve şeker içeren doku kültürü ortamına ilave edildiklerinde hücre bölünmesini uyardıkları için bu adı almışlardır. DNA ve RNA'daki dört bazdan birisi olan ve ATP'nin yapısında bulunan adenin bileşiğinin bir türevidir. Tüm sitokininler bir serbest baz ve buna karşılık gelen nükleosit ve nükleotidlerden oluşur (Lappas, 2015).

Sitokininler kök uçlarında ve genç yapraklarda meydana gelirler. Oradan ksilem yoluyla meristem dokularına, tohumlara, yapraklara ve meyvelere taşınırlar. Ulaştıkları yerlerde hücre bölünmesi için uyarıcı görev yaparlar. Hücre bölünmesini ve farklılaşmasını, yaprak genişleme, tomurcuk oluşumu, klorofil birikimi ve kloroplast için etioplasts dönüşümünü teşvik ederler ve antioksidan etki göstererek yaşlanmayı geciktirirler (Bulak ve diğerleri, 2014).

Sitokinin reseptörleri bitki gelişimini ve uyarılmasını düzenleyen sitokinin bağımlı süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır; bu nedenle, bu reseptörlerin fonksiyonel özellikleri büyük önem taşımaktadır (Lomin, Krivosheev, Steklov, Arkhipov, Osolodkin, Schmülling, ve Romanov, 2015).

Sitokininler doku kültüründe, oksinlerle beraber sürgün ve kök farklılaşmasına neden olmaktadır. Doku kültürü ortamında, oksin/sitokinin oranı yüksekse kök oluşumu, sitokinin/oksin oranı yüksekse sürgün oluşumu, her iki hormonun dengede olduğu

durumlarda ise doku farklılaşmaksızın kallus gelişimi görülmektedir (Demirsoy ve Türkan, 2000).

Sitokininler hem doğal hem de sentetik olarak bulunmaktadırlar. Doğal olarak bulunan sitokininler; *trans*-zeatin (4-hidroksi-3-metil *trans*-2-bütenil amino pürin), 2iP (N6 - Δ 2 izopentenil adenine) ve Dihidro zeatin (6-amino pürin)'dir (Staden, Zazimalova ve George, 2008). BAP (6-benzil amino pürin), Kn (Kinetin), TDZ (1-Fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)üre) ve CPPU (N-Fenil üre) gibi sentetik sitokininler de bulunmaktadır (Babaoğlu, Gürel ve Özcan, 2001).

2.10.4. Giberellinler

Giberellinler (GA) bazı mantar ve toprak bakterilerinde, yüksek yapılı bitkilerde türetilmiş olan tetrasiklik diterpenoid karboksilik asitlerdir. Giberellinler ilk kez pirincin paraziti bir *Ascomycetes* türü olan *Gibberella fujikuroi*'de keşfedildiği için bu ismi almıştır. Bugün 130'dan fazla giberellin çeşidi bilinmektedir ve bunlardan yalnızca birkaç tanesi bitki hormonu olarak görev almaktadır. En önemlileri GA₁ ve GA₃'tür. Giberellinler gibberellan türevleridir ve internodların uzamalarına neden olurlar (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Giberellin, üzümde çekirdeksizliği ve iri dane, salkım büyüklüğünü arttırmak için kullanılmaktadır. Işığa hassas olan tohumlarda çimlenmeyi teşvik eder ve büyümenin geniş devresini uzatarak bitkilerin uzun süre yeşil kalmasını sağlamaktadır. Özellikle çiçekçilikte yaprakların yeşil kalmasını sağlamak amacıyla sıkça kullanılmaktadır (Kumlay ve diğerleri, 2011; Davière ve Achard, 2013). Ayrıca GA apikal tomurcuklarda, köklerde, genç yapraklarda ve bitkilerin embriyolarında üretilir. Bu bileşikler hücre duvarını gevşeterek su alımını kolaylaştırır ve hücrenin genişlemesini sağlar. Böylece hücre bölünmesi ve hücre uzamasını uyararak, sürgün, yaprak uzamasını, polen olgunlaşmasını ve çiçeklenme indüksiyonunu sağlar. Embriyo ve ovül kültüründe bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanıldığı gibi yaygın olarak dormansi problemi olan tohumların çimlendirilmesinde kullanılmaktadır (Davière ve Achard, 2013).

2.10.5. Oksinler

Oksinlerin bitkilerin büyümesinde rol oynadığı ilk defa Hollandalı bitki fizyoloğu Frits W. Went tarafından 1926 ve 1928 yılları arasında gösterilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri arasında ilk keşfedilen ve tarımda kullanımı en eski olan büyüme düzenleyicidir. Oksinler hücre genişlemesine ve büyümeye neden olmakta, hücre uzaması, doku gelişimi ve kök oluşumunu teşvik etmektedirler. Bitki büyüme düzenleyicisi olan oksin bütün yüksek bitkiler tarafından meristematik hücreler tarafından sentezlenir ve en çok bulunan oksin formu ise indol-3-asetik asittir (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Bitkinin sürgün uçlarında, genç yapraklarda, gelişmekte olan meyve ve tohumlarda sentezlenir. Özellikle büyüme bölgelerindeki hücreler tarafından salgılanmaktadır. Oksinler doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlarlar. Oksinler hücrenin osmatik basıncını arttırarak, hücre membranında su geçirgenliğini arttırırlar. Hücre çeper basıncının azalmasına neden olmakta ve hücre çeperi sentezinde artış sağlamakta ve böylece hücre çeperi esnekliğini ve genişlemesini teşvik etmektedirler (Babaoğlu ve diğerleri, 2002; Müller, 2015).

Oksin grubu hormonlar, “doğal oksinler” ve “sentetik oksinler” olmak üzere ikiye ayrılırlar. IAA (İndol-3-asetik asit), 4-CPA (parakloro fenoksi asetik asit) ve fenil asetik asit doğal oksin iken; NAA (naftalin asetik asit), BNOA (β -naphthoxyacetic acid), IBA (indol bütirik asit), 3-CPA (3- kloro fenoksi propiyonamid), 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit), 2,4,5-T (2,4,5-triklorofenoksi asetik asit), Picloram ve 2,4,5-TP (2-2,4,5 triklorofenoksi propionik asit) sentetik oksinlerdir (George, 2008).

Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi etkileyen en önemli gruplardan olan oksin hormonu bitkinin gelişmesini diğer bitki büyüme düzenleyicilerle birlikte gerçekleştirir. Bitkilerde doğal olarak bulunan oksinlerin çok fazla salgılanmasında veya suni olanların fazla uygulanması durumunda büyümeyi durdurucu etkiye sahiptir (İşlek, Koç ve Üstün, 2010).

Oksin başta olmak üzere çeşitli büyüme düzenleyici maddeler doku kültürü kullanımlarının yanı sıra ziraai amaçlarla da kullanılmaktadır. Bu maddelerin bitkilere uygulanması amaca göre çeşitli şekillerde yapılır:

- a. Yapraklara püskürtülerek
- b. Sulama suyuna karıştırılarak
- c. Kesik yüzeylere lanolin macunu içinde sürülerek
- d. Bitki organlarını bu maddelerin çözeltilerine batırarak
- e. Belirli bir dokuya enjeksiyon yapılarak (Kocaçalışkan, 2008).

Büyüme düzenleyici maddelerin sentetik olanları pratik amaçlarla daha çok kullanılmaktadır. Sentetik maddeleri tanıyan yıkıcı enzimler bitkide bulunmadığından daha uzun süre bitkide kalırlar ve uzun süreli etki gösterirler. Ayrıca bazı sentetik maddeler doğal olan hormonlara göre daha etkili olmaktadır. Aynı zamanda sentetik olanlar daha ucuz olduğundan tercih edilmektedir (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Oksinler doku kültürü çalışmalarında kök geliştirmek amacıyla besi ortamına ilave edilerek kullanılır. Oksinler içinde tarımsal amaçla ve doku kültürü çalışmalarında en çok kullanılan 2,4-D'dir. Yüksek dozlarda herbisit olarak, düşük dozlarda ise bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılmaktadır. Embriyogenesis oluşumu için en fazla kullanılan oksin tipi 2,4-D olmakla birlikte NAA, picloram ve dikamba da tek başlarına veya 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadır (Kocaçalışkan, 2008).

2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)

2,4-Diklorofenoksi asetik asit, tarım ve tarım dışı uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.3'te gösterilmiştir (Alexander, Mandel, Baker, Burns, Bartels, Acquavella ve Gustin, 2007).

2,4-D (Diklorofenoksi asetik asit) ilk kez bitki büyüme regülatörü olarak 1942 yılında Zimmerman ve Hithoock tarafından geliştirilmiş ve herbisit olarak 1944 yılında Hammer ve Tukes tarafından kullanılmıştır (Kalıpçı, Özdemir ve Öztaş, 2011).

Çizelge 2.3. 2,4-D' nin fiziksel ve kimyasal özellikleri

IUPAC sistemine göre adı	2,4-Diklorfenoksi asetik asit
Erime noktası	140,5 °C
Buhar basıncı (20 °C)	Sıfır
Sudaki çözünürlüğü (25 °C)	620 mg/L
LD ₅₀ (ratlarda)	375 mg/kg
Kimyasal karakteri	Anyon, asit
Tolerans (diğer bitkisel gıdalarda)	0,1 ppm

(Öngen,1990)

Doku kültürü çalışmalarında 2,4-D kallus oluşumu ve somatik embriyo oluşumunda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda bazı şüpheli sonuçların bulunmasından dolayı kullanımı konusunda çekinceler oluşmuştur (Perez-Jimenez, Cantero-Navarro, Perez-Alfocea ve Cos-Terrer, 2014).

2,4-D tarım alanlarındaki geniş yapraklı ve yabancı otların kontrolünde yaygın bir herbisit olarak kullanılırken, doku kültürü çalışmalarında ise hücre süspansiyonlarının elde edilmesinde, somatik embriyoların uyarılmasında kullanılmaktadır (Kaynak ve Memiş, 1997). Zirai mücadele yöntemleri içinde yabancı otlarla mücadelede çok yaygın olarak kullanılan 2,4-D herbisitinin özellikle yüksek dozlarda, rejeneratif bitkilerin kromozomlarında yapısal ya da sayısal olarak önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Ahlodwalia, 2004). Bunun yanı sıra bakteriler (örn. *Pseudomonas*, *Flavobacterium* gibi), mantarlar (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penisillum* gibi) ve ayrıca aktinomisetler (*Streptomyces*) 2,4-D'yi karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar (Bukowska, 2006).

2,4-D yaklaşık 50 yıldır dünyada yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır ve yüksek dozlarda kullanıldığında bitki metabolizmasında gerçekleşen enzim aktivitesi, nükleik asit sentezi, protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi bazı olayları etkileyerek bitki gelişimini engellemektedir (Seiler, 2006).

2,4-D'nin bilinçsiz olarak kullanılması bitkilerin metabolik yollarını bozmaktadır. Örneğin, ROS oluşumu (süperoksit anyon, hidrojen peroksit, süperoksit radikal ve hidroksiyal radikal oluşumu) (Mates, 2000; Bukowska, 2006), zardaki fosfolipidlere bağlanarak membranların fiziksel reaksiyonlarının bozulmasını ve lipid peroksidasyonun artmasını (Pogosyan, Nikolai, Shevchenko ve Merzlyak, 1984; Bukowska, 2006; Syberg, Binderup, Cedergreen ve Rank, 2015), homolog rekombinasyon, A → G mutasyonu, kromozom

düzensizlikleri, kardeş kromatid değişimi, DNA hasarı ve sıklığında artış gibi çok sayıda mutajenik etkilere neden olduğu tespit edilmiştir (Filkowski, Besplug, Burke ve Kovalchuk, 2003; Bukowska, 2006). Sugaya ve Sakai (1996) 2,4- D'nin asparaganik asit, alanin, izolösin, fenilalanin ve triptofan gibi amino asitleri kendine kolay bağlaması sonucunda değişik protein kompleksler oluşturarak protein hasarına neden olabileceğini bildirmişlerdir.

2,4-D'nin yarılanma süresi 20-200 gün arasında değişmekte olup, tohumda zararlar meydana getirdiği gibi, bitkilerde düşük büyüme oranı ve üreme, davranış değişikliği yanında, hedef olmayan türlerde de ölüme sebep olabilmektedir (Bukowska, 2006). Hatta tarım alanları yakınlarında havadan spreyleme sebebiyle, su kaynaklarına bulaşması söz konusudur (Waite, Cessna, Grover, Kerr ve Snihura, 2002). 2,4-D kalıntısına sahip bitkilerin insanlar tarafından tüketilmesi ya da su ve toprağa karışması sonucu, kanda oksijeni taşıyamayan methemoglobin oluşumuna da sebep olmaktadır (Bukowska, Reszka ve Duda, 1998; Duchnowicz, Koter ve Duda, 2002). Ayrıca insanlarda kanser oluşumunu tetiklediği de düşünülmektedir (Gandhi, Wandji ve Snedeker, 2000; McDuffie, Pahwa, Mc Laughlin, Spinelli, Fincham ve Dosman, 2001). 2,4 D'nin (0.125-1.250 mM) *in vitro* insan lenfositlerinde önemli oranda kromozomal anormallikleri artırdığı açıklanmış (Mustonen, Kangas, Vuojolahti ve Linnainmaa, 1986), non-Hodgkin's lenfoma ve diğer kansellere neden olabileceği bildirilmiştir (Holland, Duramad, Rothman, Figs, Blair, Hubbard ve Smith, 2002).

Picloram

Picloram (4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit) bitki biyoteknolojisi çalışmalarında, somatik embriyogenesi arttıran ve düzenleyen önemli bir sentetik oksindir. Ayrıca picloram pikolinik asit herbisitler veya piridin herbisitlerin sınıfına da aittir. Picloramın fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.4'te gösterilmiştir. Yapılan birçok sitolojik çalışmada picloramın kromozomal herhangi bir değişikliğe neden olmadığı; kuşlar, memeliler ve su türlerinde düşük dozlarda toksik olmadığı bulunmuştur. Picloramın düşük konsantrasyonları RNA, DNA ve protein sentezini uyarır bunun sonucu olarak da kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünmesine neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda vasküler doku hasarı, hücre bölünmesini ve büyümesini inhibe eder (EPA, 1995).

Çizelge 2.4. Picloramın fiziksel ve kimyasal özellikleri

IUPAC sistemine göre adı	4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit
Erime noktası	218,5 °C
Buhar basıncı (35 °C)	0,0000006 mmHg
Sudaki çözünürlüğü (25 °C)	430 ppm
LD50 (ratlarda)	8,200 mg/kg
Kimyasal karakteri	Anyon, asit
Tolerans (diğer bitkisel gıdalarda)	0,1 ppm

(Tu, 2001)

Picloram bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılmasının yanı sıra, geniş yapraklı otların kontrolünü sağlamak için kullanılan bir herbisittir. 2,4-D'nin kanserojen ve toksik etkisini kanıtlayan birçok çalışmaların varlığının yanı sıra, picloramın kanserojen ve toksik etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda herhangi bir olgu kanıtlanamamıştır (Anonymous, 1992). Picloram'ın mutajenik etkilerinin incelendiği bir çalışmada farelerin medulla polikromatik eritrositlerinde mikronukleus testi ve spermatozoidlerinde kromozom anormallik testi gerçekleştirilmiş, her hangi bir genotoksik etki gözlenmediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada gerçekleştirilen Ames testi sonucuna göre de Picloram'ın mutajenik etkisi olmadığı açıklanmıştır (Yun, Qiongjiang ve Liujin, 2005).

2.11. Genotoksisite Testleri

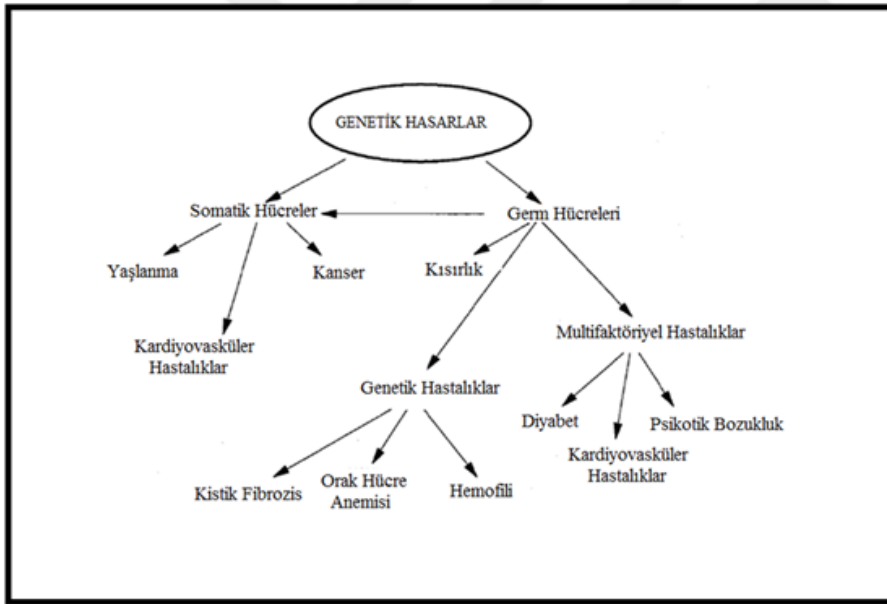
Genotoksisite, kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanların genetik materyalde oluşturduğu hasara denir. Bu hasarlar tek zincir kırıkları, çift zincir kırıklıkları, gen mutasyonu, kromozom aberasyonu, klastojenite ve anöploidi, DNA eklentileri gibi hasarlardır. Genotoksisitenin neden olduğu DNA hasarı eğer onarılmaz ise kromozomal aberasyonlar, gen mutasyonları, kanser oluşumu ve hatta hücre ölümüne dahi neden olurlar. Genotoksisite ile karsinogenez arasındaki ilişki kesin olarak gösterilmiştir. Genotoksik hasarın, kanser gelişiminde en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle genotoksisite araştırmaları karsinogenlerin belirlenmesinde önem teşkil eder. Geçmişten bugüne mutajenik, teratojenik ve genotoksik olan maddelerin karsinogenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir (Nagarathna, 2013).

Genotoksisite özelliğine sahip maddeye, genotoksin denir. Kimyasal ve radyasyon içeren genotoksinler mutajen olup DNA ve kromozomlarda mutasyonlara neden olurlar. Genotoksinler germ hücrede meydana gelirse mutasyonların nesillerden nesillere aktarılmasına sebep olmaktadır. Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar

hastalıklara ve dejenerasyonlara yol açarak gelişmeyi ve metabolizmayı olumsuz etkileyebilirler. Birçok kanser türünün somatik hücrelerde genellikle bir mutasyon nedeni ile ortaya çıktığı bilinmektedir (Khan, 2014).

Genetik hasarlar; kanser, yaşlanma, infertilite, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı genetik ve multifaktöriyel hastalıklara yol açtığı için (Şekil 2.2), mutajen ve karsinojenlerin belirlenmesi ve olası risklerinin en düşük seviyeye indirilmesi halk sağlığının korunması açısından oldukça önemlidir (Atlı-Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

Mutajenler DNA üzerindeki olası etkilerini doğrudan ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı olarak göstermektedirler (Kirsch-Volders, Sofuni, Aardemac, Albertini, Eastmond, Fenech, Ishidate, Kirchner, Lorge, Morita, Norppa, Surralles, Vanhauwaert ve Wakata, 2003; Mateuca, Lombaert, Aka, Decordier ve Kirsch-Volders, 2006).



Şekil 2.2. Genetik hasarlar (Mansoori, Gautam ve Tiwari, 2014).

DNA'ya doğrudan veya dolaylı zarar veren ajanlar;

- Kovalent bağ oluşturan elektrofilik türler. Örneğin DNA adductları, Alkilleyici maddeler
- Aril nitrenyum iyonları, PAH vb Diol epoksitleri
- Nükleosid analogları
- UV ve iyonize edici radyasyonlar

- Topoizomeraz inhibitörleri
- Reaktif oksijen türleri
- Protein sentezi inhibitörleri gibi ajanlardır (Mansoori ve diğerleri, 2014).

2.11.1. Yaygın kullanılan genotoksisite testleri

Genomu etkileyecek UV ve radyasyon gibi fiziksel etkenlerin, parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisit, ilaç, gıda katkı maddeleri, endüstriyel kimyasallar, tarım ilaçları ve nanomateryaller gibi birçok kimyasalın genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların hem piyasaya sürülmeden önce hem de piyasaya sürüldükten sonra bu ilaçları kullanan kişilerdeki genetik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, bazı hastalıklar sonucu artmış DNA hasarının tespitinde, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kanserden korunmada, kansere duyarlılığın tayininde ve takibinin yapılmasında biyoizlem testleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Mansoori ve diğerleri, 2014).

Genetik toksisite testleri, çeşitli mekanizmalarla direkt veya indirekt olarak genetik materyalde hasara neden olan bileşiklerin hasarını belirleyebilmek amacıyla, *Drosophila*'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) (Graf, Wurgler, Katz, Frei, Juon, Hall ve Kale, 1984; Isaenko, Karr ve Feder, 2002), mayalarda *Saccharomyces cerevisiae* genotoksisite testi (Buschini, Poli ve Rossi, 2003), bakterilerde *Salmonella* mutajenite testi (Mamber, Kolek, Brookshire, Bonner ve Fung-Tomc, 1993), hayvanlarda (sıçan, fare, hamster) kemik iliği mikronükleus testi (Ono, Tamura, Yamashita, Tamura, ve Iwakura, 2006), insan lenfosit hücre kültürlerinde kardeş kromatit değişimi (Çelik, Ünal, Yüzbaşıoğlu, Ergün, Arslan ve Kasap, 2005; Sivikova, Holeckova ve Dianovsky, 2005; Yılmaz, Unal, Yuzbasioglu ve Gonenc, 2015), kromozomal anormallik ve mikronükleus (Choy, 2001; Lorge, Lambert, Gervais, Becourt-Lhote, Delongas ve Claude, 2007; Yüzbaşıoğlu, Zengin ve Ünal, 2014) ve hayvan hücrelerinin yanı sıra tüm bitki türlerinde DNA zararını belirlemek için uygulanan *Allium* testi veya Tek Hücre Jel Elektroforezi gibi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) (Tice, Agurell, Anderson, Burlinson, Hartmann, Kobayashi, Miyamae, Rojas, Ryu ve Sasaki, 2000; Collins, 2002; Yüzbaşıoğlu, Ünal, ve Sancak, 2009) çeşitli *in vitro* ve *in vivo* testler geliştirilmiştir.

Bakterilerde yapılan testlerden biri Bruce Ames tarafından geliştirilen Ames *Salmonella* mikrozomal test sistemidir. Mutajen ve kanserojen maddelerin tespitinde kullanıldığı gibi çeşitli antimutajenik ve antikanserojenik etkileri olan inhibitör maddelerin de belirlenebildiği ve etkilerinin izlenebildiği, çok önemli, kısa zamanlı ve uygulanmasının kolay olması nedeniyle çok yaygın kullanılan test sistemlerinden biridir. Bu testte *Salmonella typhimuriumun* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar ile elde edilmiş suşları kullanılmaktadır. Bu test *in vivo* memeli testleriyle pozitif korelasyon göstermektedir (Kirkland, Zeiger, Madia ve Corvi, 2014).

Sıkça kullanılan bir diğer test ise *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon aktivitelerinin saptanmasında kullanılan bir mutajenite testidir (SMART). Sinek kanatlarındaki trikomlarda fenotipik olarak ifade edilen belirleyici genlerin heterozigotluğunun kaybını belirlenmesi için geliştirilmiştir. Bu test ile nokta mutasyonu, delesyon, kararsız translokasyon, mitotik rekombinasyon ve kromozom kaybı veya ayrılmama gibi, belirli kromozom aberasyonları tespit edilebilmektedir. Ucuz, hassas ve kolay bir testtir. *Drosophila* larvaları kimyasal uygulamadan sonra birkaç hücre bölünmesi geçirdikten sonra somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar hücrenin bölünmesiyle yavru hücrelere aktarılırlar. Klonlarda, somatik hücrelerdeki mutasyonun veya rekombinasyonun neden olduğu genotipik değişimler fenotipik olarak kolayca gözlenmektedir. Bu test son yıllarda çevre kirliliği ile ilgili çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır. *Drosophila* ile yapılan bu *in vivo* test yönteminin mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo* genotoksisite test sistemleri arasında bağlantı oluşturabileceğini bildirmişlerdir (Frei ve Würzler, 1996; Avalos, Haza, Drosopoulou, Mavragani-Tsipidou, ve Morales, 2015).

Genotoksisite testlerinde özellikle mitotik rekombinasyon ve gen mutasyon testlerinde *Saccharomyces cerevisiae* yaygın olarak kullanılan maya türüdür. Ökaryot olmaları ve kromozom yapısı, DNA onarım süreçleri bakımından memeliler ile benzerlik göstermelerinden dolayı tercih edilirler (Pereyra, Dogi, Lisa, Wittouck, Ortíz, Escobar, Bagnis, Yaciuk, Poloni, Torres, Dalcero ve Cavagliar, 2014).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan *in vitro* genotoksisite testleri; kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN), comet (SCGE) ve *Allium* testleridir.

Kromozomal anormallik testinde *in vitro* ortamda hücelere kimyasal verildikten sonra kromozom yapısındaki genel değişiklikleri belirlemek için tübülün polimerizasyon inhibitörleri kullanılarak çoğalan hücelerin metafazda kalması sağlanır. Preparasyonlar Giemsa ile boyandıktan sonra yapı ve sayısına bağlı olarak kromozomal anormalliklerin belirlenmesi için mikroskopta incelenir. KA testinde kültüre edilmiş; çin hamsteri ovaryumu, kemik iliği hüceleri ve insan lenfositleri kullanılmaktadır. Yaygın olarak çeşitli kimyasallara maruz kalan popülasyonda genotoksositeyi değerlendirmek için, insan biyolojik izleme test çalışmalarında da kullanılmaktadır. Kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomlar ise DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır. Genetik materyalde oluşan bu tip hasarların tamir edilememesinden ortaya çıkan yüksek KA frekansı kanser riskinin artması olarak düşünölmektedir (Doak, Liu, ve Chen, 2012; Yüzbaşıoğlu, Çelik, Yılmaz, Ünal, ve Aksoy, 2006; Yılmaz, 2008; Kumar, Khan ve Dhawan1, 2013). Bu yöntemle; kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, disentrik kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme (sister union), halka kromozom, kromatid değişimi (triradial, quadriradial şekiller), gap, translokasyon, inversiyon gibi yapısal; poliploidi ve endoreduplikasyon gibi sayısal kromozom aberasyonları tespit edilebilir (Mateuca ve diğerleri, 2006; Doak ve diğerleri, 2012).

Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) testi, 1957 yılında Taylor ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve en fazla kabul gören kısa süreli mutajenite testlerinden birisidir. Timin baz analogu 5-bromodeoksiüridin (brdU) kullanılmasıyla bir kromozomun kardeş olan kromatitleri arasında parça değişiminin gözlenmesi esasına dayanır. Çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerini belirlemede kullanılan hassas bir testtir. Analiz edilen hücrede KKD sıklığının görölməsi, kimyasalın DNA'ya yapmış olduğu etki hakkında bilgi verir (Kumar ve diğerleri, 2013). Mutajenik, karsinojenik ve klastojenik etkisi olan ajanların KKD değerlerini arttırdığı, antioksidan özellik gösteren ajanların da KKD değerini azalttığı araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Perry ve Evans, 1975; Carrano, Thompson, Lindi ve Minkler, 1978; Albertini, Anderson, Douglas, Hagmar, Hemminki, Merlo, Natarajan, Norppa, Shuker, Tice, Waters ve Aitio, 2000). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücelerinde KKD frekansının arttığı ve nokta mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu saptanmıştır. KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. KKD deneysel çalışmalarda, indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir

yöntem olarak kullanılmaktadır (Schreiner, Hoffman, Gudic ve Clark, 2014; Stults, Killen ve Pierce, 2014).

Mikronükleus testi *in vivo* kromozom hasarı değerlendirmek için Heddle ve Schmid adlı bağımsız iki araştırmacı tarafından bulunan bir testtir. Bu test çevresel kirlenmelere maruziyetin genotoksik etkilerini tahmin etmek için 1980'li yılların başından beri kullanılmaktadır. Mikronükleus testi kromozom kırılmalarındaki miktarı ve mitotik iğdeki fonksiyon bozukluğunu gösteren biyoizlem testidir (Osman, 2014). MN'ler genellikle hücre çekirdeği bölünürken anafazda kardeş çekirdeğe katılmayan tam kromozom ya da kromozom parçalarından oluşmuş DNA taşıyan küçük parçacıklardır. Normal hücre çekirdeğinin 1/5 ile 1/20' si arasında bir büyüklüğe sahiptir (Fenech, 2000). Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus (Cytochalasin Block Micronucleus= CBMN) yöntemi olarak da bilinen bu test ile kromozom kırılması, DNA tamir bozukluğu, kromozom kaybı, kromozom ayrılmaması (nondisjunction), kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplasmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen amplifikasyonu, nekrosis ve apoptozisin basit morfolojik ölçütler kullanılarak değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır (Kumar ve diğerleri, 2013). Yapılan çalışmalarda MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açmasına neden olurken; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar (Bonassi, Znaor, Ceppi, Lando, Chang, Holland, Kirsch-Volders, Zeiger, Ban, Barale, Bigatti, Bolognesi, Cebulski, Wasilewska, Fabianova, Fucic, Hagmar, Joksic, Martelli, Migliore, Mirkova, Scarfi, Zijno, Norppa ve Fenech, 2007; Parry ve Kirsch-Volders, 2010; Preston, Skare ve Aardema, 2010; Osman, 2014).

Östling ve Johanson tarafından 1984 yılında DNA hasarını ve tamirini belirlemek üzere tek hücre jel elektroforezi (*Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE*) geliştirilmiştir. Çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı, güvenilir, ekonomik ve basit bir yöntemdir. Son yıllarda bitki comet testi ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları, nanomateryaller, ağır metaller ve radyasyona maruz kalmış hücreleri incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Santos, Pourrut ve Ferreira de Oliveira, 2016). Genetik toksikolojide, apoptozis ve DNA tamiri çalışmalarında sıklıkla kullanılmaya başlanılan bu yöntem hemen hemen bütün ökaryotik hücrelerde ve bazı

prokaryotik hücrelerde DNA hasarını direkt olarak belirlemektedir. Comet yöntemiyle apoptoza bağlı DNA bozulmaları görüntülenmektedir (Osman, 2014; Östling ve Johanson, 1984). Comet yönteminde agorozla süspanse edilen hücreler lam üzerine yayılarak yüksek oranda tuz ve deterjanla lize edilerek elektroforezise tabi tutulur. Daha sonra bu hücreler mikroskopta kolay görünmelerini sağlamak için floresan boya ile boyanırlar. Hasar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, DNA'da hasar varsa, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görüntüsü vermektedir. Kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler kullanılarak DNA hasarı kantitatif olarak belirlenir (Osman, 2014; Ginzkey, Steussloff, Koehler, Burghartz, Scherzed, Hackenberg, Hagen, ve Kleinsasser, 2014). Comet testi genelde omurgasızlar, insan ve hayvan sistemleri üzerinde çalışılsa da, günümüzde genotoksinlerin *Nicotiana tabacum*, *Vicia faba* ve *Arabidopsis thaliana*, *Allium* bitki kökleri ve yapraklarındaki genotoksik etkilerinin araştırılmasında da kullanılmaktadır (Gichner, Znidar, Wagner ve Plewa, 2009; Ventura, Giovannini, Savio, Donà, Macovei ve Buttafava, 2013; Liman, Ciğerci ve Öztürk, 2015; Santos ve diğerleri, 2016; Syberg ve diğerleri, 2015).

Çeşitli çevresel ajanların genotoksik veya sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılanlarından birisi de *Allium* testidir. *Allium* testi ilk defa Levan tarafından 1938 yılında kolşisinin etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda bu test sisteminde belirli değişiklikler yapılarak kullanım alanı geliştirilmiştir (Fiskesjö, 1985). *Allium* testinde *Allium cepa*'dan başka *Crepis capillaris*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia paludose*, *Nicotiana tabacum*, *Hordeum vulgare* gibi daha birçok bitki kullanılmaktadır. Bu test ile sadece kök uçlarındaki anormallikler değil aynı zamanda polen, yaprak gibi farklı organlardaki kromozom anormallikler değerlendirilebilmektedir (Leme ve Marin-Morales, 2009; Tedesco ve Laughinghouse, 2012).

Allium testi ile mitotik indeks (Mİ), kromozom anormallikleri (KA), çekirdek anormallikleri (NA) ve mikroçekirdek (MN) gibi çeşitli parametreler aynı anda değerlendirilebilmektedir (Michalska-Kacymirow, Kurek, Smolis, Wierzbicka ve Bulska, 2014). Bu testin uygulaması kolay ve maliyeti düşüktür. Ayrıca *Allium* testi prokaryotik veya ökaryotik canlılarla yapılan diğer, alternatif kısa dönem toksisite test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir. Kimyasalların çevre üzerindeki genotoksik potansiyelini belirlemede kullanılan etkili bir test sistemidir. Çevre koruma ajansının raporunda *Allium* testi, belli bir kimyasala maruz kalma sonucu oluşan kromozom aberasyonlarının tespiti

için mükemmel bir test olarak tanımlanmıştır (Khanna ve Sharma, 2013). *A. cepa*'nın kromozomlarının sayıca az ($2n=16$) fakat yapı bakımından büyük olması ve ön-mutajenleri tespit etmek için çok önemli bir oksidaz enzim sisteminin bulunması bu testte model organizma olarak tercih edilmesini sağlamaktadır. Buna ek olarak bitki kökleri biyolojik testler için çok faydalı materyallerdir. Çünkü kök uçları, doğada suya ve toprağa karışan kimyasallara maruz kalan ilk yapılardır. Bu nedenden dolayı kök ucu sistemlerinin incelenmesi hızlı ve hassas bir metot olup iki seviyede gözlem yapılmaktadır. Makroskopik düzeyde büyümedeki düzensizlikler gözlenebilirken; mikroskopik düzeyde ise hücrelerdeki mitotik anormallikler tespit edilebilmektedir. Bu test sistemi çevresel etkenlerin zararları hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2009; Njoku, Akinola ve Tommy, 2015; Bianchi, Mantovani ve Morales, 2015).

Allium cepa hücrelerinde mitotik indeks yeterli hücre çoğalmasının ve bitki kök büyüme hızının göstergesi olarak kullanılmaktadır. Kimyasal bir maddenin sitotoksitesite seviyesi Mİ'deki artış ya da azalma ile tespit edilebilir. Mİ'de gözlenen azalma ile maruz kalınan ekzojen maddenin etkisiyle bitkide büyüme ve gelişmenin engellendiği sonucuna varılabilirken, Mİ'de gözlenen artış, düzensiz hücre bölünmeleri ve tümörlü bir doku anlamına gelebilmektedir (Leme ve Marin-Morales, 2009; Barbério, Voltolini ve Mello, 2011; Türkoğlu, 2012).

Kromozomal anormallik *Allium cepa* hücrelerinin fiziksel ya da kimyasal maddelere maruz kalması sonucu, kromozom yapısı veya kromozom sayısındaki değişikliklerdir. Yapısal kromozomal değişiklikler, DNA kırıkları, DNA sentezinin inhibisyonu ve DNA replikasyonundaki hatalar gibi birçok faktör tarafından indüklenebilir. Kromozom sayısındaki değişiklikler ise (anöplöidi ve poliploidi gibi) kendiliğinden veya anöjenik ajanların etkisiyle ya da kromozomların düzensiz şekilde ayrılmasından oluşabilir (Albertini ve diğerleri, 2000; Liman ve diğerleri, 2015).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bitki materyali

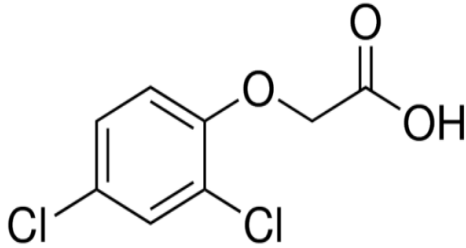
Araştırma materyali olarak, ticari olarak satılan *Allium cepa* L. (mutfak soğanı) kullanılmıştır.

Bitki büyüme düzenleyicileri

Bu araştırmada bitki büyüme düzenleyicisi olarak, 2,4-D (2,4- diklorofenoksi asetik asit) ve Picloram (4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit) kullanılmıştır.

2,4- Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)

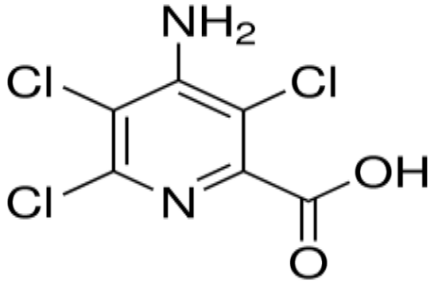
Açık formülü $C_8H_6Cl_2O_3$, moleküler ağırlığı 221,04 g'dır. Bitki biyoteknolojisinde genellikle 0,01-5 mg/L konsantrasyonlarında kullanılmaktadır (Smith, 1992; George, 1993; Franklin ve Dixoni 1994, Ateeq, Farah, Ali ve Ahmad, 2002). Yapısal formülü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 2,4-D'nin yapısal formülü (Sigma-Aldrich, 2015 a)

Picloram (4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit)

Bitki biyoteknolojisi çalışmalarında genellikle 0,01-5 mg/L konsantrasyonlarında kullanılan, somatik embriyogenesisi arttıran ve düzenleyen önemli bir sentetik oksindir. Moleküler formülü $C_6H_3Cl_3N_2O_2$, molekül ağırlığı 241,5 g'dır ve yapısal formülü Şekil 3,2'de gösterilmiştir. Bitki doku kültürü çalışmalarında oksin olarak kullanılır. Kristal yapıda ve beyaz renklidir. 1 M NaOH içerisinde çözünür, erime noktası 218,50°C'dir.



Şekil 3.2. Picloram'ın yapısal formülü (Sigma-Aldrich, 2015 b)

3.2. Metot

Çalışmada kullanılan 2,4-D ve picloram bitki büyüme düzenleyicilerinin her biri için stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltileri 1 mg BBD'nin 0,2 mL absöü etil alkol içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler 1 mL bidistile su kullanılarak farklı konsantrasyonları elde etmek için seyreltilmiştir. 2,4-D ve picloram ısı muamelesi ile bozulmadığından besin ortamına otoklavlanmadan önce ilave edilmiştir.

Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi

2,4-D ve Picloram'ın EC₅₀ konsantrasyonlarının belirlenmesi için 9 farklı konsantrasyonu (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 ve 4,5 mg/L) kullanılmıştır. 4,4 g/L MS (Murashige ve Skoog) +30 g/L Sukroz ve 7 g/L Agardan oluşan besiyeri hazırlanmış ve konsantrasyonlar ilave edilmiştir. Kontrol grubu olarak herhangi bir büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı hazırlanmıştır. Üç günün sonunda yeterli kök uzunluğunun sağlanamaması ve kök uçlarında morfolojik anormallikler görülmesinden dolayı EC₅₀ konsantrasyonu belirlenememiştir. Bu nedenle konsantrasyonların belirlenmesinde doku kültüründe kullanılan dozlara ait literatürlerden yararlanılmıştır. 2,4-D ve picloramın doku kültürü çalışmalarında optimum konsantrasyon olarak 0,01-5 mg/L olarak bildirilmiştir (Smith, 1992; George, 1993; Franklin ve Dixoni 1994, Ateeq ve diğerleri, 2002). Bu nedenle, bu tez çalışmasında 2,4-D ve Picloram için 0,67; 1,34; 2,01; 2,68; 3,35 ve 4,02 mg/L'lik konsantrasyonlar kullanılmıştır.

Eksplantın yüzey sterilizasyonu

Eksplant olarak *Allium cepa*'nın kullanıldığı çalışmada en iyi sterilizasyon dozunu belirlemek için %20, %25, %30 ve %35'lik ticari sodyum hipoklorit (Ace %5 NaOCl)

kullanılmıştır. En iyi yüzey sterilizasyon dozu olarak %25'lik doz belirlendikten sonra çalışmalar steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla soğanlar, %25' lik (v/v) ticari sodyum hipoklorit (Ace %5 NaOCl) solüsyonu ile 10 dakika manyetik karıştırıcıda yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra steril saf su ile 3 kez 5'er dakika süreyle durulanmıştır.

Ortam ve kültür şartları

Denemelerde, MS mineral, tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962) (Çizelge 3.1), % 3'lük sukroz ilave edilerek kullanılmıştır. Besin ortamının pH'sı, otoklavlanmadan önce 1 M KOH ya da 1 M HCl kullanılarak 5,6 – 5,8'e ayarlanmıştır. Ortama agar % 0,7 g/L (Type A, Sigma) ilave edilmiştir. Ortam hazırlığında distile saf su kullanılmıştır. Ortamın sterilizasyonu otoklavda 104 kPa atmosfer basınçta ve 121 °C'de 20 dakika tutularak sağlanmıştır.

Soğanlar steril kabin içinde, steril bistüri ve pens ile kesilerek dış yüzeyi temizlendikten sonra steril magenta kaplarına aktarılmıştır. Tüm kültürler Philips beyaz floresan ışığı (Preheat Daylight - 42 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında 24 ± 2 °C'de beş gün süresince MS ortamında bekletilmiştir. Daha sonra oksin içeren MS ortamlarına alınarak Philips beyaz floresan ışığında (Preheat Daylight - 42 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda kök uzunluğu 1,5 - 2 cm olana kadar bekletilmiştir.

0,67; 1,34; 2,01; 2,68; 3,35 ve 4,02 mg/L'lik konsantrasyonlar *Allium cepa*'nın hücre döngüsünün yaklaşık 24 saat olması nedeniyle önceden MS besi ortamında köklendirilen soğanlara 24 ve 48 saat süreyle MS içeren doku kültürü ortamında 6,5 g/L Agar'da uygulanmıştır. Kontrol grubunu oluşturan soğanlar da aynı sürelerde bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamında bekletilmiştir. Her bir konsantrasyon için 12 soğan kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. MS (Murashige and Skoog 1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda bulunan maddeler		mg/L
Makro besin elementleri	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Mikro besin elementleri	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	
Vitaminler	Inositol	100
	Nikotinik Asit	0,5
	Pyridoxine-HCl	0,5
	Tiamin-HCl	0,1
	Glisin	2

(Babaoğlu ve diğerleri, 2001)

Her soğandan alınan kök uçları ayrı ayrı tüplere konularak 3:1 absolu alkol: glasiyal asetik asit karışımında, buzdolabında bir gece bekletilerek tespit işlemi gerçekleştirilmiştir. Tespit işleminden sonra kök uçları %70'lik alkolde buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır. Bu kök uçları mitotik indeks ve mitozdaki anormalliklerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Mitotik indeks ve faz frekanslarının hesaplanması ve kromozom anormalliklerinin belirlenmesi, her bir konsantrasyonun her iki süresi için farklı soğanlardan alınan 10'ar kök ucundan, Feulgen metoduna göre yapılan preparatlarda gerçekleştirilmiştir. Kök uçları 1 M HCl içinde 60°C'de 12 dakika hidroliz edildikten sonra Feulgen boyasında oda sıcaklığında 1 saat boyanmıştır. Kök uçlarının 2-3 mm'lik koyu boyanan uç kısımlarından %45'lik asetik asit ile ezme preparatlar hazırlanmıştır. Yapılan preparatlar mikroskopta incelemenin ardından sıvı azotta dondurulduktan sonra lamelleri kaldırılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatların üzerine entellan damlatıldıktan sonra yeni bir lamel kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

Her bir konsantrasyonun her bir ayrı süresi için 10 preparat kullanılarak 1000 hücre taranmış ve 10 000 hücre incelenmiştir. Daha sonra her uygulama konsantrasyonu ve

süresinde ve bunların kontrol grupları içinde bölünen hücrelerin toplam hücrelere oranı olarak tanımlanan mitotik indeks hesaplanmıştır. Mitozun her safhasındaki hücre sayıları belirlenmiştir. Anormal safhalar ve bunların frekansları belirlenmiş, en sık görülen anormalliklerin fotoğrafları çekilmiştir. Mitotik indeks değerlerinin analizinde z testi, mitotik fazların oranları ve mitotik anormallik değerlerinin analizinde ise χ^2 testi kullanılmıştır.

Comet testi

Comet tekniğinde Juchimiuk, Gnys ve Maluszynska, (2006) ile Justyna, Zgórska ve Ziemińska (2012), kullandıkları metod modifikasyonlarla uygulanmıştır. İlk olarak *A. cepa* kökleri 5 gün boyunca MS ortamında bekletildikten sonra 2,4-D'nin 0,67; 1,34; 2,01; 2,68; 3,35 ve 4,02 mg/L konantrasyonlarının bulunduğu MS besi yerlerine ekilerek 24 ve 48 saat bekletilmiş ve kök uçları alınmıştır. Bütün işlemler loş kırmızı ışıkta gerçekleştirilmiştir. Bu kök uçları üzerine 400 μ L soğuk 0,4 M Tris-HCl tampon maddesi eklenerek buz üzerindeki petri kaplarında kesilmiş ve buz üzerinde 2 dk bekletilmiştir. Petri kabındaki izole edilen çekirdekler ependorfa alınmıştır. Lamlar % 1'lik NMA(Normal erime noktasına sahip agaroz) ile çalışmadan bir gün önce iki kat kaplanmıştır. % 0,75'lik LMA'nın (Tris-HCl ile hazırlanmış) 90 μ L'si ile stoktaki nükleer süspansiyonun 90 μ L'si temiz bir ependorfta karıştırılmıştır. Nükleer süspansiyon ve LMA (Düşük erime noktasına sahip agaroz) karışımı lama yayılmış ve lamel kapatılarak 5 dakika buz üzerinde tutulmuştur. Ardından lamel kaldırılmış ve % 0,75'lik LMA'dan 90 μ L lam üzerine yayılmış ve yeniden lamel kapatılmış ve bu şekilde de 5 dakika buz üzerinde tutulmuştur. Süre sonunda lamel kaldırılmış ve içinde elektroforez tamponu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH >13) bulunan tanka bu lamlar dizilmiştir. Daha sonra elektroforez tamponunda 20 dakika bekletilmiş ve 27 V, 300 mA'de 20 dakika elektroforeze tabi tutulmuştur. Ardından nötralizasyon tamponunda (0,4 M Tris, pH=7.5) yıkanan lamlar EtBr (Etidyum Bromür) (1:4 EtBr: distile su) ile boyanarak incelemeye alınmıştır. Her bir konsantrasyon için 25 hücre floresan mikroskopta "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd., UK analiz sistemi kullanılarak incelenmiştir. Hücrelerin hasar dereceleri, % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirilmiştir. Comet testi verilerinin analizinde t testi kullanılmıştır.

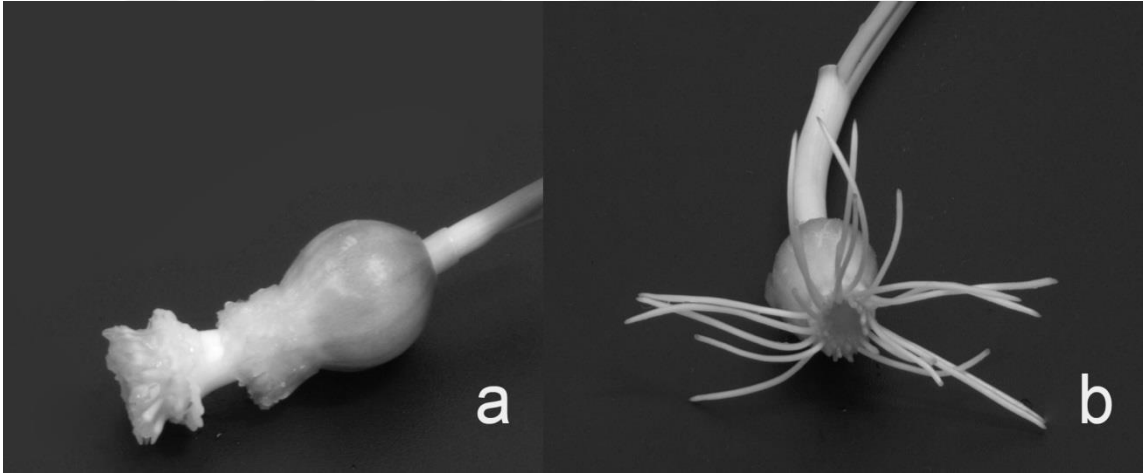


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. 2,4-D (2,4- Diklorofenoksi asetik asit)

4.1.1. Büyüme azaltma testi

2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinin EC₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan denemede başarılı bir sonuç elde edilememiştir. Kültüre alınan soğanların kontrol grubu ile kıyaslandığında (Resim 4.1.b), kök uçlarının çok küçük ve anormal yapısından dolayı (Resim 4.1.a) EC₅₀ konsantrasyonunun hesaplanması ve analiz edilmesi mümkün olmamıştır.



Resim 4.1. a. 2,4-D içeren MS ortamı içerisinde anormal kök gelişimi b. 2,4-D içermeyen MS ortamı içerisindeki normal kök gelişimi

4.1.2. Mitotik indeks ve mitotik faz frekansları

2,4-D'nin *Allium cepa* kök uçlarına uygulanması sonucu belirlenen mitotik indeks (Mİ) değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. 24 saatlik uygulamada MI değerleri $10,70 \pm 0,31$ ile $3,93 \pm 0,19$ arasında değişmektedir. Mitotik indeks kontrolde $8,01 \pm 0,27$ 'dir. En yüksek mitotik indeks değeri 1,34 mg/L'lik konsantrasyonda, en düşük mitotik indeks ise 4,02 mg/L'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. Mitotik indeks ilk üç düşük konsantrasyonda kontrole göre anlamlı düzeyde artarken (0,67; 1,34; 2,01), diğer üç yüksek konsantrasyonda ise (2,68; 3,35; 4,02) anlamlı şekilde azalmıştır.

Çizelge 4.1. 2.4-D bitki büyüme düzenleyicisinin farklı konsantrasyonlarda *A. cepa* kök ucu hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik faz frekansları

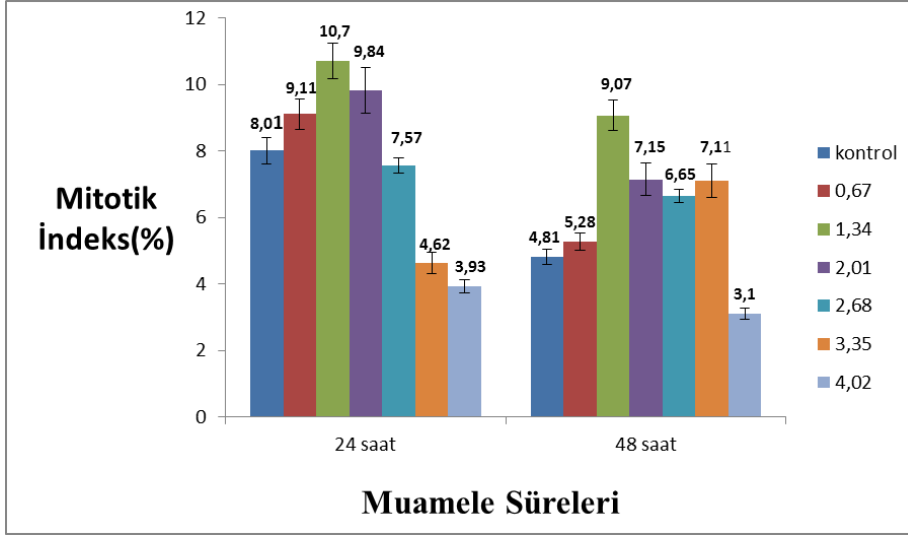
Konsantrasyon (mg/L)	Mİ (%) ± SH	Mitotik Fazlar			
		Profaz (%)	Metafaz (%)	Anafaz (%)	Telofaz (%)
24 saat					
Kontrol	8,01±0,27	36,70	35,95	13,11	14,23
0,67	9,11±0,82**	45,53	29,68	8,36	16,43
1,34	10,70±0,31**	42,75	33,74	8,73	14,78
2,01	9,84±0,29**	45,22	29,58	8,33	16,87
2,68	7,57±0,26*	47,82	30,12	7,13	14,93
3,35	4,62±0,20***	52,94	32,65	4,12	10,29
4,02	3,93±0,19***	56,99	23,66	6,37	12,98
48 saat					
Kontrol	4,81±0,21	47,33	19,14	11,31	22,22
0,67	5,28±0,22	50,35	20,96	13,40	15,29
1,34	9,07±0,28***	63,78	17,61	7,07	11,54
2,01	7,15±0,26***	64,72	14,55	5,85	14,88
2,68	6,65±0,25***	71,60	13,43	5,87	9,10
3,35	7,11±0,26***	63,43	19,13	5,06	12,38
4,02	3,10±0,17*	63,87	18,06	6,13	11,94

*Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı; (z-testi)

** Kontrole göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı; (z-testi)

*** Kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

48 saatlik uygulamada ise, mitotik indeks değerleri $9,07\pm 0,28$ ile $3,10\pm 0,17$ arasında değişmektedir. Mitotik indeks kontrolde $4,81\pm 0,21$ 'dir. En yüksek mitotik indeks $1,34$ mg/L'lik konsantrasyonda, en düşük mitotik indeks ise $4,02$ mg/L'lik konsantrasyonda belirlenmiştir. Mitotik indeks kontrole göre sadece en yüksek doz olan $4,02$ mg/L'lik konsantrasyonda anlamlı oranda azalmıştır. Diğer konsantrasyonlarda ise ($0,67$ hariç) anlamlı düzeyde artmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 2,4-D ile muamele edilen *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik indeksteki değişiklikler

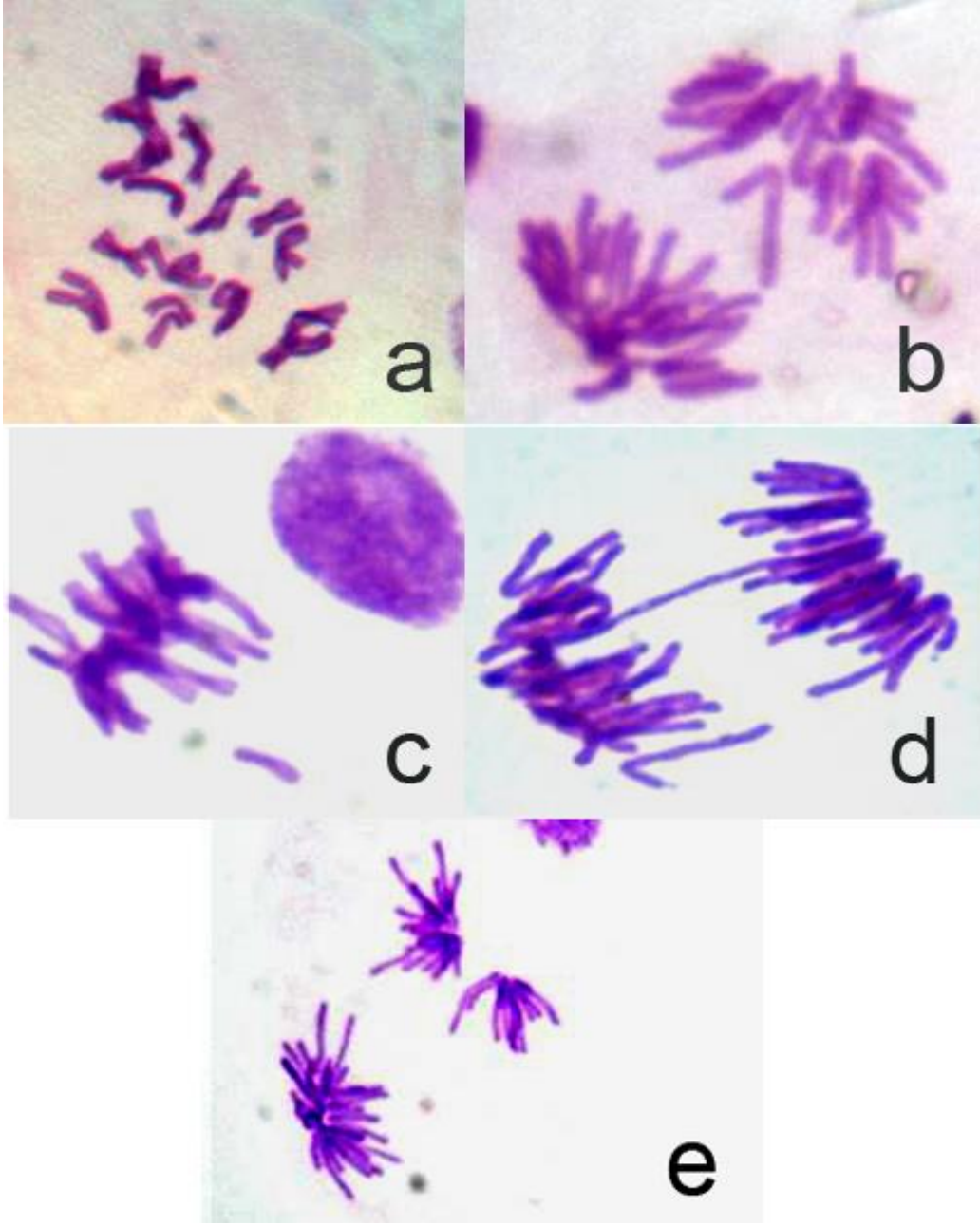
2,4-D'nin mitotik fazlar üzerine olan etkileri incelendiğinde, 24 saat ve 48 saatlik uygulamalarda profaz frekansı kontrole göre artmıştır (Çizelge 4.1). Metafaz ve anafaz frekansları ise (48 saatlik 0,67 mg/ L dozunda hariç) kontrole göre azalmıştır. Telofaz frekansı 24 saatlik uygulamada ilk dört dozda (0,67; 1,34; 2,01; 2,68 mg/L) kontrole göre artarken diğer iki dozda (3,35; 4,02 mg/L) azalmıştır. 48 saatlik uygulamada ise kontrole göre bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Kontrole oranla gözlenen değişikliklerin hiç biri anlamlı düzeyde değildir.

4.1.3. 2,4-D'nin neden olduğu mitotik anormallik tipleri ve oranları

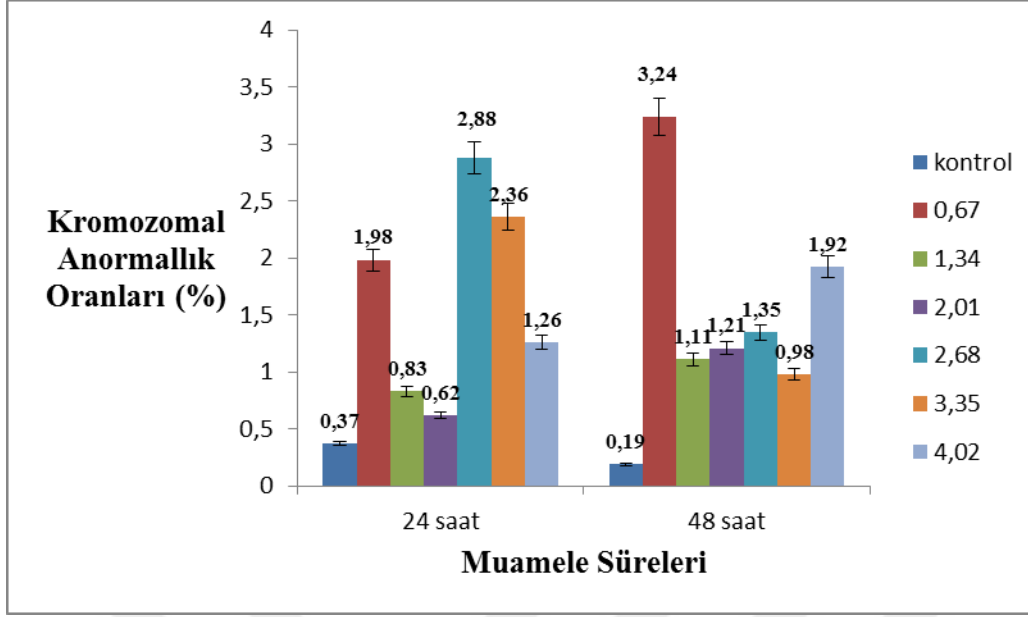
2,4-D'nin uygulanan bütün konsantrasyonları her bir uygulama süresinde mitotik safhalarda çeşitli anormalliklere neden olmuştur. Ancak 2,4-D'nin neden olduğu anormallik oranı istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). Gözlenen anormallikler; c-mitoz, kalgın kromozom, yapışıklık, köprü, fragment ve çok kutupluluktur (Resim 4.2).

Çizelge 4.2. 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi ile muamele edilen A.cepta kök ucu hücrelerindeki anormallik tipleri ve anormal hücre oranlarının kontrol ile karşılaştırılması

Konsantrasyon (mg/L)	Bölüne n hücre	% Anormallikler						Total Anormallik (%)
		C-mitoz	Kalgın kromozom	Yapışıklık	Köprü	Fragmant	Çok kutupluluk	
24 saat								
Kontrol	801	-	-	-	0,37	-	-	0,37
0,67	911	0,44	-	0,14	0,76	0,10	0,54	1,98
1,34	1076	0,09	-	-	0,74	-	-	0,83
2,01	984	0,10	-	0,10	0,42	-	-	0,62
2,68	757	0,13	0,39	0,92	1,05	0,13	0,26	2,88
3,35	462	0,21	0,43	-	1,08	-	0,64	2,36
4,02	393	-	-	-	1,01	-	0,25	1,26
48 saat								
Kontrol	481	-	-	-	0,19	-	-	0,19
0,67	528	0,76	0,37	0,57	1,35	-	0,19	3,24
1,34	806	-	-	0,12	0,74	-	0,24	1,11
2,01	907	0,11	-	0,22	0,77	0,11	-	1,21
2,68	665	0,30	0,15	-	0,60	-	0,30	1,35
3,35	711	0,14	-	-	0,84	-	-	0,98
4,02	310	0,96	-	0,32	0,32	-	0,32	1,92



Resim 4.2. 2,4-D uygulaması sonucunda *Allium cepa* kök hücrelerinde görülen kromozomal anormallikler a) c-mitoz b) geri kalmış kromozom c) yapışıklık ve kromozom fragmenti d) kromozom köprüsü e) multipolarlık



Şekil 4.2. 2,4-D ile muamele edilen *Allium cepa* kök uçlarında kromozomal anormallik oranları

C-mitoz 24 saatlik uygulamada kontrol ve 4,02 mg/L'lik konsantrasyonları hariç tüm konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulamada ise kontrol ve 1,34 mg/L'lik konsantrasyonları hariç tüm konsantrasyonlarda belirlenmiştir (Çizelge 4.2). C-mitoz değeri, en yüksek 48 saatlik uygulamanın 4,02 mg/L konsantrasyonunda 0,96 iken, en düşük olarak 24 saatlik uygulamanın 1,34 mg/L'lik konsantrasyonunda 0,09 olarak tespit edilmiştir.

Anafaz ve telofazda belirlenen kalgın kromozomlar 24 saatlik uygulamada yalnızca 2,68 mg/L'lik ve 3,35 mg/L'lik konsantrasyonda sırayla 0,39 ve 0,43 olarak belirlenirken, 48 saatlik uygulamada ise 0,67 mg/L'lik ve 2,68 mg/L'lik konsantrasyonlarda sırasıyla 0,37 ve 0,15 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

2,4-D uygulanmasıyla ortaya çıkan anormalliklerden yapışıklık, 24 saatlik uygulamada yalnızca 0,67, 2,01 ve 2,68 mg/L'lik konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulamada ise 2,68 ve 3,35 mg/L'lik konsantrasyonlar hariç tüm konsantrasyonlarda tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Anafaz ve telofazda ortaya çıkan bir diğer anormallik olan köprü oluşumu tüm uygulama konsantrasyonları ve sürelerinde belirlenmiştir.

Fragment oluşumu ise 24 saatlik uygulamada 0,67 mg/L'lik konsantrasyonda 0,10 ve 2,68 mg/L'lik konsantrasyonda 0,13 olarak gözlenmiştir. 48 saatlik uygulamada ise yalnızca 2,01 mg/L'lik konsantrasyonla 0,11 olarak belirlenmiştir.

Çok kutupluluk 24 saatlik uygulamada 0,25 ile 0,64 arasında değişmektedir. 48 saatlik uygulamada 4,02 mg/L'lik konsantrasyonda 0,32 olarak gözlenirken, en düşük 0,67 mg/L'lik konsantrasyonda 0,19 olarak kaydedilmiştir.

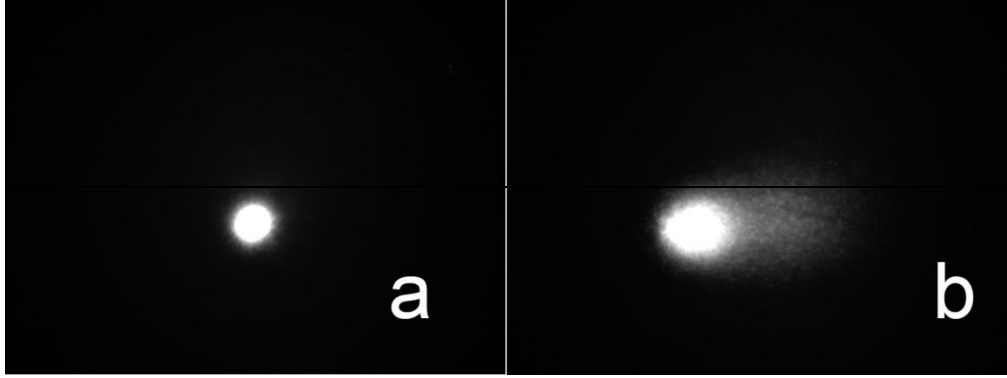
Total anormallik yüzdeleri 24 saatlik uygulamada 0,62 ile 2,88 arasında değişirken; 48 saatlik uygulamada ise 0,98 ile 3,24 arasında değişmektedir. İnterfaz safhasında hiçbir anormalliğe rastlanmamıştır.

4.1.4. Comet testi sonuçları

2,4-D ile yapılan comet testi sonuçları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları ile 24 saat ve 48 saatlik uygulamalarda DNA hasarı kontrol ($p < 0,05$) ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek olmadığı tespit edilmiştir (Resim 4.3).

Çizelge 4.3. 2,4-D ile *Allium cepa* kök uçlarında oluşan DNA hasarı

Konsantrasyon (mg/L)	Kuyruk Yoğunluğu (%) \pm SH	Kuyruk Momenti \pm SH
24 saat		
Kontrol	57,97 \pm 8,66	113,47 \pm 19,53
0,67	67,42 \pm 5,52	87,520 \pm 10,09
1,34	56,10 \pm 4,66	120,01 \pm 20,53
2,01	51,86 \pm 4,73	110,89 \pm 20,27
2,68	39,30 \pm 4,60	86,890 \pm 16,87
3,35	63,23 \pm 7,37	107,50 \pm 21,87
4,02	45,05 \pm 5,56	75,940 \pm 12,75
48 saat		
Kontrol	42,00 \pm 5,01	62,65 \pm 12,30
0,67	45,03 \pm 4,20	54,060 \pm 6,32
1,34	52,74 \pm 7,65	89,65 \pm 17,32
2,01	44,10 \pm 7,13	74,05 \pm 15,66
2,68	51,09 \pm 5,40	70,530 \pm 9,61
3,35	56,74 \pm 5,12	74,490 \pm 8,07
4,02	Yeterli hücre yok	Yeterli hücre yok



Resim 4.3. 2,4-D ile muamele edilen *Allium cepa* kök uçlarında oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) hasarlı DNA

24 saatlik uygulamada kuyruk yoğunluğu $67,42 \pm 5,52$ ile $39,30 \pm 4,60$ arasında değişmektedir. Kuyruk momenti ise $120,01 \pm 20,53$ ile $75,94 \pm 12,75$ arasında değişmektedir. 48 saatlik uygulamada ise kuyruk yoğunluğu $45,03 \pm 4,20$ ile $56,74 \pm 5,12$ arasında değişmektedir. Kuyruk momenti değerleri de $89,65 \pm 17,32$ ile $54,06 \pm 6,32$ arasındadır. Ayrıca 4,02 mg/L'lik konsantrasyon toksik etki göstermiş ve yeterli hücre sayısına ulaşamamıştır. Diğer konsantrasyonlarda her iki muamele süresinde de kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

4.2. Picloram

4.2.1. Büyüme azaltma testi

Picloram ve 2,4-D aynı oksin grubu içerisinde yer aldığından ve bitki doku kültüründe benzer oranlarda kullanılmalarından dolayı EC_{50} konsantrasyon belirlenmesi yapılamamıştır. 2,4-D ile aynı konsantrasyonlar seçilmiştir.

4.2.2. Mitotik indeks ve mitotik faz frekansları

Picloram'ın *A. cepa* kök uçlarına uygulanması sonucu belirlenen mitotik indeks değerleri 24 saatlik uygulamada $10,23 \pm 0,30$ ile $4,21 \pm 2,00$ arasında değişmektedir. Kontrol ile karşılaştırıldığında özellikle en yüksek dört konsantrasyonda (2,02; 2,68; 3,35; 4,02 mg/L) anlamlı düşüş vardır (Çizelge 4.4).

Mitotik indeks değerleri 48 saatlik uygulamada; $11,52 \pm 0,31$ - $7,98 \pm 0,27$ arasında değişmektedir. Mitotik indeks kontrole göre özellikle en yüksek dört konsantrasyon olan

2,01; 2,68; 3,35; 4,02 mg/L konsantrasyonlarda anlamlı ($p<0,001$) düzeyde düşmüştür (Şekil 4.3).

Çizelge 4.4. Picloram bitki büyüme düzenleyicisinin farklı konsantrasyonlarda *A. cepa* kök ucu hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik faz frekansları

Konsantrasyon (mg/L)	Mitotik fazlar				
	Mİ (%) \pm SH	Profaz (%)	Metafaz (%)	Anafaz (%)	Telofaz (%)
24 saat					
Kontrol	10,86 \pm 0,31	19,52	25,79	22,19	32,50
0,67	10,23 \pm 0,30	27,96	31,77	20,03	20,24
1,34	10,08 \pm 0,30	25,60	29,86	21,33	23,21
2,01	8,43 \pm 2,78***	27,52	34,16	17,80	20,52
2,68	7,26 \pm 2,59***	26,31	35,81	18,18	19,70
3,35	5,48 \pm 2,27***	27,74	27,00	28,65	16,61 ^a
4,02	4,21 \pm 2,00***	39,43 ^b	29,45	12,35	18,77
48 saat					
Kontrol	11,77 \pm 0,32	29,15	34,07	13,42	23,36
0,67	11,52 \pm 0,31	31,10	35,45	11,38	22,07
1,34	11,69 \pm 0,32	30,28	36,70	11,55	21,47
2,01	8,36 \pm 0,27***	32,17	33,25	16,75	17,83
2,68	8,15 \pm 0,27***	29,82	31,90	15,95	22,33
3,35	7,98 \pm 0,27***	32,96	29,70	16,67	20,67
4,02	8,79 \pm 0,28***	26,85	36,52	12,97	23,66

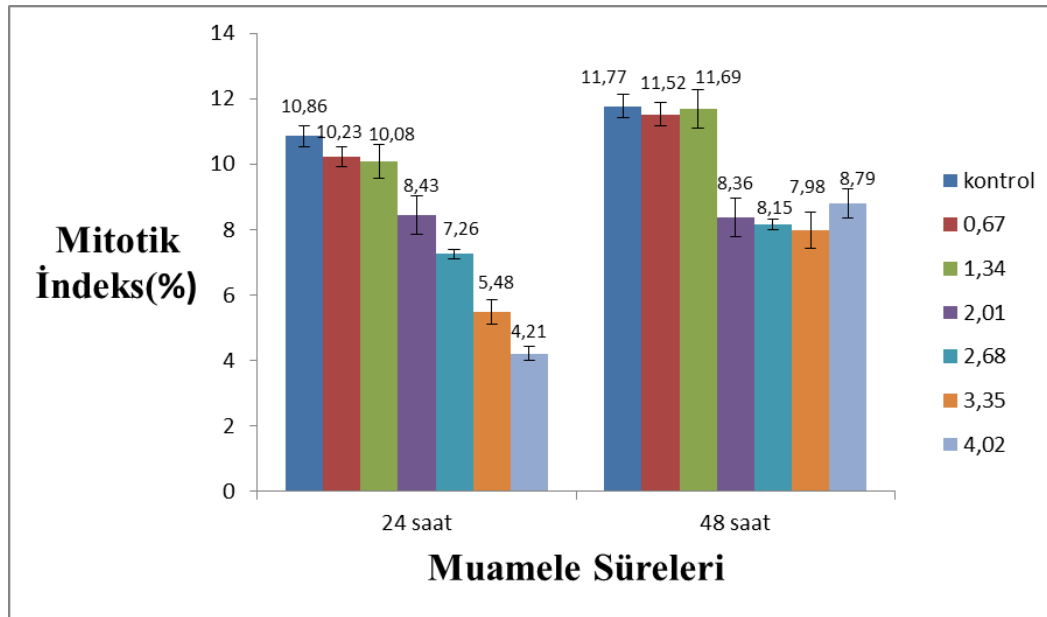
*Kontrolle göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı; (z-testi)

** Kontrolle göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı; (z-testi)

*** Kontrolle göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

a Kontrolle göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı; (χ^2 -testi)

b Kontrolle göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı; (χ^2 -testi)



Şekil 4.3. Picloram ile muamele edilen *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik indeksteki değişiklikler

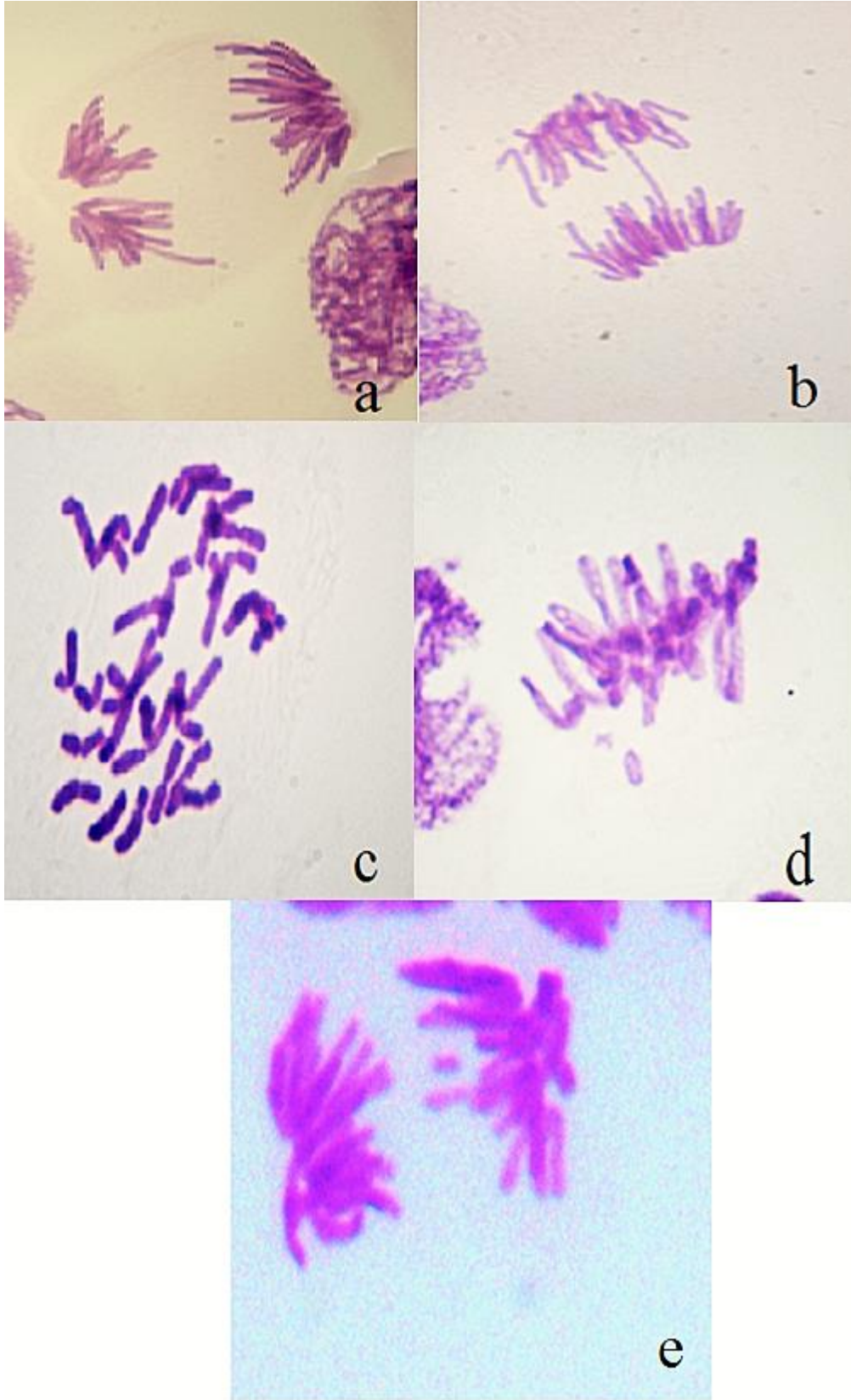
Picloram *A. cepa* kök ucu hücrelerinde 24 ve 48 saatlik uygulamalarda profaz frekansını kontrole göre arttırmıştır (48 saat 4,02 mg/L hariç). Ancak bu artış yalnızca 24 saatlik uygulamanın 4,02 mg/L'lik konsantrasyonda anlamlı düzeydedir. Metafaz ve anafaz frekanslarında ise kontrole göre düzensiz artış ve azalışlar gözlenmiştir. Telofaz frekansı ise tüm konsantrasyonlarda her iki uygulama süresinde de (48 saat 4,02 mg/L hariç) azalmıştır. Ancak bu azalma yalnızca 24 saatlik uygulamanın 3,35 mg/L konsantrasyonunda anlamlıdır.

4.2.3. Picloramın neden olduğu mitotik anormallik tipleri ve oranları

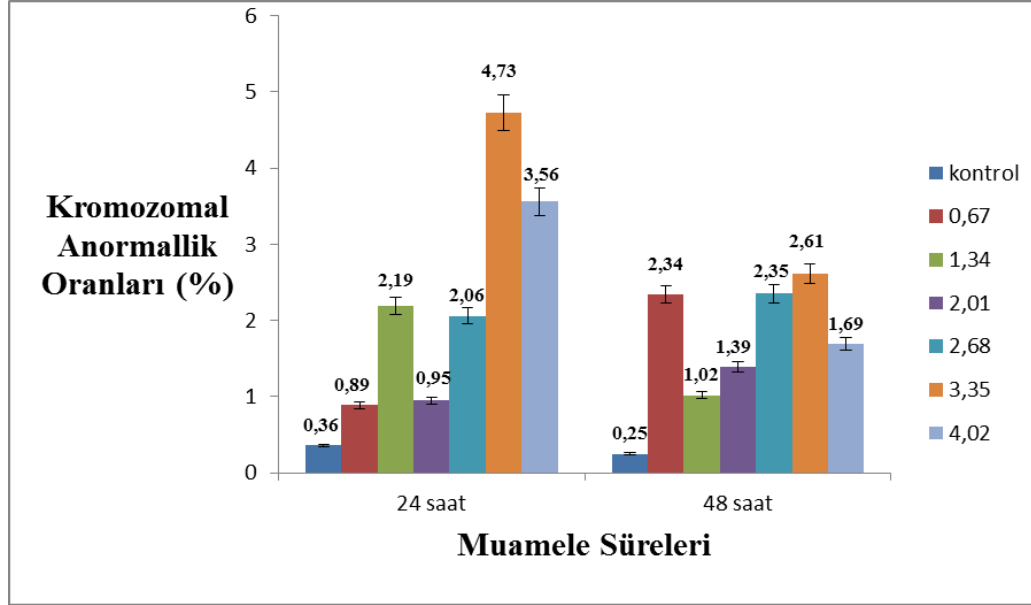
Picloramın uygulanan bütün konsantrasyonları her bir uygulama süresinde mitotik safhalarda çeşitli anormalliklere neden olmuştur (Çizelge 4.5, Şekil 4.4). Ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Gözlenen anormallikler c-mitoz, kalgın kromozom, poliploidi, köprü, fragment ve çok kutupluluktur (Resim 4.4)

Çizelge 4.5. Picloram bitki büyüme düzenleyicisi ile muamele edilen *A. cepa* kök ucu hücrelerindeki anormallik tipleri ve anormal hücre oranlarının kontrol ile karşılaştırılması

Konsantrasyon (mg/L)	Bölünen hücre sayısı	% Anormallik						Toplam Anormallik (%)
		C-mitoz	Kalgın kromozom	Poliploidi	Köprü	Fragment	Çok kutupluluk	
24 saat Kontrol	1086	-	-	-	0,18	-	0,18	0,36
0,67	1023	0,10	0,59	-	-	-	0,20	0,89
1,34	1008	0,10	0,10	-	0,69	1,00	0,30	2,19
2,01	843	-	-	-	0,13	0,35	0,47	0,95
2,68	726	0,14	-	-	1,10	0,27	0,55	2,06
3,35	548	0,73	-	-	2,37	0,36	1,27	4,73
4,02	421	0,95	0,71	-	1,43	-	0,47	3,56
48 saat Kontrol	1177	-	-	-	0,17	0,08	-	0,25
0,67	1151	0,52	0,08	-	,95	-	0,78	2,34
1,34	1169	-	-	-	0,94	-	0,08	1,02
2,01	836	0,59	-	0,11	0,47	0,11	0,11	1,39
2,68	815	1,10	0,25	-	0,50	-	0,50	2,35
3,35	798	0,75	0,25	0,12	0,75	0,12	0,62	2,61
4,02	879	0,91	0,11	0,11	0,22	-	0,34	1,69



Resim 4.4. Piclorom uygulaması sonucunda *Allium cepa* kök hücrelerinde görülen kromozomal anormallikler a) çok kutupluluk b) köprü c) poliploidi d) fragment e) kalgın kromozom ve fragmet



Şekil 4.4. Picloram ile muamele edilen *Allium cepa* kök uçlarında kromozomal anormallik oranları

C-mitoz 24 saatlik uygulamada kontrol grubu ve 2,01 mg/L'lik konsantrasyonunda, 48 saatlik uygulamada ise kontrol ve 1,34 mg/L'lik konsantrasyonunda belirlenmemiştir (Çizelge 4.5). C- mitoz en fazla 24 saatlik muamelede 4,02 mg/L'lik konsantrasyonda 0,95 olarak belirlenirken en düşük 0,67 mg/L'lik ve 1,34 mg/L'lik konsantrasyonlarda 0,10 olarak tespit edilmiştir. 48 saatlik muamelede 0,67 mg/L'lik konsantrasyonda en düşük 0,52 iken 4,02 mg/L'lik konsantrasyonda ise en yüksek 0,91 olarak gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Anafaz ve telofazda belirlenen kalgın kromozomlar tüm uygulama konsantrasyonları ve sürelerinde gözlenmemiştir. Kalgın kromozomlar en fazla 24 saatlik muamelede 4,02 mg/L'lik konsantrasyonunda, en az olarak da 48 saatlik uygulamanın 0,67 mg/L'lik konsantrasyonunda gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Poliploidi ise oldukça düşük frekanslarda olup sadece 48 saatlik uygulamada üç konsantrasyonda (2,01; 3,35; 4,02 mg/L) tespit edilmiştir.

Anafaz ve telofazda ortaya çıkan bir diğer anormallik olan köprü oluşumu tüm uygulama konsantrasyonları ve sürelerinde belirlenmiştir (24 saatlik uygulamanın 0,67 mg/L konsantrasyonu hariç). Köprüler en çok 24 saatlik uygulamada 3,35 mg/L'lik

konsantrasyonda gözlenirken (0,95), 24 saatlik uygulamada 2,01 mg/L'lik konsantrasyonda en az düzeyde (0,13) ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5).

Fragment 24 saatlik uygulamada 1,34; 2,01; 2,68 ve 3,35 mg/L'lik konsantrasyonlarda görülürken 48 saatlik uygulamada kontrol; 2,01; 3,35 mg/L'lik konsantrasyonlarda belirlenmiştir (Çizelge 4.5) .

Çok kutupluluk (Çizelge 4.5), uygulanan tüm konsantrasyonlar ve uygulama sürelerinde ortaya çıkmıştır. Çok kutupluluk frekansı, 48 saatlik uygulamanın 1,34 mg/L'lik konsantrasyonunda en düşük (0,08), 24 saatlik uygulamanın 3,35 mg/L'lik konsantrasyonunda en yüksek (1,27) değerdedir.

Total anormallik yüzdeleri 24 saatlik uygulamada 0,89 ile 4,73 arasında iken 48 saatlik uygulamada 1,02 ile 2,61 arasında değişmektedir (Çizelge 4.5).

İnterfaz safhasında hiçbir anormalliğe rastlanmamıştır.



5. TARTIŞMA

Hızla artan dünya nüfusunun 2025 yılı itibariyle 8 milyarı geçmesi beklenmektedir ve bu artışın % 95'inin gelişmekte olan ülkelerde görüleceği tahmin edilmektedir. 830 milyon insanın yeterli ve dengeli beslenememesi ve gelişmekte olan ülkelerde tarım arazilerinin yok edilmesi sonucu bazı sorunlar ortaya çıkmıştır. Farklı yöntemler kullanarak en küçük tarım alanından, en yüksek verim ve kaliteli ürünler elde etmek için mevcut doğal kaynaklardan maksimum düzeyde faydalanılmaya çalışılmıştır. Bu sebepten tarımsal alanlarda ürün veriminin artırılması ve ürünlerin ıslahı konusunda tarım kimyasalları, pestisitler, herbisitler ve BBD'ler günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Borlaug, 2003; Atsan ve Kaya, 2008; Karakuşlu, Demirtaş, Çavuşoğlu, Yapar, Yalçın ve Çavuşoğlu, 2015).

Tarım alanlarındaki verimi arttırmak için kullanılan çeşitli kimyasalların sağlık üzerine direkt etkilerinin bilinmemesine karşın toksik ya da mutajenik etkileri sonucunda çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı genotoksikite çalışmaları oldukça önem kazanmış ve bilinmeyen çevresel ajanların olası genotoksik ve biyolojik etkilerini değerlendirmek için 200'den fazla kısa zamanlı test yöntemi geliştirilmiştir (Kilbey, Legator, Nichols ve Ramel, 1984; Gopalan, 1999; Yücel, Hatipoğlu, Sözen, ve Güner, 2008; Sözen, Yılmaz, Çolak, ve Yücel, 2010).

Birçok kimyasalın genotoksik etkilerini saptayabilmek için *Arabidopsis thaliana*, *Vicia faba* ve *Allium cepa* model bitkileri araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta olup, bu bitkilerin kök meristem mitotik hücrelerinde çeşitli sitolojik kriterler değerlendirilebilmektedir (Ma, Grant ve Serres, 1997; Gopalan, 1999; Monarca, Feretti, Collivignarell, Guzella, Zebrini, Bertanza ve Pedrazzani, 2000; Yüzbaşıoğlu, Ünal, Sancak ve Kasap, 2003; Konuk, Liman ve Ciğerci, 2007; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2009; Olorunfemi, Ogieseri ve Akinboro, 2011). Yaygın olarak kullanılan *Allium* testi, kök meristem mitotik hücrelerindeki makroskobik (kök uzunluğu, şekli) ve mikroskobik (c-mitozis, kromozom kırılması ve yapışıklığı, anafaz-telofaz kromozom anomalileri ve mitotik indeks) parametrelerin araştırılmasının yanı sıra diğer test sistemleriyle yüksek kolerasyon göstermesi nedeniyle elverişli olan basit, hassas ve güvenilir test yöntemidir (Fiskeşjö, 1993; Kaymak, 1996; Patra, Sahoo ve Panda, 2005; Türkoğlu, 2007; Singh, 2015).

Yaygın olarak kullanılan çok sayıda bitki gelişim düzenleyicilerinin laboratuvar koşullarında yapılan çeşitli çalışmalarda canlıların enzim yapıları, enzim seviyeleri, bazı organları üzerinde çeşitli bozukluklara neden olduğu açıklanmıştır (Morsünbül ve diğerleri, 2010; Prodanchuk, Zhminko ve Zhminko, 2008; Xu ve Zhang, 2015). Bu çalışmada, sentetik oksinlerden olan ve bitki doku kültüründe önemli kullanım alanına sahip olan 2,4-D ve Picloram'ın bitki doku kültürü esnasında *Allium in vitro* testiyle genotoksik etkileri araştırılmıştır.

Allium cepa'nın kök ucu meristem hücrelerinin hücre döngüsünün 24 saat veya yaklaşık 20 saat olduğu bildirilmiştir (Grant, 1982; Rank ve Nielsen, 1994; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2003). Bu nedenle 2,4-D ve Picloram'ın genotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla *Allium cepa* kökleri 24 ve 48 saat sürelerle muamele edilmiştir. *Allium* testinde 24 ve 48 saatlik muamele süreleri kullanan birçok çalışma mevcuttur (Özakca ve Silah, 2013; Mohammed, Aarey, Tamkeen ve Jahan, 2015; Gindri, Coelho, Tedesco ve Athayde, 2015). Ayrıca 3, 6, 12 saat muamelelerin yapıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (Karagiannis ve Pappelis, 1993; Zabka, Winnicki, Polit ve Maszewski, 2015; Prajitha ve Thoppil, 2016).

Bitki gelişim düzenleyicilerinin uygulanacak konsantrasyonlarının belirlenmesinde öncelikle EC₅₀ konsantrasyonu tespit edilmeye çalışılmış ancak yeterli kök uzunluğu sağlanamadığı ve kök ucunda morfolojik bozukluklar oluşmasından dolayı EC₅₀ değeri belirlenememiştir. Bu nedenle uygulanacak konsantrasyonların belirlenmesinde literatürlerden yararlanılmıştır. Ateeq ve diğerleri (2002), *A. cepa*'nın köklerinde 2,4-D etkisini belirlemek amacıyla *ex vitro* koşullarda 1-100 ppm arasında 12 farklı konsantrasyonda 2,4-D uygulaması yapmışlardır. 1-4 ppm arasında 3-5 mm'lik kökler oluşurken daha yüksek konsantrasyonların kök oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. 4 ppm'den daha yüksek konsantrasyonlarda kök oluşmadığı için sadece 1, 2, 3 ve 4 ppm'de uzayan köklerin uçları alınmıştır. Bu çalışma bitki doku kültürü şartlarında değil suda çimlendirilen soğanlarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada en fazla kromozom anormallikleri 4 ppm de tespit edilmiştir. Bu bilgilere dayanarak bu tez çalışmasında her iki BBD'nin 0,67; 1,34; 2,01; 2,68; 3,35 ve 4,02 mg/L'lik konsantrasyonları kullanılmıştır.

2,4-D içeren besi ortamlarında genotoksik çalışmaya çok az rastlanırken, *Allium cepa*'nın rejenerasyonuna ait doku kültürü çalışmaları mevcuttur. Saker 1998'de, *A. cepa* tohumlarından somatik embriyo elde etmek için 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 mg/L 2,4-D

içeren MS ortamlarını kullanmıştır. En iyi sonuçları 3,5 mg/L 2,4-D içeren ortamdan elde etmiştir. Tiwari, Tripathi, Khare ve Rana, (2007) tarafından *Allium cepa*'da hücre süspansiyon kültürü vasıtasıyla yapılan somatik embriyo çalışmasında 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 ve 10 mg/L 2,4-D konsantrasyonları kullanılmıştır. 10 mg/L'de hücre ölümleri gerçekleşmiştir. Geriye kalan konsantrasyonlarda farklı oranda kallus oluşumu gözlenmiştir. Aksakal, Erturk, Sunar, Bozari ve Agar, (2013), mısır tohumlarını 7 gün süreyle 0,5; 1; 1,5; 2 ppm konsantrasyonlarda 2,4-D ile muamele etmişlerdir. Kök uçlarına RAPD analizi yaptıklarında 2,4-D'nin artan konsantrasyonu kök uzunluğuna olumsuz etki ederken, tohumda F artışa sebep olduğunu gözlemişlerdir. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde normal bantların kaybolduğu ve yeni bantların ortaya çıktığı belirlenmiştir. RAPD profiline göre, 2,4-D uygulaması genomik DNA'nın stabilitesinde mutasyona sebebiyet vermekte olduğu kalitatif olarak tespit edilmiştir. Bu değişimin 2,4-D konsantrasyonunun artmasıyla doğru orantılı olduğu sonucuna da ulaşılmıştır. Bununla birlikte 2,4-D doku kültüründeki en yaygın kullanım alanı somatik embriyogenesis oluşumu olduğu, somatik embriyo oluşumunun kullanılan eksplanta, genotipe ve 2,4-D konsantrasyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir.

Sitotoksisite, çeşitli makromoleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi sonucu hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında hasar meydana gelmesidir. Bir maddenin sitotoksisite seviyesi mitotik indeksteki artış ya da azalma ile tespit edilebilir. Mitotik indeks (Mİ), hücre bölünme sıklığını tahmin etmeye izin veren bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Freire, Peropadre, Rosal, Perez-Martín ve Hazen, 2015). Mitotik indeksin kontrol grubundan düşük olması test edilen bileşiğin, organizmanın büyümesi ve gelişmesi esnasındaki kimyasal işlemleri değiştirdiğini göstermektedir. Buna karşılık mitotik indeks değerinin yüksek olması ise hücre bölünmesinin hızlandığını, kontrolsüz çoğalmaya ve hatta tümör oluşumuna sebep olabileceğini göstermektedir (Hoshina, 2002; Leme ve Marin-Morales, 2009). Bu tez çalışmasında mitotik indekste, 2,4-D'nin 24 ve 48 saatlik uygulamasında hemen hemen tüm konsantrasyonlarda anlamlı değişimler gözlenmiştir. Özellikle düşük konsantrasyonlar mitotik indeksi artırmış, yüksek konsantrasyonlar ise azaltmıştır. Yüksek konsantrasyonların mitoz bölünmeyi baskılaması EC₅₀ konsantrasyonunun neden belirlenemediğini de açıklamaktadır. Picloram ise en yüksek dört konsantrasyonda hem 24 hem de 48 saatlik uygulamada mitotik indeksi düşürmüştür. Benzer şekilde, Kumar, Arya, Roy ve Singh, (2010), *Triticum aestivum L* bitkisine 2,4-D oksinin 50, 100, 200, 400, 800 ve 1200 ppm konsantrasyonlarını 72 saat

uygulamışlar ve konsantrasyon arttıkça mitotik indeksin azaldığını belirlemişlerdir. Kocaman ve Güven (2015) tarafından yapılan bir çalışmada sentetik oksin olan 1-Naphthaleneacetamide'in (NAAm) insan periferal lenfositlerinde mitotik indeksi sadece 48 saatlik muamelede, nükleer bölünme indeksini (NDI) ise hem 24 hem de 48 saatlik muamelelerde kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede düşürdüğünü saptamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada IAA ve NAA oksinlerinin *Vicia faba* bitkisine 6, 12 ve 24 saatlik muamelesinde konsantrasyon arttıkça mitotik indekste artışa neden olduğu gözlenmiştir (Kaifeng, Yan, Jianjun, Zhonglai, ve Chao, 2011). Truta, Zamfirache, Rosu, Olteanu, Mihai ve Gherghe, (2011) 2,4 D'nin sitogenetik etkilerini iki farklı bitkide incelemişlerdir. *Raphanus sativus* L. ve *Phaseolus vulgaris* L. tohumları 2,4 D'nin 1 mg/L ve 10 mg/L'lik konsantrasyonları ile 3 saat muamele edilmiş ve daha sonra petri kabında çimlendirilmiştir. *R. sativus*'da her iki konsantrasyon da mitotik indeksi düşürmüş, *P. vulgaris*'de ise 1 mg/L'lik konsantrasyon mitotik indeksi teşvik etmiş ancak 10 mg/L'lik konsantrasyon Mİ'yi inhibe etmiştir. Kumar ve Jagannath (2015), *Triticum aestivum* L. bitkisine uygulanan butachlor herbisitinin 24 saatlik muamele sürelerinde konsantrasyonun artmasıyla mitotik indeksi düşürdüğünü bildirmişlerdir. Mitotik indeksteki düşüş bitki büyüme düzenleyicilerinin mitoz bölünmeyi baskılamaları sonucu oluşmaktadır. Kimyasalların bu etkiyi sentez fazında, DNA sentezini engellemek suretiyle bölünme geçirecek hücre düzeyini azaltarak yaptıkları bildirilmiştir. DNA'da meydana gelen bir hasar DNA sentezini ve dolayısıyla RNA ve protein sentezini de inhibe edebilir. Mutajenitesi yüksek olan maddeye maruz kalan hücrelerde, DNA'da meydana gelen hasarın döngüdeki yerine göre, hücre döngüsü kontrol noktaları olan G1'den S fazına veya G2'den mitoz geçişi sırasında biyolojik hasar birikmesiyle mitotik indeksin düşmesine neden olabileceği açıklanmıştır (Franco, Santos, Silva, Arthur ve Silva, 2016; İlbaş, Gönen, Yılmaz ve Dadandi, 2012).

2,4-D ve Picloram'ın 24 ve 48 saatlik uygulamaları, profaz frekansını kontrol grubuna göre artmıştır. Ancak bu artış yalnızca Picloram'ın 24 saatlik uygulamasının en yüksek konsantrasyonunda anlamlıdır. Benzer şekilde; 2,4-D'nin *Vicia faba*'da 10 ve 20 ppm konsantrasyonlarının 3, 6 ve 12 saatlik muamele sürelerinde (Prasad ve Das, 1977) ve *Allium cepa*'da 25, 50, 75 ve 100 ppm konsantrasyonlarının 4 saatlik muamele süresinde (Kumari ve Vaidyanath, 1989) profaz oranının artırdığı tespit edilmiştir.

2,4-D metafaz ve anafaz oranlarını tüm muamelelerde (48 saat 0,67 mg/L'lik konsantrasyon hariç) kontrol grubuna göre azaltmıştır. Picloram ise metafaz ve anafaz oranlarını kontrole göre bazı konsantrasyonlarda artırırken bazılarında düşürmüştür. 2,4-D, 24 saatlik uygulamada telofaz frekansını tüm konsantrasyonda (3,35 ve 4,02 mg/L doz hariç) artmıştır. 48 saatlik uygulamada ise hücre frekansları farklı oranda azalıp artmıştır. Picloram ise telofaz frekansını tüm uygulama ve konsantrasyonlarda (48 saat 4,02 mg/L'lik konsantrasyon hariç) azaltmıştır. Ancak bu azalış yalnızca 24 saatlik uygulamanın 3,35 mg/L'lik konsantrasyonunda anlamlıdır. 2,4-D'nin safhalar üzerinde anlamlı düzeyde bir etkisi gözlenmezken Picloram'ın ise sınırlı etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Liman, Ciğerci, Akyıl, Eren ve Konuk, 2011), yaptıkları benzer bir çalışmada fenaminosulf, fungusit ve mikro-biyositinin genotoksik etkilerini incelemiştir. *Allium cepa*'da 24 saatlik muamele süresinde 12,5 ve 50 ppm'lik konsantrasyonların profaz frekansını arttırdığını, diğer sürelerde (24 ve 96 saat) ve tüm konsantrasyonlarda (12,5; 25 ve 50 ppm) metafaz, anafaz ve telofaz frekanslarını azalttığını bildirmişlerdir.

Truta ve diğerleri (2011), 2,4-D'nin fasulye kök meristemine uyguladıkları konsantrasyonlarda (1-10 mg/L) mitotik fazların frekanslarının azalan sıralamasını profaz > metafaz > anafaz > telofaz şeklinde bulmalarına rağmen, *R. sativus* köklerine yaptıkları 2,4-D uygulamasında profaz hücre frekansında azalma, metafaz ve anafaz frekanslarında artma bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında bulunan sonuçtan farklı olarak telofaz frekansında artma olduğunu saptamışlardır. Bunun kullanılan materyalin ve konsantrasyonların farklı olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

2,4-D ve Picloram'ın doku kültüründe *Allium cepa* kök uçlarına uygulanması kromozomal anormallik oranını artırmamıştır. Truta ve diğerleri (2011) tarafından yapılan bir çalışmada 2,4 D'nin ana-telofaz anormallik oranını etkilemediği ancak metafaz anormallik oranını artırdığı açıklanmıştır. Çabuk (2010), mısırla (*Zea mays* L.) yaptığı çalışmada, *in vitro* koşullarda, kallus kültürü aracılığı ile 6 farklı 2,4-D konsantrasyonunun (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/L), mısır çeşitlerinde kallus oluşumuna ve bitki rejenerasyonuna etkisini araştırmıştır. Aynı çalışmanın *in vivo* aşamasında ise, tüm mısır çeşitlerinin kalluslarından oluşan kök uçlarından örnekler alınmış, mısır hatlarının kromozom sayılarında gözlenen değişiklikler incelenmiştir. Kök uçlarının mikroskopik analizi sonucunda mısır çeşitlerinin kromozom sayılarında değişim gözlenmiştir. Bu değişimde mitotik anormalliğin aneuploidi

(genomdaki kromozomların sayısının değişmesi) olduğu ve kromozom sayısının azalması (hipoploidi) şeklinde meydana geldiği belirlenmiştir.

2,4-D ve Picloram'ın 24 ve 48 saatlik uygulamasının, *A. cepa* kök uçlarında C-mitoz, yapışıklık, kalgın kromozomlar, köprüler, fragmentler, çok kutupluluk ve poliploidi gibi anormalliklere neden olduğu gözlenmiştir. Kumar ve diğerleri (2010) yaptıkları çalışmada ekonomik açıdan önemli olan bitkilere 2,4-D'nin uygulanmasıyla hücrelerinde sitolojik hasarlar tespit etmiştir. 2,4-D muamelesinde oda sıcaklığında 72 saatlik uygulamada 50-1200 ppm konsantrasyonlarda *Triticum aestivum*'un mitotik kromozom morfolojisinde olumsuz etkileri olduğunu açıklamışlar ve on iki tane yapısal kromozomal anormallik bulmuşlardır. Bu anormallikler; yapışıklık, c-mitoz, multipolarlık, fragment, köprü, kalgın kromozom, kromozomların eşitsiz dağılımı, daralmış kromozomlar, yönlendirilmemiş kromozomlar, yıldız şeklinde kromozomlar, hücre boyut artışı ve hücre plakası oluşumu yetmezliğidir. Yapılan başka bir çalışmada buğdaya uygulanan butachlor herbisitinin artan konsantrasyonlarda (0,15; 0,25; 0,5; 0,75 ve 1,0 ppm) kromozomal anormalileri artırdığı ispatlanmıştır. Bu anomaliler yapışkan kromatin, kromozom köprüsü, nükleer lezyon, dağınık kromozom, parçalanmış metafaz ve anafaz, çok kutuplu kromozom ve mikroçekirdektir. Butachlor herbisitinin buğday somatik hücrelerinde mitoz bölünme üzerine olumsuz etkileri olduğunu belirtmişlerdir (Kumar ve Jagannath, 2015). Etken maddesi 2,4 D olan avenoxan herbisiti % 0,1; 0,2 ve 0,4 konsantrasyonlarda 3, 6 ve 12 saat süreler ile *A. cepa* ve *A. sativum* kök uçlarına uygulanmıştır. Avenoxan, C-mitoza, kromozom yapışıklığına, köprüye, geri kalmış kromozomlara ve multipolarlığa neden olmuştur. Mitotik indeks üzerine inhibe edici etkisi ise konsantrasyona bağlı olarak ortaya çıkmıştır (Gül, Kaymak ve Muranli, 2006).

Bu tez çalışmasında her iki oksinin de neden olduğu mitotik anormallilerden biri C-mitozdur. Metafazda kromozomların kısalıp kalınlaşması ve düzensiz dağılmış olarak bulunmasına C-mitoz denir. C-mitoz kromozomlarının dağınık şekilde elde edilmesi, mitotik iğ inaktivasyonu sonucu olabilir (Levan, 1938). Buna bağlı olarak da iğ ipliklerinin çekilmesi gecikmekte ve kromozomlar replike olmuş fakat birbirlerinden ayrılmamış olarak hücre içinde dağınık durumda kalmaktadırlar. Metafazdaki bu tip bir anormallik mitotik indeksin de azalmasına neden olabilir (Fındıklı ve Türkoğlu, 2010).

Geri kalmış kromozomlar, iğ ipliklerinin temel olarak kimyasallardan etkilenmesiyle tamamen bozulmasından ve kromozomların kutuplara çekilememesinden kaynaklanır (Tartar, 2006; Pulate ve Tarar, 2014). Ateeq ve diğerleri (2002), pentachlorophenol, 2,4-D ve butachlor pestisitlerinin *Allium cepa* kök ucu hücrelerine uygulanmasıyla yüksek oranda kalgın kromozom tespit etmişlerdir. Başka çalışmalarda, triazine (Badr ve İbrahim, 1987), maleic hidrazide (Rank ve Nielsen, 1997) ve quizalofop-P-ethyl (Arıkan, 2006) herbisitlerinin, kadmiyumun (Zhang ve Yang, 1994), cypermethrin ve fenvalerate insektisitlerinin (Chauhan, Saxena ve Gupta, 1999) geri kalmış kromozomların sayısını önemli düzeyde arttırdığını rapor etmişlerdir.

2,4-D'nin *Allium cepa* kromozomlarında meydana getirdiği diğer bir anormallik de yapışıklıktır. Mikroskopik incelemeler sonunda gözlenen kromozom yapışıklıkları kromozomların nükleik asitleri üzerine bu kimyasal maddelerin sitotoksik etkilerini göstermektedir. Yapışıklık DNA' daki fosfat grupları ile komplekslerin üzerine veya DNA, protein veya her ikisinin fiziko-kimyasal özellikleri üzerine kimyasal maddelerin etkisi olarak kabul edilebilir. Yapışık kromozom varlığı telofaz ve anafaz sırasında kromozomların anormal bir şekilde çekilememesi şeklinde oluşabilir. Kromozomun yapışıklık özelliği 2,4-D'nin muamelesinden sonra kromozomların hareketini geciktirmek şeklinde olabilir. Böylece kromozomlar kutuplara çekilemez ve sitoplazmada kalır ve bunun sonucunda yoğunlaşmış ve yapışmış şekilde görünür. Metafazdaki kromozom yapışıklıkları, kromozomların anafaz safhasına normal olarak girmesini engeller. Yapışık kromozomlar, BBD'lerin toksik etkilerini yansıtmakta ve genellikle geri dönüşümsüz olup, hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Farklı çalışmalarda da 2,4-D' nin *Allium cepa*'ya uygulanmasıyla yapışıklık saptanmıştır (Croker, 1953). Fındıklı ve Türkoğlu (2010), yaptıkları çalışmada Glyphos ve DDVP' nin *Allium cepa*'da belirli konsantrasyonlarda 24 saatlik muamele süresinde yapışık kromozomlara rastlamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada ise atrazine, avenoxan, diuron ve quizalofop-P-ethyl' in *A. cepa* 'nın kök uçlarına uygulanan 0,1; 0,5; 0,75 ve 1,0 ppm'lik konsantrasyonlarında 3 saatlik muameleden sonra yapışıklığa rastlamışlardır (Sharma ve Vig, 2012).

2,4-D ve Picloram'ın *Allium cepa* kök uçlarına uygulanmalarıyla her bir doz ve uygulama süresinde anafaz ve telofaz safhalarında köprü oluşumu gözlenmiştir. Kromozom köprüleri genellikle metafazda kromozomların yapışması veya kullanılan kimyasal maddelerin klastojenik etkisi sonucunda kromozomların kırıldıktan sonra yeniden birleşmesi sonucu

meydana gelmesidir (Tomkins ve Grant, 1976). Kromozom segmentlerinin düzensiz translokasyon veya inversiyonları da kromozom köprülerine neden olabilir. Klastojenik veya toksik etkiler sonucu oluşan kromozom köprüleri genellikle geri dönüşümsüzdür. Köprü oluşumu, yapışıklık ve disentrik kromozomlardan kaynaklanmaktadır. Kromozom köprüleri esas olarak, anafazda kromozom veya kromatidlerin yapışmasından kaynaklanmaktadır. Kromozomların yapışması kromatidlerin birbirlerinden ayrılmasını engellemekte ve köprülerle birbirlerine bağlı kalmalarına neden olmaktadır (Fiskesjö 1985; Barbério ve diğerleri, 2011). Kumar ve diğerleri (2010), üç buğday (*Triticum aestivum* L.) varyetesi (HUW 234, HUW 468 ve HUW 533) üzerine 2,4-Diklorofenoksi asetik asit ve izoproturon herbisitinin etkisini araştırmışlardır. Söz konusu kimyasalların kromozomlarda yapışma ve köprü gibi kromozomal bozulmalara yol açtığını bulmuşlardır. Başka bir çalışmada ise birçok tıbbi kimyasal ve herbisitlerin etken maddesi olan piridin *A. cepa*'da farklı konsantrasyonlarda (125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm) 72 saat süreyle muamelesinde kromozom köprüleri gözlenmiş ve sitotoksik olduğu rapor edilmiştir (Gökbayrak ve Sivas, 2011). Piridin sınıfından olan Picloram herbisitinin ise bu tez çalışmasında toksik olmadığı bulunmuştur. Bu farklılığın çalışmada kullanılan konsantrasyonların bu tez çalışmasındaki konsantrasyonlardan yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Fragmentlerin kromozom ve kromatidlerde meydana gelen kısmi ya da tamamen kırılmalarından meydana geldiği (Prakash, Lakshmi ve Harini, 1988; Yi ve Meng, 2003; Hemanth Kumar ve Jagannat, 2015) ve olası mutajenitenin bir sonucu olabileceği bildirilmiştir. 2,4-D ve Picloram fragment oluşumuna sebep olmuştur. Ateeq ve diğerleri (2002), 2,4-D'nin de aralarında bulunduğu bazı çevresel kirleticilerin *Allium cepa* kök meristemi mitoz hücrelerindeki sitogenetik etkilerini kromozom aberasyon (KA) testiyle çalışmışlardır. 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarının *Allium*'da morfolojik değişimi teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada test edilen tüm 2,4-D konsantrasyonlarında (1-4 ppm) kromozom kırıklarına rastlanmıştır. Srivastava ve Mishra (2009) atrazine herbisitinin sitogenetik etkilerini *Allium cepa* (15, 30 ve 60 mg/L) ve *Vicia faba*'da (17,5; 35 ve 70 mg/L) 4 ve 24 saat muamele sürelerinde incelemiş ve konsantrasyon arttıkça fragmentlerinde arttığını saptamışlardır.

Multipolarlık sentriolün birden fazla bölünmesi sonucu ikiden daha fazla kutbun oluşmasıyla ya da anafazdaki başarısız ayrılma veya eşit olmayan translokasyon sonucu

oluşabileceği gibi, geri kalmış kromozomların kutuplara çekilememesinden de kaynaklandığı açıklanmıştır (Jain ve Sarbhoy, 1987; Pandey, Kumar ve Roy, 2014). 2,4-D ve Picloram'ın 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde farklı frekanslarında multipolarlığa rastlanmıştır. Yapılan bir çalışmada Dichlorvos'un (DDVP) *Allium cepa* L. kök ucu meristem hücrelerine 12, 24 ve 48 saatlik 2, 4 ve 6 mL/L konsantrasyonlarının muameleleri sonucunda en çok multipolarlık ve fragment oluşumuna rastlanmıştır (Fındıklı ve Türkoğlu, 2010). Leme ve Marin-Morales (2009), kromozom köprülerini ve kırıklarını bir klastojenik etki göstergeleri olduğunu, kromozom kayıpları, gecikme, yapışıklık, çok kutupluluğun ve C-metafazın anöjenik etkilerinin sonucunda oluştuğunu rapor etmişlerdir. Zeljezic ve Garaj-Vrhovac (2004), 2,4-D'nin kromatid ve kromozom kırıklarını, mikronukleus ve nükleer tomurcukların sayısını arttırdığını belirtmişlerdir. 2,4-D kaynaklı kromozomal hasar mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. 2,4-D *Arabidopsis*, *Raphanus sativus* L. ve *Phaseolus vulgaris* L.'nin homolog rekombinasyon frekansını etkilemiştir (Truta ve diğerleri, 2011; Filkowski ve diğerleri, 2003). Mohammed ve Ma tarafından yapılan bir çalışmada (1999), *Tradescantia* bitkisine 5-10 ppm konsantrasyonlarında Picloram'ın 6 saat muamelesiyle *Trad*-SHM testinde kromozom aberasyonlarına rastlanmıştır. Ayrıca mitoz geçiren *Vicia* hücrelerinde Picloram'ın yüksek konsantrasyonlarda nekrozu indüklediği saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında bulunan C-mitoz, yapışıklık, köprüler ve diğer düzensizlikler Ateeq ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla uyum içerisindedir. Ateeq ve diğerleri (2002), yaptıkları çalışmada 2,4-D'nin yüksek dozlarda morfolojik bozukluklara neden olduğu bulunmuştur. 2,4-D'nin 5-20 ppm (5-20mg/L) konsantrasyonlarında dantel tığı, c-tümörler ve bozuk kökler gibi bazı değişiklikler gözlemlenirken, kromozom aberasyonlarını istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır. Mohandas ve Grant'ın (1972), yaptığı çalışmada 2,4-D'nin *Allium cepa*, *Triticum aestivum*, *T. dicoccum*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale* üzerinde sitolojik etkileri araştırılmış ve kök ucu hücrelerindeki indüklenmiş kromozom köprüleri, fragmentler, kalgın kromozomlar gibi sitolojik anormalliklere rastlamışlardır. Ayrıca 2,4-D'nin kromozom yoğunlaşmasını ve C- mitozu indüklediğini bulmuşlardır.

Bu tez çalışmasında 2,4-D'nin hiç bir süre ve konsantrasyonlarında poliploidiye rastlanmazken picloramın 48 saatlik 2,01; 3,35 ve 4,02 mg/L konsantrasyonlarında poliploidi görülmüştür.

Yapılan literatür taramasında bitkilerde picloramın kromozomal anormallikler üzerine etkisine dair çok fazla çalışmaya rastlanmazken, fare ve mayada picloramın kanserojenik etkisi olup olmadığına dair yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda da yüksek ve geniş doz aralığında (1,000 ile 2,000 mg/kg/gün) 13 hafta ve (30- 1,000 mg/kg/gün) 32 gün süresince farelerin klinik ve kan değerlerinde herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır (Anonymous, 1984). Yine 1,000 mg/kg doz picloram ile beslenen hamile farelerde yapılan çalışmada herhangi bir teratojenik etkiye rastlanmamıştır (Anonymous,1992). Walker ve Larwance (1992), günde 150 mg/kg veya 250 mg/kg ortalama dozlarla beslenen farelerle 80 hafta süreyle yaptıkları çalışmada herhangi bir kanserojen etki gözlememişlerdir. Picloramın erkek farelere 131, 261 ve 522 mg/kg dozda ve dişi farelere 230, 460 ve 920 mg/kg dozlarda uygulanmasıyla Medulla polikromatik eritrositlerinde mikronükleus testinde negatif sonuç elde edilmiş ve genotoksik olmadığı açıklanmıştır. Diğer bir çalışmada 326, 653 ve 1305 mg/kg dozlarında muamele edilmesiyle testis spermatositlerinde kromozom anormalliklere neden olmadığı belirlenmiştir. TA97, TA98, TA100 ve TA102 suşlarına sırasıyla 5, 50, 500, 1 000 ile 5 000 mg/L dozlarında (S9 testi olan veya olmayan) uygulanmasıyla Ames testinde de negatif sonuç tespit edilmiştir. Farklı test sistemlerinin (Ames testi, MN, kromozomal anormallik) de kullanılmasıyla picloramın mutajenik olmadığı ileri sürülmüştür (Yun ve diğerleri, 2005). *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan gen mutasyon testinde picloramın uygulamasıyla herhangi bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır (Anonymous, 1983). Bu sonuçlar bu tez çalışmasının sonuçlarını destekler niteliktedir.

Çalışmada kullanılan diğer bir genotoksisite testi bitkilerde son yıllarda yaygın şekilde kullanılan comet testidir. Bu test hızlı, güvenilir, sonucunun kısa zamanda alınması ayrıca DNA'da hasar olup olmadığının, varsa hasar seviyelerinin anlaşılması için kullanılan basit ve kapsamlı bir test yöntemidir. 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını içeren muamelelerde 24 saat ve 48 saatlik uygulamalarda DNA hasarı kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek olmadığı tespit edilmiştir. Türkoğlu (2012), klorfenvinfos ve fenbukonazol kimyasallarının genotoksik etkilerini *A. cepa* kromozomlarında comet testiyle incelemiştir. Araştırmacı bu maddelerin 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 ppm konsantrasyonlarını 24 ve 48 saatlik süre ile uygulamıştır. Bu maddelerin tek zincir kırıklarında artış oluşturduğunu ve bu artışın kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olduğunu tespit etmiştir. Klorfenvinfos ve fenbukonazol'un tüm konsantrasyon ve muamele sürelerinin kontrole kıyasla anormal hücre frekansını önemli ölçüde arttırdığını bildirmiştir. Yapılan

başka bir çalışmada kadmiyumun genotoksik etkilerini 10, 20 ve 40 mL'lik konsantrasyonlarını 24 saat süreyle *A. cepa* kök ucuna maruz bırakmışlar ve comet testi uygulanmıştır. Kadmiyumun DNA'ya hasar verdiğini ve sitotoksik olduğunu bulmuşlardır (Setha, Misraa, Chauhanb ve Singh, 2008). Yapılan bu testlerle kromozomal anormallik sonuçlarının ve comet testi sonuçlarının paralellik gösterdiği doğrulanmıştır. Liman ve diğerleri (2011), fenaminosulf'un, *Allium cepa* kök uçlarına 24 saat ve 96 saat süreyle 25 ve 50 ppm konsantrasyonlarında uygulamışlar ve comet testi ile incelemişlerdir. 24 saatlik uygulamanın 25 ppm ve 96 saatlik uygulamanın 50 ppm konsantrasyonlarında DNA hasarında önemli bir artış kaydetmişlerdir. Syberg ve diğerleri (2015), yaptıkları bir çalışmada 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), akrilamid (AA) ve maleik hidrazid (MH) kimyasalları sırasıyla 0-1,4; 0-20 ve 0-37,7 mM konsatrayonlarında (tek başına ve karışım halinde) *in vitro* Caco-2 hücre hattında (insan kolon adenokarsinomu) genotoksisiteleri araştırılmıştır. Caco-2 hücre hattında comet testiyle bulunan sonuçlarda karışımın sinerjik etki yaratarak genotoksik olduğu bulunurken, tek tek yapılan comet testiyle genotoksisite sıralaması 2,4-D > AA > MH şeklinde bulunmuştur.

Phaseolus vulgaris L. kökleri 0,1; 0,2 ve 0,3 ppm konsantrasyonlarında 96 saat süreyle 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 3,6-Dikloro-2-methoxybenzoicacid (Dikamba) ile muamele edilmiştir. 2,4-D ve Dikamba'nın artan konsantrasyonlarda kök büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu sonuç yaptığımız çalışmanın sonucuyla benzerlik göstermektedir. Dikamba'nın yüksek konsantrasyonlarda (0,2 ve 0,3 ppm) çözünür protein içeriğini, pozitif kontrole göre önemli ölçüde azalttığı tespit edilirken, 2,4-D'nin ise çözünür protein içeriğinin yalnızca 0,3 ppm'de önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Comet testinde, DNA fragmantasyonunu doza bağımlı bir şekilde artırmıştır. 2,4-D ve Dicamba'nın RAPD analizinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında normal bantların kaybolduğu ve yeni bantların ortaya çıktığı belirlenmiştir. 2,4-D ve Dicamba'nın comet ve RAPD analizleri ile tespit edilen DNA hasarındaki sonuçları benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Cenkci, Yıldız, Cigerci, Bozdog, Terzi ve Arıkan-Terzi, 2010).

Yapılan başka bir çalışmada, 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve ticari olarak kullanılan 2,4-D dimetilamin tuzunun (2,4-D DMA), CHO hücrelerinde kardeş kromadit değişim (KKD) ve comet testleriyle genotoksisiteleri değerlendirilmiştir. CHO hücreleri 2,0-10,0 µg/mL konsantrasyonlarda 24 ve 36 saat süreyle 2,4-D ve 2,4-D DMA ile muamele edilmiştir. Doza bağlı olarak kardeş kromadit değişiminde önemli artışlara neden

olduğu bulunurken, her iki bileşiğin daha yüksek dozlarda mitotik indeksi düşürdüğü belirlenmiştir. Comet testinde ise CHO hücreleri 2,0-10,0 µg/mL konsantrasyonları ile 90 dakika ve 36 saat süreyle 2,4-D ve 2,4-D DMA ile muamele edilmiştir. Analiz sonucunda DNA fragmantasyonunun dozlara bağlı olarak arttığı saptanmıştır (Gonza'lez, Soloneski, Reigosa ve Larramendy, 2005).

2,4-D bitkilerde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda kromozomlarda mitotik ve mayotik anormalliklere sebep olabilmektedir (Khalatkar ve Bhargava, 1982). 2,4-D'li bileşikler bitkilerde floem taşınımı absorpsiyon ve fotosentez gibi birçok bitki fonksiyonunda bozukluğa neden olmaktadır (Kaynak ve Memiş, 1997). Tarladaki alışmalarında 2,4-D bileşiklerin kanserojenik etkisinden dolayı son yıllarda domates ve patlıcanda kullanımı yasaklanmıştır. 2,4-D yüksek dozda kullanıldığında meyve çeşitlerinde koflaşma, lobların irileşmesi ve içi boş bir yapının oluşması bazı çeşitlerde ise iek burnu veya sap çukurunda meme oluşumu ve şekil bozuklukları ortaya çıkmakta, meyve etinde kabalaşmalar görülmektedir (Kumulay ve Eryiğit, 2011).

Sonuç olarak, 2,4-D doku kültüründe uygulanan konsantrasyonlardan yalnızca yüksek olanlarda ve uzun süre uygulanmasıyla mitodepresif etki sergilenmiştir. Hiç bir konsantrasyonu toplam mitotik anormallik oranını ve mitotik safhaların frekansını etkilememiştir. Comet testinde de yalnızca en yüksek konsantrasyon toksik etki göstermiş olup diğer konsantrasyonlar anlamlı düzeyde DNA hasarı oluşturmamıştır. Benzer şekilde Picloram'ın da yüksek konsantrasyonları mitodepresif etki göstermiş ancak hiçbir konsantrasyonu mitotik anormallik oranını arttırmamıştır. Mitotik safhaların frekanslarında ise nadiren etkili olmuştur. Tüm verilerin işığında 2,4-D ve Picloram'ın özellikle düşük konsantrasyonlarının doku kültüründe genotoksik risk oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tarım arazilerinden en yüksek verimi elde etmek için çeşitli gübreleme, sulama ve toprak işleme gibi birçok yola başvurulmuş ancak bunlardan yeterli sonuç alınmadığından hormonların ve çeşitli tarım kimyasallarının kullanılmasına başvurulmuştur. İlerleyen zamanlarda tarım arazilerinin yok edilmesi sonucunda topraksız tarımın yapılacağı öngörülmektedir. Topraksız tarımda ise bitki gelişim düzenleyicileri kullanılmaktadır. Uygulanabilecek farklı üretim metodlarından biri de doku kültürü teknikleridir. Bitki doku kültüründe genellikle sentetik hormon olan bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmaktadır. Bu nedenle BBD'ler her geçen gün önem kazanmaktadır.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin bilinçsizce kullanılması hem verim ve kaliteyi olumsuz etkilerken hem de insan ve çevre sağlığını da tehdit etmektedir. Gıda ve tarım bakanlığı bu bileşiklerin hangi konsantrasyonlarda kullanılması gerektiğini yönetmelik ve tüzüklerle belirtmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın raporları incelendiğinde, günümüzde kullanılan büyüme düzenleyici maddelerin tarım ürünlerinde kalıntı riskinin oluşturmadığı, insan ve çevreye toksik etkilerinin çok düşük seviyelerde olduğu görülmektedir.

Türkiye'de 1987 yılından itibaren BBD'ler pestisit ve benzeri maddeler içine dahil edilmiş ve tarım ilaçları gibi ruhsatlandırılmaya başlanmıştır. Bu maddeler halen yürürlükte bulunan "Zirai Mücadelede Kullanılan Pestisit ve Benzeri Maddelerin Ruhsatlandırılması Hakkında Yönetmelik" esasları çerçevesinde işlem görmektedir. Bu yönetmelik gereği bir BBD ruhsatlandırılırken, pestisitler için istenen tüm bilgi ve belgeler (kimyasal ve fiziksel özellikleri, biyolojik bilgileri, toksikolojik ve eko-toksikolojik çalışma sonuçları, kalıntı çalışmaları vb.) BBD'ler için de istenmektedir. Bu bilgi ve belgeler bakanlıkta merkez ilaç komisyonunda incelenmekte ve uygun bulunan BBD'lere ruhsat verilmektedir. Ruhsat aldıktan sonra, firması tarafından pazara sunulan BBD'ler, imalattan üreticiye kadar geçen değişik safhalarda da kaliteleri, etiket bilgileri, miktarları vb. yönünden, diğer pestisitler gibi Bakanlık Kuruluşları tarafından kontrole tabi tutulmaktadır. Bundan dolayı da ruhsatlı bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmalıdır.

Sentetik bitki hormonları tarımda gelişigüzel kullanılmamalı, uygun konsantrasyonun seçilmesine dikkate edilmelidir. Böylece kullanılan miktar çok düşük düzeylerde

tutulduğunda ürünün hasat zamanına kadar olan sürede bitki içerisinde parçalanmakta ve zararsız seviyeye inebilmektedir. Uygulamada yeterli madde miktarı aşılmadığı zaman bitki hormonlarının insan sağlığı ve çevreye zararı olmayacaktır. Gereksinim duyulan miktardan daha fazla kullanılan sentetik hormonlar istenilen amaca hizmet etmeyeceği gibi, bitkiye yarar yerine zarar vereceği bilinmelidir.

Bu çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerinin düşük konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermemelerine karşın yüksek konsantrasyonda genotoksisiteye neden olduğu bulunmuştur. Bu hormonlar, genellikle düşük konsantrasyonlarda uygulandıkları zaman yüksek verim alınabilen maddelerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 2,4-D ve Picloram'ın doku kültürü uygulamalarında 2,01 mg/L ve daha düşük konsantrasyonlarının kullanılmasının uygun olabileceği belirlenmiştir. İnsan sağlığı açısından, kimyasal bileşiklerin mutajenik özelliklerinin belirlenmesinde, tek bir test sistemi yerine, birkaç kısa zamanlı test sisteminin bir kombinasyonunun kullanılması sonuçları daha güvenilir hale getirmektedir. Bu nedenle 2,4-D ve Picloram'ın doku kültürü uygulamalarında kullanılan miktarlarının mutajen olup olmadığını belirtebilmek için farklı test sistemleriyle değerlendirilerek sonuçların karşılaştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acemi, A. (2011). *Farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinin Amsonia orientalis decne. (apocynaceae)'in doku kültürü ile çoğaltılmasına olan etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 1-107.
- Ahloewalia, B.S., Prakash, J., Savangikar, V.A. and Savangikar, C. (2004). "Plant Tissue Culture". *Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries, Proceedings of Technical Meeting*, 26-30, 3-11.
- Aksakal, O., Erturk, F.A., Sunar, S., Bozari, S. ve Agar, G. (2013). Assesment of genotoxic effect of 2,4-diklorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis. *Industrial Crops Products*, 42, 552-557.
- Aksoy, U. ve Yaşar, E. (1994). Sürdürülebilir tarım. Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi. *Teknik Bülten*, İzmir, 23.
- Aksu, M. ve Şahin-Çevik, M. (2015). Moleküler markörlerin meyve ıslahında kullanım alanları. Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, *Meyve Bilimi*, 2(1), 49-59.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety*, 463(2), 111-72.
- Alexander, B.H., Mandel, J.S., Baker, B.A., Burns, C.J., Bartels, M.J., Acquavella, J.F. and Gustin, C. (2007). Biomonitoring of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid exposure and dose in farm families. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 370-376.
- Alremi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S. ve Ellialtıoğlu, Ş. (2014). Biber (*Capsicum annum* L.)'de genotip ve besin ortamının anter kültürüne etkileri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(2), 108-116.
- Anonymous. Forest Service (1984). *Pesticide background statements, herbicides. United States Department of Agriculture*, Washington: Agriculture Handbook, 633(I).
- Anonymous. National Library of Medicine. (1992). Hazardous substances databank. Toxnet, Medlars Management Section, Bethesda, MD anthraquinones. *Mutagenesis*, 18, 25-36.
- Anonymous. National Research Council (1983). *Drinking water and health, volume 5. board on toxicology and environmental health hazards, commission on life sciences, safe drinking water committee*, Washington: National Academy Press, DC.
- Arıkan, E.S. (2006). *Quizalofop-P-Ethyl herbisitinin Allium cepa kök meristem hücreleri üzerine sitogenetik etkileri*, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 1- 67.
- Arora, R. (2010). Medicinal plant biotechnology. *USA: The Centre for Agriculture and Bioscience International*, 94-95.

- Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N. and Ahmad, W. (2002). Clastogeneticity of pentachloropol 2,4-D and Butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*, 514(1-2), 105-113.
- Atlı-Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *Tünav Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Atsan, T. ve Kaya, T.E. (2008). Genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) tarım ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(2), 1-6.
- Avalos, A., Haza, A.I., Drosopoulou, E., Mavragani-Tsipidou, P. and Morales, P. (2015). *In vivo* genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila*. *Food and Chemical Toxicology*, 85, 114–119.
- Awad, T.M. ve Taha, F.A. (1976) . The effect of some plant growth inhibitorson the developmental stages of *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep.: Noctuidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 80(3), 306-310.
- Babaoğlu, M ., Gürel, E. ve Özcan, E. (2002). *Bitki biyoteknolojisi 1. Doku kültürü ve uygulamaları*. Konya: Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, E. (2001). *Bitki biyoteknolojisi - doku kültürü ve uygulamaları I*. Konya: Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 8-70.
- Badr, A. ve İbrahim, A.G. (1987). Effect of herbicide Glean on mitosis, chromosomes and nucleic acids in *Alium cepa* and *Vicia faba* root meristems. *Cytologia*, 52, 293-302.
- Barbério, A., Voltolini, J.C. and Mello, M.L.S. (2011). Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology*, 20, 927–935.
- Başpınar, H., Durmuşoğlu, E. ve Yıldırım, E.M. (2010). *Türkiye’de Tarım İlaçları Üretim ve Kullanımı, Ziraat Mühendisliği VII.*, Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı -2,1047-1054. Sözlü sunum.
- Bayram, E.S. ve Elmacı, Ö.L. (2014). Ege Bölgesi Tie İlçesi Mısır Plantasyonlarının Beslenme Durumlarının İncelenmesi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(2), 26-32.
- Bianchi, J., Mantovani, M.S. and Morales, M.A.M. (2015). Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. *Journal of Environmental Sciences*, 36, 102-111.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, L., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., CebulskaWasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H. and Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28, 625–631.

- Borlaug, N. (2003). Towards a Hunger-free World: The Final Milestone *UNESCO Chair in Ecotechnologies*, 36.
- Bozdoğan, Ş.G., İşlek, C., Kara, R. ve Ezer, T. (2013). Briyofitlerde doku kültürü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 124-130.
- Bukowska, A.B., Reszka, E. and Duda, W. (1998). Influence of phenoxyherbicides and their metabolites on the form of oxy and deoxyhemoglobin of vertebrates. *Biochemistry Molecular Biology Internatinal*, 45(1), 47, 59.
- Bukowska, B. (2006). Toxicity of 2,4 - Dichlorophenoxy acetic acid - molecular mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(3), 365-374.
- Bulak, P., Walkiewicz, A. and Brzezińska, M. (2014). Plant growth regulators - assisted phytoextraction. *Biologia Plantarum*, 58(1), 1-8.
- Buschini, A., Poli, P. and Rossi, C. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis*, 18(1), 25-36.
- Campbell, N.A. and Reece, J. B. (2010). *Biyoloji* (Altıncı Baskı), Ankara: Palme Yayıncılık, 806.
- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindi, P.A. and Minkler, J.L. (1978). Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271(5645), 551-553.
- Çenkci, S., Yıldız, M., Cigerci, İ.H., Bozdağ, A., Terzi, H. ve Arıkan-Terzi, E.S. (2010). Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1558-1564.
- Chauhan, L.K.S., Saxena, P.N. and Gupta, S.K. (1999). Cytogenetic effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the root meristems cells of *Allium cepa*. *Environmental Experimental Botany*, 42(3), 181-189.
- Choy, W.N. (2001). "Genetic toxicology and cancer risk assessment". New York: Marcel Dekker, 29-187.
- Collins, A.R. (2002). The comet assay. Principles applications, and limitations. *Methods Molecular Biology*, 203, 163-77.
- Crocker, B.H. (1953). "Effects of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on mitosis in *Allium cepa*", *Botanical Gazette (Chicago)*, 114(3), 274-283.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. and Abrams, S.R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Plant biology*, 61, 651-679.
- Çabuk, B. (2010). *Mısırdaki (Zea mays L.) farklı 2,4 - D dozlarının kallus oluşumu ve kromozomal yapıya etkisi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 1-139.

- Çelik, M., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Ergün, M.A., Arslan, O. ve Kasap, R. (2005). *In vitro* effect of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes. *Mutagenesis*, 20(2), 101-104.
- Davière, J.M. and Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development at a Glance*, 140(6), 1147-1151.
- Demirsoy, A. ve Türkan, G. (2000). *Genel Biyoloji* (Sekizinci Baskı), Ankara: Palme Yayıncılık, 587-1187.
- Ding, J., Lu, Z., Wang, R., Shen, G. and Xiao, L. (2014). Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for 2,4 dichlorophenoxyacetic acid quantification. *Sensors and Actuators B Chemical*, 193, 568-573.
- Doak, S.H., Liu, Y. and Chen, C. (2012). "Genotoxicity and cancer. *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, 14, 243-261.
- Duchnowicz, P., Koter, M. and Duda, W. (2002). Damage of erythrocyte by phenoxyacetic herbicides and their metabolites. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 74(1), 1-7.
- El-Hawaz, R.F., Bridges, W.C. and Adelberg, W.J. (2015). *In vitro* growth of *Curcuma longa* L. in response to five mineral elements and plant density in fed-batch culture systems, *Plos one*, 10(4), e0118912.
- Elliältioğlu, Ş. ve Okay, Y. (2011). *Bahçe Bitkilerinin Çoğaltılması. Bahçe Tarımı - I (Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları Ders Kitabı)*. Eskişehir.
- Elliältioğlu, Ş.Ş., Sönmez, K., Evcen, F., Gümrah, E. ve Çetinkaya, S. (2014). *Farklı Patlıcan Genotiplerinde Anter Kültüründen Haploid Bitki Elde Edilmesi Üzerinde Çalışmalar*. 10. Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu 2-6 Eylül, Tekirdağ.
- EPA. (1995). *Reregistration Eligibility Decision – Picloram. Office of Pesticide Programs*. Washington, DC.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455(1-2), 81–95.
- Fındıklı, Z. ve Türkoğlu, Ş. (2010). Glyphos ve DDVP'nin *Allium cepa* L.'da Mitoz Bölünme ve Kromozomlar Üzerine Etkisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 31, 2.
- Filkowski, J., Besplug, P., Burke, 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(1-2), 23-32.
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* Test as a Standard in Environmental Monitoring. *Hereditas* 102(1), 99-112.
- Fiskesjö, G. (1993). *Allium* test 1: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the root growth of onions. *Environmental Toxicology Water Quality*, 8,461-470.

- Franco, H.C., Santos, V.H.M., Silva, L.P., Arthur, V. and Silva, R.G.M. (2016). Mutagenic potential of lettuce grown from irradiated seeds. *Scientia Horticulturae*, 182, 27–30.
- Franklin, C.I. and Dixon, R.A. (1994). Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Dixon R. A., Gonzales R. A. (eds), *Plant Tissue Culture-A practical Approach*, second Edition, *Oxford University Press*, Oxford, UK, 1-27.
- Frei, H. and Würigler, F.E. (1996). Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 11(4), 315-325.
- Freire, P.F., Peropadre, A., Rosal, R., Perez Martín, J.M. and Hazen, J.M. (2015). Toxicological assessment of third generation (G3) poly (amidoamine) dendrimers using the *Allium cepa* test. *Science of The Total Environment*.
- Gandhi, R., Wandji, S. and Snedeker, S.M. (2000). Critical evaluation of cancer risk from 2,4-D. *Reviews Environmental Contamination Toxicology*, 167,1–33.
- George, E.F. (1993). *Plant propagation by tissue culture. Part I. The technology*, Second edition, Exegetics, England, 57.
- George, E.F. (2008). *Plant growth regulators I. Introduction; Auxins, Their Analogues and Inhibitors*. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, 175-204.
- Gichner, T., Znidar I., Wagner E. and Plewa M. (2009). The use of higher plants in the Comet Assay, in *Issues in Toxicology n 5 The Comet Assay in Toxicology*, eds Dhawan A., Anderson D., editors. (London: Royal Society of Chemistry), 98–119.
- Gindri, A.L., Coelho, A.P.D., Tedesco, S.B. and Athayde, M.L. (2015). Genotoxic evaluation of infusions of *Urera baccifera* leaves and roots in *Allium cepa* cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 3(2), 51-58.
- Ginzkey, C., Steussloff, G., Koehler, C., Burghartz, M., Scherzed, A., Hackenberg, S., Hagen, R. and Kleinsasser, N.H. (2014). Nicotine derived genotoxic effects in human primary parotid gland cells as assessed *in vitro* by comet assay, cytokinesis block micronucleus test and chromosome aberrations test. *Toxicology in vitro*, 28(5), 838-846.
- González, M., Soloneski, S., Reigosa, M.A. and Larramendy, M. L. (2005). Genotoxicity of the herbicide 2,4- dichlorophenoxy acetic 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*, 19(2), 289–297.
- Gopalan, H.N.B. (1999). Ecosystem health and human well being: The mission of the international programme on plant bioassays. *Mutation Research*, 426(2), 99-102.
- Gökbayrak, S. ve Sivas, H. (2011). Investigation of cytotoxic effects of pyridine in root meristem cells of *Allium cepa*. *Biological Diversity and Conservation*, 4(2), 92-98.

- Graf, U., Wurgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.J. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 6(2), 153-188.
- Grant, W.F. (1982). Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 99(3), 273-91.
- Gül, T., Kaymak, F. ve Muranlı, F.D.G. (2006). *Genotoxic effects of Avenoxan on Allium cepa L. and Allium sativum L. Caryologia*, 59(3), 241-247.
- Güleryüz, M. (1982). "Bahçe ziraatında büyüücü ve engelleyici maddelerin kullanılması ve önemi". Erzurum: Atatürk Üniversitesi Yayınları, 277-279.
- Gürel, A., Hayta, Ş., Nartop, P., Bayraktar, M. ve Fedakar, S., (2013). Bitki Hücre, Doku ve organ Kültürü Uygulamaları. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları, 58,221.
- Heinze, D.J. and Mee, G.W.P. (1971). Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Schizanthus litoralis* species hybrid clones derived from callus culture. *American Journal Botany*, 58(3), 257- 262.
- Hemanth-Kumar, L.N.K. and Jagannath, S. (2015). Effects of Herbicide Butachlor EC50 on Somatic cells of *Triticum aestivum* L. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 3(2), 30-34.
- 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-dichlorophenoxy acetic acid *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Research*, 521(1-2), 165-178.
- Hoshina, M.M. (2002). Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Trabalho de conclusão (Bacharel e Licenciatura - Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 52.
- Hussain, A., Qarshi, I., Nazir, H. and Ullah, I. (2012). *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*, Agricultural and Biological Sciences book edited by Annarita Leva and Laura M. R. Rinaldi.
- Isaenko, O.A., Karr, T.L. and Feder, M.E. (2002). Hsp70 and thermal pretreatment mitigate developmental damage caused by mitotic poisons in *Drosophila*. *Cell Stress Chaperones*, 7(3), 297-308.
- Işık, K. (çeviri editörü). (2004). *Bitki Biyolojisi*. Ankara: Palme Yayınevi, 202-203, 497.
- İlbaş, A.İ., Gönen, U., Yılmaz, S. ve Dadandı, M.Y. (2012). Cytotoxicity of Aloe vera gel extracts on *Allium cepa* root tip cells, *Turkish Journal of Botany*, 36, 263-268.
- Internet: URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2>

Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fd7299%3Flang%3Den%26region%3DCA+&date=2016-04-07, Son Erişim Tarihi:13.01.2016

İnternet: URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fp5575%3Flang%3Den%26region%3DCA+&date=2016-04-07>, Son Erişim Tarihi:13.01.2016

İnternet: URL:
http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Ftarim.+Kalk%26C4%B1nma.+gov.tr%2F++wpcontent%2F++uploads+%2F2015%2F+01%2F+Bitkisel_Uretimde+_Genetiginde+_Degistirilmis+_Organizmalar-_ve%3B+_Urunleri_+ile_+Biyoguvencilik.-+pdf&date=2016-04-07, Son Erişim Tarihi:13.01.2016

İnternet: URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.turktob.org.tr%2Ftr%2Fturktob-dergisi+nisan+haziran+2015%2C&date=2016-04-07>, Son Erişim Tarihi:13.01.2016.

İnternet: URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.banvitas.com%2Fpdf%2Fturk%2520gida%2520kodeksi%2520yonetmeli.pdf+&date=2016-04-07>, (20), Son Erişim Tarihi:13.01.2016

İşlek, C., Koç, E. ve Üstün, A.S. (2010). Biber (*Capsicum annuum L.*) Tohumlarında Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *İn Vitro* Çimlenme Üzerine Etkisi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(2), 42-49.

Jain, A.K. and Sarbhoy, R.K. (1987) . Cytogenetica l studies on the effect of some chlorinated pesticides I. effect on somatic chromosomes of Lens and Pisum. *Cytologia*, 52(1), 47-53.

Juchimiuk, J., Gnys, A. and Maluszynska, J. (2006). DNA damage induced by mutagens in Plant and human cell nuclei in acellular comet assay. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 44(1), 127-131.

Justyna, G.U.Z.Y., Zgórska, A. and Ziemińska, A. (2012). Comet assay optimization with *Allium cepa* as an indicator for ecotoxicological usage, *Architecture Civil Engineering Environment*, 5(3), 109-116.

Kaifeng, C., Yan,D., Jianjun,G., Zhonglai,L. and Chao, Q.I. (2011). Effects of IAA and NAA on micronucleus in the rip cells of *Vicia faba* root. Journal of Huazhong Normal University. *Natural Sciences*, (4), 643.6.

Kalıpçı, E., Özdemir, C. ve Öztaş, H. (2011). Investigation of ecotoxicological effects of 2,4-D acid herbicide on the ecosystem. *World Applied Sciences Journal/Special Issue Food and Environment (ISI)*, 14, 126-135.

Karagiannis, C.S. and Pappelis A.J. (1993). Ethylene is a selective ribosomal cistron regulator in *Allium cepa* epidermal cells. *Mechanisms of Ageing Development*, 72(3), 199-211.

- Karakuş, C. ve Köker, R. (2007). *Tarımda bitki gelişim düzenleyicilerin (BGD) kullanımı ve hormon riski*, University Students 2. Environmental Problems Congress, Fatih Üniversitesi, İstanbul.
- Karakuşlu, S., Demirtaş, G., Çavuşoğlu, K., Yapar, K., Yalçın, E. ve Çavuşoğlu, K. (2015). Tarımda Zararlılara Karşı Kullanılan Fenpiroksimat Akarisitinin Fizyolojik ve Anatomik Etkilerinin Araştırılması. *Türk Doğa ve Fen Bilimleri Dergisi*, 4(1), 65-71.
- Kaymak, F. (1996). Effects of aluminium (Al^{3+}) on the root meristem cells of *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. *Turkish Journal of Biology*, 20, 139-145
- Kaynak, L. ve Memiş, M. (1997). Bitki büyüme engelleyici ve geciktiricilerinin etki mekanizmaları. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10, 237-248.
- Khalatkar, A.S. and Bhargava, Y.R. (1982). 2,4 - Dichlorophenoxy acetic acid—a new environmental mutagen. *Mutation Research*, 103(2), 111–114.
- Khan, M.S. (2014). Genotoxicity: *In vivo* Cytogenetic Assays. *International journal of pharmamedix India*, 2(3), 792-803.
- Khanna, N. and Sharma, S. (2013). *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review , *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* , 1(3), 2320-9267.
- Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (1984). Handbook of mutagenicity test procedures. Amsterdam: Elsevier, 855.
- Kirkland, D., Zeiger, E., Madia, F. and Corvi, R. (2014). Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? II. Construction and analysis of a consolidated database. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775–776, 69–80.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardemac, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, J.R.M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working. *Mutation Research*, 540(2), 153-163.
- Kocaçalışkan, İ. (2008). *Bitki Fizyolojisi*. Ankara: Nobel Yayınevi, 137-156.
- Kocaman, Y. ve Güven, B. (2015). *In vitro* genotoxicity assessment of the synthetic plant growth regulator, 1-Naphthaleneacetamide. *Cytotechnology*, 1-10.
- Konuk, M., Liman, R. ve Ciğerci, İ.H. (2007). Determination of genotoxic effects of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. *Pakistan Journal Botany*, 39(1), 73-79.
- Krikorian, A.D. and Berquam, D.L. (1969). Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. *The Botanical Review*, 35(1), 59-67.
- Kumar, A., Khan, S. and Dhawan1, A. (2013). Metal oxide nanoparticles elicit genotoxic responses in mammalian cells: A critical review, institute of life sciences. Ahmedabad University, *Hindistan*, 160-194.

- Kumar, N.K.H. and Jagannath, S. (2015) . Cytological effects of herbicide butachlor EC 50 on somatic cells of *Triticum aestivum L.*, *Journal of Applied Biology & Biotechnology* , 3(2), 30-34.
- Kumar, S., Arya, S.K., Roy, B.K. and Singh, A.K. (2010). The effects of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid and isoproturon herbicides on the mitotic activity of wheat (*Triticum aestivum L.*) root tips. *Turkish Journal of Biology*, 34(1), 55-66.
- Kumari, T.S. and Vaidyanath, K. (1989). Testing of genotoxic effects of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) using multiple genetic assay systems of plants. *Mutation Research*, 226(4), 235-238.
- Kumlay, A.M. ve Eryiğit, T. (2011). Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: Bitki hormonları. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 47-56.
- Lakzadeh, B., Mir-Mahmoodi, T. and Jalilnezhad, N. (2015). Effects of azospirillum bacteria and gibberellin hormone on morpho-physiological properties, yield and yield components of corn (*Zea mays L.*). *Biological Forum – An International Journal*, 7(1), 986-993.
- Lappas, C.M. (2015). The plant hormone zeatin riboside inhibits Tlymphocyte activity via adenosine A2A receptor activation. *Cellular & Molecular Immunology*, 12(1), 107–112.
- Leme, D.M. and Marin-Morales, M.A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71-81.
- Levan, A. (1938). The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, 24(4), 471-486.
- Li, G., Liu ,S., Sun, Z., Xia, L., Chen, G. and You, J. (2015). A simple and sensitive HPLC method based on pre-column fluorescence labelling for multiple classes of plant growth regulator determination in food samples. *Food Chemistry*, 170, 123-30.
- Liman, R., Ciğerci, I.H. ve Öztürk, N.S. (2015). Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cep* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 118, 38–42.
- Liman, R., Ciğerci, I.H., Akyıl, D., Eren, Y. ve Konuk, M. (2011). Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1), 61–64.
- Lomin, S.N., Krivosheev, D.M., Steklov, M.Y., Arkhipov, D.V., Osolodkin, D.I., Schmülling, T. and Romanov, G.A. (2015). Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1851-63.
- Lorge, E., Lambert C., Gervais, V., Becourt - Lhote, N., Delongeaes, L. and Claude, N. (2007). Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances of the in vitro micronucleus test compared to the

- mouse lymphoma assay and the *in vitro* chromosome aberration assay. *Toxicology Sciences*, 96(2), 214-7.
- Ma, T.H., Grant, W.F. and Serres, F.J. (1997). The genotoxicity monitoring of the air, water and soil – a preliminary report of the International Program on Plant Bioassays (IPPB). *Mutation Research*, 379(99), 1.
- Mamber, S.W., Kolek, B., Brookshire, K.W., Bonner, D.P. and Fung-Tomc, J. (1993). Activity of quinolones in the Ames Salmonella TA102 mutagenicity test and other bacterial genotoxicity assays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2), 213-217.
- Mansoori, A.N., Gautam, R.K. and Tiwari, P.C. (2014). A review on genotoxicity. *Asian Pharma Press All Right Reserved*, 4(3), 162-165.
- Mates J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83-104.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I. and Kirsch-Volders, M. (2006). “Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring”, *Biochimie*, 88(11), 1515-1531.
- McDuffie, H.H., Pahwa, P., Mc Laughlin, J.R., Spinelli, J.J., Fincham, S. and Dosman, J.A. (2001). Non-Hodgkin’s lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, 10(11), 1155–1163.
- Michalska-Kacymirow, M., Kurek, E., Smolis, A., Wierzbicka, M. and Bulska, E. (2014). Biological and chemical investigation of *Allium cepa* L. response to seleniuminorganic compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(15), 3717-3722.
- Mohammed, K.B. and Ma, T.H. (1999). Tradescantia - micronucleus and - stamen hairmutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutation Research*, 426(2), 193–196.
- Mohammed, K.B., Aarey, A., Tamkeen, S. and Jahan, P. (2015). Forskolin: genotoxicity assessment in *Allium cepa*. *Mutation Research/Mutation Research Genetic Toxicology Environmental Mutagen*, 777, 29-32.
- Mohandas, T. and Grant, W.F. (1972). Cytogenetic effects of 2,4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 14(4), 773-783.
- Monarca, S., Feretti, D., Collivignarell, C., Guzella, L., Zebrini, I., Bertanza, G. and Pedrazzani, R. (2000). The influence of different disinfectans on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Resarch*, 34(17), 4261-4269.
- Morsünbül, T., Solmaz, S.K.A., Üstün, G.E. ve Yonar, T. (2010). Bitki Gelişim Düzenleyici (BGD)’lerin Çevresel Etkileri ve Çözüm Önerileri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 15(1).

- Mustonen, R., Kangas, J., Vuojolahti, P. and Linnainmaa, K. (1986). Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations *in vitro* and *in vivo*. *Mutagenesis* 1(4), 241-245.
- Müller, J.L. (2015). Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. *Journal of Plant Physiology*, 172, 4–12.
- Nagarathna, P.K.M., Wesley, M.J., Sriram Reddy, P. and Reena, K. (2013). Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 236-243.
- Neumann, K.H., Kumar, A. and Imani, J. (2009). Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology. *Principles and Practice*, 1-7.
- Njoku, K.L., Akinola, M.O. and Tommy, I.O. (2015). Genotoxicity of industrial paint effluent on the root meristem of *Allium cepa*. *IOSR Journal of Environmental Science*, 9(2), 11-17.
- Nwauzoma, A.B. and Jaja, E.T. (2013). A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp.) mechanisms and applications. *Journal of Applied Biosciences*, 67, 5252–5260.
- Olorunfemi, D.I., Ogieseri, U.M. and Akinboro, A. (2011). Genotoxicity screening of industrial effluents using onion bulbs (*Allium cepa* L. L.). *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*, 15(1), 211 – 216.
- Onay, A., Yıldırım, H., Piriç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y.Ö., Akdemir, H., Süzerer, V., Çalar, N., Binici, M., Akdemir, Ö.F. ve Kılınç, M.F. (2012). Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut Durum ve Gelecekteki Durum. *Batman Üniversitesi Journal of Life Sciences*, 1(2), 11-27.
- Ono, H., Tamura, H., Yamashita, Y., Tamura, K. ve Iwakura, K. (2006). *In vitro* chromosome aberration test and *in vivo* micronucleus test of Ca-type *Garcinia* extract. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 47(2), 80-84.
- Osman, A.G.M. (2014). Genotoxicity tests and their contributions in aquatic environmental research. *Journal of Environmental Protection*, 5(14), 1391-1399.
- Öktem, H.A. ve Yücel, M. (2012). Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik. Ankara: *Nobel Yayınları*, 374.
- Öngen, N.K. (1990). Herbisit-Toprak ilişkileri. *Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü*, Bornova-İzmir, 29.
- Östling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298.
- Özakca, D.U. ve Silah, H. (2013). Genotoxicity effects of Flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 107(1), 38-43.

- Özen, H.Ç. ve Onay, A. (2003). *Bitki büyüme ve gelişme fizyolojisi*. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Basımevi, 185.
- Özgen, M., Adak, S., Söylemezoğlu, G. ve Ulukan, H. (2000). *Bitki genetik kaynaklarının korunma ve kullanımında yeni yaklaşımlar*. Türkiye Ziraat Mühendisliği 5. Teknik Kongresi, Ankara.
- Özzambak, M.E. (2015). Süs bitkilerinde doku kültürü uygulamaları. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 4(4), 16-21.
- Pandey, H., Kumar, V. and Roy, B.K. (2014). Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. *Toxicology Reports*, 1,300-308.
- Parry, J.M. and Kirsch-Volders, M. (2010). Special issue on *in vitro* MN trial. *Mutation Research*, 702(2), 132-134.
- Pasqual, M., Soares, J.D. and Rodrigues, F.A. (2014). Tissue culture applications for the genetic improvement of plants. *Biotechnology and Plant Breeding*, 157-178.
- Patra, J., Sahoo, M.K. and Panda, B.B. (2005). Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa* L.. *Mutation Research*, 581(1-2), 173-18.
- Pereyra, M.L.G., Dogi, C., Lisa, A.T., Wittouck, P., Ortíz, M., Escobar, F., Bagnis, G., Yaciuk, R., Poloni, L., Torres, A., Dalcerro, A.M. and Cavagliar, L.R. (2014). Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* RC016: a 60-day subchronic oral toxicity study in rats. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 824–833.
- Perez-Jimenez, M., Cantero-Navarro, E., Perez-Alfocea, F. and Cos-Terrer, J. (2014). Endogenous hormones response to cytokinins with regard to organogenesis in explants of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and rootstocks (*P. persica* × *Prunus dulcis*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 197–202.
- Perry, P. and Evans, H.J. (1975). Cytological detection of mutagen- carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258(5531), 121-125.
- Pierik, R.L.M. (1989). *In vitro* culture of higher plants. Martinus nijhoff publishers, dordrecht, Online, 340.
- Pogosyan, S.J., Nikolai, V., Shevchenko, N.V. and Merzlyak, M.N. (1984). Stimulation of NADPH – dependent lipid peroxidation by 2,4-dichlorofenoxyacetic acid and diquat in microsomes isolated from *Pisum sativum*. *Plant Science Letters*, 37(1-2), 69-72.
- Prajitha, V. and Thoppil, J.E. (2016). Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. Using *Allium cepa* assay. *South African Journal of Botany*, 102, 18–25.

- Prakash, N.S., Lakshmi, N. and Harini, I. (1988). Cytological effects of agricultural chemicals II. Effects of fungicides “bavistin” and “deltan” on chilli (*Capsicum annuum* L.). *Cytologia*, 53(4), 709-715.
- Prasad, G. and Das, K. (1977) . Effects of some growth substances on mitosis. *Cytologia*, 42(2), 323-329.
- Preston, R.J., Skare, .A. and Aardema, M.J. (2010). A review of biomonitoring studies measuring genotoxicity in humans exposed to hair dyes. *Mutagenesis*, 25(1), 17-23.
- Prodanchuk, M., Zhminko, O. and Zhminko, P. (2008). Effect of some plant growth regulators-Derivatives of Noxide-pyridine on protein-synthesis processes and mitochondrial membrane of hepatocytes at subchronic ingestion to rats. *Toxicology letters*, 180(1), 177.
- Pulate, P.V. and Tarar, J.L. (2014). Cytogenetic effects of tilt on root tip meristem of onion *Allium cepa* L.. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 4(2), 53-57.
- Rank, J. and Nielsen, M.H. (1997). *Allium cepa* anaphase - telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. . *Mutation Research*, 390(1-2), 121-127.
- Rank, J. and Nielson, M.H. (1994). Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test inrelation to genotoxicity screening ofindustrial wastewater. *Mutation Research*, 312(1), 17-24.
- Sabovljević, M., Vujičić, M. and Sabovljević, A. (2014). Plant growth regulators in bryophytes, *Botanica Serbica*, 38(1), 99-107.
- Saker, M.M. (1998). *In vitro* regeneration of onion through repetitive somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum*, 40(4), 499-506.
- Santos, C.L.V., Pourrut, P. and Ferreira de Oliveira, J.M.P. (2016). The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Recent advances Frontiers in Genetics*, 6, 216.
- Sauer, M., Robert, S. and Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2565–2577.
- Schreiner, C.A., Hoffmanb, G.M., Gudic, R. and Clarkd, C.R. (2014). Health assessment of gasoline and fuel oxygenate vapors: Micronucleus and sister chromatid exchange evaluations,. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70(2), 29–34.
- Seiler, J.P. (2006). The genetic toxicology of phenoxy acids other than 2,4,5-T. *Mutation Research*, 55(3-4), 197- 226.
- Setha, C.S., Misraa, V., Chauhanb, L.K.S. and Singh, R.R. (2008). Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), 711–716.

- Sharma, S. and Vig, A.P. (2012). Genotoxicity of Atrazine, Avenoxan, Diuron and Quizalofop-P-ethyl herbicides using the *Allium cepa* root chromosomal aberration assay. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, 6(2), 90-95.
- Singh, P. (2015). Genotoxicity assessment of water samples from Gomti river, U.P. India using the *Allium cepa* L. test. *International Journal of Advanced Research*, 3(3), 474-482.
- Sivikova, K., Holeckova, B. and Dianovsky, J. (2005). Chromosome damage induced by benzene after the use of conventional and FISH chromosome painting. *Neoplasma*, 52(1), 79-84.
- Smith, R. (1992). Plant tissue culture Tecqniques and experiments. *Academic Press is an imprint of Elsevier*, University College Station, Texas, 1-22.
- Sözen, E., Yılmaz, M., Çolak, G. ve Yücel, E. (2010). Ecotoxicological effects of alkaline metal salts (H₂SO₄) and some heavy metals (CuCl₂, FeCl₃, MgCl₂ ve ZnCl₂) on the germination of chickpea (*Cicer arietinum*) seeds. *Biological Diversity and Conservation*, 3(3), 64-71.
- Srivastava, K. and Mishra, K.K. (2009). Cytogenetic effects of commercially formulated Atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1), 8–12.
- Staden, J., Zazimalova, E. and George, E.F. (2008). Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists, In: Plant Propagation by Tissue Culture. *Springer*, AA Dordrecht, Netherlands, 3, 175.
- Stults, D.M., Killen, M.W. and Pierce, A.J. (2014) The sister chromatid exchange (SCE) assay. *Molecular Toxicology Protocols*, 1105, 439-455.
- Sugaya, S. and Sakai, S. (1996). Identidification of a soluble auxinbinding protein as a glutathione-dependent formaldehydedehydrogenase. *Plant Science*, 114(1), 1-9.
- Syberg, K., Binderup, M., Cedergreen, N. and Rank, J. (2015). Mixture Genotoxicity of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid, Acrylamide, and Maleic Hydrazide on human Caco-2 cells assessed with comet assay. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 78(6), 369-80.
- Tartar, G., Kaymak, F. ve Muranli, F.D.G. (2006). Genotoxic effects of Avenoxan on *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. *Caryologia*, 59(3), 241-247.
- Tedesco, S.B. and Laughinghouse, H.L. (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* test. *Environmental contamination*, 220.
- 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 Moleculer Mutagenesis*, 35(3), 206-221.

- Tiwari, S., Tripathi, M.K., Khare, V.K. and Rana, R. (2007). Initiation of embryonic suspension culture and plant regeneration in onion (*Allium cepa* L.). *Indian Journal Biotechnology*, 6(1), 100-106.
- Tomkins, D.J. and Grant, W.F. (1976). Monitoring natural vegetation for herbicide induced chromosomal aberrations. *Mutation Research*, 36(1), 73-83.
- Truta, E., Zamfirache, M.M., Rosu, C., Olteanu, Z., Mihai, C. and Gherge, D. (2011). Cytogenetic effects induced by 2,4-D and Kinetin in radish and common bean root meristems. *Romanian Agricultural Research*, 28, 207-215.
- Tu, M., Hurd, C. and Randall, J.M. (2001). Picloram. Weed control methods handbook. *Tools & Techniques for Use in Natural Areas*, 1-27.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Resmi Gazete 16 Kasım 1997, 23172.
- Türkoğlu, Ş. (2007). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L.. *Mutation Research*, 626(1-2), 4-14.
- Türkoğlu, Ş. (2012). Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(3), 224-230.
- Türküzü, D., Yaşar, F., Ellialtıoğlu, Ş. ve Yıldırım, B. (2014). Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) bitkisinin doku kültürü yoluyla çoğaltılması üzerinde çalışmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi (YYU J AGR SCI), 26(3), 300-308.
- Uçkan, F., Soydabaş, H.K. ve Özbek, R. (2014). Effect of Indol-3 acetic acid on the biochemical parameters of *Achoria grisella* hemolymph and apanteles galleriae larva. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 11(2), 163-171.
- Ventura, L., Giovannini, A., Savio, M., Donà, M., Macovei, A. and Buttafava, A. (2013). Single cell gel electrophoresis (Comet) assay with plants: research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere*, 92(1), 1-9.
- Waite, D.T., Cessna, Grover, R., Kerr, L.A. and Snihura, A.D. (2002). Environmental concentrations of agricultural herbicides: 2,4-D and triallate. *Journal of Environmental Quality*, 31(1), 129-44.
- Walker, M.M. and Lawrence, H.K. (1992). *EPA's Pesticide Fact Sheet Database*. Lewis Publishing. Chelsea: MI, 32.
- Wang, F., Cui, X., Sun, Y. and Dong, C. (2013). Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Reports*, 32(7), 1099-1109.
- Wang, J., Man, S., Gao, W., Zhang, L. and Huang, L. (2013). Cluster analysis of ginseng tissue cultures, dynamic change of growth, total saponins, specific oxygen uptake rate in bioreactor and immunoregulative effect of ginseng adventitious root. *Industrial Crops Products*, 41, 57-63.

- Wang, M. and Ha, Y. (2007). An electrochemical approach to monitor pH change in agar media during plant tissue culture. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), 2718-2723.
- Winkelmann, T., Geier, T. and Preil, W. (2006). Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985–2004. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 319–3274.
- Xu, J. and Zhang, S. (2015). Mitogen - activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science*, 20(1), 56-54.
- Yılmaz, S. (2008). “*Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri*”, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yılmaz, S., Unal, F., Yuzbasioglu, D. and Gonenc, I.M. (2015). Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays by clomiphene citrate in human lymphocytes. *Human and Experimental Toxicology*, 34(3), 284-288.
- Yi, H. and Meng, Z. (2003). Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research*, 537(1), 109-1124.
- Yun, X., Qiongjiang, C. and Liujin, G. (2005). *Mutagenicity of Picloram in Herbicide*. Institute of Hygienic Research, Zhejiang Academy of Medical Science, Hangzhou, 310013.
- Yücel, E., Hatipoğlu, A., Sözen, E. ve Güner, Ş.T. (2008). The effects of the lead (PbCl₂) on mitotic cell division of anatolian black pine (*Pinus nigra* ssp. *pallasiana*). *Biological Diversity and Conservatio*, (BioDiCon). 1(2), 124-129.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N. ve Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite Testleri. *Gıda*, 39(3), 179-186.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. ve Aksoy, H. (2006). “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”. *Mutation Research*, 604(1-2), 53-59.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. ve Sancak, C. (2009). Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L.. *Turk Journal Biology/Türk Biyoloji Dergisi*, 33, 283-290.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Sancak, C. ve Kasap, R. (2003). Cytological effects of the herbicide racer "flurochloridone" on *Allium cepa*. *Caryologia*, 56 (1), 97- 05.
- Zabka, A., Winnicki, K., Polit, J.T. and Maszewski, J. (2015). The effects of anti DNA topoisomerase II drugs, etoposide and ellipticine, are modified in root meristem cells of *Allium cepa* by MG132, an inhibitor of 26S proteasomes. *Plant Physiol Biochemistry*, 96,72-82.
- Zeljezic, D. and Garaj-Vrhovac, V. (2004). Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxy acetic acid pesticide formulation. *Toxicology*, 200, 39-47.
- Zhang, Y. and Yang, X. (1994). The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. *Mutation Research*, 312, 121-126.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Özkul, Meral
 Uyuğu : T.C.
 Doğum yeri : Ankara
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 535 294 01 86
 e-mail : meral.ozkul@windowslive.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi	2011
Pegadojik Formasyon	Gazi Üniversitesi	2013

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2013	Gazi Üniversitesi	Ücretli Asistanlık
2014-2016	Y. Emre Ticaret Meslek Lisesi, Mamak/Ankara	Ücretli Biyoloji Öğretmenliği
2016-	Aksaray Güzelyurt Çok Programlı Anadolu Lisesi, Aksaray /Güzelyurt	Biyoloji Öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

SCI tarafından Taranan Dergilerdeki Yayınlar

Özkul, M., Özel, Ç.A., Yüzbaşıoğlu, D. ve Ünal, F. (2016). Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? *Cytotechnology*.

Kongreler

Özkul, M., Özel, Ç.A., Yüzbaşıoğlu, D. ve Ünal, F. (2015). *Bitki Büyüme Düzenleyicilerinden 2,4 Diklorofenoksi Asetik Asitin Genotoksik Etkilerinin Bitki Doku Kültüründe Allium Testi İle İncelenmesi*. 1.Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu.

Özkul, M., Özel, Ç.A., Yüzbaşıoğlu, D. ve Ünal, F. (2015). *Evaluation of the genotoxicity of dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) in tissue cultured Allium roots by comet assay*. International Gazi Pharma Symposium, Antalya.

Projelerde Yaptığı Görevler

Özkul, M. (2013- 2015). *Bitki Büyüme Düzenleyicilerinden 2,4-D'nin Genotoksik Etkilerinin Bitki Doku Kültüründe Allium testi ile İncelenmesi*, Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu 04/201402, Yardımcı Araştırmacı.

Hobiler

Yürüyüş yapmak, Gitar çalmak, Kitap okumak.



GAZİ GELECEKTİR..