

**BİTKİ GELİŞİMİNDE KULLANILAN BAZI MADDELERİN
MUTAJENİK ETKİLERİNİN SALMONELLA AMES
MİKROZOM TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Sevilay YAPICI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2013
ANKARA**

Sevilay YAPICI tarafından hazırlanan “BİTKİ GELİŞİMİNDE KULLANILAN BAZI MADDELERİN MUTAJENİK ETKİLERİNİN SALMONELLA AMES MİKROZOM TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Güven URAZ

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

.....

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, H.Ü.

Prof. Dr. Güven URAZ

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Doç. Dr. Barbaros BALABANLI

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Tez Savunma Tarihi: 28/01/2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Sevilay YAPICI

**BİTKİ GELİŞİMİNDE KULLANILAN BAZI MADDELERİN
MUTAJENİK ETKİLERİNİN SALMONELLA AMES
MİKROZOM TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Sevilay YAPICI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2013**

ÖZET

Çalışmamızda, tarım sektöründe sıklıkla kullanılan 4 farklı bitki gelişim düzenleyicisinin (Gibberellic acid, Kinetin, Chlormequat chloride, 2,4,6-trichlorobenzoic acid) mutajenik aktivitesinin kısa zamanlı test sistemi olan Ames/Salmonella testi uygulanarak araştırılması amaçlanmıştır. Deneyler *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak metabolik aktivasyon enzimleri varlığında (S9+) ve yokluğunda (S9-) yapılmıştır. Mutajenite deneylerine başlamadan önce, test maddelerinin sitotoksik dozları belirlenmiştir. Daha sonra her test maddesi için sitotoksik olmayan 5 doz seçilmiştir. Mutajenite tayini için Gibberellic acid maddesinin 50 µg/plak, 100 µg/plak, 500 µg/plak, 1000 µg/plak, 5000 µg/plak dozları çalışılmıştır. Kinetin maddesinin 2,5 µg/plak, 25 µg/plak, 250 µg/plak, 1000 µg/plak, 2500 µg/plak dozları, Chlormequat chloride maddesinin 100 µg/plak, 200 µg/plak, 400 µg/plak, 800 µg/plak, 1600 µg/plak dozları çalışılmıştır. 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin ise 5 µg/plak, 50 µg/plak, 500 µg/plak, 1000 µg/plak, 2500 µg/plak dozları çalışılmıştır. Sonuçlar spontan kontrol plakları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Test bulgularına göre; Kinetin maddesinin 2500 µg/plak dozu, TA 98 suşu üzerinde S9 enzimi varlığında ve yokluğunda, TA 100 suşu üzerinde S9 enzimi varlığında mutajen olarak tespit edilmiştir. 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 2500 µg/plak dozu, TA 98 suşu üzerinde

S9 enzimi yokluğunda yapılan deneylerde mutajen olarak belirlenmiştir. Diğer 2 madde GA ve CCC bakteri suşları üzerinde mutajenik etkiye sebep olmamıştır. Dolayısıyla bu iki madde için çerçeve kayması ve baz çifti değişimi gibi mutasyonlara neden olmadıkları düşünülebilir.

Bilim Kodu : 203.1.010

Anahtar Kelimeler: Mutajenite, *Salmonella* / mikrozom testi, *Salmonella typhimurium*, Bitki gelişim düzenleyicileri, Gibberellic acid, Kinetin, Chlormequat chloride, 2,4,6-trichlorobenzoic acid

Sayfa Adedi : 107

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Güven URAZ

**INVESTIGATION OF THE MUTAGENIC EFFECTS OF SOME
SUBSTANCES USED IN PLANT GROWTH WITH SALMONELLA AMES
MICROSOME TEST**

(M.Sc. Thesis)

Sevilay YAPICI

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

January 2013

ABSTRACT

In this study was aimed to investigate mutagenic activity of four different plant growth regulator (Gibberellic Acid, Kinetin, Chlormequat chloride, 2,4,6-trichlorobenzoic acid) that commonly used in the agricultural sector by Ames / *Salmonella* short-time test system. Experiments were performed in the presence (+ S9) or absence (-S9) of enzymes in the metabolic activation by using TA 98 and TA 100 strains of *Salmonella typhimurium*. Before starting the mutagenicity test, the cytotoxic doses of the test substances were determined. Then, 5 non-cytotoxic dose for each test substances were selected. For the determination of mutagenicity of Gibberellic acid 50 µg/plate, 100 µg/plate, 500 µg/plate, 1000 µg/plate, 5000 µg/plate doses were studied. 2.5 µg/plate, 25 µg/plate, 250 µg/plate, 1000 µg/plate and 2500 µg/plate doses of Kinetin substance, 100 µg/plate, 200 µg/plate, 400 µg/plate, 800 µg/plate, 1600 µg/plate doses of Chlormequat chloride substance were studied. 5 µg/plate, 50 µg/plate, 500 µg/plate, 1000 µg/plate, 2500 µg/plate doses of 2,4,6-trichlorobenzoic acid substance were studied. The results were evaluated by compare with spontaneous control plates. According to results, 2500 µg/plate dose of Kinetin has been found mutagenic on the strain TA 98 in the presence and in the absence of S9 enzyme, on the strain TA 100 in the absence of S9 enzyme. 2500 µg/plate dose of 2,4,6-trichlorobenzoic acid were determined to be mutagenic on

strain TA 98 in the absence of S9 enzyme experiments. The other two substances GA and CCC did not cause mutagenic effects on bacterial strains. Therefore, for these two substances should be considered that are not caused by mutations such as frameshift and base pair changes.

Science Code: 203.1.010

Key Words : Mutagenicity, *Salmonella* / microsome assay, *Salmonella typhimurium*, Plant growth regulators, Gibberellic acid, Kinetin, Chlormequat chloride, 2,4,6- trichlorobenzoic acid

PageNumber: 107

Adviser : Prof. Dr. Güven URAZ

TEŞEKKÜR

Tez alıŐma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren danıŐman hocam Sayın Prof. Dr. Güven URAZ'a; deney aŐamasında, deneylerin yapılıp değerlendirilmesinde yardımlarını benden esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ebru YILMAZ'a; benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, daima yanımda olarak bana güç ve moral veren canım aileme, mikrobiyoloji laboratuvarında görevli çalışma arkadaşlarıma sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Mutasyonlar	6
2.1.1. Kromozom yapısı değişimleri.....	7
2.1.2. Kromozom sayısı değişimleri	9
2.1.3. Gen mutasyonları.....	11
2.2. Mutajenler	12
2.3. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu.....	16
2.4. Ames <i>Salmonella</i> / Mikrozoom Test Sistemi	18
2.4.1. Histidin mutasyonu	20
2.4.2. Rfa mutasyonu	21
2.4.3. UvrB mutasyonu	21
2.4.4. R faktörü.....	22
2.5. Bitki Gelişim Düzenleyicileri (BGD).....	23

Sayfa

2.6. Geçmişten günümüze Ames Test Sistemi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar..	31
3. MATERYAL ve METOT	41
3.1. Materyal.....	41
3.1.1. Kimyasal maddeler	41
3.1.2. Kullanılan test suşları.....	41
3.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı	42
3.1.4. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler	43
3.2. Metot.....	49
3.2.1. <i>Salmonella</i> suşlarının kültürlerinin ve master petrilerin hazırlanması..	49
3.2.2. <i>Salmonella</i> suşlarının saklanması ve stok kültürlerin açılması	50
3.2.3. Sıvı kültürde bakteri sayısının belirlenmesi	50
3.2.4. <i>Salmonella</i> suşlarının genotiplerinin kontrol edilmesi	51
3.2.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması.....	55
3.2.6. Pozitif kontrol.....	56
3.2.7. Negatif (çözücü/DMSO) kontrol	56
3.2.8. S9 karışımının hazırlanması	57
3.2.9. Ames testinin yapılışı.....	57
3.2.10. Ames test sonuçlarının değerlendirilmesi	60
4. BULGULAR	62
4.1. Sitotoksik Doz Belirleme Sonuçları	62
4.2. <i>Salmonella</i> / Mikrozoom Mutajenite Test Sonuçları	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	82
KAYNAKLAR.....	90

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ 108

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri.....	3
Çizelge 4.1. GA maddesinin artan seviyelerdeki dozlarına göre petri başına oluşan koloni sayısı.....	63
Çizelge 4.2. CCC maddesinin artan seviyelerdeki dozlarına göre petri başına oluşan koloni sayısı.....	63
Çizelge 4.3. Kinetin maddesinin artan seviyelerdeki dozlarına göre petri başına oluşan koloni sayısı.....	64
Çizelge 4.4. 2,4,6- trichlorobenzoic acid maddesinin artan seviyelerdeki dozlarına göre petri başına oluşan koloni sayısı.....	65
Çizelge 4.5. GA maddesinin 5 dozunun farklı zamanlarda elde edilen Salmonella AMES mutajenite test sonuçları.....	66
Çizelge 4.6. GA maddesinin 5 dozunun mutajenite test sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları.....	66
Çizelge 4.7. Kinetin maddesinin 5 dozunun farklı zamanlarda elde edilen Salmonella AMES mutajenite test sonuçları.....	67
Çizelge 4.8. Kinetin maddesinin 5 dozunun mutajenite test sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları.....	67
Çizelge 4.9. CCC maddesinin 5 dozunun farklı zamanlarda elde edilen Salmonella AMES mutajenite test sonuçları.....	68
Çizelge 4.10. CCC maddesinin 5 dozunun mutajenite test sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları.....	68
Çizelge 4.11. 2,4,6- trichlorobenzoic acid maddesinin 5 dozunun farklı zamanlarda elde edilen Salmonella AMES mutajenite sonuçları.....	69
Çizelge 4.12. 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 5 dozunun mutajenite test sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları.....	69

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mutasyon çeşitlerinin sınıflandırılması.....	7
Şekil 2.2. Kromozom yapısı mutasyonları.....	9
Şekil 2.3. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in molekül yapısı.....	26
Şekil 2.4. Kinetin'in molekül yapısı.....	27
Şekil 2.5. Gibberellic acid'in molekül yapısı.....	29
Şekil 2.6. Chlormequat chloride'in molekül yapısı.....	30
Şekil 3.1. Ames testinin şematik görünümü (S9-)......	59
Şekil 3.2. Ames testinin şematik görünümü (S9+)......	60
Şekil 4.1. GA'nın TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi).....	70
Şekil 4.2. GA'nın TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi).....	70
Şekil 4.3. GA'nın TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi).....	71
Şekil 4.4. GA'nın TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi).....	71
Şekil 4.5. GA'nın S9'lu ve S9'suz deneyde TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği.....	71
Şekil 4.6. GA'nın S9'lu ve S9'suz deneyde TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği.....	72
Şekil 4.7. Kinetin'in TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi).....	72
Şekil 4.8. Kinetin'in TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi).....	73
Şekil 4.9. Kinetin'in TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi).....	73
Şekil 4.10. Kinetin'in TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi).....	73

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. Kinetin'in S9'lu ve S9'suz deneyde TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği.....	74
Şekil 4.12. Kinetin'in S9'lu ve S9'suz deneyde TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği.....	74
Şekil 4.13. CCC'nin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi).....	75
Şekil 4.14. CCC'nin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)	75
Şekil 4.15. CCC'nin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi).....	75
Şekil 4.16. CCC'nin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi).....	76
Şekil 4.17. CCC'nin S9'lu ve S9'suz deneyde TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği.....	76
Şekil 4.18. CCC'nin S9'lu ve S9'suz deneyde TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği.....	76
Şekil 4.19. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)	77
Şekil 4.20. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)	77
Şekil 4.21. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi)	78
Şekil 4.22. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi)	78
Şekil 4.23. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in S9'lu ve S9'suz deneyde TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği.....	78
Şekil 4.24. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in S9'lu ve S9'suz deneyde TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği.....	79

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. <i>S. typhimurium</i> TA 100 suşunun histidin gereksinimi kontrol sonuçları.....	51
Resim 3.2. <i>S. typhimurium</i> TA 98 suşunun histidin gereksinimi kontrol sonuçları.....	52
Resim 3.3. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşları için <i>Rfa</i> mutasyonunu kontrol sonuçları.....	52
Resim 3.4. <i>S. typhimurium</i> TA 100 suşunda <i>uvrB</i> mutasyonu kontrol sonuçları.....	53
Resim 3.5. <i>S. typhimurium</i> TA 98 suşunda <i>uvrB</i> mutasyonu kontrol sonuçları.....	53
Resim 3.6. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşları için R faktör varlığı kontrol sonuçları.....	54
Resim 3.7. TA 98 ve TA 100 suşlarının normal sınırlarda spontan olarak geri dönüşen koloni görünüşleri.....	55
Resim 4.1. GA 50 µg dozu S9(-).....	79
Resim 4.2. GA 1000 µg dozu S9(-).....	79
Resim 4.3. CCC 200 µg dozu S9(+)......	80
Resim 4.4. CCC 1600 µg dozu S9(-).....	80
Resim 4.5. Kinetin 250 µg dozu S9(-).....	80
Resim 4.6. Kinetin 2500 µg dozu S9(-).....	80
Resim 4.7. 2,4,6-trichlorobenzoic acid 2500 µg dozu S9(-).....	81
Resim 4.8. 2,4,6-trichlorobenzoic acid 2500 µg dozu S9(-).....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
°	Derece
g	Gram
γ	Gama
ml	Mililitre
mg	Miligram
Mg	Magnezyum
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
N	Normal
Kısaltmalar	Açıklama
2AF	2-aminoflouren
A-G	Adenin-Guanin
AP	Apürinik
A-T	Adenin-Timin
CA	Chromosome aberation
CAS	Chemical Abstracts Service
CCC	Chlormequat chloride (Chlorcholine chloride)
C-T	Sitozin-Timin
DMSO	Dimetil sülfoksit

Kısaltmalar**Açıklama**

DNA	Deoksiribonükleik Asit
GA	Gibberellic acid
G-C	Guanin-Sitozin
HB	Histidin/Biyotin
HBA	Histidin /Biyotin/Ampisilin
His-	Histidin sentezlemeyen
His+	Histidin sentezleyebilen
MGA	Minimal glukoz agar
MN	Mikronükleus
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NA	Nutrient agar
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NB	Nutrient broth
O₂	Oksijen molekülü
pH	Power of Hydrogen
P.K	Pozitif kontrol
SA	Sodyum azid
S.C.E.	Sister cromatid exchange
S.K.	Spontan kontrol
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Son yıllarda artan nüfus ile birlikte artış gösteren çevre kirliliği, canlıların sağlıklarını her yönden tehdit etmektedir. Sanayileşme, teknolojik gelişmeler ve bunlara bağlı olarak yaşam düzeyinin yükselişi, kullanılan çeşitli ilaçlar, gıdalara katılan tatlandırıcı ve renklendiriciler, tarımda kullanılan çeşitli kimyasallar çevre kirliliğine büyük ölçüde sebep olmakta, doğal kaynakları olumsuz yönde etkilemektedir [Korkmaz, 2005; Akyıl, 2006].

Teknolojinin ilerlemesine paralel olarak tarımda ve gıdalarda kullanılan kimyasal maddelerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır [Tomatis, 1979; Öncül, 2009]. Özellikle son yıllarda sentetik kimyasal maddelerin sayısı ve üretiminde büyük bir gelişme olmuştur. Bugün 5.000.000 kimyasal madde bilinmektedir. Tıp, tarım, endüstri ve ev gereksiniminde kullanılanların sayısı 70.000'e ulaşmıştır. Son 50-100 yıl içerisinde bu kimyasal maddelerin sayı olarak hızla artması, birçok toksikolojik olayları da ortaya çıkarmıştır [Vural 1996; Akyıl, 2006].

Kimyasal maddelerin bir kısmının mutajenik ve kanserojenik olabileceği uzun zamandır tartışılmaktadır [Tomatis, 1979; Öncül, 2009]. Çevresel faktörlerin, kalıtsal doğum bozuklukları, kalp hastalıkları, yaşlanma, katarakt ve gelişimsel doğum bozukluklarına neden olmalarının yanında kanserin ana sebebi olduklarına ilişkin hipotez giderek destek kazanmaktadır [Vural, 1996; Murray ve ark., 1996; Akyıl, 2006].

Kimyasalların çok azının (20.000 civarında) kanserojenik potansiyelleri hakkında bilgimiz vardır. Geriye kalanların ve yeni sentezlenen kimyasal maddelerin de test edilerek mutajenik/kanserojenik etkilerinin saptanması insan sağlığı açısından önem arz etmektedir [Akyıl, 2006; Barış, 2007].

Kanserojen ve mutajen maddelerin önemli özelliklerinden biri, çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olmalarıdır. Mevcut kimyasal yöntemlerle dokularda bulunan bu tür maddelerin kimyasal yapılarının analitik şekilde tespiti mümkün

değildir. Bu nedenle, invitro olarak kanserojen ve mutajen madde taraması esasına dayanan yöntemler önem kazanmıştır [Tübitak, 1985; Ergin, 2009].

Kimyasalların mutajenik etkilerini belirlemeye yönelik, kısa sürede sonuç elde edilen, düşük maliyetli pek çok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları DNA hasarlarına sebep olan kimyasal mutajen ve kanserojenlerin test edildiği sitogenetik metotlardır. Bu testler; kardeş kromatid değişimi (SCE) [Hamasaki, 1992; Lee, 1994; Tutgun 1996; Trosko, 1997], mikronükleus testi (MN) [Majone, 1990; Wyszyn, 1991; Trosko, 1997], kromozom bozulma testi (CA= chromosome aberation) [Bakale ve Mc Creary, 1990], comet testi (gen konversiyonları ve DNA kırılmaları) [Hayashi, 1994, Zhuleva, 1994], programlanmamış DNA sentezi (UBS=Unscheduled DNA synthesis) [Griffoll, 1990; Forster, 1992; Jarvis, 1996], Ames test, SOS kromotest [Hamasaki, 1992; Josephy, 1997], transformasyon yöntemi umu test [Josephy, 1997] şeklinde sıralanabilir [Wyszyn, 1991; Hayashi, 1994; Zhuleva, 1994; Galli ve Schiestl, 1996; Trosko, 1997]. Tüm bu mutajenite test yöntemleri *Salmonella* test suşları, çeşitli *E.coli* suşları, rat, primat ve tavşan türleri kullanılarak hazırlanmış memeli hücre kültürleri ve memelilerin kan, kemik iliği hücreleri, *Saccharomyces cerevisia* suşları ve farklı organizmalar kullanılarak uygulanmaktadır [Meng, 1992; Bhunya, 1993; Hayashi, 1994; UNEP, 1995; Wyszyn ska, 1995]. Bu testlere kısa zamanlı (short term) testler de denir [Bakale ve Mc Creary, 1990; Wyszyn ska, 1995; Trosko, 1997]. Çizelge 1.1'de mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri gösterilmiştir.

Zaman açısından en pratik ve hızlı cevap veren test sistemleri genellikle bakteriyel testlerdir [Maron ve Ames, 1983; Brockman ve ark., 1984; Quillardet ve Hofnung, 1985; Hofnung ve Quillardet, 1986]. Bu testlerin tercih edilme nedeni; bakterilerin kolayca sağlanabilen basit besi ortamlarında hızlı üreyebilmeleri, üretim maliyetlerinin düşük olması ve uygulamalarının kolay olmasıdır [Hofnung ve Quillardet 1986, Josephy ve ark., 1997; Uysal, 2006]. Bu testlerle, kimyasal maddelerin genetik özelliklerde oluşturduğu sonuçlar hızla tayin edilmekte ve elde

edilen sonuçlarla maddelerin karsinojenik potansiyelleri arasında ilişkiler kurulmaktadır [Tübitak, 1985; Yüksel, 2005; Ergin 2009].

Çizelge 1.1. Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri [Diril, 1988; Öncül, 2009]

Kısa Zamanlı Testler	İzlenen Genetiksel/ Biyokimyasal Yol	Kaynak
1. <i>S. typhimurium</i>	Histidin okzotrofları	Ames ve ark, 1973b, Maron ve Ames, 1983.
2. <i>E. coli</i>	Arjinin/triptofan oksotrofları	Green ve Muriel, 1976
	Profaj indüksiyonu	Elesperu ve Yarmolinsky, 1979.
	Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu	Moreu ve ark., 1976. Rosenkranz ve Mermelstein, 1980.
	SOS cevabı	Slater ve ark., 1971, Leifer ve ark., 1981.
	Büyüme inhibisyonu	Quillardet ve Hofnung, 1985.
	DNA onarımı hatalı suşlar	Gümüş ve ark., 1996.
3. <i>Vibrio harveyi</i>	GTP bağlayıcı proteini (cgtA geni) hasarı olan suşların kimyasal ile muamelesinden sonra neomisin dirençli mutantların tespiti	Czy'z ve ark., 2002.
4. <i>Bacillus subtilis</i>	Büyüme inhibisyonu	Leifer ve ark, 1981.
	DNA onarımı hatalı suşlar	Kada ve Hirano, 1980.
5. <i>Neurospora crasa</i>	Adenin okzotrofları	Brockman ve ark., 1984.
6. Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri ile	HGPRT (Hipoksantinguanin fosforiboziltransferaz) lokusundamutasyonlar	Beudet ve ark., 1973.
7. <i>Drosophila melanogaster</i>	Kromozomal hatalar	Vogel ve Sobels, 1976.
8. Suriye hamsteri embriyo hücreleri	Morfolojik transformasyonlar	Pienta ve ark. 1977
9. Çin hamsteri hücreleri	Kardeş kromatid değişimi	Perry ve Evans, 1975
10. İnsan periferik lenfositleri	Kromozomal hatalar	Preston ve ark., 1981

Karsinojenlerin araştırılmasında mutajenitenin temel teşkil etmesinin önemli nedenlerinden birincisi genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu, İkincisi karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur [De Serres, 1976, Ramel ve Rannug 1980; Tübitak, 1985; Temizkan, 1996; Uysal, 2006; Ergin 2009].

Çoğunlukla kabul edilen bir görüşe göre, doğrudan veya metabolize edildikten sonra kanserojenik etki gösteren tüm maddelerin aynı zamanda mutajenik etki gösterecekleri yani mutajen olabilecekleri vurgulanmaktadır [Bağcı 1985; Temizkan, 1996; Uysal, 2006]. Bakteriyel test sistemlerinde de mutajen olduğu saptanan bir çok bileşiğin aynı zamanda karsinojen olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2012]. Örneğin; Mc Cann ve Ames'in 1976'da mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişkiyi araştırdıkları bir çalışmada, 300 kimyasal madde kullanılarak, bakteriyel test sistemlerinde mutajen olduğu tespit edilen birçok bileşiğin aynı zamanda karsinojen olup olmadığı Salmonella / mikrozom test sistemi ile araştırılmış ve 175 karsinojen maddenin 157'sinin mutajenik etkili, karsinojenik etki göstermeyen 108 maddenin 94 tanesinin mutajenik etkili olmadığı saptanmıştır. Sonuç olarak, karsinojen etki gösteren bileşiklerin % 90'ı mutajenik etki gösterdiği, karsinojen olmayan bileşiklerin % 87'sinin de mutajenik etki göstermediği bulunmuştur [Mc Cann ve Ames, 1976]. Ancak tüm mutajenik maddelerin kanserojenik etki göstermeleri beklentisi ise bazı durumlarda gerçekleşmemektedir. Bunun nedeni, mutasyonun genetik materyalin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkabilmesine rağmen kanserin çok basamaklı karmaşık bir biyolojik olaylar sonucu ortaya çıkması olabilir [Bağcı, 1985].

Günümüzde bakterilerin kullanıldığı mutajenite test sistemlerinin kullanım alanları arasında; çeşitli kimyasalların potansiyel karsinojenitelerinin incelenmesi, kompleks karışımlardan, biyolojik olarak etkin bileşiklerin belirlenmesi, prokarsinojenlerin öncül ya da son metabolitlerinin saptanması, vücut sıvılarının ve atıklarının test edilmesiyle, insanların mutajen ve karsinojenlere maruz kalma düzeylerinin izlenmesi, kimyasalların mutajenik etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar,

konakçılar üzerinde yapılan deneyler, karsinojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptama şeklinde sıralanabilir [Öksüzoğlu, 2000].

Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom test sistemi, Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiştir. Ames testi, kimyasal maddelerin toksik, mutajenik, karsinojenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın kullanılan, geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden birisidir [Maron ve Ames, 1983; Akyıl, 2006].

Ames testinin amacı, yapay mutasyonla oluşturulmuş *Salmonella typhimurium*'un His- (oksotrof) olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra tekrar mutasyon geçirip His+ hale geri dönüşmesi temeline dayanır. Fakat normalde mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakterilerde olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant sayısından daha fazla sayıda revertant koloni elde edilmesi gerekir [Maron ve Ames, 1983; Alcama, 1991; Tottora 1992].

Tüm bunlar göz önünde bulundurarak, her gün artan kimyasal maddelerin mutajenik, karsinojenik etkilerinin saptanması çalışmalarına katkıda bulunmak için tarımda bitki gelişim düzenleyicisi olarak geniş bir kullanım alanına sahip olan 4 farklı sentetik hormonun (Gibberellic acid, Kinetin, Chlormequat Chloride, 2,4,6- trichlorobenzoic acid) mutajenik aktivitesinin kısa zamanlı test sistemi olan Ames/Salmonella testi uygulanarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mutasyonlar

DNA kalıtsal bir materyal olduğu için gelecek nesillere değişmez bir formda aktarılması gerekir [Akman, 1983]. Fakat, zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında mutasyon denen değişiklikler gözlenebilir. DNA'nın türe özgü kalıtsal kombinasyonu değişmeksizin, taşıdığı bilgi içeriğinde meydana gelen değişmeye “mutasyon” denir [Akman, 1983; Bağcı, 1989; Oraller, 1990; Demirsoy, 1992].

Mutasyon vücut hücrelerinde ya da üreme hücrelerinde olabilir. Vücut hücrelerinde olan mutasyonlara “somatik mutasyonlar” denir. Bu mutasyonlar hastalıklara ve dejenerasyonlara yol açarak gelişmeyi ve metabolizmayı olumsuz etkileyebilirler. Birçok kanser türünün somatik hücrelerde genellikle bir mutasyon nedeni ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Üreme hücrelerinde görülen mutasyonlara ise “germinal mutasyonlar” denir. Üreme hücrelerinin DNA'sında görülen değişimler genetik içeriğin farklılığına yol açar ve bu mutasyon kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılır [Suzuki, 1989; Erkan, 1992; Strachan, 1996].

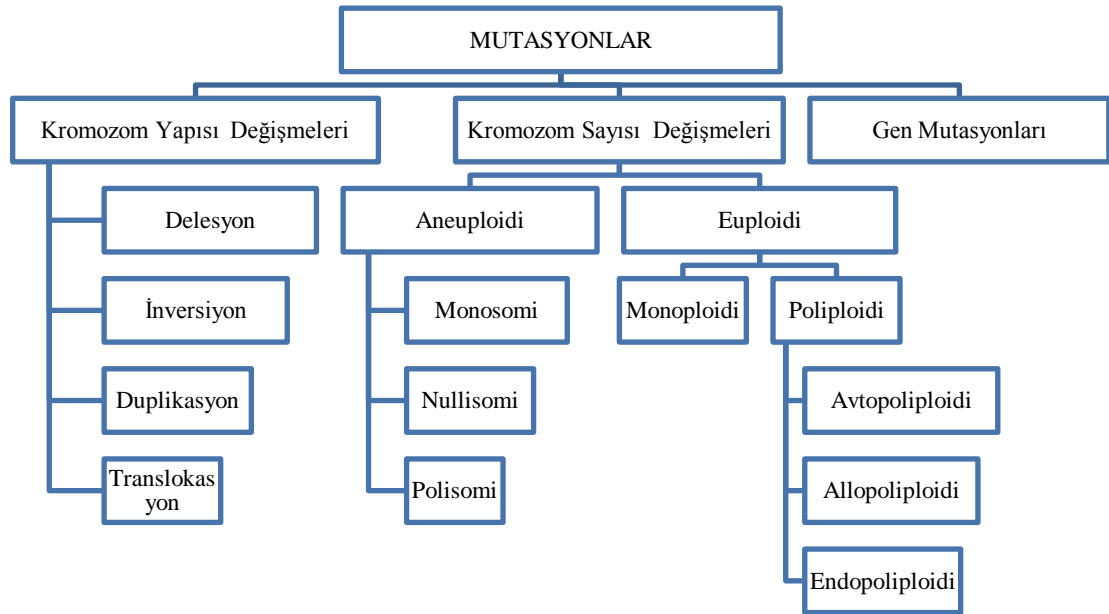
Mutasyonlar şu özellikleri gösterirler:

1. Kalıtsal maddedeki nükleotitlerin çeşit, sayı veya sırasındaki kalıtsal olan değişikliklerdir.
2. Daha önceden şifrelenmemiş ya da programlanmamış değişikliklerdir.
3. Nadiren meydana gelen değişikliklerdir. Çünkü kalıtsal madde şifrelenmemiş ender değişimlerin oluşumuna karşı çift sarmal yapısı ve proteinlere bağlanması ile kendini koruma eğilimindedir.
4. Replikasyonun doğruluğu ve onarım sisteminin etkinliği ile hata oluşumu en aza indirilmektedir [İstanbul Üniversitesi, 2012].

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebildiği gibi, mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana gelebilirler. Mutasyonların kendiliğinden meydana gelebilme olasılığı çok düşük olmasına karşın, mutajenlerin

etkisi ile mutasyon frekansı oldukça yükselmektedir [Bağcı, 1989; Oraler, 1990; Yüksel, 2005; Akyıl, 2006; Barış, 2007; Dadakoğlu, 2011].

Mutasyonlar kromozomların sayı veya yapılarındaki değişiklikler ile sitolojik olarak kromozom düzeyinde gözlenemeyen ancak bireyin fenotipindeki farklılıkla saptanabilen gen mutasyonları olarak gruplandırılabilirler. Mutasyon çeşitlerinin sınıflandırılması Şekil 2.1’de gösterilmiştir [Oraler, 1990].



Şekil 2.1. Mutasyon çeşitlerinin sınıflandırılması [Bilge, 1974; Kuru, 2005],

2.1.1. Kromozom yapısı değişmeleri

Kromozom yapısındaki değişmeler kromozom kırılmaları şeklinde ortaya çıkar [Erensayın, 2000]. Bir kromozom kırılmasını, kromozom segmentlerinin tekrar birleşmesi işlemi izleyebileceği gibi bu şekilde tekrar birleşme olayı oluşmayabilir. Segmentler, orijinal yapı halinde tekrar birleşirse normal olarak kırılma da farkedilemez olur. Eğer tekrar birleşme meydana gelmemiş ise kromozomal değişmelerin bir veya birkaçı meydana gelebilir [Erensayın, 2000; Akyıl, 2006]. Kromozom yapısı mutasyonları Şekil 2.2’de gösterilmiştir.

Delesyon

Delesyonlar, DNA molekülünden bir ya da daha fazla nükleotid veya baz çiftinin ayrıldığı mutasyonlardır. Delesyonlar, kromozomların uç kısmından ya da iç bölgelerinden olabilir. İçten eksiklik durumunda kromozom iki noktasından kırılır ve kırılan parça ayrılıp serbest uçlar birbirine bağlanır. Kromozomun sarmal yapısından dolayı oluşan halka kopmaları da bu gruba girer. Uçtan kopmalarda ise tek noktadan kırılma olur [Öner, 2003; Barış, 2007].

Duplikasyon

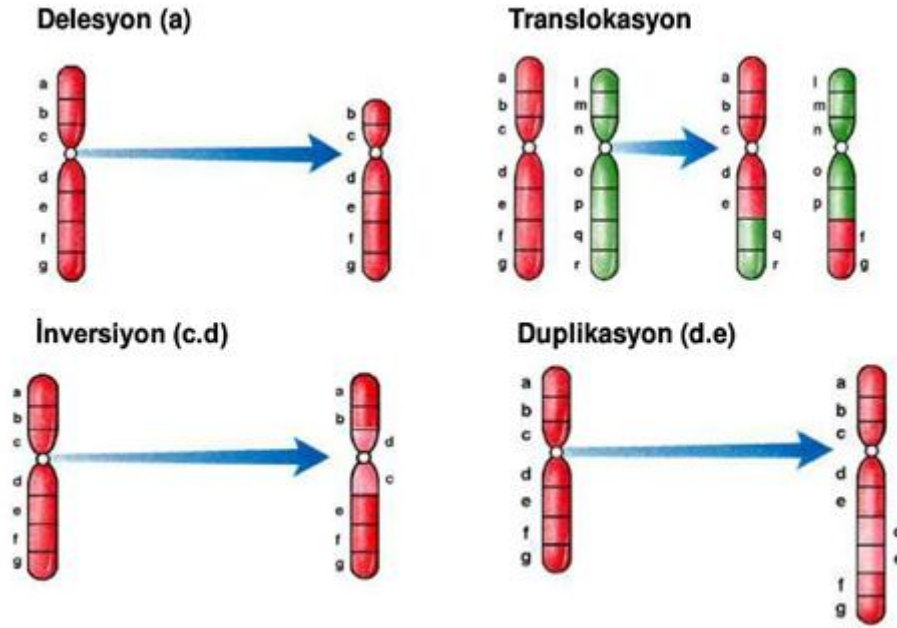
Normal olarak diploid bir hücrede bir kromozom kısmının iki'den fazla bulunması duplikasyon olarak bilinmektedir. O halde duplikasyonda, delesyonun aksine bir parça çoğalması vardır [Erensayın, 2000; Kuru, 2005]. Duplikasyonun üç değişik özelliği bulunur. Birincisi, duplikasyon geninin birden fazla kopyasının bulunmasını sağlayabilir. İkincisi, delesyonlarda olduğu gibi, duplikasyon sonucu fenotipik çeşitlilik oluşabilir [Öner 2003; Barış, 2007; Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2012]. Üçüncüsü, güvenilir bir teoriye göre, duplikasyonlar evrim sürecinde genetik çeşitliliğin önemli bir kaynağıdır [Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2012].

Translokasyon

Bir kromozomun bir parçası ile homolog olmayan başka bir kromozom parçasının yer değiştirmesi translokasyon olarak ifade edilmektedir. Basit translokasyon ve resiprokal translokasyon şeklinde iki esas translokasyon çeşidi vardır. Basit translokasyon, kırılmayı müteakip bir kromozom segmentinin homolog olmayan diğer bir kromozoma transfer edilmesi olayıdır [Erensayın, 2000; Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2012]. Resiprokal translokasyon aynı büyüklükte olması gerekmeyen segmentlerin homolog olmayan kromozomlar arasındaki yer değiştirmesi olayıdır [Erensayın, 2000].

İnversiyon

İnversiyon, bir kromozomun iki defa kırılması ve kopan parçanın 180° ters dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması şeklindedir [Falakalı, 1993; Öner, 2003,]. Kırılmadan önce kromozomda halkaya benzer bir yapı oluşur. Kırılmayla ortaya çıkan yapışkan uçlar birbirine yaklaşır ve tekrar birleşir. Bu durumda gen sayısı ve özelliği aynı olmasına rağmen diziliş sırası değişir. Ters çevrilen parça eğer sentromer içeriyorsa inversiyon perisentrik, içermiyorsa parasentrik inversiyon olarak isimlendirilir. [Öner, 2003; Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2012].



Şekil 2.2. Kromozom yapısı mutasyonları [Belgeler, 2012]

2.1.2. Kromozom sayısı değişimleri

Kromozom sayısındaki çeşitlilik, bir ya da daha fazla haploit kromozom takımının ilavesinden, bir ya da birden fazla kromozom ilavesi veya kaybına kadar değişkenlik gösterir [Öner, 2003]. İzole edilmiş hücre ya da dokulara çeşitli mutajenik maddelerin uygulanmasıyla da bu mutasyonlar meydana getirilmektedir. Euploidi ve aneuploidi olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır [Demirsoy, 1991].

1)Euploidi

Bir türdeki kromozomların n veya n 'in tam katları kadar artmasıdır. Monoploidi, poliploidi olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Kromozom takımları sayısında tam katlar halinde artma poliploidi, azalmalar monoploidi olarak adlandırılır. Poliploidi, autopoliploidi, allopoliploidi ve endopoliploidi olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Bir poliploidin sahip olduğu takımların hepsi aynı türe ait ise olaya autopoliploidi, farklı türe ait ise allopoliploidi denir [Demirsoy 1988; Temizkan, 1996]. Endopoliploidi ise, endomitoz adı verilen olayın sonucudur. Endomitozla oluşan kromatidler birbirinden ayrılarak bağımsız kromozomlar halini alırsa olaya endopoliploidi denir [Kuru, 2005; Yüksel, 2005]. Euploidide temel kusur, hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin olmamasıdır (endomitoz). Bunun sonucunda kromozom sayıları her bölünmede katı kadar artmış olur [Başaran ve ark, 1995, Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2012].

2)Aneuploidi

Bir takımdaki kromozomların birinin veya birden fazlasının sayısını değiştirmesi olayıdır. Aneuploid bir birey, normal haploid sayıdan fazla veya eksik sayıda kromozom içeren gametlerin, birleşmesiyle meydana gelen bir zigotun ürünüdür [Temizkan, 1996; Demirsoy, 1988; Yüksel, 2005; Kuru, 2005].

Aneuploidi başlıca 3 gruba ayrılır. Bunlar;

1. *Monosomi*: Diploid bir fertte tek bir kromozom eksik olması olayıdır.
2. *Nullisomi*: Bir canlıda bir kromozomun, homologu ile eksik olması olayıdır.
3. *Polisomi*: Bir takımda bulunan kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısını yükseltmesi olayıdır [Temizkan, 1996; Demirsoy, 1988; Yüksel, 2005].

2.1.3. Gen mutasyonları

Gen mutasyonları veya diğerk bir deyişle ‘nokta mutasyonları’ kromozomların yapısında bir değişikliğe sebep olmaz ve mikroskopla da görülmezler. Gen mutasyonları DNA’da bulunan nükleotid dizisinin ya da bazlarının değişmesinden ileri gelir. Baz sırasının veya AT / GC oranının değişmesi, o gene özgü enzimin tamamen kaybolmasına ya da etkisinin azalmasına neden olur. Bir gen, binlerce baz çiftinden meydana gelmiş bir birim olduğundan ve kuramsal olarak her bazda mutasyon olabileceğinden, bir genin en azından baz çifti kadar mutasyon çeşidi olabilir [Demirsoy, 1992].

Gen mutasyonları hem somatik hücrelerde, hem de gametlerde meydana gelebilir. Mutasyonla, genellikle dominant genler resesif hale geçerler. Çok seyrek olarak, mutasyonla meydana gelmiş olan resesif bir gen, başka bir mutasyonla tekrar kendisini veren dominant gene dönebilir. Bu olaya ters mutasyon veya geri mutasyon adı verilir [Bilge, 1981; Oraler, 1990].

Gen mutasyonları genetik materyale etkilerine göre çeşitli alt sınıflara ayrılırlar [Ateş, 2002].

1) *Tek bir baz çiftini etkileyen değişiklikler*: Bu tip mutasyonlara ‘nokta mutasyonları’ (point mutation) denir. Bu mutasyonlar da farklı sınıflara ayrılabilir [Suzuki, 1989; Öner, 2003].

a) *Baz ikamesi (base substitution: Bir baz çiftinin yerine başka bir baz çiftinin girmesi)*: Bu tip değişiklikte, gen yapısındaki bir pürin yerine diğerk bir pürinin veya bir pirimidin yerine diğerk bir pirimidinin girmesi söz konusu olabilir. Bu olay *transisyon* olarak adlandırılır. DNA yapısında bir pürin yerine bir pirimidin geçmesi de mümkündür. Bu tip mutasyonlara da *transversiyon* denir [Öner, 2003]. Nokta mutasyonu oluşturan bromüraciil, nitrikasit, formalin gibi kimyasal maddeler, DNA’daki özel bazlarla tepkimeye girer ve onların yapısını değiştirir. DNA’da bazların yerine geçen bu kimyasallara *baz analogları* denir. Ayrıca nadiren iki

pirimidinin ve pürinin birleşerek A - G ve C - T baz çiftlerini meydana getirmesi; daha sonraki DNA replikasyonlarında A - T ve G - C dönüşmesine neden olur. DNA kalıp olarak görev yaptığı sırada bazların herhangi birinde oluşabilecek 'tautomerik' bir değişikliğin, moleküllerin hidrojen bağı oluşturma özelliklerini de değiştirmesi nedeniyle, timinin guaninle veya adeninin sitozinle çiftler oluşturması olanağı daima vardır [Demirsoy, 1992]. DNA molekülünün, bir protein için olan kodlarının bir parçasında eğer bir bazın yerine bir başka baz geçerse, bu genin transkripsiyonu sonucu oluşacak mRNA'nın yapısına hatalı bir baz katılacaktır ve sonuçta bu durum protein sentezinde de yer değiştiren aminoasitlerle sonuçlanır. Bu mutasyona *yanlış anlamlı mutasyon* denir. Bazen de yer değiştiren bazların etkisi sonucu mRNA molekülünün ortasında bir stop (anlamsız) kodonun meydana gelmesiyle fonksiyonel bir proteinin sentezi engellenebilir ve protein yalnızca bir fragmenti sentezlenmiş olur. Böyle mutasyonlara *anlamsız mutasyon (nonsense)* denir [Tortora, 1992].

b) *Bir bazın aradan çıkması veya yeni bir baz çiftinin yapıya girmesi*: DNA molekülünde bir nükleotid'in yapıdan ayrılmasına 'delesyon', yapıya katılmasına 'insersiyon' denir [Akman, 1983].

2) *Birden fazla baz çiftini ilgilendiren değişiklikler*: çerçeve kayması (frameshift mutation) mutasyonlarında bir ya da birden çok nükleotit çiftleri DNA'dan kopar (delesyon) ya da DNA'ya eklenir (insersiyon). Bu durum ise okunan çerçevenin translasyonunu değiştirir. Böylece translasyon sırasında tRNA'ların tanıdığı kodonlar değişir. Çerçeve kayması mutasyonlarında her zaman uzun mesafede yanlış anlamlı ve inaktif protein üretilir ya da en sonunda bir anlamsız kodonun translasyonu sonlandırması ile protein sentezi durdurulabilir [Suzuki, 1989; Tortora, 1992; Öner, 2003].

2.2. Mutajenler

Mutasyona neden olan ve DNA'da değişmelere yol açan ajanlara mutajen denir. Kanserle neden olan ajanlar ise kanserojen olarak ifade edilir ve bunlar da mutajendir [Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2012]. Mutajenlerin kullanılması mutasyon meydana

gelme olasılığını arttırmaktadır. Mutajenler genellikle genler üzerinde fark gözetmeden etkili olurlar [İstanbul Üniversitesi, 2012] Temel olarak mutasyon oluşturabilen faktörler; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç ayrı grupta sınıflandırılabilir.

Fiziksel mutajenler

Fiziksel mutajenler; sıcaklık, manyetik ve elektriksel alan, UV, proton, nötron ışınları, pH gibi etkenlerdir. Fiziksel mutajenler etki şiddetine ve sürecine göre geçici veya kalıcı değişimlere yol açarlar [Erkan, 1992]. Genellikle baz çifti değişimlerine yol açarlar. DNA'da onarımı çok zor olan çift iplik kırıkları oluştururlar. DNA omurgasındaki deoksiribozları etkilerler. Deoksiribozla etkileşime girecek reaktif oksijen türlerinin üretimine yol açarlar. X ve γ ışınları gibi iyonlaştırıcı ışınlar kuvvetli fiziksel mutajenlerdir [İstanbul Üniversitesi, 2012].

Yüksek sıcaklık moleküllerin kinetik enerjilerini artırmak suretiyle mutasyonlara sebep olur. Moleküllerin hızla hareket ederek birbirleriyle çarpıştıkları bir ortamda moleküler kazalar veya yanlışlıkların meydana gelme olasılığı artar [Kuru, 2005]. Daha az enerjili olmasına karşın UV'de kuvvetli bir mutajendir. UV'nin bazlar üzerindeki etkisi; bazlardaki tautomerik değişimler için gerekli enerjiyi vermek ve elektron hareketi için uyarı yaparak mutasyon oluşumuna yol açmak, primidin dimerlerinin oluşumuna neden olarak DNA'da geçici ya da kalıcı değişimlere yol açmaktır [İstanbul Üniversitesi, 2012].

Biyolojik Mutajenler

Biyolojik mutajenler olarak virüsler ve transpozibil elementler bilinmektedir. Virüs genomu konak hücrenin DNA'sına girdiğinde, kendi DNA'sında bulunan bazı genleri konak DNA' sına ekleyerek veya ayrılırken beraberinde bir parçayı da götürerek onun genetik yapısını değiştirdiği için mutasyon olarak kabul edilir. Transpozonlar ise genom içinde bir pozisyondan diğerine hareket ederler ve

kromozom kopması gibi genetiksel değişikliklere neden olurlar [Erkan, 1992; Yüksel, 2005].

Kimyasal Mutajenler

Kimyasal mutajenik maddelerin etkisi altında oluşan mutasyonlar kolayca tamir edilebilirler. Mutajenik maddeler, genellikle, transisyonel ve transversiyonel mutasyonlara yol açarlar. Bazıları da bazların çıkmasına ve DNA'da kopmalara sebep olurlar [Mikrobiyoloji, 2012]. Kimyasal mutajenler de etki biçimlerine göre 5 alt grupta incelenebilir. Bunlar;

a) *Baz analogları*: Nükleik asit biyosentezi sırasında, pürin ve pirimidinler yerine geçebilen moleküllere baz analogları denir ve bunlar genellikle mutajenik kimyasallardır [Öner, 2003]. Baz analogları bakteri kültürüne ilave edildiğinde sentezlenen DNA'nın yapısına girerler ve ilk replikasyonda çift yönlü transisyona neden olurlar. Baz analoglarının kullanılmasıyla geri mutasyon meydana getirilebilir [Erkan, 1992].

b) *Akridin ajanlar*: Alkilleyici ajanlar nükleotidlerin amino veya keto gruplarına -CH₃ veya CH₃-CH₂- gibi bir alkil grubu eklerler [Öner, 2003; Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2012]. "akridin boyaları" adını alan kimyasal mutajenler çerçeve kayması mutasyonlarına neden olur [Öner, 2003]. Akridin mutasyonları diğer transversiyon mutasyonlarından farklı olarak daima gen fonksiyonlarının tümüyle kaybolmasına yol açar. Birden fazla baz çifti içeren DNA segmenti gen yapısından çıkar (delesyon) ya da uzun DNA segmentleri gen yapısına girer (insersiyon). Akridin boyalarının mutasyona yol açtıkları noktalar DNA üzerinde gelişmiş güzel dağıtılmıştır ve bu noktalara 'hot spots' (sıcak noktalar) denir [Erkan, 1992]. Akridin boyaları histolojide nükleik asitlerin boyanmasında, lokal antiseptik olarak, veteriner hekimlikte akut mastitis ve septisemide intravenöz enjeksiyon yolu ile kullanılır [Vural, 1984].

c) *Apürinik bölgeler ve diğer lezyonlar*: Diğer bir mutasyon tipi de, sağlıklı bir çift-sarmal DNA molekülündeki azotlu bazlardan birinin, genellikle guanin ya da adeninin, spontan olarak kaydedilmesiyle ilgilidir. Pürin halkasının 9 nolu azotu ile deoksiribozun 1 nolu karbonu arasındaki glikozidik bağın kırılmasıyla oluşan bu bölgelere “Apürinik bölgeler” (AP bölgeler) denir. Bir AP bölgede bir bazın yokluğu, eğer ilgili zincir transkripsiyon ve translasyona uğramaktaysa genetik kodu değiştirecektir. Eğer replikasyon olursa, AP bölge kalıp olarak uygun olmayacak ve replikasyonun durmasına neden olabilecektir. Eğer yapıya bir nükleotid girmişse, bu nükleotid genellikle yanlışır ve diğer bir mutasyonun oluşmasına neden olur [Öner, 2003].

d) *Tautomerik değişmeler*: Watson ve Crick DNA'daki pürin ve pirimidinlerin tautomerik formlarda yani azotlu bir bazın her birinin, molekülde sadece tek bir protonun kayması ile farklılık gösteren, yapısal izomerler olarak adlandırılan alternatif kimyasal formları halinde bulunabileceğini ileri sürdüler. Biyolojik bir öneme sahip olan tautomerler, sitozin ve adeninin amino-imino formları ile timin ve guaninin keto-enol formlarını içerir. Bu tür bir kayma molekülün bağ özelliğini değiştireceğinden, tautomerik kaymaların baz çifti değişmelerine veya mutasyonlara yol açacağı ileri sürülmüştür [Öner, 2003].

e) *Ultraviyole radyasyonu ve timin dimerleri*: Pürin ve pirimidinlerin ultraviyole (UV) radyasyonunu yaklaşık 260 nm dalga boyunda yoğun olarak absorbe etmeleri, nükleik asitlerin analiz ve tanısında yararlanılan bir özelliktir. UV radyasyonunun zararlı etkisi, özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu pirimidinler üzerindedir. Sitozin–sitozin ve timin–sitozin dimerleri de oluşabilir, fakat sayıları daha azdır. Dimerler DNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonu durdurur. Replikasyonun durması, UV radyasyonunun mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisini sorumlusu olarak görülmektedir [Öner, 2003].

2.3. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu

Metabolizma, yaşam için gerekli olan ve organizmada meydana gelen bütün kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Organizmaya yabancı olan kimyasal maddelere “ksenobiyotik” adı verilir. Biyolojik sisteme giren yabancı maddeler, enzimlerin katalitik etkisi ile metabolize edilerek, orijinal bileşiklere oranla suda daha çok çözünebilen farklı ürünlere dönüştürülür. Bu olay için “biyotransformasyon” kelimesi daha uygun bir terim olarak kullanılmaktadır. [Vural, 1984; Bağcı, 1985; Murray, 1993].

Biyotransformasyon, ilaç etkisinin ortadan kalkması, toksisitenin azalması (detoksifikasyon=zehirsizleştirme) ve ilacın vücuttan daha kolay ve daha kısa sürede atılması olaylarıdır [Arınç, 1994; Watson, 1997]. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu genellikle özellikli olan kompleks enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimlerin önemli bir kısmı karaciğerde yerleşmiştir. Ayrıca biyotransformasyon olayı barsak, böbrek, akciğer, beyin ve deride de olabilir. Ancak vücut sıvıları içerisine giren yabancı bir kimyasal molekül dolaşım sistemi yardımı ile direkt karaciğere taşındığı için biyotransformasyonu gerçekleştiren kompleks enzim sistemleri bu organda daha aktif olarak çalışmaktadır [Sipes ve ark, 1997]. Karaciğerdeki mikrozomal enzimler toksik maddelerin metabolizmasında önemli rol oynarlar. Mikrozomal enzimlerin yaptığı oksidasyon olayında P-450 sitokromuna bağlı değişik etkili oksidazlar (monooksijenazlar) rol oynar [Vural, 1984; Britvic, 1986; Rollas, 1992; Dökmeci, 1994; Vural, 1996].

Biyotransformasyon olayı Faz I ve Faz II reaksiyonları olmak üzere iki evrede gerçekleşir. Faz I reaksiyonları oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz olaylarının (kopma), Faz II reaksiyonları ise çeşitli konjugasyon veya sentez olaylarını içerir. Faz I reaksiyonlarında toksik maddede oksitlenme, indirgenme veya hidroliz sonucu polar bir grup oluşur. Yani toksik maddeye fonksiyonel grup ilave edilir. Faz II reaksiyonların da ise fonksiyonel gruba başka bir madde bağlanarak maddenin suda çözünürlüğü artırılır [Vural, 1984; Gatehouse ve ark, 1990; Rollas, 1992; Kayaalp, 1995].

Oksidasyon, sitokrom P450 enzimleri tarafından yapılır. Bunlara, ‘‘oksidazlar’’ veya ‘‘monooksijenazlar’’ denir ve ilaç molekülüne oksijen sokarlar. Ayrıca bu sistemle eşgüdömlü alışan NADPH-sitokrom P450 redöktaz sistemi vardır. Enzimin aktif noktası demir iyonudur. Redöksiyon, NADPH, FAD ve diğer flavinlerin yardımıyla olur. Olayların çoğu aldehydlerin alkollere dönüşümü, Azo (N=N) grubunun aminlere dönüşümü ve nitro grublarının amin veya hidroksilamin grubuna dönüşümü şeklinde olur. Kopma, ya ilaç molekülünden bir grubun koparılması ya da molekülü oluşturan daha küçük moleköllere ayrılması şeklinde gerçekleşir. Konjugasyon, bir ilaç veya onun metabolitine bir radikalın veya endojen bir molekülün kovalent bağla bağlanmasıyla olur [Vural, 1984; Kadbular, 1989; Ergenç, 1990; Rollas, 1992; Kaya, 1992; Dökmeci, 1994].

Mikrozomal enzimler

Oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzim sistemi, hücrenin endoplazmik retikulumundan elde edilen mikrozomlarda yerleşmiştir. Bu enzimler başlıca karaciğer mikrozomlarında olduğu gibi, başka dokularda da bulunmaktadır [Vural, 1984]. Vücuttaki diğer enzimlerden farklı olarak mikrozomal enzimler daha önce hiç karşılaşılmamış olan bir maddeyi tanıyıp onu etkisizleştirmek için molekülü parçalamak ve/veya başka bir molekül eklemek suretiyle başka maddelere (metabolit) dönüştürürler [Türk Farmakoloji Derneği, 2012]

Bu enzim sisteminin başlıca komponenti olan sitokrom P-450 bir hemoproteindir [Vural, 1984]. Sitokrom P450’ nin farklı substrat özgülüğu gösteren birçok formu vardır. Bu da, karaciğer monooksijenaz sisteminin geniş substrat özgülüğünün bir göstergesidir [Dadakoğlu, 2011]. Sitokrom P-450 enzim sistemi, yükseltgenme tepkimeleri esnasında NADPH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinökleotid), moleküler oksijen (O₂) ve Mg⁺² iyonuna gereksinim duyar. Substratın (SH) yükseltgenmesi sırasında moleküler oksijenin bir atomu substratı yükseltgerken (SOH), diğer oksijen atomu ise suya indirgenir. Moleküler oksijenin tek bir atomunu kullanarak substratı yükseltgedikleri için bu enzimler sitokrom P-450

monooksijenazlar olarak isimlendirilmektedir [Lehninger ve ark, 2000; Öncül, 2009].

Ayrıca, mikrozomal enzim sisteminin diğer önemli koplementerleri; bir flavo protein olan NADPH sitokrom P450 redüktaz ve NADPH' dan sitokrom P450' ye elektron taşıyan bir lipid olan sitokrom b5'dir [Rollas, 1992; Hollanberg, 1992; Kappers, 2000; Baydar, 2002].

2.4. Ames *Salmonella*/ Mikrozom Test Sistemi

Bruce Ames tarafından geliştirilen Ames *Salmonella* mikrozomal test sistemi, mutajen ve kanserojen maddelerin tespitinde kullanıldığı gibi, başta antioksidantlar olmak üzere çeşitli antimutajenik ve antikanserojenik etkileri olan inhibitör maddelerin de belirlenebildiği ve etkilerinin izlenebildiği, çok önemli, kısa zamanlı test sistemlerinden biridir [Kalaycıoğlu ve Öner, 1994].

Salmonella / Mikrozom testi hemen hemen tüm laboratuvarlarda rutin çalışmalarda uygulanır. 1970'li yılların başında geliştirilen bu yöntem, bakteri mutasyonu oluşan mutant kolonilerin saptanması prensibine dayanmaktadır. Bu test *Salmonella typhimuriumun* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlar ile elde edilmiş TA ve YG suşları ile uygulanmaktadır. En çok kullanılan bakteri suşları ise TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1538 suşlarıdır. Bu suşlardan TA 1535 ve TA 100 baz çifti değişimi, TA 1537, TA 97, TA 1538 ve TA 98 çerçeve kayması tipi mutasyonlar için duyarlıdır [Vural, 1984; Forman, 1991; Francasso, 1992; Kusamran ve ark, 1994; Smith, 1996; Wagner, 1996; Watanabe, 1996]. TA 102 suşu ise, *S. typhimurium* TA1535 ve TA100 suşları ile saptanamayan ve baz çifti değişimine neden olan mutajenleri tespit edebilmek amacı ile geliştirilmiştir [Mortelmans ve Zeiger, 2001].

Salmonella typhimurium, histidin operonunda oluşturulan farklı mutasyonlarla (his G, his C yada his D) gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür [Korkmaz, 2005]. Histidin bulunmayan ortamlarda bu

bakterilerin üremesi, dolayısı ile de koloni oluşumu gerçekleşemez. Histidin genindeki mutasyon bölgesinde veya bu genin yakınındaki bir bölgede oluşan yeni bir mutasyonla bu genin fonksiyonu düzeltilebilir ve hücreler histidin olmayan ortamda üreyebilirler. Bu nedenle, bu test sıklıkla bir “reversiyon (geri dönüşüm) yöntemi” olarak bilinmektedir [Mortelmans ve Zeiger, 2000].

Ayrıca test suşları histidin mutasyonuna ek olarak belirli mutajenlere karşı duyarlılıklarını arttıran başka mutasyonlar da içerirler. Bu mutasyonlardan biri Rfa mutasyonudur. Bu mutasyon normal hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllere karşı geçirgenliğini arttırmaktadır [Dadakoğlu, 2011]. Ayrıca DNA onarım mekanizmasında etkili olan uvr B mutasyonunu da içermektedir. Buna ilaveten ampisiline dirençlilik sağlayan pKM101 plazmitini içerir [Maron, 1983; Alcama, 1991; Tottora 1992].

Aynı zamanda *Salmonella*/mikrozom test sistemine, biyoaktif edici bir sistem olan rat karaciğeri mikrozom enzimlerini içeren S9 (9000xg süpernatant) fraksiyonu eklenerek memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır [Ames ve ark, 1973b; Mortelmans ve Zeiger, 2000]. Çünkü, birçok kimyasal madde kendileri mutajen olmadıkları halde memelilerin metabolizmasında oksidaz sisteminin etkisi altında aktif metabolitlere dönüşebilmektedir [Asal, 1983]. Karaciğer enzimlerinin Ames test sistemine eklenmesi ile kimyasal maddelerin biyotransformasyonu sonucu gösterebileceği etkinin saptanması ve kısa zamanda, düşük bir maliyetle bu kimyasal maddelerin memelilerde kanser oluşturma potansiyelleri hakkında tahmin yürütülmesi amaçlanmaktadır [Maron ve Ames, 1983; Paolini ve Forti, 1997; Mortelmans ve Zeiger, 2001].

Ancak Ames yönteminde pozitif sonuç veren bir ajan için, insan ya da diğer memelilerde de mutajenik veya karsinojenik etkilidir denilemez. Bakteriyel mutasyonun pozitif olması, ajanın potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamını taşır. Ames testi bu sebeple dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır [Yüksel, 2005].

Salmonella typhimurium LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş suşlarının genetik özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

2.4.1. Histidin mutasyonu

Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar ya DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri, ya da bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden olduğu mutasyonun esas mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir [Ames ve ark, 1973a].

S. typhimurium TA 100 ve TA 1535 suşlarında bulunan his G46 mutasyonu, histidin biyosentezindeki ilk enzim olan pirofosforilazı kodlayan PRATP his G geni üzerindedir. Bu mutasyon, his G geninde, lösin amino asidi kodonu yerine prolin amino asidi kodonu gelmesine neden olur. *S. typhimurium* TA 100 ve TA 1535 suşları, baz çifti değişimine neden olan mutajenlerin keşfinde kullanılan suşlardır [Levin ve Ames, 1986; Mortelmans ve Zeiger, 2000].

His D 3052 mutasyonu, *S. typhimurium* TA 1538 ve TA 98 test suşlarında bulunur. Bu mutasyon, histidinolü histidine çeviren, histidin biyosentezindeki son enzim olan L-histidinol dehidrogenazı kodlayan His D geni üzerindedir. His D 3052 mutasyonu, çerçeve kayması şeklinde bir mutasyon olup tek bir nükleotidin eksikliği sonucu oluşmuştur [Brayn ve ark, 1993; Mortelmans ve Zeiger, 2000]. His D3052 mutasyonu, His D geni içinde 8 kez tekrarlanan GC dizisine sahiptir. Bu dizi, -1 çerçeve kayması mutasyon bölgesinin yanındadır [Isono ve Yourna, 1974]. *S. typhimurium* TA 1538 ve TA 98 suşları, çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olan farklı mutajenler tarafından indüklenmesi ile tekrar his⁺ hale geri dönüştürülmektedir [Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000].

S. typhimurium TA 102 suşuna ait his G genindeki A-T baz çifti, tüm altı muhtemel baz çifti değişimi (transisyon/transversiyon) ile geri döndürülebilir. Bu mutasyon aynı zamanda oksidatif mutajenler, x ışınları, U.V. ışığı, bleomisin, hidrojen peroksit,

streptonigrin ve çeşitli aldehitler tarafından da geri döndürülebilir. DNA onarım sistemi sağlam olan *S. typhimurium* TA 102 suşu mitomisin C gibi DNA ya çapraz bağlanan ajanları da tespit etmektedir [Levin ve ark., 1984, Mortelmans ve Zeiger, 2000].

His D 6610 mutasyonu gene bir nükleotid eklenmesi sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. Mutasyonda etkilenen bölgede beş yerine altı sitozin dizisi bulunmaktadır. His G 428 mutasyonunda "ochre" stop kodonu varlığından dolayı His G geni inaktif durumdadır [Korkmaz, 2005].

Başlangıçta geliştirilen his- mutantlarının çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını arttırmak üzere, bu suşlara aşağıda bahsedilen bazı mutasyonlar eklenmiştir.

2.4.2. Rfa mutasyonu

S. typhimurium'da normal olarak mutajenlerin hücre membranına ulaşmalarında kısmi bir engel olarak iş gören bir kapsül bulunmaktadır. Bu kapsül lipopolisakkarit (LPS) yapısındadır. Rfa mutasyonu bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelmiştir. Lipopolisakkarit tabakanın kısmen yok olması ile normalde hücre içine giremeyen büyük moleküller hücre içine girmektedir. LPS kusurları mutajenin bakteri içerisine girmesini kolaylaştırarak, hücrenin daha duyarlı olmasına yol açmaktadır [Ames ve ark., 1973b; Claxton ve ark., 1987; Korkmaz, 2005].

2.4.3. UvrB mutasyonu

UvrB mutasyonu DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan *uvrB* geninde delesyon sonucu oluşmuştur. UvrB mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden dolayı *uvrB* geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasında "chl (nitrat redüktaz enzimi kodlayan genidir)" ve "bio" genleride çıkarılmıştır. Bio geni bakterinin biotin sentezinden sorumlu bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla

bakterilerin üreyebilmeleri için histidin amino asidinde olduğu gibi biyotin amino asidine ihtiyaç vardır [Ames ve ark., 1973b].

2.4.4. R faktörü

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA 1538 ve TA 1535 suşlarına, ampisiline dirençlilik geni taşıyan pKM 101 R faktörü plazmidin eklenmesiyle *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları elde edilmiştir [Ames ve ark., 1973a]. Plazmid içeren suşların, mutajenik olduğu gösterilmiş ajanlara karşı cevapları, plazmid içermeyen suşlara göre oldukça yükselmiştir. Plazmid içeren yeni suşlar, orijinal suşlarla zayıf ya da mutajen olmayan ajanlara karşı net bir pozitif cevap vermişlerdir. pKM 101 plazmidi bu suşların daha duyarlı olmasından sorumlu olan hata oranı yüksek onarım sistemi ile bağlantılı gen ürünleri içermektedir. Bu plazmid, DNA'nın kesme-çıkarma yoluyla onarım mekanizmasının inaktivasyonuna ve dolayısıyla spontan mutasyonların ve kimyasalların neden olduğu mutasyonların artmasına neden olur. Daha sonraki yıllarda, mutajenik özgülüğü *S. typhimurium* TA 1537 ile aynı olan, ancak pKM 101 plazmidi taşıdığı için çerçeve kayması mutajenlerine karşı ondan daha duyarlı olan *S. typhimurium* TA 97 suşu geliştirilmiştir. Oksidatif mutajenleri saptamak amacıyla da, yeni bir suş olan *S. typhimurium* TA 102 suşu geliştirilerek kullanıma girmiştir [Levin ve ark., 1982]. Bu suşta bir his G428 mutasyonu ve bir tetrasiklin dirençlilik geni taşıyan pAQ1 plazmidi bulunmaktadır.

Bilinen bakteriyel mutajenlerin büyük bir kısmını belirlemede çok hassas oldukları için TA 98 ve TA 100 kombinasyonu literatürlerde kabul görmüştür [Gatehouse ve ark., 1998]. Bu nedenle bu çalışmada 4 farklı Bitki Gelişim Düzenleyicisinin (Gibberellic acid, Kinetin, Chlormequat chloride, 2,4,6-trichlorobenzoic acid) mutajenitesi araştırmak için *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır.

2.5. Bitki Gelişim Düzenleyicileri (BGD)

Dünya nüfusunun hızla artmasına karşın, gıda açığının kapatılmaması nedeniyle, ürün miktarını artırabilmek için çareler aranmaya başlanmıştır. Üretimi ve verimi artırmak için mevcut doğal kaynaklardan maksimum düzeyde faydalanmaya çalışılmıştır [Kaynak ve Memiş, 1997; Çetinbaş, 2010]. Tarımsal üretimde temel amaç birim alandan bol ve kaliteli ürün elde etmektir. Tarım üreticileri bu amaca ulaşmak için, toprak işleme, sulama, budama, gübreleme, hastalık ve zararlılarla mücadele gibi çeşitli uygulamalarda bulunmaktadır. Bu uygulamaların yanında, Türkiye’de özellikle 1970’li yılların başından itibaren, büyümeyi düzenleyici madde denemeleri de tarım uygulamalarında yer almaya başlamıştır [Hızal, 1985]. Hormon etkisindeki çeşitli kimyasal maddeler tarımda verimin ve kalitenin düzenlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. [Nickell, 1973].

Bitkilerde büyüme en önemli fizyolojik olaydan biridir [Güleryüz, 1982; Akgül, 2008]. Kompleks yapılar gösteren yüksek organizasyonlu bitkiler düzenli olarak büyüüp gelişebilmek için hücreler arası iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde bu iletişimi sağlayan temel araç, bilgiyi kimyasal mesaj olarak hücreden hücreye taşıyan bitki büyüme düzenleyicileridir (BGD) [Özen ve Onay, 1999; Batem, 2012; Özen ve Onay, 2007].

Bitki büyüme düzenleyicileri kavramı; bitki büyümesini etkilediği belirlenen hem tabii hemde sentetik maddeler için kullanılır [Aydoğdu ve Boyraz, 2005]. Doğal bitki büyüme hormonlarının etkisine benzer etkiler gösteren, hatta bazen daha fazla etkilere sahip olan çeşitli sentetik büyüme hormonları geliştirilmiştir. Bu nedenle, bugün bitki hormonu denildiğinde bitkide büyümeyi etkileyen doğal ya da sentetik bir organik molekül anlaşılmaktadır [Akman ve Darıcı, 1998]. Bitki büyüme maddelerinin bir kısmı bitki büyüme ve gelişmesini uyarıp hızlandırmaktadır (stimülatörler). Bir kısmı ise büyüme ve gelişmeyi geriletken etkilere sahip olduklarından dolayı bunlara inhibitörler adı verilir [Bozcuk ve Topçuoğlu, 1982; Batem, 2012].

BGD'lerin ortak özellikleri şunlardır:

- 1) Bitki tarafından sentezlenmesi,
- 2) Oluştığı yerden başka bir yere taşınabilir olması,
- 3) Taşındığı yerde metabolik değişikliklere neden olması,
- 4) Çok düşük konsantrasyonlarda bile etki göstermesi [Kaynak ve Ersoy, 1997; Özen ve Onay, 2007]

Bitki büyüme düzenleyicileri beş grup altında toplanır: *oksinler*, *gibberellinler*, *sitokininler*, *absisik asit (ABA)* ve *etilen*. Bunlara ek olarak brassinosteroidler, poliaminler, jasmonatlar, oligosakkarinler ve salicylatlar da bazı araştırmacılar tarafından bu sınıfta değerlendirilirler [Westwood, 1993; Basra, 2000; Botany Online, 2003; Özen ve Onay, 2007; Tiaz ve Zeiger, 2008; Morsünbül ve ark., 2010; Salipazarıtarım, 2012; İstanbultarım, 2012]. Doğal BGD'ler arasında etilen %23'lük oranla dünyada en yaygın olarak kullanılan bitkisel hormonken, oksin %20 ile ikinci, gibberellinler %17 ile üçüncü sırada yer almaktadır. Sitokinin ve absisik asit ise dünyada henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır [Barut, 1995; Kumlay ve Eryiğit, 2011]. Bunlardan oksinler, gibberellinler ve sitokininler büyümeyi teşvik ediciler; absisik asit, etilen ve jasmonik asit ise büyümeyi engelleyiciler olarak gruplandırılırlar [Westwood, 1993; Fırat, 1998; Walsh, 2003]. Ayrıca bu grupların dışında bitki büyümesini engelleyici maddeler; Chlormequat Chloride (CCC), Daminozide, Maleik hidrazid, Ancymidol, Phosphon- Do ve Amo-1618, Paclobutrazol'dur [Kumlay ve Eryiğit, 2011].

Tarımda BGD'lerin başlıca kullanım amaçları; çelikle çoğaltmayı sağlamak, tohumların çimlenme gücünü artırmak, çiçeklenmeyi teşvik etmek veya geciktirmek, soğuğa dayanıklılığı artırmak, meyvelerde tohum oluşumunu artırmak, meyve iriliğini artırmak, meyve muhafaza süresini uzatmak, bitkilerin hastalık ve zararlılara dayanıklılığını artırmak, yabancı ot kontrolünü sağlamak, pamuk ve tahıllarda yatmayı önlemek, hasat öncesi meyve dökülmesine engel olmak, makinalı hasadı kolaylaştırmak için tüm bitkilerin aynı zamanda olgunlaşmasını sağlamak ve hasatta iş gücünü azaltmak, olgunlaşmayı hızlandırarak yatmayı engellemek, patateste dormansiyi kırmak, özellikle doku kültürü çalışmalarında kök-sürgün ve yumru

oluşumunu teşvik etmek şekilde sıralanabilir [Budak ve ark., 1994; Kaynak ve Ersoy, 1997; Majeed ve Asghari, 2006].

Oksinler

İlk olarak keşfedilen bitki büyüme düzenleyicisi oksinlerdir (Indol-3-asetik asit). Oksinler, bitkilerde büyümeyi ve gelişmeyi etkileyen en önemli gruptur. Genel olarak bitkinin her yerinde bulunmasına rağmen özellikle gövde ve kök uçlarında sentezlenir ve bitki eksenine içine hapsedilirler. Oksinler hücrelerin uzaması, kök ve gövde gelişimi, aksillar tomurcuk, çiçek ve meyve gelişimi gibi olaylarda görev yaparlar [Özen ve Onay, 2007]. Ayrıca pertonakarpik (çekirdeksiz) meyve oluşumuna da katkı sağlamaktadırlar. Bitkinin en önemli metabolik olaylarından olan solunumu hızlandırmakta ve hücre bölünmeyi gerçekleştirmektedir. Oksinler; bitkisel embriyogenez (embriyo oluşumu), fitotropizma (uyarıcılara tepki) aktivitelerinde etkili olmaktadır [Evans, 1984; Chen ve ark., 2001; Davies, 2004; Christian ve ark., 2006; Kılıç, 2007; Christian ve ark., 2008; Huang ve ark., 2008].

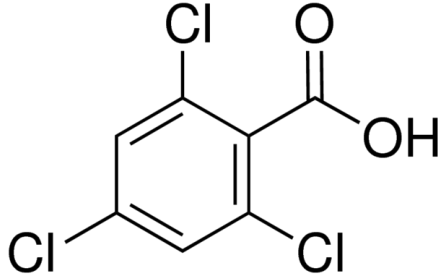
Bitkilerde bulunan ve temel oksin olduğu kabul edilen IAA (Indol-3-asetik asit) en önemli oksin grubudur [Farrow, 1976]. IAA dışında en yaygın bulunan oksinler; indol bütirik asit (IBA), naftalin asetik asit (NAA), naftoksi asetik asit (NOAA), fenoksi asetik asit (FOAA), 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), fenil asetik asit (FAA), parakloro fenoksi asetik asit (4-CPA/pCPA), 2-metoksi-3,6-diklorbenzoik asit (dikamba), İndol Propionik Asit (IPA), 3-CPA, 2,4,5-triklorofenoksi asetik asit(2,4,5-T), Triklorofenoksi propionik asit (2,4,5-TP), β -naphthoxyacetic acid (BNOA), 2,4,6-triklorobenzoik asit, 2,3,6-triklorobenzoik asit, fenoprop, potasyum naftthenat, sodyum naftthenat, aromatik asit'dir [Seçer, 1989; Westwood, 1993; Özen ve Onay, 2007].

Bu araştırmada mutajenite tayini için oksin grubundan seçilen hormon 2,4,6-trichlorobenzoic acid 'tir. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in molekül yapısı aşağıda gösterilmiştir.

Diğer isimleri : Benzoic acid, 2,4,6-trichloro-; 2,4,6-trichlorobenzoate.

Kimyasal formülü : $C_7H_3Cl_3O_2$

Yapısal formülü :



Şekil 2.3. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in molekül yapısı [Sigma-aldrich(a), 2012]

Molekül ağırlığı : 225,46 g/mol

CAS-No : 50-43-1

Erime ısısı : 158-162°C

Sitokininler

Bitki hücrelerinin bölünmesini yani sitokinezi uyarıcı faktörlerin araştırılması sırasında keşfedilen sitokininlerin daha sonra yapılan çalışmalarda besin elementlerinin taşınması, apikal dormansi, gövde apikal meristeminin oluşumu ve aktivitesi, yaprak gelişimi, tomurcuk dormansisinin kırılması ve tohum çimlenmesi gibi fizyolojik ve gelişimle ilgili birçok olayda etkili oldukları ortaya konulmuştur. Ayrıca, sitokininlerin, kloroplast farklılaşması, ototrofik metabolizma gelişimi, yaprak ve kotiledon genişlemesi gibi ışık tarafından kontrol edilen pek çok gelişme olayında rol oynadıkları belirlenmiştir [Akman ve Darıcı, 1998; Tiaz ve Zeiger, 2008]. Sitokininlerin yaprakta proteaz ve nükleazların oluşumunu engelleyerek, protein yıkımını önledikleri ve bu yolla yaşlanmayı geciktirdikleri sanılmaktadır [Kaynak ve Ersoy, 1997].

Bilinen sitokininlerin en yaygın olanları; Zeatin, 2ip (2-isopentenyladenine), BA (benziladenin), PBA (N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl) adenine), Kinetin (N⁶-

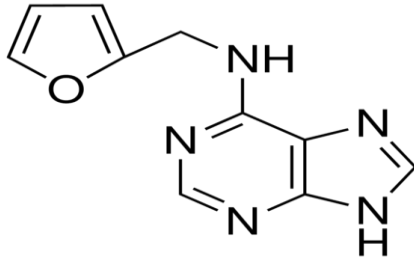
furfuryladenine), PBG (porphobilinogen) ve tetra hidropirani'dir [Westwood, 1993; Morsünbül ve ark, 2010]

Bu araştırmada mutajenite tayini için sitokin grubundan seçilen hormon *Kinetin*'dir. Kinetin'nin moleköl yapısı aşağıda gösterilmiştir.

Diğer isimleri : 6-Furfurylaminopurine, N6-Furfuryladenine

Kimyasal formölü : C₁₀H₉N₅O

Yapısal formölü :



şekil 2.4. Kinetin'in moleköl yapısı [Sigma-aldrich(b), 2012]

Moleköl ağırlığı : 215,21 g/mol

CAS-No : 525-79-1

Erime ısısı : 264 - 270 °C

Çok sayıda tohum veya meyve ile kök salgılarında bulunan zeatin, çok yaygın olmasına rağmen, kinetin, bu grubun sitokinler içerisinde en önemlisi ve uzun zamandan beri bilinen temsilcisidir [Seçer, 1989; Kılıç, 2007]. Kinetin ilk olarak keşfedilen sentetik bir sitokindir [Özen ve Onay, 2007; Tiaz ve Zeiger, 2008]. Bu maddenin diğerlerine nazaran büyük farkı esas itibariyle DNA'nın ısıyla parçalanması sonucu oluşan bir yan ürün olması ve büyümeyi özellikle hücre bölünmelerini teşvik ederek etkilemesidir. Bu yan üründe, adozin halkası üzerinde 9. pozisyondan 6. pozisyona yer değiştirmektedir [Tiaz ve Zeiger, 2008]. Kinetin aynı zamanda protein ve nükleik asit sentezine devam ettirerek özellikle kesme çiçeklerin uzun süre dayanmasını sağlar [Güleryüz, 1982; Westwood, 1993; Kaynak

ve Ersoy, 1997]. Kinetinin keşfi, hücre bölünmesinin basit bir kimyasal madde ile uyarılabildiğini göstermesi açısından önem taşımaktadır [Tiaz ve Zeiger, 2008].

Gibberellinler

Gibberellinler; mantarlar ve diğer yüksek yapılı bitkiler tarafından sentezlenir [Özen ve Onay, 2007]. Gibberellinler ismini ilk kez pirincin paraziti bir Ascomycetes türü olan *Gibberella fujikuroi*'de keşfedildiği için oradan almıştır [Akman ve Darıcı, 1998]. Ayrıca *Sphaceloma manihoticola*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Sphaceloma* sp., *Rhizobium phaseoli*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas* sp. ve *Phaeosphaeria* sp. türleri tarafından da sentezlenmektedir [Bilkay ve ark., 2010]. Gelişmekte olan tohum ve meyveler, genç yapraklar ve uzamakta olan sürgün ve kök uçlarında sentezlenen gibberellinler kimyasal olarak diterpenoid sınıfına girer. Gibberellinler biyolojik aktivitelerinden çok kimyasal yapılarına göre sınıflandırılan tek BGD grubudur [Özen ve Onay, 2007; Tiaz ve Zeiger, 2008]. Yapılan çalışmalarda 80'den fazla gibberellin türevi bulunmuştur. Gibberellik asit olarak bilinen C₂₀ gibberellin (GA₃) ilk olarak izole edilen ve üzerinde en fazla çalışılan gibberellindir [Özen ve Onay, 2007].

GA'ler bitkide, internodların uzamasında, tohumun çimlenmesi sırasında besin maddelerinin harekete geçirilmesinde, çiçeklenmenin uyarılmasında ve çiçek cinsiyetinin oluşmasında [Özen ve Onay, 2007; Tiaz ve Zeiger, 2008], yaprak ve meyvenin büyümesinde, tomurcukların gelişmesinde, bazı proteinlerin sentezinin kontrolünde DNA'daki bilgilerin mRNA'ya aktarılmasında [Özen ve Onay, 2007], genetik bodurluğun ortadan kaldırılmasında ve bazı enzimlerin sentezlenmesinde [Kaynak ve İmamgiller, 1997] etkilidirler.

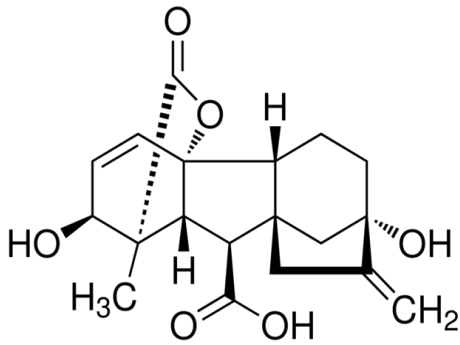
GA ticari olarak meyve üretiminde, arpadan malt eldesinde, şeker kamışının veriminin artırılmasında, bitki ıslahında, gibberellin biyosentezinin engellenmesinde (bazı bitkilerin uzamasının engellenmesi için), kereviz ve enginar da hasat verimini artırmada, kabakgillerde cinsiyet özelliğini kontrol etmede kullanılır [Tiaz ve Zeiger, 2008; Kumlay ve Eryiğit, 2011].

Bu araştırmada mutajenite tayini için gibberellin grubundan seçilen hormon *Gibberellic acid*'dir. GA'nın molekl yapısı aşağıda gösterilmiştir.

Diğer isimleri : Gibberellin A₃, GA₃

Kimyasal forml : C₁₉H₂₂O₆

Yapısal forml :



şekil 2.5. Gibberellic acid'in molekl yapısı [Sigma-aldrich(c), 2012]

Molekl ağırlığı : 346,37 g/mol

CAS-No : 77-06-5

Erime ısısı : 227 C

Chlormequat chloride (CCC)

Araştırmada mutajenite tayini için belirlenen dördüncü madde, bitki büyümesini engelleyen diğer maddeler olan Chlormequat chloride (CCC)'dir ve molekl forml aşağıda gösterilmiştir.

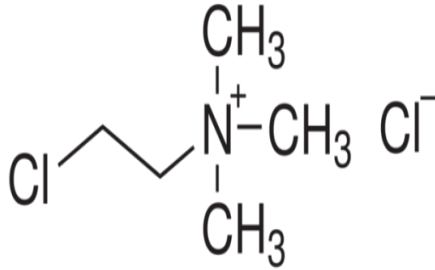
Bitki boyunun uzamasına engel olan sentetik bir BGD'dir. CCC tahıllarda uzamayı engellemekle birlikte, tahıllarda yatmayı engellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca zmlerde meyve tutumunun artırılması için uygulanmaktadır. Kanserojen etkisi olduğu inancıyla, kullanımı ss bitkileriyle sınırlı kalmıştır [Sağlam, 1991; Kaynak ve Ersoy, 1997]. Aelya, sardunya ve poinsettia gibi saksılı ss bitkilerinin gelişmelerini engellemek, erken iek

açmalarını teşvik etmek, çiçeklenmeyi artırmak, bitki başına tomurcuk ve çiçek sayısını artırmak için kullanılmaktadır [Kumlay ve Eryiğit, 2011].

Diğer isimleri : (2-Chloroethyl)trimethylammonium chloride, Chlorcholine chloride, Choline dichloride

Kimyasal formülü : $C_5H_{13}Cl_2N$

Yapısal formülü :



Şekil 2.6. Chloromequat chloride'nin molekül yapısı [Sigma-aldrich(d), 2012]

Molekül ağırlığı : 158,07 g/mol

CAS-No : 999-81-5

Erime ısısı : 239 - 243 °C

Absisik asit

Absisik asit (ABA) bitki bünyesinde giberellik asitin etkilerinin tam tersi bir etki gösterir [Özen ve Onay, 1999]. ABA, stomaların kapanmasını, tohumlarda depo proteinlerinin sentezlenmesini teşvik eder. Dormansi oluşumu ve sürekliliği üzerine önemli etkileri söz konusudur [Salisbury ve Ross, 1991]. Ayrıca ABA diğer bitki büyüme düzenleyicilerinin stimülatör özelliklerini de etkilemektedir [Batem, 2012]. Bitkilerin hemen her yerinde ve her zaman bulunur. Yalnız çevre şartları değiştiğinde azalır veya çoğalır. Buna bağlı olarak da fizyolojik olaylardaki etkisi de değişir. Ticari olarak kullanımı pek olmasa da zaman zaman büyümeyi engelleyici olarak kullanılmaktadır. Bitkisel üretimde ABA hem tabii olarak hem de sentetik olarak üretilmektedir [Kumlay ve Eryiğit, 2011].

Etilen

Basit bir bileşik olan etilen (C_2H_4) bitkinin kendisi tarafından üretilen gaz halinde bir bitki gelişim düzenleyicisidir [Westwood, 1993, Özen ve Onay, 2007]. Bitki büyüme ve gelişmesinin her aşamında ve tüm dokularda üretilen bir hormondur. Olgunlaştırma hormonu olarak da bilinir. Ticari olarak etilenin sentetik olarak üretilen isimleri etephone ve ethrel'dir. Etilenin bitkideki başlıca etkileri; meyve olgunluğunu artırmak, yaprak ve meyve dökümünü hızlandırmak, çiçeklenmeyi düzenlemek, bouyna uzamayı sınırlandırmak, çelikten köklenmeyi teşvik etmek, dormansiyi kırmak, adventif kök oluşumunu uyarmak, kök tüyü gelişimini sağlamaktır. Ayrıca bitkilerdeki cinsiyetin belirlenmesinde, olgunlaşmayla ve patojen bulaşmasıyla ilgili genlerin ifade olmasında da etkilidir [Seçer 1989; Raven, 1992; Westwood, 1993; Kaynak ve Ersoy, 1997; Tiaz ve Zeiger, 2008].

2.6. Geçmişten Günümüze Ames Test Sistemi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

1977' de De Lorenzo ve ark., 1,3- Dichloropropene içeren pestisitler (Telone ve Fumigant) üzerinde ames metoduyla mutajenite tayini yapmışlar ve Telone'nin TA 1535 ve TA 100 suşlarında mutajenik etki gösterdiğini belirtmişler [De Lorenzo ve ark., 1977].

1978'de Seino ve ark. 5 antibiyotik (Daunomycin-HCl, andriamycin-HCl, bleomycin-HCl, actinomycin D, mitomycin), 19 antimetabolit, 5 alkali ajan, 2 alkaloid, 1 enzim ve 1 adrenal steroid hormon üzerine, *S. typhimurium* TA 98, TA 100 ve TA 92 suşlarını kullanarak mutajenite tayini yapmışlardır. Bunların dördü busulfan, carbazilquinone, 1-(4-amino-2-methy Ipyrimidine-5-yl)methyI-3-(2-ch loroethy l)-3-n, itrosoarea hydrochloride ve pipobroman mutajenik etki gösterdiğini belirtmişler [Seino ve ark., 1978].

De Lorenzo ve ark. (1978), 20 carbamate herbisit ve fungusitlerinin mutajenik özelliklerinin saptanması amacıyla *Salmonella*/mikrozom testi uygulamışlar ve

sonuç olarak, TA 1535 ve TA 100 suşlarında, diallate, triallate ve sulfallate S9 fraksiyon varlığında mutajenik olarak tespit edilmiştir [De Lorenzo ve ark., 1978].

Zdzienicka ve ark. (1979), thiram fungusitinin mutajenik aktivitesi *S. typhimurium* TA 1535, TA 100, TA 1538, TA 98 suşları kullanılarak metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz olarak araştırmıştır. TA 1535 ve TA 100 suşlarında metabolik aktivasyonsuz çalışmalarda thiram mutasyona sebep olmuştur [Zdzienicka ve ark., 1979].

Diallate ve triallate kimyasal maddelerinin mutajenik aktivitesi, Douglas ve ark. (1981) tarafından *Salmonella*/mikrozom testi ile çalışılmış, TA 1535, TA 100 ve TA 98 suşlarında metabolik aktivasyonsuz deneylerde doza bağlı bir artış gözlenmiştir. Her iki herbisidin mutajenitesi S9 enziminin varlığında büyük ölçüde arttığı belirtilmiştir [Douglas ve ark., 1981].

Brooks (1982) tarafından Tetrachlorvinphos pestisitinin mutajenik aktivitesi *E. coli* WP2 ve WP2 uvrA, *S. typhimurium* TA 1535, TA 1538, TA 98 ve TA 100 suşları ile araştırılmıştır. Deneyler S9 varlığında ve yokluğunda, ayrıca Aroclor 1254 ile muamele edilmiş ve edilmemiş olarak iki şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, bakteri suşları üzerinde herhangi bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır [Brooks, 1982].

Moriya ve ark., 1983'de toplam 228 pestisit (88 insektisit, 60 fungusit, 62 herbisit, 12 bitki büyüme düzenleyicisi, 3 metabolit ve 3 diğer bileşikler)'in mutajenitesi Ames testi ile 5 suş (TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537 ve TA 1538) kullanılarak incelenmiştir. Bu kimyasal maddelerden 50 tanesi mutajenik bulunmuştur. Test edilen 22 pestisit karsinogenik olarak saptanmasına rağmen, onların 7 tanesi; captain, dibromochlorpropane, ethylene dibromide, ethylene dichloride, ethylenethiourea, 2-hydrazinoethanol ve nitrofen bu deneyde mutajen olarak tespit edilmiştir [Moriya ve ark., 1983].

Svehu ve ark. (1984) tarafından iki thiocarbamate herbisiti olan diallate ve triallate'in, mutajenik potansiyellerinin belirlenmesi için Ames testi metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda uygulanmıştır. *Salmonella*/mikrozom testi her iki herbisitte de TA 1535, TA 98 ve TA 100 suşlarında sadece metabolik aktivasyonlu çalışmalarda genotoksik etkiye rastlanılmıştır [Svehu ve ark., 1984].

Tzoneva ve ark. 1985 yılında yaptıkları bir çalışmada, endodan fungusitinin TA 100 suşunda S9 varlığında zayıf mutajenik etkiye sahipken, kilacar insektisit-akarisitinin S9 varlığında ağır mutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir [Tzoneva ve ark., 1985]. Asal (1985) Türkiye'de ruhsatlı olan 10 pestisidin mutajenik aktivitelerini *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında spot test ile incelemiştir. Sadece orthacide 50 WP, hem baz çifti dönüşümleri ve hem de kodon kayması tipinde mutasyonlara neden olmuş, diğerleri ise bu sistemde negatif sonucu vermişlerdir [Asal, 1985].

Diril ve arkadaşları (1988), bazı pestisitlerin *Salmonella*/mikrozom mutajenite test sistemi araştırmışlardır. TA 100 suşu için endosulfan, azinfosetil ve diklorvos'un mutajenik; diptereks ve trifluralin'in ise zayıf mutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Trifluralinin *S. typhimurium* TA 98 suşu için mutajenik; endosulfanın ise zayıf mutajenik etkili olduğu saptanmıştır [Diril ve ark., 1988].

Prival ve Davis (1988) tarafından Ames testi ile yapılan bir çalışmada, gıdalarda kullanılan Tartrazin, FD&C Yellow No 6, FD&C Red No 40 ve Amaranth boyalarının mutajenik etkileri S9 varlığında ve yokluğunda araştırılmıştır ve bu boyaların mutajenik olmadıkları belirlenmiştir [Prival ve Davis, 1988].

Akın ve Sümer (1989), gıda katkı maddelerinden sodyum benzoat ve sodyum nitratın mutajenitesini *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile incelemiştir. Sodyum benzoatın S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda test suşları üzerinde mutajenik etkili olmadığını; sodyum nitratın S9 fraksiyonu varlığında *S. typhimurium* TA 100 standart test suşu üzerinde zayıf mutajenik etkili olduğunu tespit etmişlerdir [Akın ve Sümer, 1989].

Wever (1989) tarafından Sunset Yellow'un genotoksik etkilerinin test edildiği bir çalışmada, boya günlük diyetleriyle birlikte rodentlere verilmiş ve daha sonra safra, idrar ve fekal ekstraktları Ames testi ile incelenmiştir. *S. typhimurium* TA 100 suşuna göre Sunset Yellow'un mutajenik olmadığı ancak S9 fraksiyonu varlığında mutajenik etkiler gösterdiği belirlenmiştir [Wever, 1989].

Hara (1989) tarafından Fenitrothion insektisitinin mutajenitesi *S. typhimurium* ve *E. coli*'nin suşlarında tespit edilmiştir. Fenitrothion'da zayıf mutajenite, sadece *S. typhimurium* TA 100'de gözlenirken ve S9 karışımının ilavesiyle mutajenite artmıştır. *S. typhimurium*'un TA 98, TA 1535 ve TA 1537 suşlarında S9 varlığında ve S9 yokluğunda *E. coli* WP2 uvrA suşlarında fenitrothion'un mutajenik olmadığı tespit edilmiştir [Hara, 1989].

1989'da Laidlaw, dietrich, lamtenzan, taurinin antimutajenik etkilerini test etmişlerdir. Taurine, TA 102 suşunda, doxorubicin (-74%), bleomycin (-55%), 2-aminofluorene (-52%) ve mitomycin C (-56%)'nin mutajenitelerini inhibe etmiştir, fakat danthrone ya da benzo(a)pyrene'nin mutajenitelerini inhibe etmemiştir. TA 100 suşunda, N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (-73%)'nin mutajenitesini inhibe etmiştir, fakat dexionun mutajenitesini inhibe etmemiştir [Laidlaw, 1989].

Pandey (1990) tarafından, endosülfan insektisitinin mutajenitesi *Salmonella* TA 97(a), TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları ile araştırılmıştır. Endosülfan 50 µg/plak ve üzerindeki dozlarda toksik bir etki sergilemiştir. Ancak ames testinde kullanılan hiçbir test suşu üzerinde mutajenik etki göstermemiştir. Bir pre-inkübasyon işlemi kullanılarak yapılan deneyde sadece TA 97 ile metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz yapılan çalışmalarda mutajeniteye rastlanmıştır [Pandey, 1990].

İzbrak ve ark. (1990), 4 azo boyasını (Ponceau 4R, Amaranth, Sunset Yellow FCF ve Tartrazine) mutajenik özellikleri açısından Ames testi ile incelemiştir. Azo boyaların hiçbiri, *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 üzerine mutajenik etki göstermemiştir [İzbrak ve ark., 1990].

Sümer ve ark. (1990), *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile 4 adet insektisit (Bioallethrin, Tetramethrin, Lethane, Propoxur) ve 3 adet ticari formdaki insektisit (Asbo, Formulation I, Formulation II) mutajenik etkilerini araştırmışlardır. Bioallethrin, *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşunda; Propoxur ve Formulation I'in sadece *S. typhimurium* TA 98 suşunda zayıf mutajenik etki gösterdiğini saptamışlardır [Sümer ve ark., 1990].

Li ve ark. (1990), 5 dental malzeme kitinin bileşenlerinin mutajenitelerini Ames testi kullanarak incelemişlerdir. Ancak diş malzemelerinin mutajenitesinin yeteri kadar test edilemediğini, bunların ağız çalışmalarında güvenilir kullanımının, mutajenite belirleme yönünden daha detaylı testler kullanılmasına bağlı olduğunu belirtmişlerdir [Li ve ark., 1990].

Pollastrini, (1990) tarafından *S. typhimurium* ve *E.coli* bakterisi ile yapılan bir çalışmada, tartrazin boyasının genotoksik etkileri incelenmiştir. S9 varlığında test edilen numunelerde mutajenik etkinin gözlenmediği bildirilmiştir [Pollastrini, 1990].

Prival ve Simmon, (1991) tarafından bir çalışmada, 49 gıda katkı maddesinin mutajenik etkileri *Salmonella* Ames testi ile araştırılmıştır. katkı maddelerinden 4'ü Ames'e göre mutajenik bulunmuştur. Yapılan çalışmada hidrojen peroksit ve potasyum nitrit'in revertant sayısında artışa neden olduğu bildirilmiştir [Prival ve Simmon, 1991].

Sümer ve ark. 1991 yılında organoklorlu insektisitlerden aldrin, endosulfan, heptaklor ve tetradifonun Ames test sistemi ile mutajenik etkilerini araştırmıştır. Endosulfan, *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarına mutajenik etkili bulunmuş, aldrin, heptaklor ve tetradifonun sadece TA 100 suşunda zayıf mutajenik etki gösterdiği saptanmıştır [Sümer ve ark., 1991].

Barrueco ve ark. (1991) tarafından yapılan diğer bir çalışmada da trichlorfon pestisitinin mutajenitesinin değerlendirilmesi için *Salmonella typhimurium*'un TA 1535, TA 100, TA 97, TA 98 ve TA 104 suşları kullanılmıştır. Trichlorfon baz

değişimi mutasyonlarına sebep olmuştur ve onun mutajenik aktivitesi S9 karışımı ile azalmıştır [Barrueco ve ark., 1991].

Loprieno ve Boncristitani (1992) tarafından yapılan bir çalışmada, cochineal carmin'in (Natural Red 4) genoksik etkileri; Ames testi, Çin hamsterı over hücrelerinde kardeş kromatid değişimi ve fare mikronükleus testi ile incelenmiştir. Her üç teste göre de mutajenik etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir [Loprieno ve Boncristitani, 1992].

Bilgin (1992) organofosforlu bir insektisit olan triklorfon'un mutajenik potansiyelinin belirlenmesi için prokaryotik ve ökaryotik mutajenisite test sistemlerini kullanmıştır. Ön çalışma olarak uygulanan Ames testi triklorfonun 1×10^{-10} M ve 1×10^{-12} M kadar küçük dozlarda bile metabolik aktivasyon gerektirmeksizin mutajenik etkisi olduğunu göstermiştir [Bilgin, 1992].

Hakura (1993) tarafından yapılan bir çalışmada, dimetilsülfoksitin (DMSO) potansiyel mutajenitesini değerlendirmede Ames testinin ön inkübasyon metodu kullanılmıştır. DMSO, *S. typhimurium* TA 1537 ve TA 2637 ve *E.coli* WP2UVRA için mutajenik bulunmuştur [Hakura ve ark., 1993].

Le Curieux ve ark. (1993), SOS chromo test, Ames fluktuasyon test ve newt mikronükleus testi ile 7 kimyasalın (4-nitroquinoline 1- oxide, potassium dichromate, formaldehide, sodium hypochlorite, benzo[a]pyrene, cyclophosphamide 2-naphthylamine) genotoksisitesini degerlendirmişler. Ames testinde sodyum hipoklorit hariç diğer bütün kimyasallar *S. typhimurium* TA 100, TA 102 ve TA 98 üzerinde mutajenik aktivite göstermiştir [Le Curieux ve ark., 1993].

Sarrif ve ark. (1994) tarafından tarımda sıklıkla kullanılan Benomyl ve metaboliti olan carbendazimin mutajenik aktiviteleri *S. typhimurium*'un TA 1535, TA 100, TA 98 ve TA 1537 suşlarında S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda araştırıldığında herhangi bir mutajenik aktiviteye rastlanılmamıştır [Sarrif ve ark., 1994].

Gollapudi ve ark. 1995'te bir organofosfat insektisiti olan *Chlorpyrifos phosphorothioate*'in genetik toksisitesi Ames testi ile incelenmiş ve chlorpyrifos için genotoksik aktivite göstergesi bulunamamıştır [Gollapudi ve ark., 1995].

Ruiz ve Marzin'in (1997) yaptıkları bir çalışmada, Ames testi ve SOS kromotesti ile 6 çeşit pestisit üzerinde uygulanmıştır. Pestisitlerden Captan ve Captafol hem Ames hem de SOS kromotestinde genotoksik etki göstermiştir. Test suşlarına atrazine, molinate, chlorpyrifosmethyl ve tetrachlorvinphos uygulandığında S9 varlığında ve yokluğunda her iki testte genotoksik etkiye neden olmuşlardır [Ruiz ve Marzin, 1997].

Pillai ve Shankel (1997), poliaminlerin antimutajenik potansiyelini tespit etmek için modifiye edilmiş Ames testi kullanmışlardır. Poliaminlerden spermin, spermidin ve putreskinin tümü, EMS indüklenmiş dönüşümüne karşı anti mutajenik etki göstermiştir. Buna ek olarak spermidin ve putreskin modifiye edilen Ames testinde kendiliğinden geri dönenlerin sayısında azalma potansiyeli göstermiştir [Pillai ve Shankel, 1997].

Gomes-Carneiro ve ark. (1998), kozmetik, gıda katkı maddesi ve eski ilaç hammaddesi olarak kullanılan 6 adet monoterpenoid bileşiğin mutajenik potansiyelini, *S. typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 ve TA102 suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda araştırmışlardır. Terpeneol TA 102 suşu üzerinde zayıf mutajenik özellikte bulunmuştur [Gomes-Carneiro ve ark., 1998].

Yoon ve arkadaşları (2001), dünyada böcek ve nematodların kontrolü için kullanılan bir pestisit olan carbofuran ve metaboliti olan Nnitrosocarbofuranın Ames testi ile mutajenitesini incelemişlerdir. Sonuç olarak; Nnitrosocarbofuran metabolik aktivasyon yokluğunda mutajenik bir etkiye sahipken carbofuran mutajenik olmadığı belirtilmiştir. Metabolik aktivasyon varlığında ise her ikisi de mutajenik bulunmamıştır [Yoon ve ark., 2001].

Aiub ve ark. (2002) Brezilya'da *Aedes aegypti* (humma etkeni) için kullanılan organofosforlu bir pestisit olan temephosun Ames testi ile mutajenitesi araştırmıştır. Pestisit Ames testinde metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz deneylerin ikisinde de *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları üzerinde mutajenik etkide bulunmamıştır. Ancak TA 98NR, YG 7104 ve YG 7108 suşları üzerinde metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz çalışmalarda 3.33 μM 'ın üzerindeki konsantrasyonları mutajenik bulunmuştur [Aiub ve ark., 2002].

2004'te Jager ve ark. farklı tekstil boyalarının *S. typhimurium* ve fare lenf hucreslerinde üzerindeki mutajenik etkilerini araştırmışlardır. Boya maddeleri % 28 oranında pozitif sonuç vermiştir. Bunların 9 tanesine fare lenf testi yapılmıştır. 6 tanesinde genotoksik etki gorulmuştur [Jager, 2004].

Shukla 2004'te bir dithiocarbamate fungusiti olan mancozeb'in mutajenik aktivitesini *S. typhimurium* test suşlarından TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 ile araştırmıştır. Sonuç olarak 40 $\mu\text{g}/\text{plak}$ ve ustundeki dozlarda toksik bir etki gostermiştir. Mancozeb ile TA 97 suşunda metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz çalışmalarda revertant koloni sayısında doza bağlı bir artış gozlenmiştir [Shukla, 2004].

Akyıl'ın 2006'da yaptığı bir çalışmada, tarım sektorunde oldukça sık kullanılan 4 farklı pestisit (fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid ve benodanil) mutajenik etkileri, Ames test sistemi ile araştırılmıştır. Test edilen bu pestisitlerden sadece fenoxanil'in TA 100 suşunun S9 varlığında ve yokluğunda mutajenitesine rastlanılmıştır [Akyıl, 2006].

Uysal'ın 2006 yılında yaptığı bir çalışmada, bitki gelişim dunenleyicilerinden; 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 4-Klorofenoksiasetik asit (4-CPA) ve Betanaftoksiasetik asit (BNOA), mutajenik aktiviteleri yonunden Salmonella /mikrozom test sisteminde incelenmiştir. Elde edilen bulgulara dayanılarak 2,4-D, 4-CPA ve BNOA'nın Salmonella / mikrozom test sisteminde mutajen veya promutajen olmadıkları sonucuna varılmıştır [Uysal, 2006].

Phoxim ve azinphos metil insektisidlerinin kullanıldığı bir çalışmada, Aufderheide ve Gressmann (2007) tarafından azinphos metilin TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki mutajenik etkisi Ames/Salmonella test sistemi ile araştırılmıştır. Buna karşılık phoxim'in bu suşlar üzerinde mutajenik etkisine rastlanmamıştır [Aufderheide ve Gressmann, 2007].

Ren ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada bir bitki gelişim düzenleyicisi olan 2-furan-2-yl-[1,3] Dioxolane'nin toksisitesini Ames testi ve kromozomal aberasyon test sistemleri ile araştırılmışlar ve test maddesinin toksik etkisinin bulunmadığını belirtmişlerdir [Ren ve ark., 2007].

Barış 2007'de, günümüzde tarımda yaygın olarak kullanılan 4 farklı pestisit (piperophos, fenclorphos, dioxacarb, promecarb) mutajenik etkilerini, Ames test yöntemi ile araştırmıştır. Test edilen bu pestisitlerden sadece piperophos'un TA 98 suşunun S9 varlığında 0,01 ml/plak ve 0,001 ml/plak dozlarında mutajeniteye rastlanılmıştır [Barış, 2007].

Öncül (2009) çalışmasında, Ponceau 4R, Tartrazin, Indigotin, Cochineal Carmin, Sunset Yellow adlı gıda boyalarının mutajenik potansiyelleri Ames test sistemi ve ilave olarak β -Galaktozidaz enzim aktivitesi değişimi ile araştırılmıştır. Test sisteminde *S. typhimurium* TA 100 ve TA 102 suşları kullanılmıştır. Ponceau 4R ve Sunset Yellow, S9 fraksiyonu yokluğunda mutajenik etki göstermiştir. Tartrazin, Indigotin ve Cochineal Carmin'de mutajenik aktivite gözlenmemiştir. S9 fraksiyonu varlığında Cochineal Carmin hariç diğer boyaların tümü mutajenik etki göstermiştir [Öncül, 2009].

Dadakoğlu'nun 2011'de yaptığı bir çalışmada 6 farklı simanın *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında S9 enzimi kullanılarak ve kullanılmadan mutajenitesi, *Escherichia coli* PQ37 suşunda ise genotoksitesini araştırılmıştır. TA 98 suşunda S9 enzimi kullanılarak yapılan testlerde Poly-F-Plus ve Harvard simanlarının bazı dozlarının, Cavex, SDI, RelyX ve Voco simanlarının ise tüm dozlarının mutajen olabileceği belirlenmiştir. TA 98 suşunda S9 enzimi kullanılmadan yapılan testlerde,

Voco simanının bazı dozlarının, Cavex, SDI, RelyX, Poly-f-Plus ve Harvard simanlarının ise tüm dozlarının mutajen olabileceği belirlenmiştir. TA 100 suşunda S9 enzimi varlığında simanların tüm dozlarının mutajen olabileceği belirlenmiştir. TA 100 suşunda S9 enzimi yokluğunda, Voco simanının bazı dozlarının, Cavex, SDI, RelyX, Poly-F-Plus ve Harvard simanlarının ise tüm dozlarının mutajen olabileceği belirlenmiştir [Dadakoğlu, 2011].

Liman ve ark. (2012) tarafından *Thermopsis turcica* tıbbi bitkisinden elde edilen sulu ekstratların mutajenik etkisi, *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları kullanılarak Ames testi ile değerlendirilmiştir. Tüm ekstratlarının TA98 suşu üzerinde S9 varlığında ve yaprak ekstratları, *S. typhimurium* TA102 suşu üzerinde S9 varlığı ve yokluğunda mutajenik olarak bulunmuştur [Liman ve ark., 2012].

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Materyal olarak belirlediğimiz 4 bitki gelişim düzenleyicisinin; Gibberellic acid (GA), Kinetin, Chlormequat chloride (CCC/Chlorcholin chloride) ve 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in mutajenik etkilerini araştırmak için Salmonella AMES Mutajenite testi kullanılmıştır. Deneyler *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları kullanılarak, S9 enzimi varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan, Gibberellic acid (G7645), Kinetin (K3378), Chlormequat chloride (C4049) Sigma, 2,4,6-trichlorobenzoic acid (344281) Aldrich'den sağlanmıştır. Sodyum azid (1.06688.0250), dimetil sülfoksit (8.02912.2500), magnezyum sülfat heptahidrat, sodyum dihidrojen fosfat, magnezyum klorit, potasyum klorit, dipotasyum hidrojen fosfat, sitrik asit monohidrat ve sodyum klorür Merck; β -NADP (N5755), Ampisilin trihidrat (A6140) ve S9 fare karaciger fraksiyonu (S2442) Sigma; 2-aminoflouren (A 55500) ve Sodyum fosfat dibasic heptahidrat Sigma-Aldrich; 4-nitro-o-fenildiamin ve Amonyum sodyum fosfat dibasic tetrahidrat Aldrich; L-histidin-HCl monohidrat (53370) Fluka; D-glukoz 6-fosfat, D-biyotin (4-7868) Supelco; Nutrient broth No: 2 ve Bacto agar Difco; Nutrient Agar ve Agar No 1' LABM; D() Glukoz monohidrat Emir kimya'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan test suşları

Çalışmada Ames ve arkadaşları tarafından *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla geliştirilen TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmış olup, bu suşlar Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ABD'den temin edilmiştir. TA 98 suşu çerçeve kayması, TA 100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını belirleyen suşlardır. Bu suşların genotip özellikleri şöyledir:

TA 98: his D 3052, rfa, Δuvr B, +R

TA 100: his G 46, rfa, Δuvr B, +R

LT2 atasal suşu, yani prototrofik bakteriler, histidin amino asidini sentezleme yeteneğine sahiptirler. Oysa, mutant suşlar, histidin operonunun farklı yerlerinde, farklı tipte mutasyonlar içermektedirler ve bu nedenle ortamda hazır olarak histidin aminoasidi bulunmadığında üreyemezler. Mutant suşlar histidin mutasyona ek olarak, mutajenleri ortaya çıkarma yeteneklerini büyük oranda arttıracak başka mutasyonlar içerirler. Mutajen bir maddeye maruz bırakılan bu mutant suşların histidin sentezleme yeteneklerini geri kazanmaları (reverse mutasyon) bize bu maddelerin mutajen olabileceğini göstermektedir.

3.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı

Bu çalışmada araştırılan bitki gelişim düzenleyicileri sırasıyla; Gibberellic acid (GA), Kinetin, Chlormequat chloride (CCC/Chlorcholine chloride) ve 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddeleri belli oranlarda tartılarak dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözdürülmüştür. Test maddeleri DMSO çözeltisi içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Böylece DMSO içindeki çözünürlükleri artırılmaya çalışılmıştır. Dozlar oda sıcaklığında saklanmışlardır. Tüm maddelerin ayrı ayrı dozları hazırlanmış ve sitotoksik dozları tayin edilmiştir. Seçilen dozlar ile mutajenite deneylerine başlanılmıştır.

GA maddesinin sitotoksik dozlarının belirlenmesi için farklı zamanlarda ve oranlarda hazırlanan dozlar sırasıyla 10-50-100-500-1000-5000-10000-25000 µg/petri'dir. Sitotoksik doz ya da dozlar belirlendikten sonra 50-100-500-1000-5000 µg/ petri dozları seçilerek mutajenite deneylerine başlanılmıştır.

CCC maddesinin sitotoksik dozlarının belirlenmesi için farklı zamanlarda ve oranlarda hazırlanan dozlar sırasıyla 10-100-200-400-800-1000-1600-10000 µg/ petri'dir. Sitotoksik doz ya da dozlar belirlendikten sonra 100-200-400-800-1600 µg/ petri dozları seçilerek mutajenite deneylerine başlanılmıştır.

Kinetin maddesinin sitotoksik dozlarının belirlenmesi için hazırlanan dozlar sırasıyla 2,5-10-25-100-250-1000-2500-10000 µg/petri'dir. Sitotoksik doz ya da dozlar belirlendikten sonra 2,5-25-250-1000-2500 µg/petri dozları seçilerek mutajenite deneylerine başlanılmıştır.

2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin sitotoksik dozlarının belirlenmesi için hazırlanan dozlar sırasıyla 5-50-100-500-1000-2500-5000-10000 µg/petri'dir. Sitotoksik doz belirlendikten sonra mutajenite tayini için 5-50-500-1000-2500 µg/petri dozları seçilmiştir.

3.1.4. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler

Vogel-Bonner-E Ortamı (50xVB tuzları)

Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	10 g
Sitrikasit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat (K ₂ HPO ₄)	500 g
Sodyum amonyum fosfat (NaH ₂ NH ₄ PO ₄ .4H ₂ O)	175 g
Distile su (45 °C)	670 ml

Temiz bir erlen içine distile su konularak ısıtılır. Kaynama seviyesine gelmeden yukarıdaki maddeler sırayla sıcak suyun içine eklenir. Kristallenmeyi önlemek için bir madde iyice çözünmeden diğeri eklenmemelidir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. Oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda saklanır.

(0,5 mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

D-Biyotin (F.W. 247,3)	30,9 mg
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	24,0 mg
Distile su	250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. +4°C'de saklanır.

(% 0,8/0,02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Ampisilin trihidrat 0,8 g

0,02 N Sodyum hidroksit 100 ml

Ampisilin trihidrat, 0,02 N NaOH içinde çözülür ve sterilizasyon için 0,22 µm çaplı filtreden geçirilir ve +4°C'de, ışık geçirmeyen bir cam şişede saklanır.

(%1) Kristal viyole Solüsyonu

Kristal viyole 0,1 g

Distile su 100 ml

Kristal viyole ve distile su karıştırılır ve solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konup +4°C'de saklanır.

(% 0,13) Biyotin Çözeltisi

D-biyotin 0,65 mg

Distile su 50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. +4°C'de saklanır.

(% 0,5) Histidin Çözeltisi

L-Histidin-HCl (F.W. 191,7) 2 g

Distile su 400 ml

Histidin distile su içinde çözülür ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. +4°C'de saklanır.

(%20) Glukoz Çözeltisi

Glukoz	20 g
Distile su	100 ml

Glukoz distile su içinde çözülerek otoklavda 110°C'de 15 dakika sterilize edilir ve 0–4°C'de saklanır.

2-aminofluorene (2AF)

100 µg /petri başına olmak üzere DMSO içerisinde çözülerek hazırlanır. 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. TA 98 ve TA 100 suşu için S9 enzimi varlığında kullanılan kimyasaldır. 0–4°C'de saklanır (Her çalışmadan önce taze olarak hazırlanmıştır).

4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)

100 µg/petri olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanılır. 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. TA 98 suşu için S9 enzimi gerektirmeyen kimyasaldır. Oda ısısında saklanır (Her çalışmadan önce taze olarak hazırlanmıştır).

Sodyum azid (AZS)

100 µg/petri olmak üzere distile su içinde çözülerek hazırlanır. TA 100 suşu için S9 enzimi gerektirmeyen, TA 98 için S9 enzimi gerektiren bir kimyasaldır. 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. 0°C ile +4°C arasında saklanır (Her çalışmadan önce taze olarak hazırlanmıştır).

Top agar

Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

Agar, tuz ve su manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözülmeye kadar karıştırılır ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Histidin / Biyotin Agar (HB Agar)

Agar	15 g
Distile su	914 ml
50xVB tuzu	20 ml
Glukoz	50 ml
Histidin HCl H ₂ O (2g/400ml H ₂ O)	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml

Agar ve distile su karıştırılır. 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Solüsyon 45°C ye soğutulup %20' lik glukoz, 50xVB ve histidin çözeltisi eklenir. Solüsyon biraz daha soğutulduktan sonra biyotin çözeltisi eklenip karıştırılır. Petri kutularına 25-30 ml olarak dağıtılır.

Histidin / Biyotin / Ampisilin Agar (HBA Agar)

Agar	15 g
Distile su	910 ml
50xVB tuzu	20 ml
%20 glukoz	50 ml
Histidin HCl H ₂ O (2g / 400 ml H ₂ O)	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml
(%0,8 / 0,02 M NaOH) Ampisilin	3,15 ml

Agar ve su karıştırılıp 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Solüsyon 45°C ye soğutulup %20' lik glukoz, 50xVB ve histidin çözeltisi eklenir. Solüsyon biraz daha soğutulduktan sonra biyotin çözeltisi, arkasından ampisilin çözeltisi eklenip karıştırılarak petrilere 25-30 ml olacak şekilde aktarılır. Bu petrilere bakteriler +4°C de 2 ay boyunca saklanabilir.

Minimal glukoz agar (MGA)

Agar	15g
Distile su	880 ml
50xVB tuzları	20 ml
%20 Glukoz	100 ml

Agar ve su karıştırılıp çözülür ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. 45°C ye soğutulup %20 glukoz ve 50xVB tuzları yavaş yavaş karıştırılarak eklenir, petrilere 25-30 ml olarak aktarılır. Bu ortam, suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının hesaplanmasında ve mutajenite deneylerinde kullanılmıştır [Maron ve Ames, 1983].

Nutrient agar (NA)

Nutrient Broth No:2	25 g
Agar	15 g
Distile su	930 ml

Agar ve broth distile su içinde karıştırılıp 121°C de 15 dakika sterilize edilir. Petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarılır.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Nutrient Broth No:2	5 g
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir ve 4°C'de saklanır.

Tuz Çözeltisi (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂)

Potasyum klorür (KCl)	61,5 g
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	40,7 g
Distile su	500 ml

Maddeler distile suda çözülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve 4°C'de ya da oda sıcaklığında saklanır.

0,2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH=7,4)

0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	13,82 g
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	14,2 g
Distile su	500 ml

Karışım pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

0,1 M β-NADP çözeltisi

B-NADP (F.W. 765,4)	383 mg
Steril distile su	10 ml

0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. Daha sonra -20° C de saklanır.

1 M Glukoz-6-Fosfat çözeltisi

Glukoz-6-fosfat	2,82 g
Steril distile su	10 ml

0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. Çözelti taze olarak hazırlanmalıdır.

S9 Mikrozoom Enzimin Hazırlanması (% 10) S9 karışımı

S9 Mikrozoom enzimi	1 ml
MgCl ₂ -KCl tuzları	0,5 ml
Glukoz-6-fosfat	0,25 ml
0,1 M NADP	1 ml
0,2 M fosfat tamponu (PH 7.4)	12,5 ml
Steril distile su	9.875 ml

Tüm kimyasallar taze olarak hazırlanıp, buz içindeki steril bir kaptaki karıştırılır. Enzim tekrar kullanılmaz. Bu nedenle kullanılmayan enzim saklanmaz, atılır.

3.2. Metot

Bu çalışmada, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve Ames/Salmonella/Mikrozoom Testi Maron ve Ames'in yöntemine uygun olarak petri inkorporasyon metodu ile yapılmıştır [Maron ve Ames, 1983]. Deneyler S9'lu ve S9'suz olarak iki grup halinde çalışılmıştır. Her doz üçer petri kullanılarak denenmiş ve farklı zamanlarda bağımsız deneyler yapılmıştır. Gerek duyulan testler tekrarlanmıştır. Pozitif kontrol, çözücü kontrol (DMSO) ve spontan kontroller de deneye paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. *Salmonella* suşlarının kültürlerinin ve master petrilerin hazırlanması

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ABD'den getirilen bakterilerin histidin/biyotin/ ampicilin (HBA) petrilere çizgi ekimleri yapıldıktan sonra 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 37°C de 48 saat inkübasyonun ardından, iyi izole olmuş bir koloni seçilerek, NB içinde süspanse edilerek bir gece (12-16 saat) 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bir öze dolusu sıvı kültür alınıp HBA agar üzerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Deney için kullanılacak uygun bakterileri içeren

bu master petriker +4°C de 1-2 ay süre ile saklanmış ve pasajları yapılmıştır. Böylece stok kültürlerin mutasyon yeteneklerini kaybetmesi engellenmiştir.

3.2.2. *Salmonella* suşlarının saklanması ve stok kültürlerin açılması

Test suşlarının canlılığını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekir. Bunun için HBA agarda üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş bir koloni öze ile alınıp 3ml Nutrient Broth içeren tüplerde süspansiyon edilir ve 37°C de bir gece (12-16 saat) inkübe edilir. Bu sürenin sonunda steril Eppendorf tüp içersine 1 ml bakteri kültürü ve 1 ml steril gliserinli buyyon ilave edilmiştir. Kuru buz üzerinde donması sağlandıktan sonra -20°C'de saklanmıştır.

Kültürün açılması gerektiğinde stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip 0,1ml alınarak steril eküvyon ile HB agar petrikerine paralel ekim yapılmıştır. Daha sonra 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda iyi izole olan bir koloni öze ile alınıp HBA agar petrikerine paralel ekim yapılmıştır. HBA petrikeri 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası master petrikeri +4°C de iki ay süre ile saklanabilir.

3.2.3. Sıvı kültürde bakteri sayısının belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını belirlemek için HBA petrikerinden bir koloni alınarak NB içinde süspansiyon edilmiş ve 37 °C' de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu gecelik kültürün, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ olacak şekilde bir dizi seyreltmeleri hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA petrikerine 1 ml'lik miktarda ekim yapıp 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra petrikerdeki koloniler sayılmış ve bakteri sıvı kültürünün ml'sinde 2,4x10⁹ bakteri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bakteri kültürünün optik dansitesi 650 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülüp saf kültürün (10⁰) optik dansitesi 0,165 olarak belirlenmiştir.

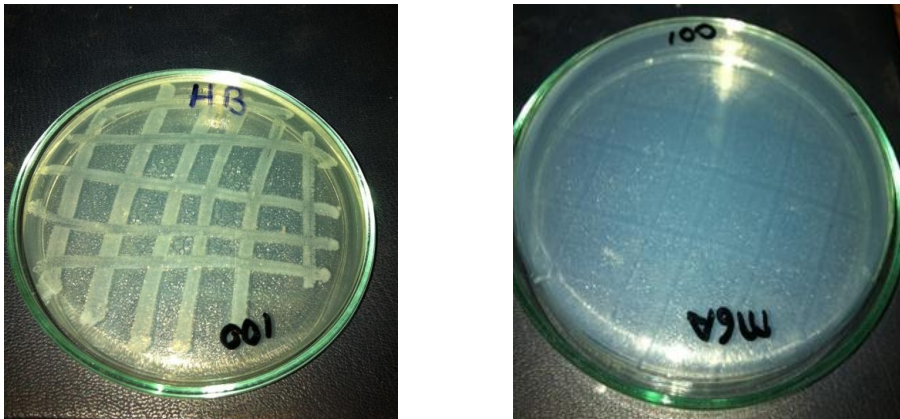
3.2.4. *Salmonella* suşlarının genotiplerinin kontrol edilmesi

Mutasyon testlerinde test maddesinin mutant suşu atasal tipe döndürme gücü yani test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığı ölçüldüğü için suşun genotip bakımından mutant karakterlere sahip olup olmadığının kontrol edilmesi testin güvenilirliği açısından gereklidir. Test suşlarının genotip kontrolleri;

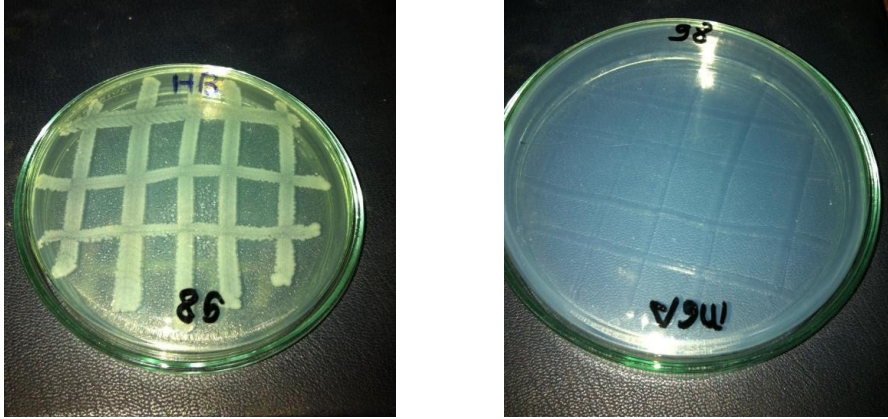
- Kültür alındıktan hemen sonra
- Petri başına düşen spontan geriye dönüşüm sayısı normal oranın altındaysa
- Standart mutajenlere karşı duyarlılıkları azaldığında yapılmalıdır [Dadakoğlu, 2011].

Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin histidin içermeyen Minimal Glukoz Agar (MGA) petrilere ekilmeleri sonucu his- bakteriler his+ bakterilerden ayırt edilir. NB`de üretilen bakteriler Histidin/Biyotin (HB) agar ve histidin içermeyen MGA petrilere ekilerek 37°C de 48-72 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda HB petrilinde üreme gözlenirken, MGA petrilinde üreme gözlenmez ise bu bakterilerin His- mutasyonu taşıdığını gösterir. Resim 3.1 ve 3.2`de TA 98 ve TA 100 suşlarının HB agarda üremeleri görülmektedir.



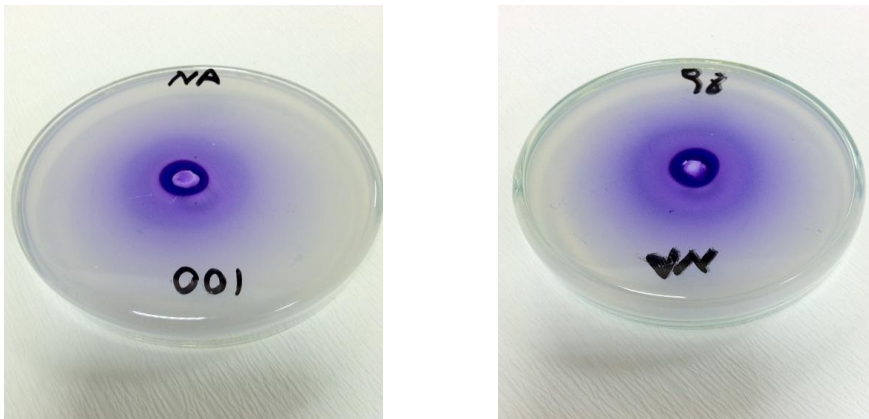
Resim 3.1. *S. typhimurium* TA 100 suşunun histidin gereksinimi kontrol sonuçları



Resim 3.2. *S. typhimurium* TA 98 suşunun histidin gereksinimi kontrol sonuçları

Rfa mutasyonu kontrolü

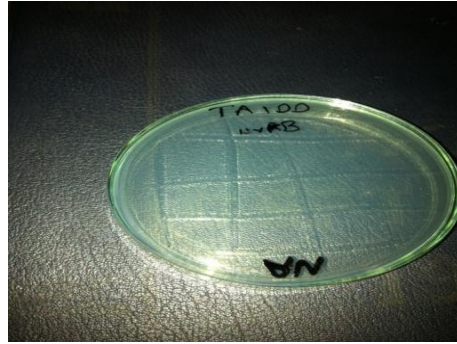
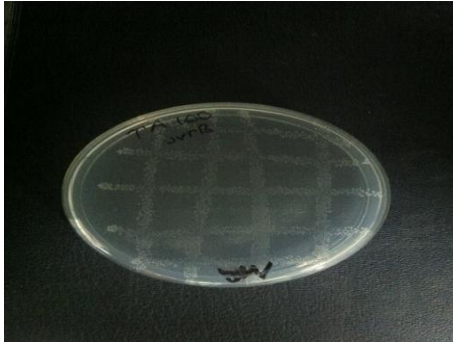
Bu mutasyon bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre zarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmektedir. Bu test için, NB'da bir gece büyütülen 0,1 ml sıvı kültür, 45°C ye ısıtılmış 3 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra NA petrilere dökülerek petrilere 8 işareti yaptırılır. 10 dakika donması beklendikten sonra, plağın orta kısmına bir kuyucuk açılır ve içersine % 0,1' lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatılmıştır. Petriler 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuk çevresinde üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip, bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin *Rfa* mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır (Resim 3.3).



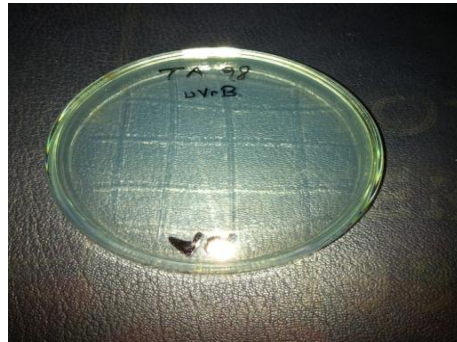
Resim 3.3. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları için *Rfa* mutasyonunu kontrol sonuçları

UvrB mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon ile bakterilerin, Ultra Viyole (UV) ışınlarının neden olduğu, replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan “DNA onarım mekanizması” engellenmiştir. Bu mutasyon varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile kanıtlanmıştır. Test için, NB’da bir gece üretilen bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp 2 adet NA petrisinin tamamına paralel ekim yapılmıştır. Petrilerden bir tanesi 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn süre ile ışınlanmıştır. Işınlamadan sonra petriler kapatılıp 37° C de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, uvrB mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV’ye maruz kalan petride üreme olmazken, diğer petride normal bir üreme gözlenmiştir. Böylece bakterilerin *uvrB* mutasyonunu taşıdığı gösterilmiştir [Ames ve ark., 1973b]. Resim 3.4 ve 3.5’de test bakterilerinin uvrB mutasyonu taşıyıp taşımadıkları gösterilmiştir.



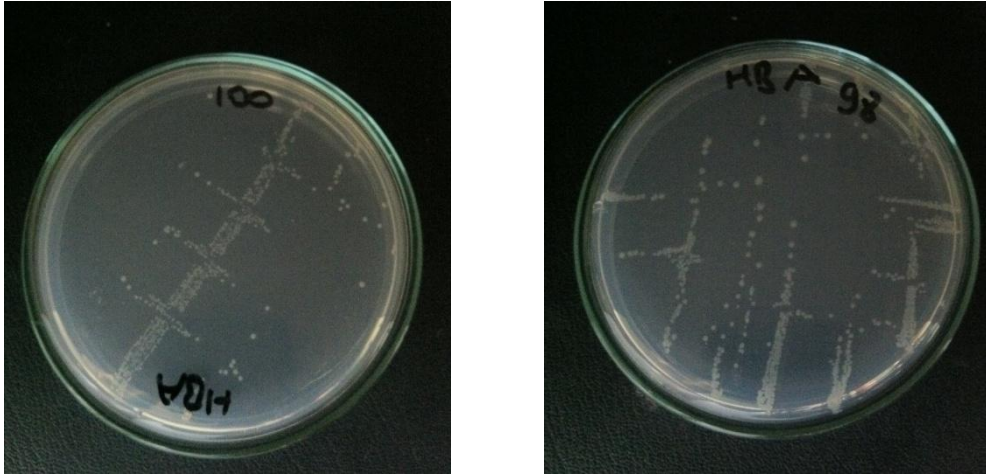
Resim 3.4. *S. typhimurium* TA 100 suşunda uvrB mutasyonu kontrol sonuçları



Resim 3.5. *S. typhimurium* TA 98 suşunda uvrB mutasyonu kontrol sonuçları

R faktör varlığı kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği, R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, NB içinde büyütülen bakteri kültürü, (% 0,8 ampisilin / 0,02 M NaOH) ampisilin içeren HBA agar petrilerine çizgi ekim yapılarak, 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenmiştir [Mc Cann v.d., 1975]. Yani bakteriler R faktör plazmidini içermektedirler. Resim 3.6'da test bakterilerinin R faktör taşıyan pKM101 plazmidini taşıyıp taşımadığı gösterilmiştir.



Resim 3.6. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları için R faktör varlığı kontrol sonuçları

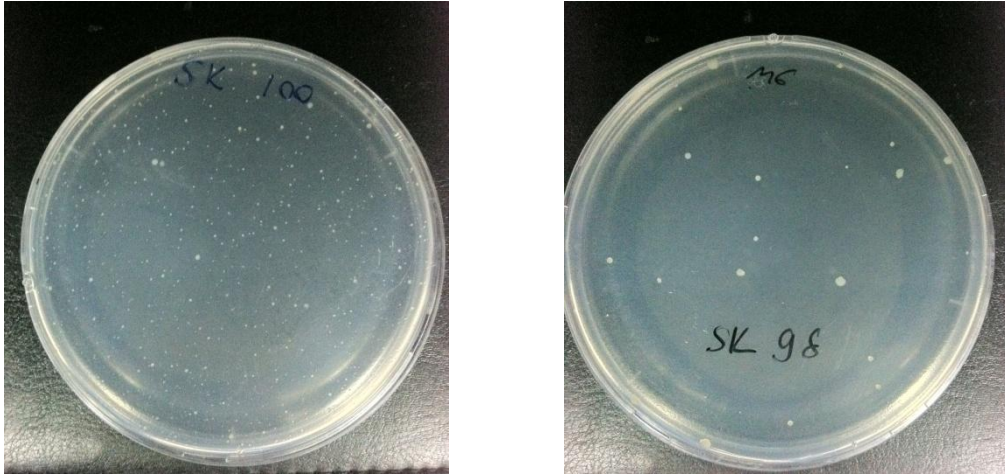
Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden His- durumdan His+ durumuna dönüşmesi belirli sınırlar içinde olabilmektedir. Test bakterilerinin, histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geriye dönüş, mutajenite deneylerinde rutin olarak ölçülür ve her petride kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısı olarak ifade edilir. Her suş için kendiliğinden geri dönüş sınırları;

TA 98 için 20-50 revertant / petri

TA 100 için 75-200 revertant / petri [Mortelmans ve Zeiger, 2000]

Spontan olarak geriye dönüş sıklığını kontrol etmek için normal gecelik kültürden 0,1 ml alınıp, 45⁰C'ye soğutulan ve su banyosunda bekletilen 3 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra 0,3 ml Histidin/Biyotin solüsyonu da eklenip test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA petrilere yayılmıştır. Petriler 37⁰C' de 48 saat inkübe edilerek petrilerde üreyen koloniler sayılmıştır. Normal sınırlarda revertant sayı gösteren kültürler deneyde kullanılmıştır. Resim 3.7'de TA 98 ve TA 100 suşlarının normal sınırlarda spontan olarak geri dönüşen koloniler görülmektedir.



Resim 3.7. TA 98 ve TA 100 suşlarının normal sınırlarda spontan olarak geri dönüşen koloni görünüşleri

3.2.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması

Mutajenite deneyine başlamadan önce, deneyin sağlıklı olabilmesi için sitotoksik etkinin (LD₅₀) saptanması gerekmektedir. LD₅₀ değerinin belirlenmesinin önemi test bakterileri üzerinde inhibisyona neden olabilecek dozların mutajenite testinde sonuç vermeyecek olmasıdır. Test maddelerinin test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla öncelikle uygun sayıda bakteri içeren (1-2x10⁹) gecelik kültürden sıvı besiyeri kullanılarak 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ oranlarında seyreltmeler yapılmıştır. Sitotoksik etkiyi belirlemek için daima 10⁻⁶ seyreltmedeki

kültür kullanılır. Daha sonra her bir test maddesinin dozları hazırlanmıştır. Top agara 0,1 ml gecelik bakteri kültürü ve 0,1 ml test maddelerinin değişik konsantrasyonları eklenmiştir. Tüpteki karışım NA petrilere yayılmış ve 37⁰C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrideki koloniler sayılmıştır [Dean ve ark., 1985]. Kimyasal madde eklenmeyen kontrol petrilere ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Bir dozun sitotoksik olduğunun anlaşılması LD₅₀ (Letal doz) dozunun altında olmasıyla anlaşılır. Yani kontrol plağındaki koloni sayısının yarısının altında koloni sayısına sahip petri dozları sitotoksik doz olarak kabul edilir.

3.2.6. Pozitif kontrol

Bakterilerin bilinen standart mutajenlere karşı tepkilerini saptamak için mutajen olduğu bilinen belirli bir madde, pozitif kontrol amacıyla esas denemeye paralel olarak yapılır. *S. typhimurium* TA 98 suşu için kesin mutajen olan, 4-nitro-o-fenildiamin S9 karışımı yokluğunda, 2-aminoflouran (2AF) S9 karışımı varlığında kullanılmıştır. *S. typhimurium* TA 100 için pozitif mutajen olarak sodyum azid (SA) S9 karışımı yokluğunda, 2AF S9 karışımı varlığında kullanılmıştır. Bu pozitif mutajenlerden 2-aminoflouran ve 4-nitro-o-fenildiamin; dimetil sülfoksit içerisinde, sodyum azid ise suda çözdürülmüştür. Sodyum azid, 4-nitro-o-fenildiamin ve 2-aminoflouran petri başına 100 µg konsantrasyonlarında kullanılmıştır.

3.2.7. Negatif (çözücü/DMSO) kontrol

Test kimyasallarının ve kontrol mutajenlerinden 2-aminoflouran ve 4-nitro-o-fenildiamini çözmek için kullanılan dimetil sülfoksitin, bakteri suşları üzerine etkisinin olup olmadığının kontrolü için bu deney yapılmıştır. Uygun derişimdeki bakteri kültüründen 0,1 ml, milipordan geçirilerek steril edilen DMSO’dan 0,1 ml alınarak içerisinde 3 ml top agar bulunan tüpe aktarılmıştır. Karışım MGA petrilere yayılmış ve petrilere 37⁰C’de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda kontrol petrilere ile deneme petrilereindeki bakteri sayıları karşılaştırılmıştır.

3.2.8. S9 Karışımının Hazırlanması

S9 karışımının bileşenleri: 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glukoz-6- fosfat, 4 mM NADP, 100 mM pH 7,2 Na-fosfat tamponu ve bu karışımın her mililitresi için 0,04 ml yoğunluğunda S9 fraksiyonudur. Karışım her S9'lu mutajenite deneyi için taze olarak hazırlanmıştır. Karışım deney esnasında enzimin aktivitesini kaybetmemesi için buz içerisinde tutulmuştur (S9 karışımı, buz içinde birkaç saat aktivitesini kaybetmeden saklanabilmektedir). Mutajenite deneylerinde kullanılmadan önce hazırlanan S9 karışımı için sterilizasyon kontrolü yapılmıştır. Bunun için histidin/biyotin içeren MGA petrilere 0,1 ml supernatant eklenerek 37 °C'lik etüvde 1 gece bekletilmiştir [Maron ve Ames, 1983].

3.2.9. Ames testinin yapılışı

Ames testinin amacı, üremesi için histidin amino asidine gereksinim duyan oksotrofik (histidin sentezleyemeyen) suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir yani prototrofik hale dönüşmesi temeline dayanır. Bunun için deneylerde “plak inkorporasyon” yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde top agar ve MGA olmak üzere iki farklı agar kullanılmaktadır. Yöntem, üst katmanı oluşturan top agar ile alt katmanı oluşturan MGA arasında üreyen revertant bakteri kolonilerinin sayımı esasına dayanan bir yöntemdir.

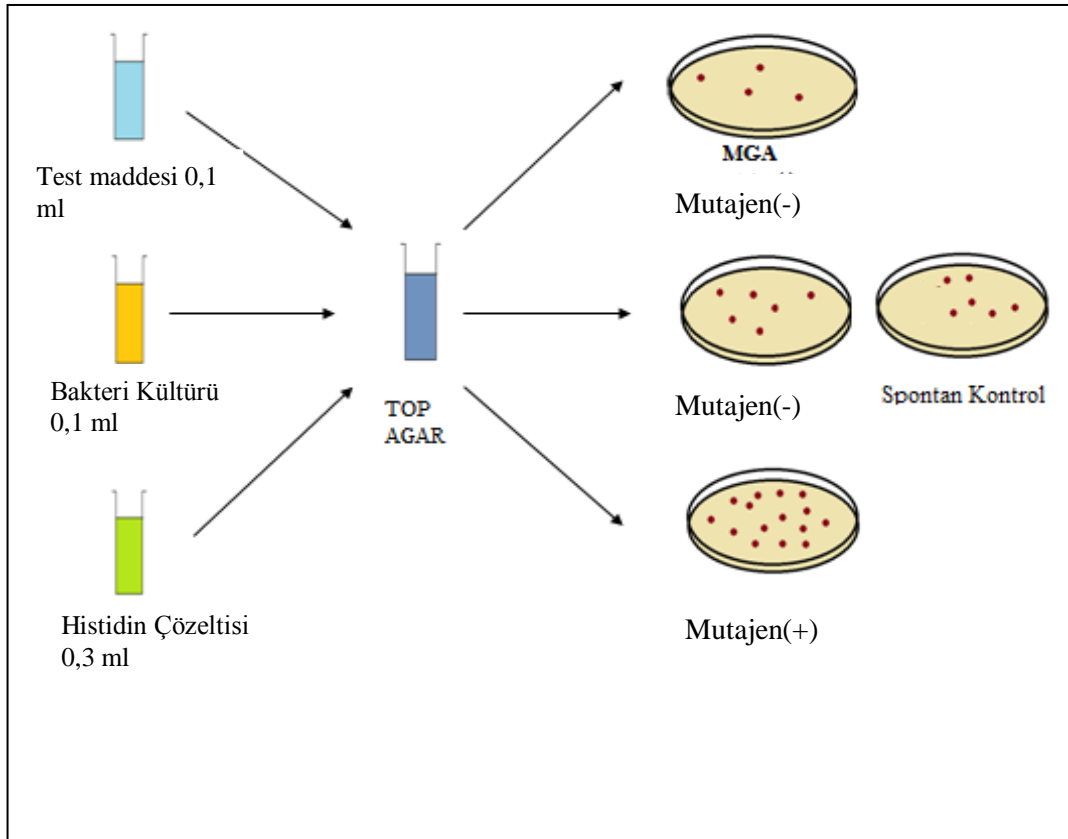
Test edilen maddenin mutajen gücü ne kadar yüksekse, ters mutasyon sonucu ortamda prototrofik bakteri sayısı da o kadar çok olacaktır. Ancak kimyasal maddelerin kendileri direk mutajen olabileceği gibi bu maddelerin metabolitleri de mutajen etki gösterebilir. Bu nedenle AMES testinde metabolizasyon sonucu mutajen maddelerin etkilerini ölçmek amacıyla “S9 mikrozomal enzimi” de kullanılır. Bu sayede mutajen maddelerin direkt ve indirekt etkileri saptanmaya çalışılır. Bu nedenle çalışmalarımız TA 98 ve TA 100 suşlarında S9 mikrozom enzim varlığında ve yokluğunda, birbirine paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Test maddeleri DMSO içinde çözüldüğü için DMSO çözücü kontrol olarak kullanılmıştır. Her denemede her suşun ayrı ayrı geri dönme özgülükleri, S9 karışımının etkisini

doğrulamak için rutin olarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Sadece bakteri ve histidin/biyotin solüsyonu içeren spontan kontrol petrileri, her suş için kendiliğinden geri dönen koloni sayısının hesaplanmasında kullanılmıştır. 48-72 saatlik inkübasyon sonucunda histidin bağımlı bakteri koloni sayımı ile elde edilen sonuçların ortalama değerleri alınmıştır. Bu sonuçlara ait standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

S9' suz (-) deney

Öncelikle top agarın donmasını engellemek için su banyosunu 45°C ayarlanmıştır. 0,3 ml top agar içeren tüpler 45°C su banyosuna yerleştirilmiştir. Daha sonra bu tüplere histidin/biyotin solüsyonu (top agarın %10 u kadar) eklenmiştir (Ortama çok az histidin/biyotin eklenmemizin nedeni bakterilerin belirli bir düzeye ulaşmasını, birkaç bölünme geçirmelerini sağlamaktır). Daha sonra 3 ml top agar bulunan tüplerin içlerine değişik dozlarda 0,1 ml test maddesi ve 0,1 ml 12-16 saatlik bakteri kültürü eklenir. Bu deney TA 98 ve TA 100 için ayrı ayrı yapılmıştır. Deneyler GA, Kinetin, CCC ve 2,4,6- trichlorobenzoic acid maddeleri için, 5'er doz ve her doz için 3'er petri olacak şekilde deney yapılmıştır. Tüpler çalkalanarak MGA petrilere dökülmüş ve hızla 8 hareketi yapılarak top agarın petri üzerinde homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra petriler ters çevrilip 37°C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloniler sayılmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için, test maddeleriyle yapılan deneylere paralel olarak, spontan kontrol, çözücü kontrol (DMSO) ve pozitif kontrol deneyleri de yapılmıştır. Pozitif kontrol maddesi olarak TA 100 suşu için 100 µg/petri sodyum azid (NaN₃), TA 98 suşu için 100 µg/petri 4-nitro-o-fenilendiamin kullanılmıştır. Spontan kontrolde, 3 ml top agar tüplerine 0,3 ml histidin/biyotin solüsyonu, 0,1 ml bakteri kültürü konulup karıştırılarak MGA'lı petrilere dökülüp 8 hareketi yapılmış ve 37°C'de 48-72 saatlik etüve konulmuştur. DMSO kontrolde, 3 ml top agar tüplerine 0,3 ml histidin/biyotin solüsyonu, 0,1 ml bakteri kültürü ve 0,1 ml DMSO konulup karıştırılarak MGA'lı petrilere dökülüp 8 hareketi yapılmış ve 37 °C' de 48-72 saat etüve konulmuştur. Pozitif kontrolde, 3 ml top agar tüplerine 0,3 ml histidin/biyotin solüsyonu, 0,1 ml bakteri kültürü, TA 98 suşu için 0,1 ml 4-nitro-o-

fenildiamin, TA 100 suşu için 0,1 ml sodyum azid konulmuştur. Karışım MGA'lı petrilere dökülüp 8 hareketi yapılır. Donması için bekletildikten sonra, 37°C' lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloniler manuel olarak sayılmıştır. Ames testinin yapılışının şematik görünümü şekil 3.1.'de gösterilmiştir

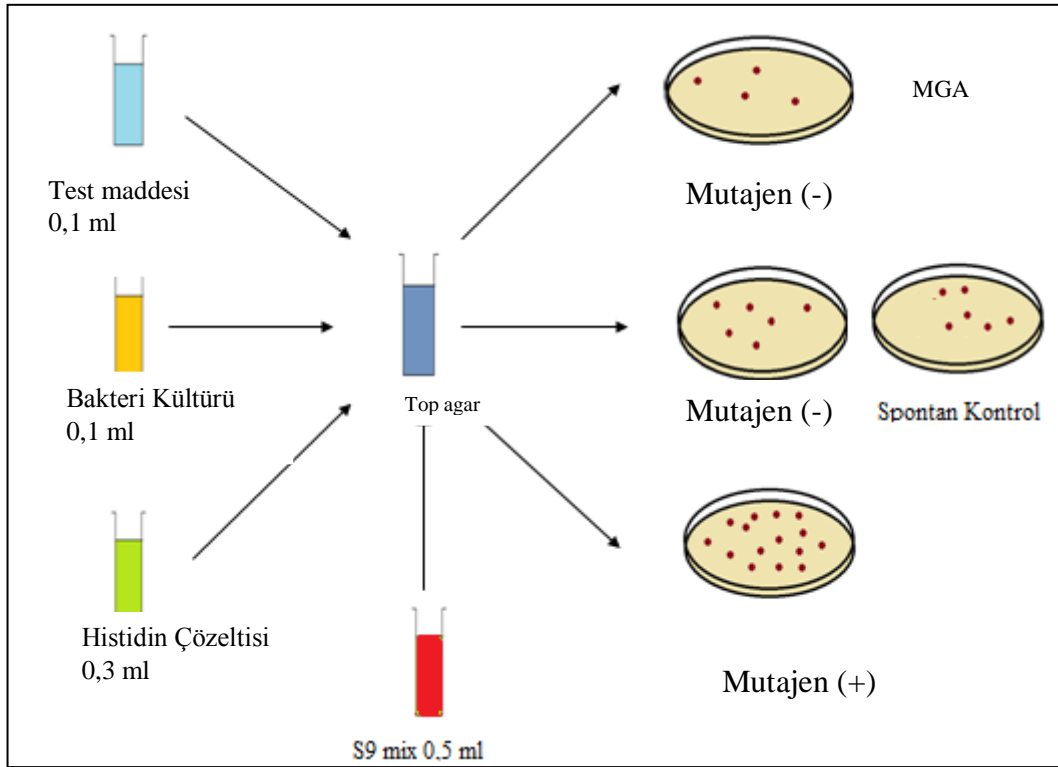


Şekil 3.1. Ames testinin şematik görünümü (S9-)

S9' lu (+) deney

Araştırılan kimyasal maddelerin metabolize olduktan sonra etkilerini araştırmak için memeli karaciğer mikrozomları hazırlanmıştır. Deneyler S9'lu olarak tekrarlanmıştır. Bu amaçla yine 12-16 saatlik bakteri kültürü ve deneyden hemen önce de taze olarak S9 karışımı hazırlanmıştır. 3 ml top agar, histidin-biyotin çözeltisi, bakteri kültürü ve test edilen maddeler S9'suz deneydeki ölçülerde koyulduktan sonra, 0,5 ml buzda bekletilen S9 karışımı da ilave edilip karıştırılarak MGA petrilere homojen bir

şekilde yayılmıştır. Agar donduktan sonra 37 °C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Spontan, pozitif ve dimetil sülfoksitli kontrollerde aynı şekilde, 0,5 ml S9 karışımı ilave edilerek hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak TA 98 ve TA 100 suşları için 100 µg/petri 2AF (2-Aminofluoren) kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra koloniler manuel olarak sayılmıştır ve sonuçlar değerlendirilmiştir. S9 enzimi varlığında ames testinin yapıışının şematik görünümü şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Ames testinin şematik görünümü (S9+)

3.2.10. Ames test sonuçlarının değerlendirilmesi

Bu çalışmada bitki gelişim düzenleyicisi olarak kullanılan 4 madde, *S. typhimuriumun* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak mutajenite testine tabi tutulmuştur. Her doz her suş için 3 paralel petri ile aynı anda test edilmiş ve farklı zamanlarda bağımsız deneyler yapılmıştır. Ayrıca, test bileşenlerinin etkilerinin memeli metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacıyla S9 enzimi varlığında da deney aynen tekrarlanmıştır. Sonuçlar, petrilerdeki koloni sayılarının ortalamaları alınarak ve standart sapmaları hesaplanarak

değerlendirilmiştir. Bir maddeye mutajen denilebilmesi için, mutajenite testi sonucunda sayılan koloni sayısı, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı olması gerekmektedir. Bununla birlikte, bu sayı kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının iki katından az olmasına rağmen doza bağlı bir artış söz konusu olursa bu durumda da o maddeye mutajen denilebilmektedir. Doza bağlı artış gözlemlendiği halde koloni sayısı spontanların iki katından az çıkmışsa örnek zayıf mutajen olarak değerlendirilir [Maron ve Ames, 1983, Emig ve ark., 1996].

4. BULGULAR

Materyal ve metod bölümünde açıklandığı gibi, 4 ayrı bitki gelişim düzenleyicisinin (Gibberellic acid, Chlormequat chloride, Kinetin ve 2,4,6-trichlorobenzoic acid) mutajenik aktivitesi, sitotoksik dozları belirlendikten sonra, söz konusu test maddelerinin 5 ayrı dozu S9 enzimi varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Her doz paralel 3 petri ile aynı zamanda test edilmiştir. Her deneye paralel olarak spontan revertant kontrol, çözücü kontrol (DMSO) ve pozitif kontroller yapılmıştır. Her doz için 3 ayrı plağa ekim yapıldığından değerler bunların ortalaması olarak alınmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Spontan revertant koloni sayısının 2-3 katı olanlar şüpheli mutajen, 3 katından fazla olanlar mutajen olarak değerlendirilmiştir. Spontan revertant sayısının 2 katından az olan sonuçlar ise non-mutajen olarak değerlendirilmiştir.

4.1. Sitotoksik Doz Belirleme Sonuçları

Mutajenite denemelerinde kullanılan kimyasal maddelerin, toksik doz belirleme sonuçları Çizelge 4.1-4.3' de verilmiştir.

GA (Gibberellic acid) maddesinin sitotoksik dozlarının belirlenmesi için 10-50-100-500-1000-5000-10000-25000 µg/petri (0,1 ml) çalışılmıştır. Yapılan sitotoksik doz tayini denemelerinde sadece 10000 µg/ petri dozu *S. typhimurium* TA 98 suşu için sitotoksik olarak belirlenmiştir. Sitotoksik bulunmayan diğer dozlardan birbiri ile orantılı şekilde artan 50 – 100 – 500 – 1000 – 5000 µg/ petri dozları seçilerek mutajenite testine tabi tutulmuştur. Seçilen dozların sitotoksik doz belirleme deney sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. GA maddesinin artan seviyelerdeki dozlarına göre petri başına oluşan koloni sayısı.

Test Maddesi	Test Edilen Dozlar ($\mu\text{g}/$ petri)	TA 98		TA 100	
		1. Deney	2. Deney	1. Deney	2. Deney
Gibberellic acid	50	36	37	75	84
	100	45	32	85	92
	500	49	37	87	88
	1000	37	28	93	109
	5000	36	25	92	102
	Kontrol	41	33	110	152

CCC maddesinin sitotoksik dozlarının belirlenmesi için 10-100-200-400-800-1000-1600-10000 $\mu\text{g}/$ petri dozları çalışılmıştır. Yapılan sitotoksik doz tayin denemelerinde hiçbir deneme dozu toksik bulunmamıştır. Sitotoksik bulunmayan bu dozlardan birbiri ile orantılı şekilde artan 100 – 200 – 400 – 800 – 1600 $\mu\text{g}/$ petri dozları seçilerek mutajenite testine tabi tutulmuştur. Seçilen dozların sitotoksik doz belirleme deney sonuçları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge-4.2. CCC maddesinin artan seviyelerdeki dozlarına göre petri başına oluşan koloni sayısı.

Test Maddesi	Test Edilen Dozlar ($\mu\text{g}/$ petri)	TA 98		TA 100	
		1. Deney	2. Deney	1. Deney	2. Deney
CCC	100	39	39	71	72
	200	38	37	80	80
	400	36	34	82	76
	800	45	38	91	82
	1600	37	40	119	105
	Kontrol	71	65	110	119

Kinetin maddesinin sitotoksik olan dozlarının belirlenmesi için 2,5-10-25-100-250-1000-2500-10000 µg/ petri çalışılmıştır. Bu dozlardan 10000 µg/ petri dozunda koloni gözlenmesine rağmen elde edilen sonuçlar, kontrol plağında bulunan koloni sayısının yarı değerinin altında bir değere sahip olduğu için toksik doz olarak kabul edilmiştir. Sitotoksik olmayan diğer dozlardan birbiri ile orantılı şekilde artan 2,5 – 25 – 250 – 1000 – 2500 µg/ petri dozları seçilerek mutajenite testine tabi tutulmuştur. Seçilen dozların sitotoksik doz belirleme deney sonuçları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Kinetin maddesinin artan seviyelerdeki dozlarına göre petri başına oluşan koloni sayısı.

Test Maddesi	Test Edilen Dozlar (µg/ petri)	TA 98		TA 100	
		1. Deney	2. Deney	1. Deney	2. Deney
Kinetin	2,5	179	104	135	78
	25	226	145	115	65
	250	190	151	120	71
	1000	163	143	124	69
	2500	100	99	100	82
	Kontrol	174	171	140	110

2,4,6- trichlorobenzoic acid maddesinin sitotoksik olan dozlarının belirlenmesi için 5-50-500-1000-2500-5000-10000-50000 µg/ petri çalışılmıştır. Bu dozlardan 5000, 10000, 50000 µg/0.1ml dozları tamamen sitotoksik olarak belirlenmiştir. Sitotoksik olmayan diğer dozlardan birbiri ile orantılı şekilde artan 5 – 50 – 500 – 1000 – 2500 µg/petri dozları seçilerek mutajenite testine tabi tutulmuştur. Seçilen dozların sitotoksik doz belirleme deney sonuçları Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. 2,4,6- trichlorobenzoic acid maddesinin artan seviyelerdeki dozlarına göre petri başına oluşan koloni sayısı

Test Maddesi	Test Edilen Dozlar ($\mu\text{g}/\text{petri}$)	TA 98		TA 100	
		1. Deney	2. Deney	1. Deney	2. Deney
2,4,6- trichlorobenzoic acid	5	27	52	62	117
	50	40	40	76	106
	500	23	49	72	119
	1000	28	36	80	76
	2500	25	35	88	77
	Kontrol	33	41	92	110

4.2. Salmonella / Mikrozoom Mutajenite Test Sonuçları

Çalışmada kullanılan bitki gelişim düzenleyicilerinin, S9 enzimi varlığında ve yokluğundaki plak inkorporasyon test sonuçları *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 için Çizelge 4.5- 4.12'de verilmiştir. Denemelere başlamadan önce suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları belirlenmiş; sonuçların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5 ve 4.6 incelendiğinde, Gibberellik asit maddesinin, TA 98 ve TA 100 suşuyla S9 enzimi kullanılarak ve kullanılmadan yapılan testlerde, dozların tümü negatif mutajen olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol (Spontan revertant) grubunun koloni sayıları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.5. GA maddesinin 5 dozunun farklı zamanlarda elde edilen Salmonella AMES mutajenite test sonuçları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/ petri)	Revertant Koloni Sayısı Aritmetik Ortalama							
		TA 98				TA 100			
		S9'suz		S9'lu		S9'suz		S9'lu	
Gibberellic acid	50	23*	26*	32	64	142*	164*	260	219
	100	27*	25*	57	72	146*	104*	199	257
	500	23*	34*	50	62	174*	241*	253	225
	1000	24*	56*	54	66	162*	203*	256	220
	5000	39*	33*	51	78	143*	122*	299	255
Spontan Kontrol	100	35*	30*	53	60	130*	138*	175	201
DMSO Kontrol	100	43*	38*	66	51	150*	154*	171	182
Pozitif Kontrol	100	1600*	960*	619	697	646*	624*	675	701

* Bu değerler 3 petrideki koloni sayılarının ortalamasıdır.

Çizelge 4.6. GA maddesinin 5 dozunun mutajenite test sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/ petri)	Revertant Koloni Sayısı Aritmetik Ortalama±standart sapma			
		TA 98		TA 100	
		S9'suz	S9'lu	S9'suz	S9'lu
Gibberellic acid	50	24,5±1,5 ^a	48±16 ^a	153±11 ^a	239,5±20,5 ^a
	100	26±1 ^a	64,5±7,5 ^a	125±21 ^a	228±29 ^a
	500	28,5±5,5 ^a	56±6 ^a	207,5±33,5 ^a	239±14 ^a
	1000	40±16 ^a	60±6 ^a	182,5±20,5 ^a	238±18 ^a
	5000	36±3 ^a	64,5±13,5 ^a	132,5±10,5 ^a	277±22 ^a
Spontan Kontrol	100	32,5±2,5	56,5±3,5	134±4	188±13
DMSO Kontrol	100	40,5±2,5	58,5±7,5	152±2	176,5±5,5
Pozitif Kontrol	100	1280±320	658±39	635±11	688±13

a: negatif, b: pozitif, c: şüpheli mutajen

Çizelge 4.7 ve 4.8'deki sonuçlarda görüldüğü gibi Kinetin maddesinin TA 98 suşunda S9 kullanılmadan yapılan testlerinde 2500 µg/petri dozunun mutajen olabileceği belirlenmiştir. Diğer dozları negatif olarak bulunmuştur. Tüm sonuçlar

kontrol (Spontan revertant) grubunun koloni sayıları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.7. Kinetin maddesinin 5 dozunun farklı zamanlarda elde edilen Salmonella AMES mutajenite test sonuçları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/ petri)	Revertant Koloni Sayısı Aritmetik Ortalama							
		TA 98				TA 100			
		S9'suz		S9'lu		S9'suz		S9'lu	
Kinetin	2,5	23*	23*	65	64	251*	211*	132	206
	25	39*	38*	72	78	267*	204*	250	281
	250	49*	38*	93	84	264*	232*	244	337
	1000	57*	55*	82	91	242*	262*	258	398
	2500	1131*	257*	1140	436	230*	265*	1040	628
Spontan Kontrol	100	30*	35*	53	60	194*	142*	175	201
DMSO Kontrol	100	35*	30*	66	51	180*	198*	171	182
Pozitif Kontrol	100	1954*	960*	619	697	1078*	646*	675	701

* Bu değerler 3 petrideki koloni sayılarının ortalamasıdır.

Çizelge 4.8. Kinetin maddesinin 5 dozunun Salmonella AMES mutajenite test sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/ petri)	Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma			
		TA 98		TA 100	
		S9'suz	S9'lu	S9'suz	S9'lu
Kinetin	2,5	23±0 ^a	64,5±0,5 ^a	231±20 ^a	169±37 ^a
	25	38,5±0,5 ^a	75±3 ^a	235,5±31,5 ^a	215,5±34,5 ^a
	250	43,5±5,5 ^a	88,5±4,5 ^a	248±16 ^a	290,5±46,5 ^a
	1000	56±1 ^a	86,5±4,5 ^a	252±10 ^a	328±70 ^a
	2500	694±437 ^b	788±352 ^b	247,5±17,5 ^a	834±206 ^b
Spontan Kontrol		32,5±2,5	56,5±3,5	168±26	188±13
DMSO Kontrol		32,5±2,5	58,5±7,5	189±9	176,5±5,5
Pozitif Kontrol	100	1457±497	658±39	862±216	688±13

a: negatif, b: pozitif, c: şüpheli mutajen

Çizelge 4.9 ve 4.10'daki sonuçlarda görüldüğü üzere CCC maddesinin TA 98 ve TA 100 suşlarıyla S9 enzimi varlığında ve yokluğunda yapılan testlerde CCC

maddesinin dozlarının mutajen olmadığı belirlenmiştir. Tüm sonuçlar kontrol (Spontan revertant) grubunun koloni sayıları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.9. CCC maddesinin 5 dozunun farklı zamanlarda elde edilen Salmonella AMES mutajenite test sonuçları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/ petri)	Revertant Koloni Sayısı Aritmetik Ortalama							
		TA 98				TA 100			
		S9'suz		S9'lu		S9'suz		S9'lu	
CCC	100	31*	45*	40	31	112*	160*	125	132
	200	19*	38*	69	66	99*	108*	154	147
	400	20*	57*	87	43	151*	160*	208	159
	800	38*	34*	85	89	144*	128*	219	153
	1600	48*	50*	101	72	183*	150*	203	161
Spontan Kontrol		30*	34*	67	51	138*	123*	129	155
DMSO Kontrol		25*	30*	60	61	150*	136*	122	187
Pozitif Kontrol	100	960*	326*	560	510	624*	669*	402	464

* Bu değerler 3 petrideki koloni sayılarının ortalamasıdır

Çizelge 4.10. CCC maddesinin 5 dozunun mutajenite test sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/ petri)	Revertant Koloni Sayısı Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma			
		TA 98		TA 100	
		S9'suz	S9'lu	S9'suz	S9'lu
CCC	100	38±7 ^a	35,5±4,5 ^a	136±24 ^a	128,5±2,5 ^a
	200	28,5±9,5 ^a	67,5±1,5 ^a	103,5±4,5 ^a	150,5±3,5 ^a
	400	38,5±18,5 ^a	65±22 ^a	155,5±4,5 ^a	183,5±24,5 ^a
	800	36±2 ^a	87±2 ^a	136±8 ^a	186±33 ^a
	1600	49±1 ^a	86,5±3,5 ^a	166,5±16,5 ^a	182±21 ^a
Spontan Kontrol		32±2	59±8	130,5±7,5	142±13
DMSO Kontrol		27,5±2,5	60,5±0,5	143±7	154,5±32,5
Pozitif Kontrol	100	643±317	535±25	646,5±22,5	434±30

a: negatif, b: pozitif, c: şüpheli mutajen

Çizelge 4.11 ve 4.12' deki sonuçlara göre 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin TA 98 suşuyla S9 enzimi kullanılmadan testlerde 2500 µg/petri dozunun mutajen

olabileceği belirlenmiştir. Tüm sonuçlar kontrol (Spontan revertant) grubunun koloni sayıları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.11. 2,4,6- trichlorobenzoic acid maddesinin TA 98 ve TA 100 için mutajenite sonuçları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/ petri)	Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma							
		TA 98				TA 100			
		S9'suz		S9'lu		S9'suz		S9'lu	
2,4,6- trichlorobenzoic acid	5	80*	26*	58	44	82*	87*	118	89
	50	45*	30*	79	52	139*	140*	99	124
	500	59*	22*	55	80	153*	144*	151	97
	1000	43*	23*	59	75	170*	128*	137	95
	2500	227*	140*	125	92	143*	144*	142	141
Spontan Kontrol		48*	35*	67	51	139*	112*	129	155
DMSO Kontrol		35*	40*	60	61	150*	121*	122	187
Pozitif Kontrol	100	881*	1954*	560	510	624*	862*	402	464

* Bu değerler 3 petrideki koloni sayılarının ortalamasıdır

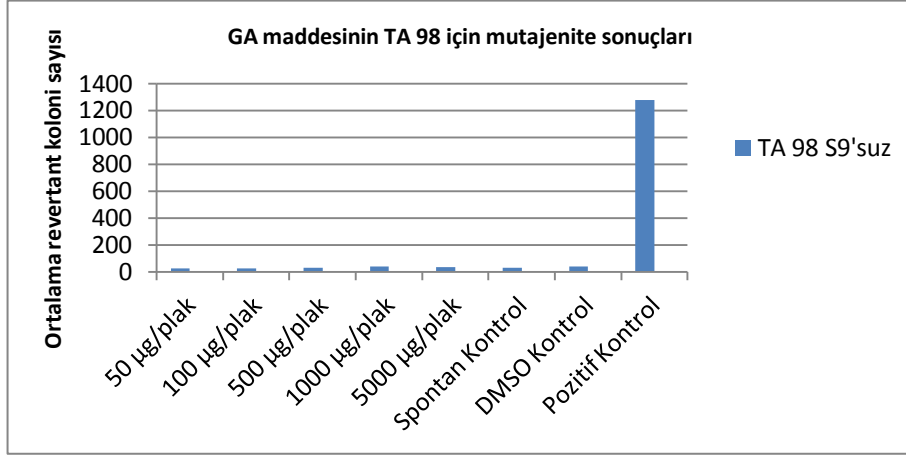
Çizelge 4.12. 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 5 dozunun mutajenite test sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/ petri)	Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma			
		TA 98		TA 100	
		S9'suz	S9'lu	S9'suz	S9'lu
2,4,6- trichlorobenzoic acid	5	53±27 ^a	51±7 ^a	84,5±2,5 ^a	103,5±14,5 ^a
	50	37,5±7,5 ^a	65,5±13,5 ^a	139,5±0,5 ^a	111,5±12,5 ^a
	500	40,5±18,5 ^a	67,5±12,5 ^a	148,5±4,5 ^a	124±27 ^a
	1000	33±10 ^a	67±8 ^a	149±21 ^a	116±21 ^a
	2500	183,5±43,5 ^b	108,5±16,5 ^a	143,5±0,5 ^a	141,5±0,5 ^a
Spontan Kontrol		41,5±6,5	59±8	125,5±13,5	142±13
DMSO Kontrol		37,5±2,5	60,5±0,5	135,5±14,5	154,5±32,5
Pozitif Kontrol	100	1417,5±536,5	535±25	743±119	434±30

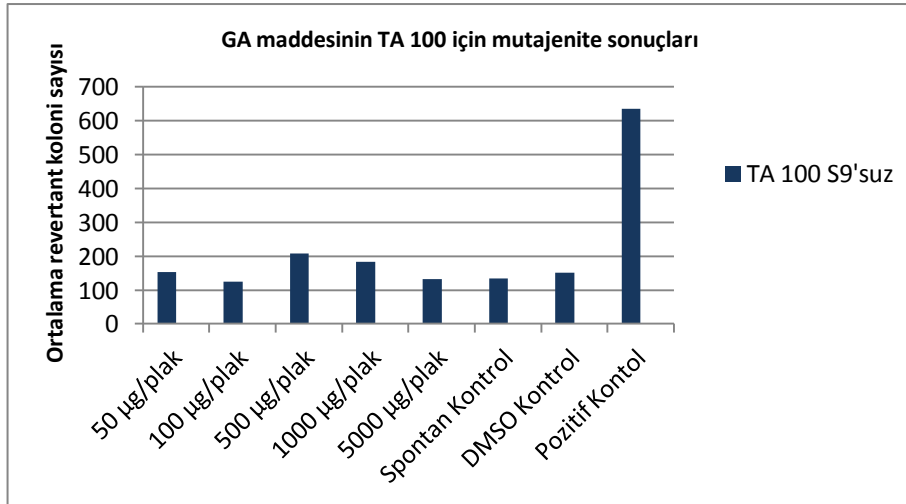
a: negatif, b: pozitif, c: şüpheli mutajen

Test bakterilerimizin (*S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları) kimyasal test maddeleri ile verdiği doz cevap eğrileri aşağıda grafiklerde yer almaktadır.

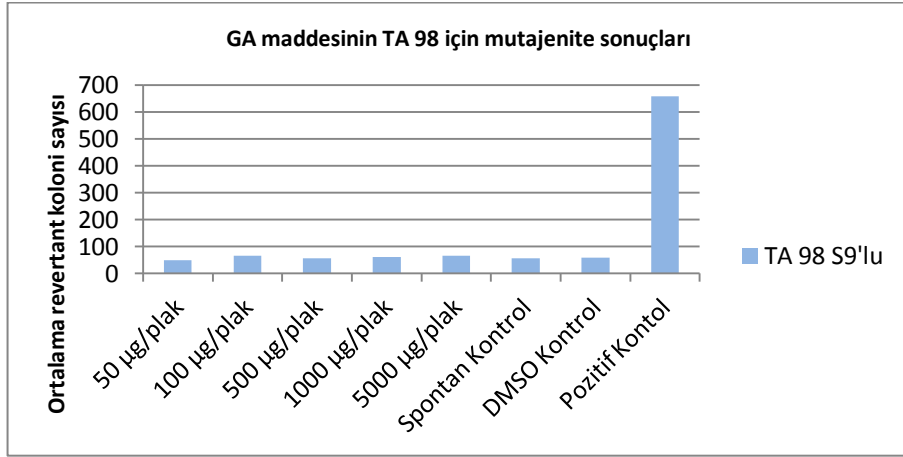
Şekil 4.1-4.6’de görüldüğü üzere GA maddesinin hiçbir dozu S9 enzimi varlığında ve yokluğunda TA 100 ve TA 98 suşlarına mutajenik etkili değildir. Doza bağlı bir artış da söz olmadığı için GA maddesinin tüm dozları ”non mutajen ” olarak belirlenmiştir.



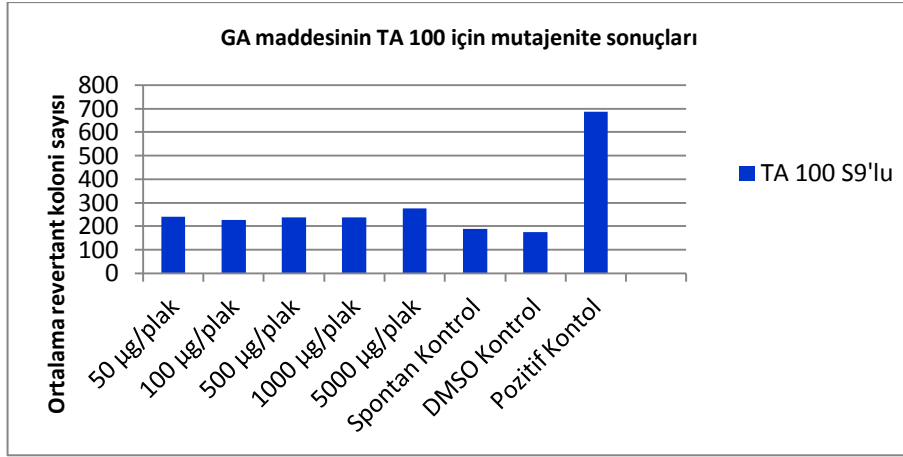
Şekil 4.1. GA’nın TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9’suz mutajenite deneyi)



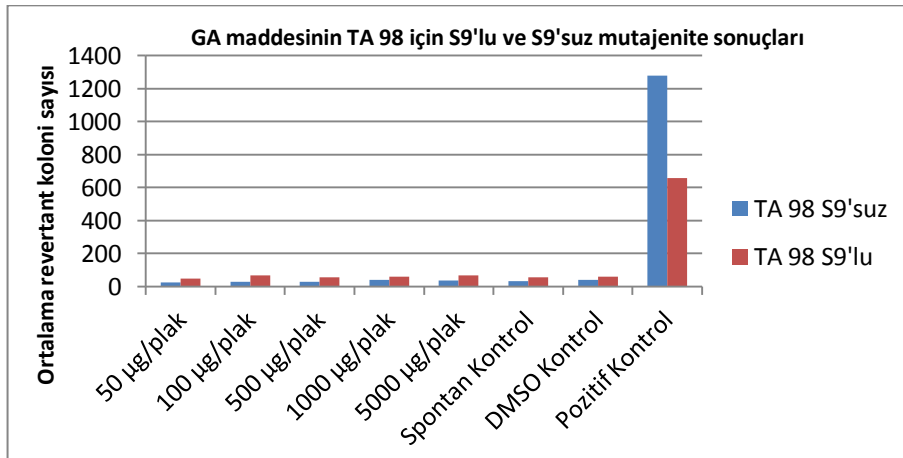
Şekil 4.2. GA’nın TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9’suz mutajenite deneyi)



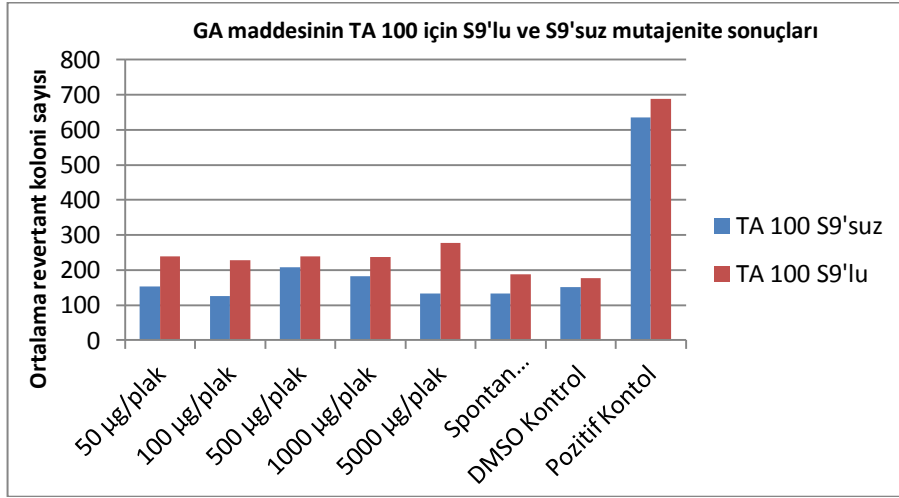
Şekil 4.3. GA'nın TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi)



Şekil 4.4. GA'nın TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi)

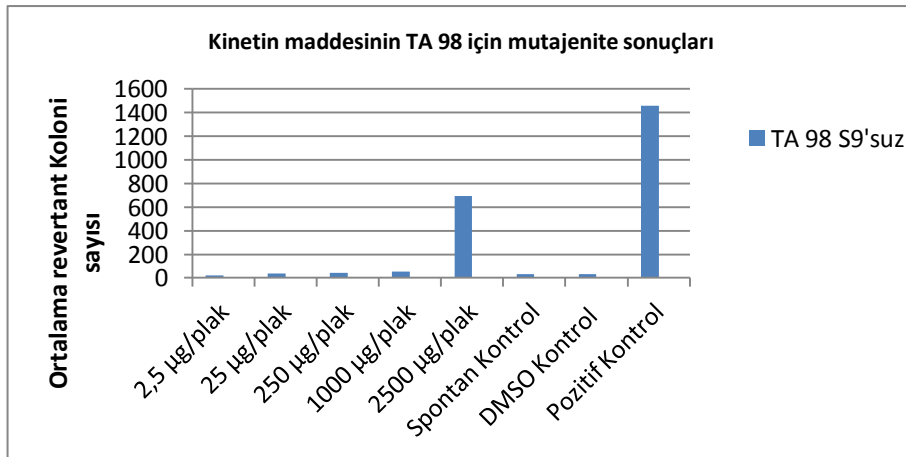


Şekil 4.5. GA'nın S9'lu ve S9'suz deneyde TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği

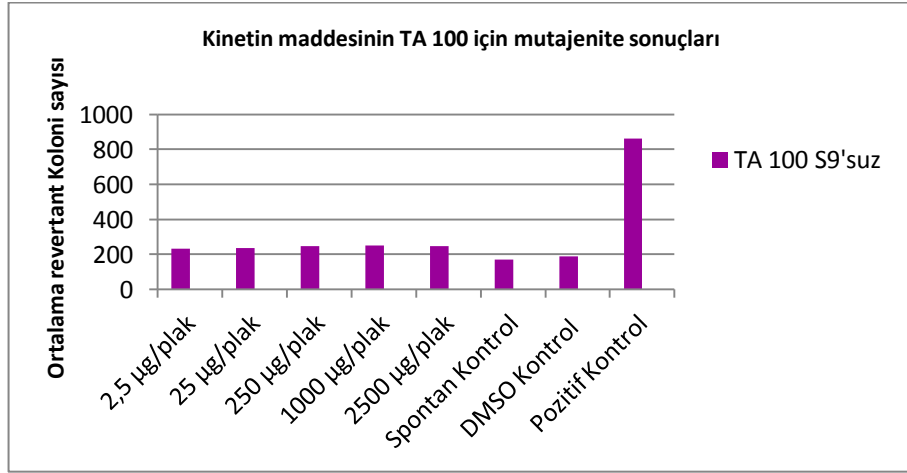


Şekil 4.6. GA'nın S9'lu ve S9'suz deneyde TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği

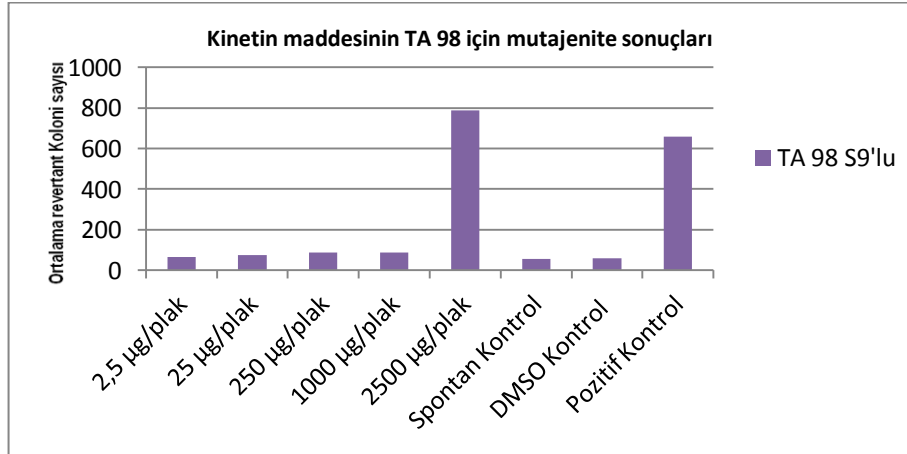
Şekil 4.7-4.12'yi inceleyecek olursak, 4.7, 4.9 ve 4.10 grafiklerde görüldüğü üzere Kinetin maddesinin 2500 µg/petri dozu, TA 98 suşu ile S9 enzimi varlığında ve yokluğunda, TA 100 suşu ile S9 enzimi varlığında yapılan deneylerde elde edilen koloni sayısı spontan revertant koloni sayısının 2 katından fazla olduğu için 2500 µg/petri dozu TA 98 suşu için "mutajenik" olarak değerlendirilmiştir.



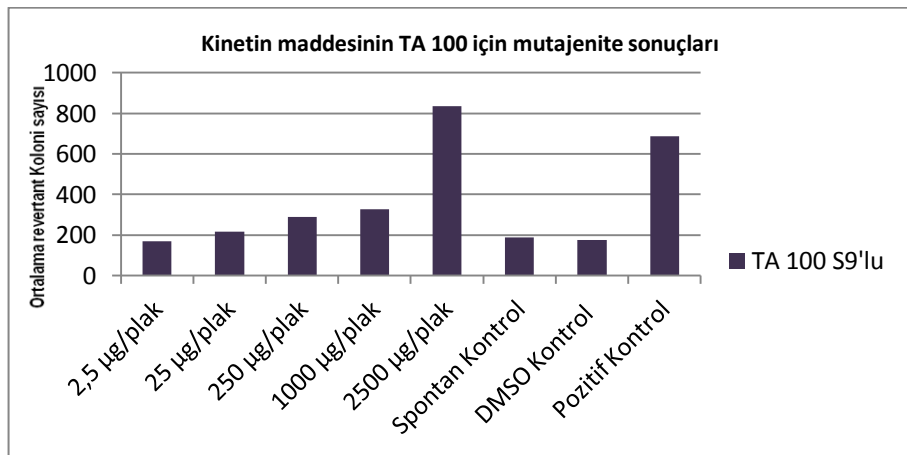
Şekil 4.7. Kinetin'in TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)



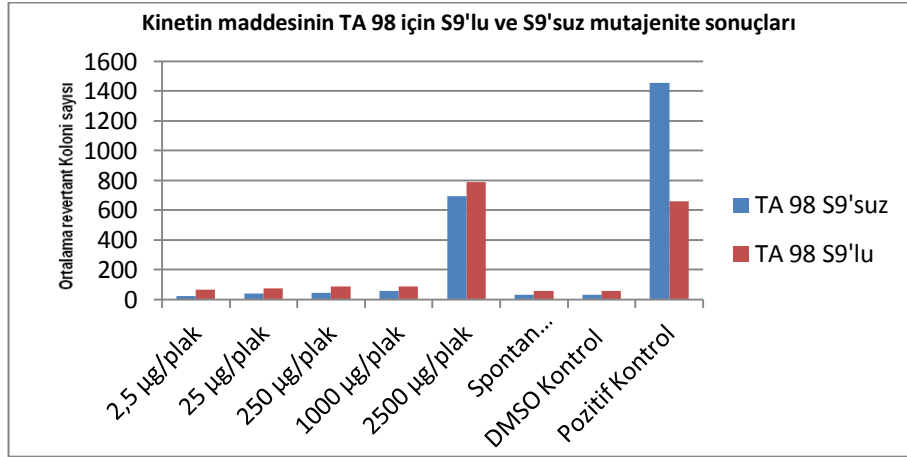
Şekil 4.8. Kinetin'in TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)



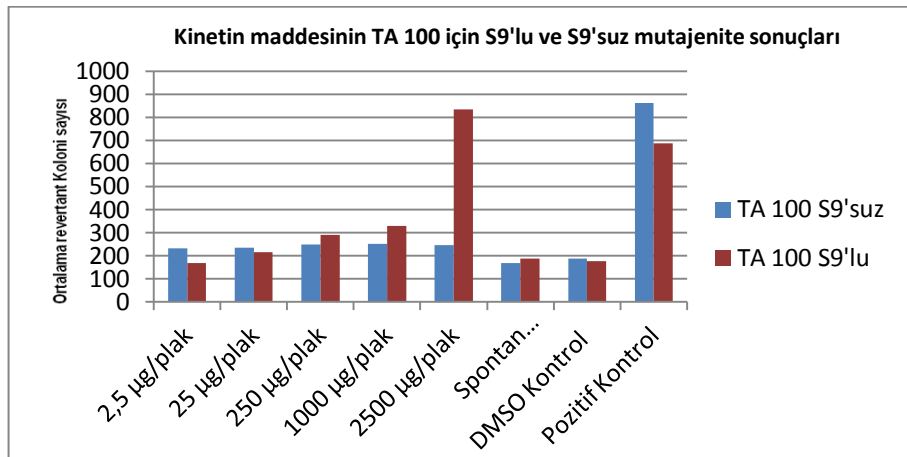
Şekil 4.9. Kinetin'in TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi)



Şekil 4.10. Kinetin'in TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi)

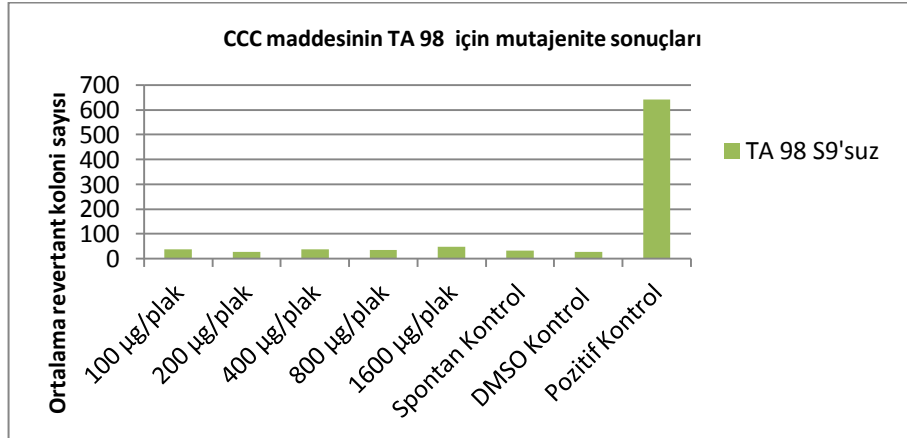


Şekil 4.11. Kinetin'in S9'lu ve S9'suz deneyde TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği

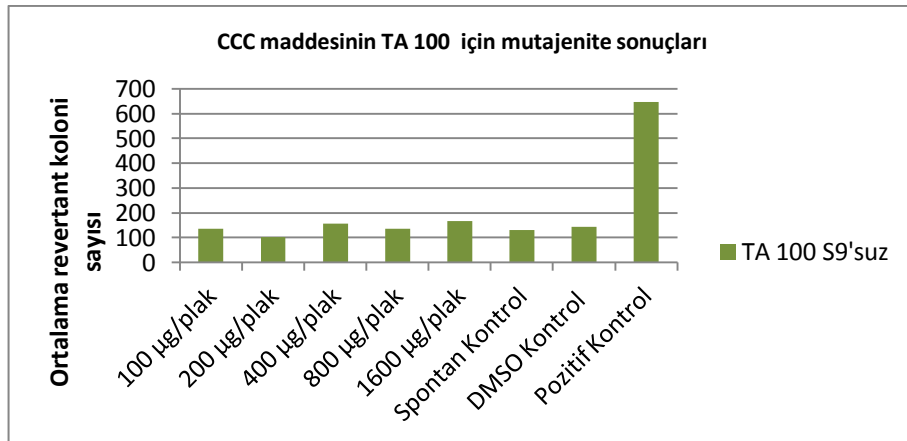


Şekil 4.12. Kinetin'in S9'lu ve S9'suz deneyde TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği

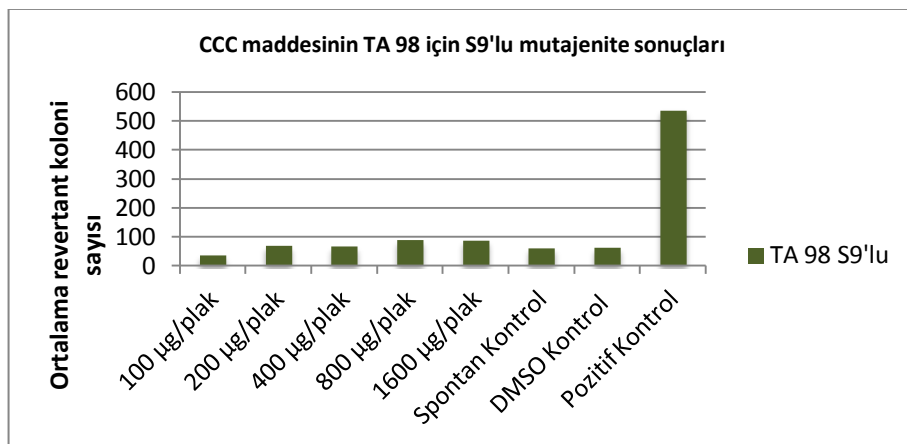
Şekil 4.13-4.18 incelendiğinde CCC maddesinin S9 enzimi varlığında ve yokluğunda yapılan deneylerde elde edilen koloni sayıları spontan kontrol koloni sayısının 2 katından az ya da 2 katına yakın bulunmuştur. Bu nedenle CCC maddesi "non-mutajen" olarak değerlendirilmiştir.



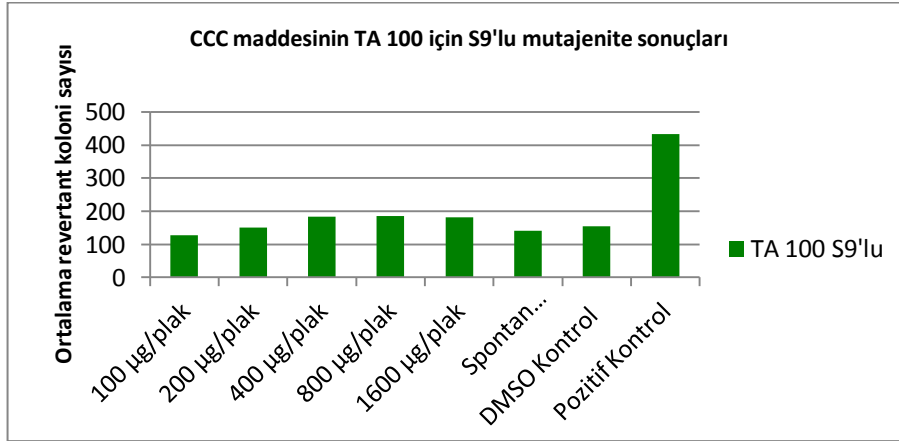
Şekil 4.13. CCC'nin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)



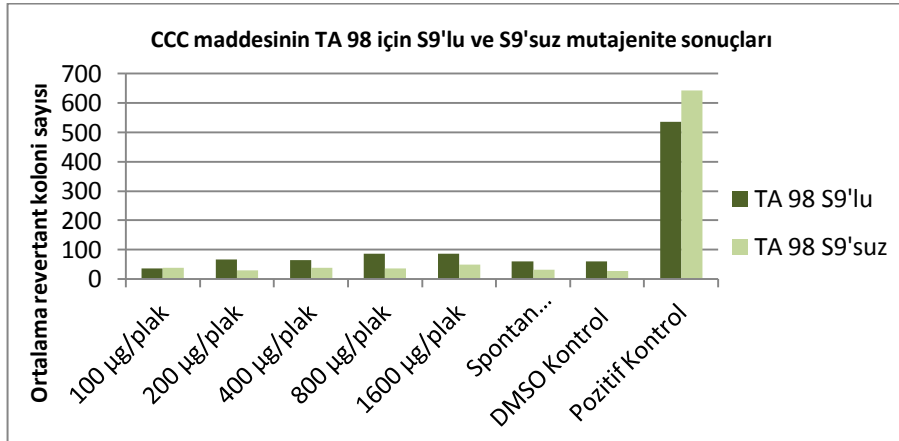
Şekil 4.14. CCC'nin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)



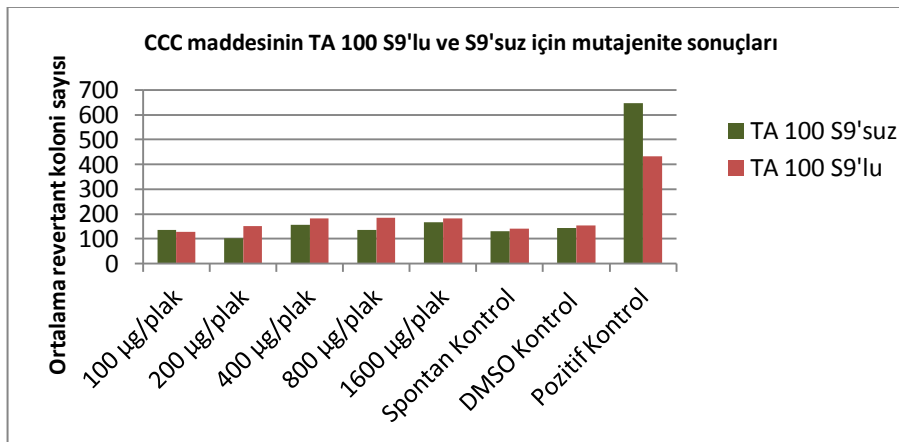
Şekil 4.15. CCC'nin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi)



Şekil 4.16. CCC'nin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu mutajenite deneyi)

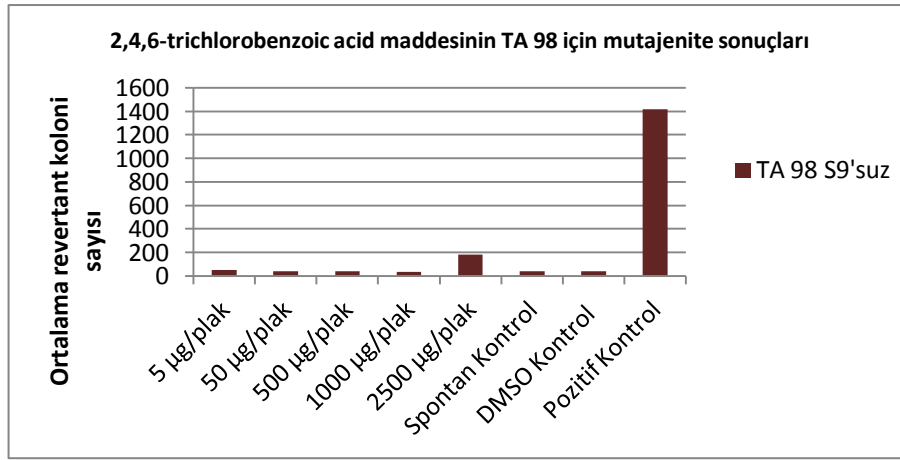


Şekil 4.17. CCC'nin S9'lu ve S9'suz deneyde TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği

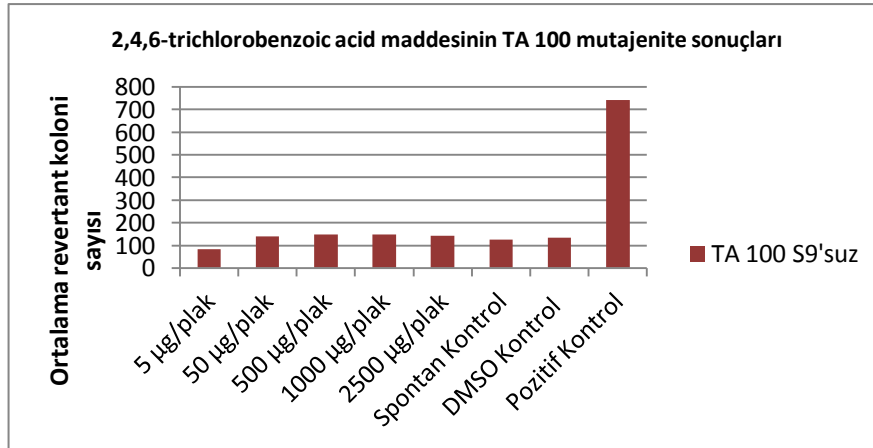


Şekil 4.18. CCC'nin S9'lu ve S9'suz deneyde TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği

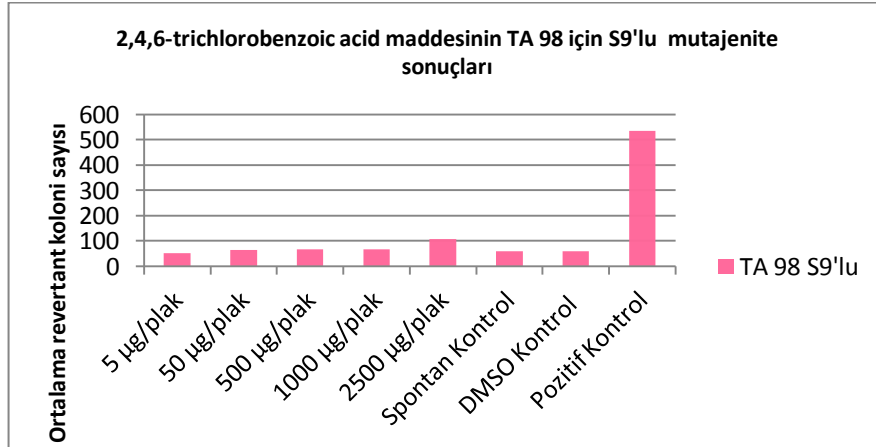
Şekil 4.19-4.24 incelendiğinde, 4.19. grafikte görüldüğü üzere 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 2500 µg/plak dozu, TA 98 suşu ile S9 enzimi yokluğunda yapılan deneylerde elde edilen koloni sayısı spontan revertant koloni sayısının 2 katından fazla olduğu için 2500 µg/plak dozu TA 98 suşu için "mutajenik" olarak değerlendirilmiştir.



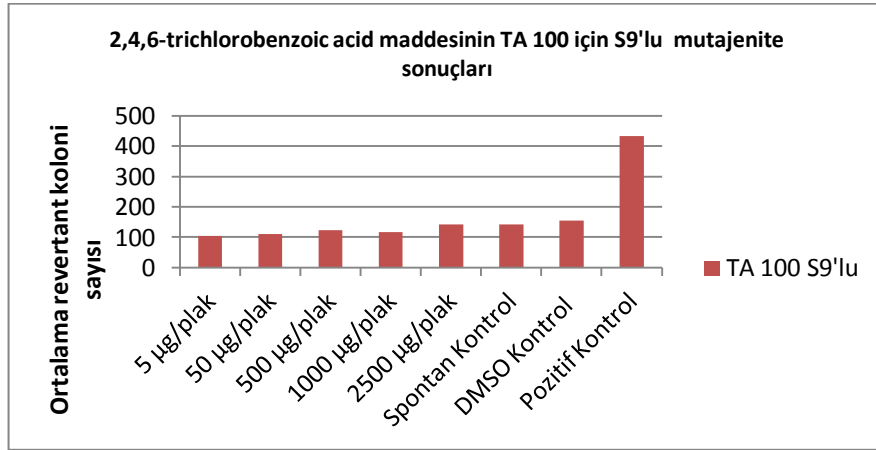
Şekil 4.19. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)



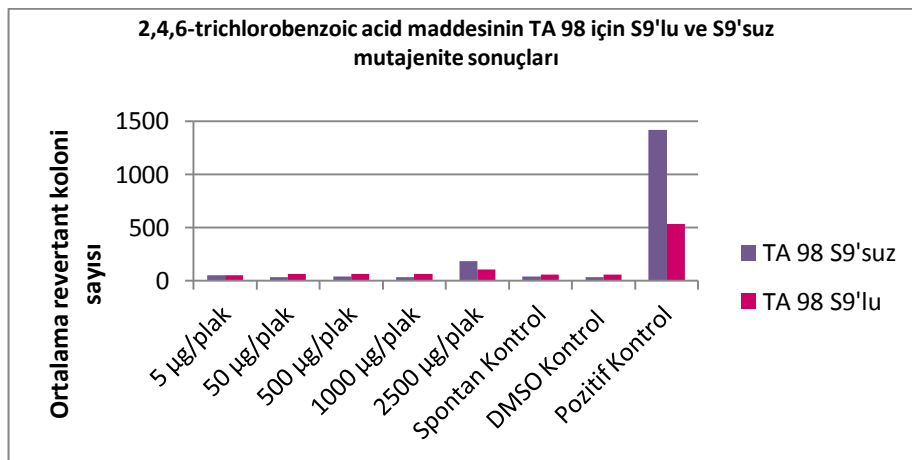
Şekil 4.20. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'suz mutajenite deneyi)



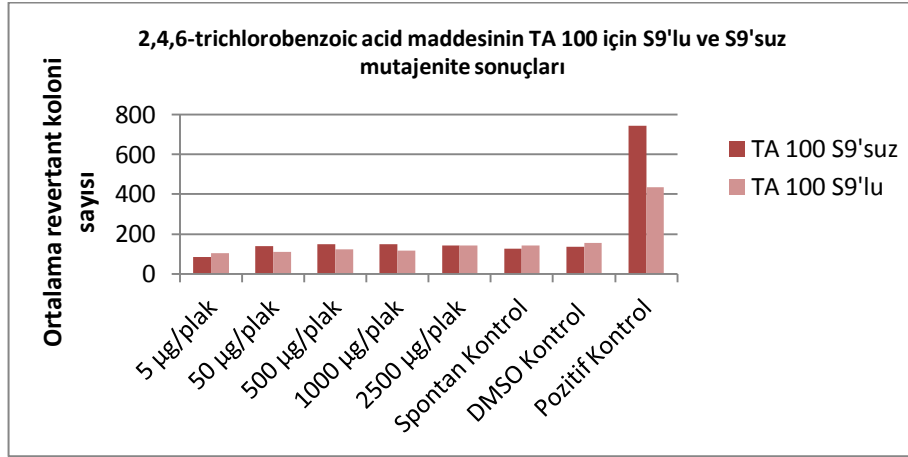
Şekil 4.21. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu)



Şekil 4.22. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği (S9'lu)

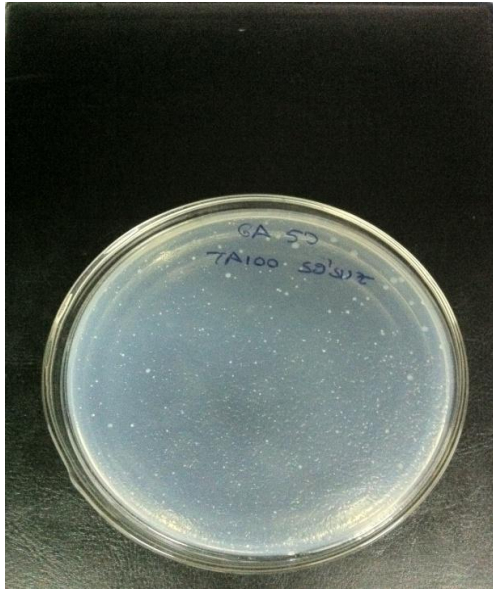


Şekil 4.23. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in S9'lu ve S9'suz deneyde TA 98 suşu ile verdiği doz cevap grafiği

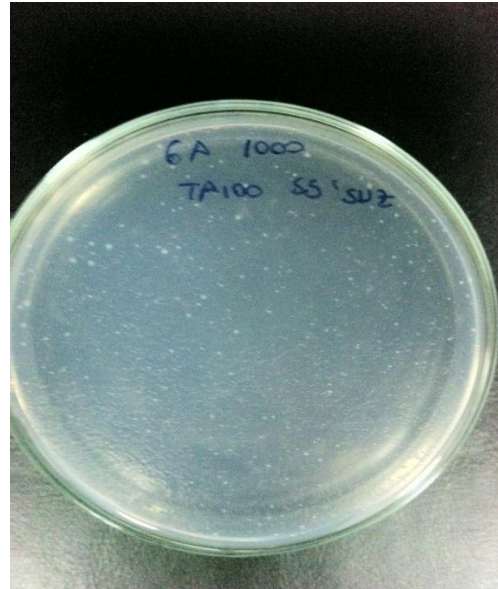


Şekil 4.24. 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in S9'lu ve S9'suz deneyde TA 100 suşu ile verdiği doz cevap grafiği

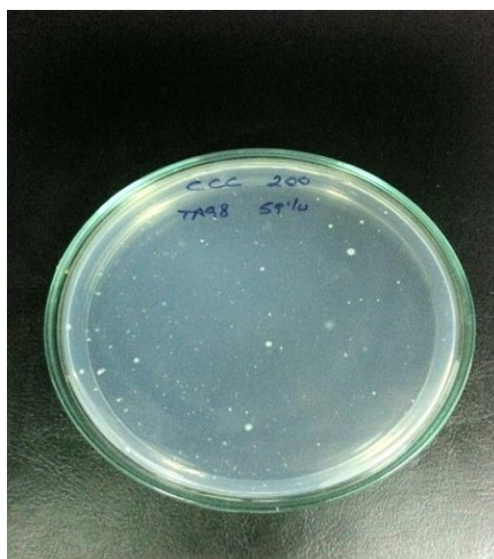
Çalışmadan elde edilen sonuçlardan bazılarının resimleri Resim 4.1-4.8' de gösterilmiştir.



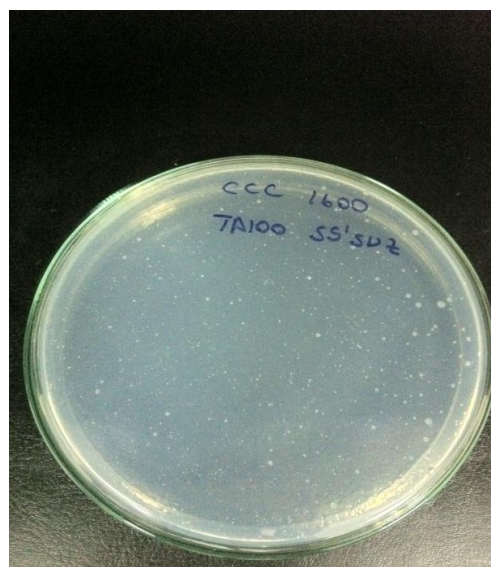
Resim 4.1. GA 50 µg dozu S9(-)



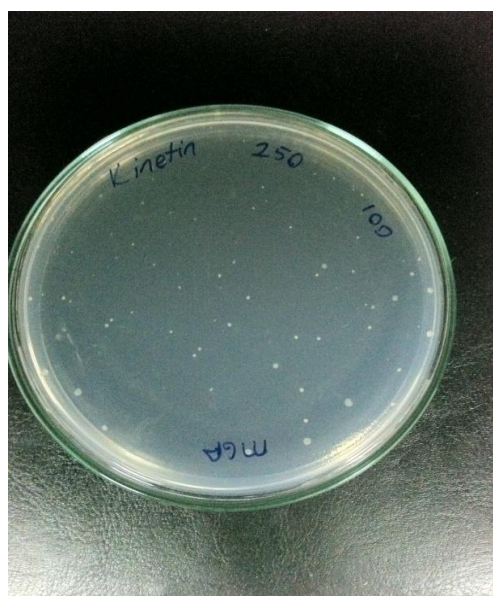
Resim 4.2. GA 1000 µg dozu S9(-)



Resim 4.3. CCC 200 µg dozu S9(+)



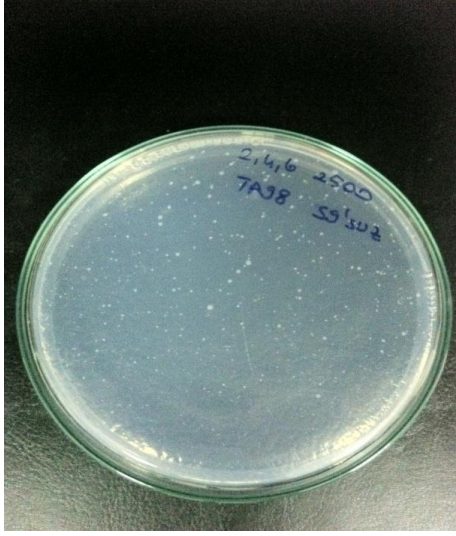
Resim 4.4. CCC 1600 µg dozu S9(-)



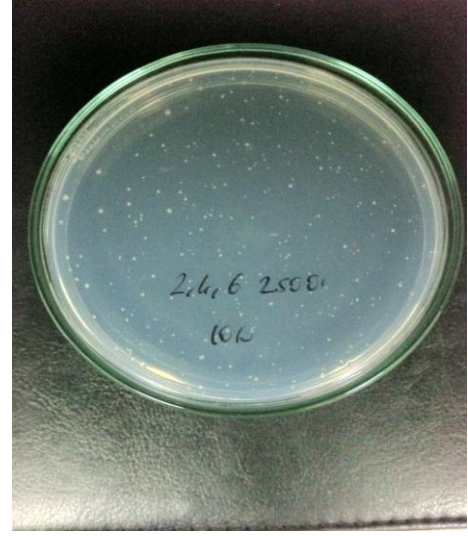
Resim 4.5. Kinetin 250 µg dozu S9(-)



Resim 4.6. Kinetin 2500 µg dozu S9(-)



Resim 4.7. 2,4,6-trichlorobenzoic acid 2500 µg dozu S9(-)



Resim 4.8. 2,4,6-trichlorobenzoic acid 2500 µg dozu S9(-)

Test edilen kimyasal maddelerin *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 üzerinde herhangi bir mutajenik etkisinin olabilmesi için, her madde ile eşzamanlı olarak hazırlanan kontrol petrilerindeki (0 dozu) koloni sayısının; maksimum sayılarının iki veya 3 katından fazla değerlerde olması gerekmektedir [Maron ve Ames, 1983]. Elde ettiğimiz sayılara göre; GA ve CCC maddeleri TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde mutajenik etkili değildir. Kinetin maddesinin 2500 µg/petri dozu TA 98 ve TA 100 suşları üzerine mutajenik olarak tespit edilmiştir. 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 2500 µg/petri dozu TA 98 suşu üzerine mutajenik olarak tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hormonların bitkiler üzerindeki etkileri çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Hormonların bu etkilerinin bilimsel olarak anlaşılmasının ardından bu maddelere benzer hatta doğal olanlarından daha da etkin hormonlar sentetik olarak üretilmiştir ve hala da üretilmektedir [Thomas, 1981; Weichmann, 1987]. Ancak bu sentetik maddelerin (bitki gelişim düzenleyicilerinin), bitkilerde kalıntı bırakması, bu maddelerin kullanımında sınırlama getirmiştir [Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 2012].

BGD uygulamalarında en önemli konulardan biri bu maddelerin insana, çevreye ve bitkiye zarar vermeyecek düzeyde ve hasattan belirli bir süre önce kullanılmasıdır [Halloran ve Kasım, 2002]. BGD'lerin yetersiz veya fazla uygulanmaları, uygulama zamanının tam belirlenememesi gibi durumlar, istenmeyen sonuçlar doğurabilmektedir. [Westwood, 1993; Akgül, 2008]. Büyüme düzenleyici maddeler çok düşük dozlar da etkili olduklarından çok az bir miktar yeterli olmaktadır. Ancak "daha yüksek doz, daha fazla etki" gösterir inancı tarım uygulamalarında hem bitki ve toprağa zarar vermekte hem de bu bitkilerden beslenen insan ve diğer canlıların hayatlarını tehlikeye sokmaktadır [Halloran ve Kasım, 2002].

Tarımda kullanımı teşvik edilen, BGD'lerin kontrolsüz ve bilinçsiz kullanımı sonucu ürünlerde oluşabilen kalıntılar insan ve çevre sağlığı üzerine toksik etkiler oluşturmaktadırlar. BGD'ler organizmadan tamamen atılamayıp organlarda depolanmakta ve fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır [Yılmaz ve Yüksel, 2002]. Gelişmiş toplumlarda bu uygulamalar daha bilinçli ve sıkı kontroller altında yapılmaktadır. Ancak ülkemizde BGD'lerin zaman zaman bilinçsizce uygulanmaları söz konusu olabilmektedir [Çetinkaya ve Baydan, 2006].

Özellikle tarım uygulamalarında kullanılan kimyasal maddelerin öneminin artmasıyla, bu kimyasal maddelerin biyolojik aktiviteleri ve sağlığımız üzerindeki etkileri, son zamanlardaki araştırmaların ana konusu haline gelmiştir. Bu yüzden, günlük hayatta farklı nedenlerle ve yollarla maruz kalınan kimyasalların mutajenik

etkilerinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Bu doğrultuda, kimyasal maddelerin mutajenik etkileri çeşitli test yöntemleri ile araştırılmaktadır [Kutlu ve ark., 2011].

Cappuccino ve Sherman (2001), kimyasal bileşiklerin kullanımının geçen on yıla göre arttığını ve çok geniş kullanım alanına sahip olan bu maddelerin; yapılan araştırmalar sonucu yaklaşık % 90'nının karsinojen ve mutajen olduğunu belirtmişlerdir.

BGD'ler ile mutajenite tayini yapılmış araştırmalar yok denecek kadar azdır. Akut zehirli etki bakımından BGD'lerin çoğu hemen öldürücü olmasa da, yapılan deneysel çalışmalar, bu maddelere uzun süreli maruz kalındığında karsinojenik, immunotoksik, üremeye yönelik vb zararlı etkilere neden olabileceğini göstermektedir [Çetinkaya ve Baydan, 2006].

Örneğin; 2,4-D yakın zamana kadar yaygın olarak kullanılan oksin etkisine sahip bir bitki düzenleyicisiydi [Özbek, 1947]. Ancak 2,4-D'nin akut toksik, kronik toksik, teratogenik ve kanserojen etkileri nedeniyle meyve tutumunda kullanımı yasaklanmıştır [Eser 1989, Demir ve ark., 1991].

Bütün bu nedenlerle, araştırmamızda tarımda sıklıkla kullanılan çeşitli bitki gelişim düzenleyicilerinin (BGD) potansiyel mutajenik etkileri, dolayısıyla kanserojen olup olmadıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan araştırmada bitki gelişim düzenleyicilerinden, Gibberellic acid, Kinetin, Chlormequat chloride ve 2,4,6-trichlorobenzoic acid'in mutajenite tayinleri Ames Salmonella/mikrozom test sistemi ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak çalışılmıştır. Deneyle S9 enzimi varlığında ve yokluğunda test maddelerinin 5'er dozu ile yapılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan TA 98 suşu, çerçeve kayması mutasyonuna neden olan kimyasal maddelerin teşhisinde kullanılırken, TA 100 suşu baz değişimi mutajenlerinin teşhisinde kullanılmaktadır [Maron ve Ames, 1983].

Ames'e (1973b) göre bakteri suşlarının spontan olarak his- durumundan his+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20-50 revertant/plak; TA 100 için 75-200 revertant/plaktır. Araştırmamız sonucunda TA 98 suşu için S9 enzimi varlığında ortalama spontan koloni sayısı, farklı deneylerde $56,5 \pm 3,5$ ve 59 ± 8 olarak, yokluğunda ise $32,5 \pm 2,5$, 32 ± 2 ve $41,5 \pm 6,5$ olarak bulunmuştur. TA 100 suşu için ise S9 enzimi varlığında ortalama spontan koloni sayısı, farklı deneylerde 188 ± 13 ve 142 ± 13 olarak, yokluğunda 134 ± 4 , 168 ± 26 , $130,5 \pm 7,5$ ve $125,5 \pm 13,5$ olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bazı değerler, Ames (1973b)'in belirttiği değerlerden arasında bulunmuştur. Ancak TA 98 suşu için S9 enzimi varlığında elde edilen değerlerin sınırı çok az da olsa aşması çeşitli şartlardan kaynaklanabilmektedir. Bu şartlar arasında minimal ortamın tipi, glikoz-6-fosfatın derişimi, β -NADP, fosfat tamponu derişimi [Boath, 1980], petrilere ekilen hücre sayısı, glikoz ve tuz çözeltisinin derişimi, petrilere ekilen minimal agarın hacmi, top agarın miktarı, yayılma şekli ve sıcaklığı, etüvdeki nem oranı [Belser, 1981], sıvı üreme ortamının hazırlanması [Herbold, 1983], S9 fraksiyonunun miktarı, minimal agarın bileşimi ve hazırlanmasındaki farklılıklar gibi etkileri sayabilir [Aeschbacher ve ark., 1983].

Yaptığımız çalışmada mutajenik etkilerini araştırdığımız Gibberellic acid, Kinetin ve Chlormequat chloride maddelerinin mutajenik potansiyelleri hakkında çeşitli çalışmalar mevcutken, 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin mutajenite tayinlerine ait literatürlerde bir veriye rastlanmamıştır. Dolayısıyla çalışma bu yönüyle yeni bir çalışma niteliğindedir.

Araştırmamızda Gibberellic acid maddesinin mutajenite tayininden önce sitotoksik dozları belirlenmiştir. Gibberellic acid'in 10000 μg /petri dozu *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için sitotoksik bulunmuştur. Sitotoksik doz belirlendikten sonra GA'nın 50-100-500-1000-5000 μg /petri dozlarının mutajenite tayinleri yapılmıştır. Gibberellic acid maddesinin tüm dozları ile elde edilen koloni sayıları, spontan kontrol koloni sayısına yakın veya 2 katından az bulunduğu için S9 enzimi varlığında ve yokluğunda non mutajenik değerlendirilmiştir. Dolayısıyla test

sonuçlarına göre, Gibberellic acid maddesinin çerçeve kayması mutasyonu ve baz çifti değişimi mutasyonuna neden olmadığı gözlenmiştir.

Öksüzoglu'nun 2000 yılında yaptığı bir çalışmada, çeşitli bitki büyüme hormonlarının mutajenik etkilerini Salmonella/mikrozom test sistemi ile araştırılmıştır. Çalışmada bitki büyüme hormonlarından; Gibberellik asit ve bunun ticari formu olan Bereleks test edilmiştir. Salmonella/mikrozom test sisteminde, TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmış ve test sistemi, S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Test edilen bitki büyüme hormonlarından GA test sisteminde mutajenik etki göstermemiştir. Bu çalışmanın sonuçları Gibberellic acid açısından araştırmamızla paralellik göstermektedir.

Yine Zeiger ve ark. gibberellic acid'in 100, 333, 1000, 3333, and 10,000 ug/petri dozlarını Ames testinin preinkübasyon metoduyla mutajenitesini araştırmışlardır. Deneyler *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda yapılmıştır. Test sonuçlarına göre; GA'in tüm dozları non-mutajen olarak belirlenmiştir [Zeiger ve ark., 1987]. Zeiger ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın sonucu da çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Araştırmamızda kullanılan Gibberellic acid maddesinin çeşitli hayvan deneylerindeki etkileri hakkında pek çok çalışma yer almaktadır. Elde edilen verilere göre; GA₃, öldürücü olmayan dozlarda farelere verildiğinde, farelerde lezyon ya da doku değişikliklerinin olmadığı gözlenmiştir [Peck, 1957]. Başka bir çalışmada Gibberellic acid'in ticari formu olan bereleks, çeşitli dozlarda farelere verildiğinde hiçbir toksik etki gözlenmemiştir [Parkinson, 1975]. Bu çalışmada GA toksik bulunmasa da bizim çalışmamızda GA'nın 10000 µg/ petri dozu bakteriler üzerinde toksik etki yaratmıştır.

Laboratuar farelerinde böbrekte mononükleer yangı infiltrasyonuna ve karaciğerde mikro apselere neden olmuştur, ancak tümöre oluşturmamıştır [Özmen, 1995]. Bu veriler ile bizim araştırmamızın sonuçları incelendiğinde mutajenite ile karsinojenite arasındaki ilişkiden bahsedilebilir.

el-Mofty ve Sakr, 1988 yılında Gibberellik asitin mısır karakurbağalarında (*Bufo regularis*) neoplazma indüklemeye etkisini araştırmışlardır. GA %16 oranında pozitif etki göstermiştir. Sonuçlara göre; karaciğerde primer tümörlerin (hepatoselüler karsinoma) geliştiğini ve metastaz sonucu ikincil tümörlerin böbreklerde ve yumurtalıklarda gözlemlendiğini belirtmişler ve sonuçta GA'nın mısır karakurbağası için kanserojenik olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları bizim sonuçlarımızla paralellik göstermemektedir. Bu nedenle GA maddesi için mutajenik etkili olmadığı ancak karsinojenik etkili olabileceği düşünülebilir.

Araştırmamızda diğer bir bitki gelişim düzenleyici olan Kinetin maddesinin de öncelikle sitotoksik dozları belirlenmiştir. Kinetin'in 10000 µg/ petri dozunun uygulandığı petrilere elde edilen koloni sayısı, kontrol petrisinde elde edilen koloni sayısının yarı değerinin altında bulunduğundan sitotoksik olarak belirlenmiştir. Toksik doz belirlendikten sonra kinetin maddesini 2,5-25-250-1000-2500 µg/ petri dozları çalışılmıştır.

Kinetin maddesinin 2500 µg/ petri dozu ile S9 enzimi varlığında ve yokluğunda yapılan deneylerde elde edilen koloni sayısı spontan revertant koloni sayısının 2 katından fazla olduğu için TA 98 suşu için "mutajenik" olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla Kinetinin çerçeve kayması şeklinde mutajenik etkili olabileceği gözlemlenmiştir. Yine kinetin 2500 µg/ petri dozuyla S9 enzimi varlığında yapılan deneylerde elde edilen koloni sayısı spontan revertant koloni sayısının 2 katından fazla bulunduğu için kinetin 2500 µg/ petri dozu TA 100 suşu için S9 enzimi varlığında mutajenik olarak değerlendirilmiştir. Kinetinin nokta mutasyonu şeklinde mutajenik etkili olabileceği gözlemlenmiştir.

Başlangıçta TA 100 suşu için tespit edilmeyen ancak S9 enzimleri eklendikten sonra belirlenen mutajenik etkiler, test edilen kimyasal maddenin enzimle metabolize olması ile meydana gelen ara bileşik sebebi ile oluşmuş olabilir.

Yeşilada (2000), yaptığı bir çalışmada *Drosophila melanogaster*'in somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kullanılarak, mutajen EMS ile indüklenmiş mutant kanat benekleri üzerine Kinetin, Gibberellinik asit (GA_3) ve indol asetik asitin etkisini

araştırmıştır. GA₃, bütün kanat beneklerini azaltmıştır. Kinetinin 10⁻³ M konsantrasyonu ikili beneklerin sayısını azaltırken, 10⁻⁴ M konsantrasyonu beneklerin bütün tiplerinin sayısında artışa neden olmuştur. Kinetinin yüksek konsantrasyonda etkisinin değişmesi onun mutajenik etkili olmasından kaynaklanabilmektedir. Bizim çalışmamızda da Kinetin'in 2,5, 25, 250, 1000 µg/ petri dozlarında mutajenik etkisi gözlenmezken, 2500 µg/ petri dozunda mutajenite açısından önemli bir fark görülmüştür.

Kappas (1983), İndole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA) ve Kinetin (6-furfuryl-aminopurine)'in *Aspergillus nidulans* üzerine genotoksik aktivitesini araştırmıştır. Test sonuçlarına göre; Kinetin *Aspergillus nidulans*'in somatik ayırma frekansını arttırmamıştır. Metabolik aktivasyon tekniği kullanılarak yapılan testlerde de S9'un kinetinin etkisini artırmadığını belirtmiştir. Ancak yaptığımız araştırmamızda Kinetin maddesi TA 100 suşu üzerinde S9 enzimi yokluğunda mutajenik bulunmazken, S9 enzimi varlığında mutajenik olarak gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada Chlormequat Chloride (CCC) maddesinin denenen dozları arasında sitotoksik doz tayin edilmemiştir ve mutajenite tayini için Chlormequat Chloride maddesinin 100-200-400-800-1600 µg/ petri dozları araştırılmıştır. CCC maddesinin tüm dozlarıyla S9 enzimi varlığında ve yokluğunda yapılan deneylerde elde edilen koloni sayıları, spontan koloni sayılarının 2 katından az ve ya 2 katına yakın bulunmuştur. Bu nedenle test sonuçlarına göre CCC maddesi non mutajenik olarak değerlendirilmiştir.

Ancak literatürlerde, CCC maddesi ile ilgili bir tane mutajenite verisine rastlanılmıştır. Sussmuth ve Lingens(1976)'in yaptıkları bir çalışmada, Chlorocholine chloride (CCC)'in, 0,2-0,5 M konsantrasyonlarda ve pH 5 ile 8 arasında, valine duyarlı *E. coli* K12 suşu üzerinde mutajenik etki göstermezken, pH 9'da mutajenik etki gösterdiğini belirtmişler. Araştırmamızın CCC maddesi ile ilgili sonuçları, bu çalışma ile çelişkilidir.

Diğer taraftan CCC maddesi ile ilgili çeşitli hayvan deneyleri ile elde edilmiş verilerde; CCC'nin yüksek dozlarının koyunlarda nöromusküler blokan etkiye ve

ölüme neden olduğu bildirilmiştir [Özmen, 1995]. Farelerde, yüksek dozlarda dalağın lenfosit/g oranını ve düşük dozlarda ise hemolizin titresini önemli derecede artırmıştır. Ayrıca, timus ağırlığını, beyaz kan hücrelerinin sayısını, dalağın lenfosit/g oranını etkilemiştir [Olson, 1984]. Ratlarda CCC'nin tümör oluşturmadığı bildirilmektedir. Ağızdan LD50 değeri rat için 330-750 mg/ kg., fare için 215-1020 mg/kg., deri yolu ile LD50 değeri rat için >4000 mg/kg., erkek tavşan için 440 mg/kg., solunum yolu ile LC50 değeri rat için >5.2 mg/l./4 saat'dir [Toxnet, 2012].

Ancak bizim yaptığımız çalışmada, CCC maddesinin 10 ve 10000 µg/ petri aralığındaki denenen dozların hiçbirinde LD50 değeri bulunmamıştır. Bu nedenle CCC maddesini hayvan ve bitkilerde pek çok olumlu veya olumsuz etkiler oluşturduğu ancak çerçeve kayması ve baz çifti değişimi mutasyonlarına neden olmadığı düşünülebilir.

Araştırmamızda mutajenite tayini için seçilen bir diğer bitki gelişim düzenleyicisi 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesi oksin grubunda yer alan bir maddedir. Bu madde oksin grubunda bulunup daha önce mutajenitesi tayin edilmemiş bir madde olduğu için tercih edilmiştir.

Çalışmamızda öncelikle 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin sitotoksik dozları diğer maddelerde olduğu gibi belirlenmiştir. 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 5000, 10000, 50000 µg/ petri dozları tamamen sitotoksik olarak belirlenmiştir. Daha sonra mutajenite tayini için 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 5-50-500-1000-2500 µg/ petri dozları çalışılmıştır.

2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 2500 µg/ petri dozu, TA 98 suşu ile S9 enzimi yokluğunda yapılan deneylerde elde edilen koloni sayısı spontan revertant koloni sayısının 2 katından fazla olduğu için TA 98 suşu için "mutajenik" olarak değerlendirilmiştir. Bu maddenin diğer tüm dozlar non mutajenik olarak değerlendirilmiştir.

2,4,6-trichlorobenzoic acid maddesinin 2500 µg/ petri dozunun S9 enzimi yokluğunda mutajenik bulunup, S9 varlığında mutajenik bulunmamasının nedeni,

maddesinin S9 enzimi ile metabolize olduktan sonra zararsız ara bileşiklere dönüştürülmesi olabilir.

Yaptığımız çalışmada test edilen 4 maddeninde TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde ortalama revertant sayılarının doza bağlı bir ilişki göstermediği tespit edilmiştir.

Bitki büyümesini teşvik edici hormonların bir kısmının zaten bitkinin genetik yapısında doğal olarak mevcut olduğu ve zararlı olmadığı bilinmektedir. Ancak uygulama zamanlarının ve konsantrasyonlarının iyi ayarlanmaması, yasak olanların uygulanması ve uzman kişilerce uygulanmaması durumlarında çeşitli zararlı etkilere yol açabilmektedirler [Kumlay ve Eryiğit, 2011]. Dolayısıyla bu maddelerin ve içerdikleri kimyasal bileşiklerin mutajenik, karsinojenik aktivitelerinin belirlenmesi insan sağlığı açısından önem arz etmektedir.

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 [Ennever ve Rosenkranz, 1986; Hofnung ve Quillardet, 1986; Quillardet ve Hofnung, 1988; Mc Daniels, 1990].

Çalışmamızda Kinetin ve 2,4,6-trichlorobenzoic acid maddelerinin en az bir bakteri suşu üzerinde mutajenik dozları tespit edilmiştir. Diğer 2 madde GA ve CCC bakteri suşları üzerinde mutajenik etkiye sebep olmamıştır. Ancak bu test maddelerinin kesin olarak mutajen ya da non-mutajen olarak belirtmemiz için, bu maddelerin farklı test sistemleriyle de değerlendirilerek sonuçların karşılaştırılması ve bu şekilde güvenilir bir sonuca varılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aeschbacher, H.V., Friedrich, U., Seiller, J.P., "Criteria for the standardization of Salmonella mutagenicity tests: Results of a collaborative study. III. The influence of the composition and preparation of the minimal medium in the Salmonella mutagenicity test", *Teratog. Carcinog. Mutag.*, 3:195-203 (1983).
- Aiub, C.A.F., Coelho, E.C.A., Sodr , E., Pinto, L.F.R., Felzenszwalb, I., "Genotoxic Evaluation of the Organophosphorous Pesticide Temephos", *Genetics and Molecular Research*, 1 (2):159-166 (2002).
- Akgül, H., "Büyüme ve Gelişim Düzenleyiciler", *Eğirdir Bahçe Kültürleri Araç. Ens.*, 12: 1-12, (2008).
- Akın, A., Sümer, S., "Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sodyum Benzoat ve Sodyum Nitratın Salmonella / Mikrozom Test Sisteminde Mutajenik Etkilerinin Araştırılması", *Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10:21-27, (1989).
- Akman, M., "Bakteri Genetiği", *C. . Yayını*, 2. Baskı, Sivas 32-40 (1983).
- Akman, Y., Darıcı, C., "Bitki Fizyolojisi (Beslenme ve Gelişme Fizyolojisi)", *Kariyer Matbaacılık*, Ankara, 100-150 (1998).
- Akyıl, D., "Farklı Tipteki Fungusitlerin Muhtemel Mutajeniteleri  zerine Bir alışma", Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyon, 1-21, 38-48, (2006).
- Alcama, I.E., "Fundamentals of Microbiology", 3. Baskı, *Cummings Publishing*, 175-185, (1991).
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D., "Carcinogens are mutagens a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection", *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.*,70:2281-2285 (1973a).
- Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E., "An Improved Bacterial Test System for the Detection of Classification of Mutagens and Carcinogens", *Proc. of the Nat. Acad. of Sci.*,70: 782-786 (1973b).
- Arın, E., şen, A., "Effect of in vivo Benzo(a)pyrene Treatment on Liver Microsomal Mixed-Function Oxidase Activaties of Gilthead Seabrem (*Spararus Aurata*) comp., *Comp. Biochem. and Physiology*, 107 C:405-414, (1994).
- Asal, S., "Türkiye'de Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Pestisitlerin Mutagen Etkilerinin *Salmonella typhimurium* Histidin Mutantlarıyla Saptanması  zerinde Araştırmalar", *Tübitak, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu*, Ankara (1983).

Asal, S., "Bazı Pestisitlerin Mutajenik Etkileri Üzerinde Araştırmalar", *Doğa Bilim Dergisi*, 9(1):72-78 (1985).

Ateş, A., "Moleküler Biyoloji", 9. Bölüm, *S.Ü., Fen Edebiyat Fakültesi*, Konya, 113-121 (2002).

Aufderheide, M., Gressmann, H., "A modified Ames Assay Reveals the Mutagenicity of Native Cigarette Mainstream Smoke and Its Gas Vapour Phase", *Department of In-Vitro Toxicology, Fraunhofer Institute of Toxic. and Experimental Med.*, Germany, 58, 383-392 (2007).

Aydoğdu, M., Boyraz, N., "Bitki Büyüme Düzenleyicileri (hormon) ve Hastalıklara Dayanıklılık", *Bitkisel Araştırma Dergisi*, 1:35-40 (2005).

Bağcı, H., "Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları", *ODTÜ*, 25-55 (1985).

Bağcı, H., "Comparisons of the Promutagen-Actwaty Capacity of S9 Liver Preperation From Rat and Fish, Using the in Vitro Salmonella Mutagenicity Test", *Mutat. Res.*, 195-201 (1989).

Bakale, G., Mc Creary, R.D., "Response of Ke Test to NCI/NTP-Screaned Chemicals Non – Carcinogens", *Carcinogenesis*, 11 (10):1811-1818 (1990).

Barış, A., "Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajeniteri Ames/Salmonella/ Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyon, 1-22, 56-60 (2007).

Barrueco, C., Herrera., A., De la Pena, E., "Mutagenic Evaluation of Trichlorfon using Different Assay Methods with *Salmonella typhimurium*", *Mutagenesis.*, 6(1):67-71 (1991).

Barut, E., "Gelecekte Bahçe Bitkilerinde Büyüme Düzenleyici Maddelerin Kullanımı", *Derim*, 7(2): 51-73 (1995).

Basra, A.S., "Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture: Their Role and Commercial Uses", *Haworth Press*, 264 (2000).

Başaran, A., Başaran, N., Solak, M., Güneş, H., "Tıbbi Biyoloji ve Genetik", *Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Yayınları*, 117-123 (1995).

Baydar, H., "Genetik", *S.D.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*, Isparta, 63-72 (2002).

Beaudet, A.L., Roufa, A.J., Cassay, C.T., "Mutations Effecting the Structure of Hypoxanthine: Guanine Phosphoribosyltransferase in Cultured Chinese Hamster Cells", *The Pro. of the Nat. Acad. of Sci.*, USA., 70:320-324 (1973).

- Belser, Jr., Shaffer, W.B., Bliss, S.D., Hynds, E.D., Yamamoto, H.M., Pitts L., Winer, J.A., "A Standardized Procedure for Quantification of the Ames/*Salmonella*/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test", *Environ. Mutagen.*, 3:123-139 (1981).
- Bhunya, S.P., Jena, G.B., "Studies on the Genotoxicity of Monocrotophasphat and Organophosphate Insecticide, in the Chick In Vivo Test System", *Mutat. Res.*, 293: 231-239 (1993).
- Bilge, E., "Genetik", **İ.Ü. Yayınları**, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 121: 50-100 (1974).
- Bilge, E., "Genetik", *Ar Yayın Dağıtım*, İstanbul, 4:220- 231 (1981).
- Bilgin, M., "Studies on the Mutagenicity of An Organophosphorus Pesticide Trichlorfon", Yüksek Lisans Tezi, *Ortadoğu Teknik Üniversitesi*, Ankara 1-5 (1992).
- Bilkay, I.S., Karakoç, Ş., Aksöz, N., "Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*", *Turk J Biol.*, 34: 313-318 (2010).
- Boath, S.C., Welch, A.M., Garner, R.C., "Some Factors Affecting Mutant Numbers in the *Salmonella*/Microsome Assay", *Carcinogenesis*, 1(11):911-923 (1980).
- Bozcuk, S., Topçuoğlu, Ş.F., "Değişik Stres Koşullarında Bitkilerde Absisik Asit (ABA) Miktarının Değişimi ve Strese Adaptasyon Mekanizması", *Doğa Bilim Dergisi*, 6(3):157-167 (1982).
- Britvic, S., Kurulec, B., "Selective Activation of Carcinogenic Aromatic Amines to Bacterial Mutagens in the Marine Mussel *Mytilus Galloprovincialis*", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85 (1):111-114 (1986).
- Brockman, H.E., de Serres, F.J., Ong, T.M., DeMarini, D.M., Katz A.J., Griffiths A.J., Stafford R.S.. "Mutation Test in *Neurospora crassa*", *Mutat. Res.*, 133(2): 87-134 (1984).
- Brooks, T.M., Dean, B.J., Hutson, D.H., Potter, D., "Microbial Mutation Studies with Tetrachlorvinphos (Gardona)", *Mutat. Res.*, 105(4):211-221 (1982).
- Bryan, B., Timothy, M., Poul, T., "General Applied Toxicology", *Macmillan*, 2:897-898 (1993).
- Budak, N., Çalışkan, C.F., Çaylak, Ö., "Bitki Büyüme Regülatörleri ve Tarımsal Üretimde Kullanımı", *E.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 31:289-296 (1994).

Cappuccino, J. G., Sherman, N., "The Ames test: A Bacterial Test System for Chemical Carcinogenicity". *Microbiology: A Laboratory Manual*, Sixth Edition, **Benjamin Cummings**, San Francisco, U.S.A, 25 (2001).

Chen, J.G., Ullah H., Young J.C., Sussmann M.R., Jones A.M., "ABP1 is Required for Organized Cell Elongation and Division in Arabidopsis Embryogenesis", *Genes & Development*, 15:902–911 (2001).

Christian, M., Steffens, B., Schenck, D., Burmester, S., Bottger, M., Luthen, H., "How Does Auxin Enhance Cell Elongation? Role of Auxin-Binding Proteins and Potassium Channels in Growth Control", *Plant Biology*, 8:346–352 (2006).

Christian, M., Hannah, W.B, Luthen ,H., Jones, A.M., "Identification of Auxins by A Chemical Genomics Approach", *Journal of Experimental Botany*, 59(10): 2757–2767 (2008).

Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., Zeiger, E., "Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Test for Bacterial Mutagenicity", *Mutat. Res.*, 189: 83-91 (1987).

Czyż, A., Szpilewska, H., Dutkiewicz, R., Kowalska, W., Biniewska Godlewska, A., Wegrzyn, G., "Comparison of the Ames Test and A Newly Developed Assay for Detection of Mutagenic Pollution of Marine Environments", *Mutat. Res.*, 519: 67-74 (2002).

Çetinbaş, M., "Bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin 'Monreo' Şeftali Çeşidine Verim ve Meyve Kalitesi Üzerine Etkisi", Doktora tezi, **Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü**, Isparta, 1-20 (2010).

Çetinkaya, A.M., Baydan, E., "Bitki Gelişim Düzenleyicilerin Zehirliliğine Genel Bir Bakış", *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 77(4):26-31 (2006).

Dadakoğlu, B., "Diş Hekimliğinde Kullanılan Bazı Simanların Mutajenik Potansiyellerinin Salmonella Ames Mikrozom Testi ve Sos Chromotest ile Değerlendirilmesi", Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara1-50 (2011).

Davies, P.J., "Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action", **Kluwer Academic** (2004).

Demirsoy, A., "Kalıtım ve Evrim", **Meteksan Yayınları**, Ankara, 902 (1988).

Demirsoy, A., "Biyoloji Genetik", **Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Lisans Tamamlama Programı** (1991).

Demirsoy, A., "Yaşamın Temel Kuralları", **Meteksan Yayınları**, Genel Biyoloji, Ankara, 1(1):162-178 (1992).

Dean, B.J., Brooks, T.M., Hodson –Walker., G., Hutson, D.H., ”Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals”, *Mutat. Res*, 153, 57-77 (1985).

De Lorenzo, F., Degl'Innocenti, S., Ruocco, A., ”Mutagenicity of Pesticides Containing 1,3-Dichloropropene”, *Cancer Research*, 37:1915-1917 (1977).

De Lorenzo, F., Staiano, N., Silengo, L., Cortese, R., “Mutagenicity of diallate, sulfallate, triallate and relationship between structure and mutagenic effects of carbamates used widely in agriculture” *Cancer Research*, 38(1):13-5 (1978).

Demir, K., Dönmez, F., Abak, K., ” Sera Domates Yetiştiriciliğinde 2,4-D, 4-CPA ve NOXA'nın Verim ve Bazı Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi”, *Derim* 8(4):153-161 (1991).

De Serres, F.J., ”Report of the conference on in vitro mutagenicity and carcinogenicity tests”, *Mutat. Res*, 41:395-400 (1976).

Diril, N., Sümer, S., İzbrak, A., “Türkiye’de çevre kirliliğine neden olan bazı pestisitlerin *Salmonella*/mikrozom test sistemi kullanılarak mutajenitelerinin saptanması”, *TÜBİTAK, Deniz Bilimleri ve Çevre Araştırmaları Grubu*, Ankara, (1988).

Douglas, G.R., Nestmann, E.R., Grant, C.E., Bell, R.D., Wytsma, J.M., Kowbel, D.J., “Mutagenic activity of diallate and triallate determined by a battery of in vitro mammalian and microbial tests” *Mutat. Res*, 85(2):45-56 (1981).

Dökmeci, I., “Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi”, *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 364-547 (1994).

Elesperu, E., Yarmolinsky, M.B., “A colorimetric assay of lizogenic induction designed for screening potential carcinogenetic and carcinostatic agents”, *Environ. Mutagen.*, 1: 65-78 (1979).

El-Mofty, M.M., Sakr, S.A., ”Induction of neoplasms in the Egyptian toad *Bufo regularis* by gibberellin A3”, *Oncology*, 45(1):61-4 (1988).

Emig, M., Reinhardt, A., Mersch Sunderman, V., “A comparative study of five nitro musk compounds for genotoxicity in the SOS choromtest and *Salmonella* mutagenicity”, *Toxicol. Letter.*, 85: 151-156 (1996).

Ennever, F.K., Rosenkraz, H.J., ” Evaluating Batteries of Short Term Genotoxicity Tests”, *Mutagenesis*, 1: 293-298 (1986).

Erensayın, C., ” Genetik”, *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 165-169 (2000).

Ergenç, N., Ateş, Ö. ve Gürsoy, A.; “Eczacılar için Organik Kimya”, *İ.Ü. Yayınları*, Ecz. Fak., 57: 568-573 (1990).

- Ergin, E., "Bazı Rutenyum Bileşiklerinin Mutajenik aktivitelerinin Ames Testi ile Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir 1-50 (2009).
- Erkan, S., "Moleküler Biyoloji", *Doğruluk Matbaacılık Ltd. Ş.*, 30-52, İzmir (1992).
- Eser, B., "Bitkisel Hormonlar ve İnsan Sağlığı Çevre-Tarım", *Tarım ve Mühendislik*, 18-20 (1989).
- Evans, M.L., "Functions of hormones at the cellular level of organization. In: Pirson A, Zimmermann MH, eds", *Encyclopedia of Plant Physiology*, 10:23-79 (1984).
- Falakalı, B., "Genel Genetik", *Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi*, İzmir, 84-97 (1993).
- Fırat, B., "Bitki nasıl beslenir", *Atlas Kitabevi*, 1. Basım, Konya 1-50 (1998).
- Forman, D., Ames, B., "The Ames Test and The Causes of Cancer Reprinted From The British", *Medical Journal*, 303:428-429 (1991).
- Forster, R., Blowers, S.D., Cinelli, S., Marquardt, H., Westendorf, J., "Mutagenicity Testing of Imidazole and Related Compounds", *Mutat. Res.*, 292, 71-79 (1992).
- Francasso, M.N., Leone, R., Brunello, F., Monostra, C., Tezaa, F., Storti, P.W., "Mutagenic Activity in Waste Water Concentrates From Dye Plants", *Mutat. Res.*, 298: 91-95 (1992).
- Galli, A. ve Schiestl, R.S., "Effects of Salmonella Assay Negative and Positive Carcinogens on Intrachromosomal Recombination in G₂-Arrested Yeast Cells", *Mutat. Res.*, 370, 209-221 (1996).
- Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Dander, R. D., Foster, R. "Bacterial mutation assay, basic mutagenic recommended procedure", *Avon Research*, 227-234 (1998).
- Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D., Foster, R., "Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised". Ed. D.J. Kirkland, *Cambridge University Press*, 13-61 (1990).
- Gingold, E.B., "The Ames test. experiments in molecular biology", *Humana Press*. Clifton, U.S.A. 20-30 (1986).
- Gollapudi, B.B., Mendrala, A.L., Linscombe, V.A., "Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos", *Mutat. Res.*, 342(1-2):25-36 (1995).

Gomes-Carneiro, M.R., Felzenszwalb, I., Paumgartten, F.J.R., "Mutagenicity testing of camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, menthol and terpineol with the Salmonella / microsome assay", *Mutat. Res.*, 416:129-136 (1998).

Green, M.H.L., Muriel, W.J., "Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *E. coli*", *Mutat. Res.*, 38: 3-32 (1976).

Griffoll, M., Solanas, A.M. ve Bayona, J.M., "Characterization of Genotoxic Compounds in Sediments by Mass Spectrometric Techniques Combined with Salmonella/Microsome Test", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19,:175-184 (1990).

Güleryüz, M., "Bahçe ziraatında büyütücü ve engelleyici maddelerin kullanılması ve önemi", *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, 279 (1982).

Gümüş, F., İzgü, F. Algül, Ö., "Synthesis and structural characterization some 5(6)-substitued-2-hydroxymethylbenzimidazoles derivates and their platinum(II) complexes and determination of their in vitro antitumor activities by rec-assay test", *Fabad J. Pharm. Sci.*, 21: 7-15 (1996).

Hakura, A., Mochida, H., Yamatsu, K., "Dimethyl Sülfoxide is Mutagenic for Bacterial Mutagenicity Tester Strains", *Mutat. Res.*, 303(3):127-33 (1993).

Halloran, N. Kasım, M.U. "Meyve ve Sebzelerde Büyüme Düzenleyici Madde Kullanımı ve Kalıntı Düzeyleri", *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi* (1999).

Hamasaki, T., Sato, T., Nagase, H. ve Kito, H., "The Genotoxicity of Organotion Compounds in SOS Chromotest and Rec Assay", *Mutat. Res.*, 280:195-203, (1992).

Hara, M., Kogiso, S., Yamada, F., Kawamoto, M., Yoshitake, A., Miyamoto, J., "Mutagenicity studies on fenitrothion in bacteria and mammalian cells", *Mutat. Res.*, 222(1):53-61 (1989).

Hayashi, M., Tice, R.R., Mac Gregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Volders, M.K., Oleson, F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S., Vannier, B., "In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay", *Mutat. Res.*, 312:293-304 (1994).

Hedenstedt, A., Jenssen, D., Lidesten, B. M., Ramel, C., Rannung, U., Stern, R. M., "Mutagenicity of fume particles from stainless steel welding", *J. Work Environ. Health.*, 3:203-211 (1977).

Herbold, B.A., Arni, P., Driesel, A., Engelhardt, G., Jäger, J., Joosten, H.F., King, M.T., Klemp, H., Lang, R., Miltenburger, H.G., de Raat, W.K., Strobel, R., Träger, H., Waalkens-Berendsen, D.H., Wallat, S., Willems, M., "Criteria for the standardization of Salmonella mutagenicity tests: results of a collaborative study. II. Studies to investigate the effect of bacterial liquid culture preparation conditions on

Salmonella mutagenicity test results, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 3(2):187-93 (1983).

Hesbert, A., "Testing naturel indigo for genotoxicity", *Toxicol Lett.*, 21(1): 119-25 (1984).

Hızal, A.Y., "Büyüme Düzenleyicilerin Ülkemiz Meyve Yetiştiriciliğindeki Yerleri", *Derim*, 2(2):15-17 (1985).

Hofnung, M., Quillardet, P., "Recent developments in bacterial short-term for the detection of genotoxic agents", *Mutagenesis*, 1(5):319-330 (1986).

Hollenberg P.F.; "Mechanism of Cytochrome P450 Peroxidase- Catalyzed Xenobiotic Metabolism", *Faseb. J.*, 88: 694 (1992).

Huang, Y., Chang, Y., Hsu, J., Chuang, H. "Transcriptome analysis of auxin-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*", *Gene*, 420; 118–124 (2008).

İnternet: Afyon Kocatepe Üniversitesi "Mutasyon ve Mutajenler",
<http://www2.aku.edu.tr/~mkonuk/mutasyonvemutajenler.pdf> (2012).

İnternet: Batem "Bitki besin maddeleri ile bazı bitki büyüme düzenleyicileri (hormonlar) arasındaki ilişkiler"
[http://www.batem.gov.tr/yayinlar/derim/2005/201-09%20\(3\).pdf](http://www.batem.gov.tr/yayinlar/derim/2005/201-09%20(3).pdf)

İnternet: Belgeler "Mutasyon"
<http://www.belgeler.com/blg/2e1b/mutajenler-kanserojenler> (2012).

İnternet: Botany Online, "Plant Hormones"
<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e31/31a.htm>. (2012).

İnternet: İstanbultarım "Bitki Gelişim Düzenleyicileri"
http://www.istanbultarim.gov.tr/index.php?option=com_content&view=article&id=1049:bitki-geliim-duezenleyicileri&catid=124:bt-koruma&Itemid=294 (2012).

İnternet: İstanbul Üniversitesi "Mutasyon"
www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1294153812.ppt (2012).

İnternet: Mikrobiyoloji
<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF5BEB3EFCBD5B1D4F#04>. (2012).

İnternet: Salipazarıtarım "Bitki gelişim düzenleyicileri ve etki mekanizmaları"
www.salipazarim.gov.tr/hale/bitki_gelisim_duzenleyicileri.ppt (2012).

İnternet: Sigma-aldrich(a)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/344281?lang=en®ion=TR> (2012).

İnternet: Sigma-aldrich(b)

<http://www.sigmaaldrich.com/large/structureimages/57/mfcd00075757.png> (2012).

İnternet: Sigma-aldrich(c)

<http://www.sigmaaldrich.com/large/structureimages/29/mfcd00079329.png> (2012).

İnternet: Sigma-aldrich(d)

<http://www.sigmaaldrich.com/large/structureimages/69/mfcd00011869.png> (2012).

İnternet: Toxnet "The National Library of Medicine's system database, HSDB (Hazardous Substances Databank)"

<http://toxnet.nlm.nih.gov> (2012).

İnternet: Türk Farmakoloji Derneği "Farmakokinetik ve klinik toksikolojiye uyarlanması"

http://www.tfd.org.tr/eski/KTCG_Kurs_042010/02_AK.pdf (2012).

İnternet: Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (R.Gazete 16 Kasım 1997, 23172)

<http://www.banvitas.com/pdf/turk%20gida%20kodeksi%20yonetmeli.pdf> (2012).

Isono, K., Yourna, J., "Chemical carcinogens as frame shift mutagens: *Salmonella* DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens", *The Proc. of the Nat. Acad. of Sci.*, 71: 1612-1617 (1974).

İstanbuluoğlu, E., Pamukçu, T., Pamukçu, M., "Eğreltiotu ile Beslenen İneklerden Elde Edilen Sütün Mutajenik Aktivitesi Üzerinde Çalışmalar", *Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Derg.*, 28(1-4): 137-143 (1981).

İzbrak, A., Sümer, S., Diril, N., "Gıdalara katılan azo boyalarının mutajenik etkilerinin test edilmesi", *Mikrobiyoloji Bülteni*, 24: 48-56 (1990).

Jarvis, A.S., Honeycutt, M.E., Mc Farland, V.A., Bulich, A.A. ve Bounds, H.C., "A Comparison of the Ames Assay and Mutatox in Assessing the Mutagenic Potential of Contaminated Dredged Sediment", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33, 193-200 (1996).

Josephy, P.D., Gruz, P. ve Nohmi, T., "Recent Advances in the Construction of Bacterial Genotoxicity Assays", *Mutat. Res.*, 386, 1-23 (1997).

Jäger, I., Hafner, C., Schneider, K., "Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells", *Mutat. Res.*, 561: 35-44 (2004).

Kada, T., Hirano, K., "Screening of environmental chemical mutagens by the recassay system with *Bacillus subtilis*", Chemical mutagens, principles and methods for their detection, plenum, *Hollanendes, A and de Serres, F.*, New York, 6: 165-172 (1980).

Kadlubar, F.F, Hammons, G.J.; "The role of Cytochone puso in the Metabolism of Chemical Carcinogens, Mammalian Cytochromes, P450". *CRC Pres*, Boca Ralon, 2:81-130 (1989).

Kalaycıoğlu, A., Öner, C., "Bazı bitki özütlerinin antimutajenik etkilerinin Ames/*Salmonella* test sistemi ile araştırılması", *Doga. Turkish Journal of Botany*, 117-122 (1994).

Kappas, A., "Genotoxic avtivity of plant growth regulating hormones in *Aspergillus nidulans*", *Carcinogenesis*, 4(11):1409-11 (1983).

Kappers, W.A., Van Och, F.M.M., De Groene, E.M. , Horbach, G.J.; "Comparison of Three Different in vitro Mutation Assays Used For the Investigation of Cytochrome P450-mediated Mutagenicity of Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons", *Mutat. Res.*, 466: 143-159 (2000).

Kayaalp, O., "Tıbbi farmakoloji", *Hacettepe Taş Yayınları*, Ankara 30-60 (1995).

Kaya, E.O., "Biyokimya", *İ.Ü. Yayınları*, İstanbul, 16: 410 (1992).

Kaynak, L., Ersoy, N., "Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Genel Özellikleri Ve Kullanım Alanları", *Akdeniz Üni. Zir. Fak. Dergisi*, 10, 223-236 (1997).

Kaynak, L., Memiş K., "Bitki Büyüme Engelleyci ve Geciktiricilerin Etki Mekanizmaları", *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10:237-248 (1997).

Kılıç Y., "Fitohormonların Saplı Meşe (*Quercus Robur* L.) 1+0 Yaşlı Fidan Morfolojik Karakterleri Üzerine Etkisi", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 1-20 (2007).

Korkmaz, B., "Bazı 2-Sübtitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir 1-40 (2005).

Kuru, M., Ergene, S., "Genetik (Örnek Problemlerle)", *Palme yayıncılık*, 2. Baskı, Ankara, 250-260 (2005).

Kumlay, A.M., Eryiğit, T., " Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: bitki hormonları (derleme)", *Iğdır Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi* 1(2):47-56 (2011).

Kusamran, W.R., Wakabayashi, K, Ogori, A., Tepsuwan, A., Nagao, M. ve Sugimura, T., "Mutagenicities of Bangkok and Tokyo River Waters", *Mutat. Res.*, 325:99-104 (1994).

Kutlu, M., Öztaş, E., Aydoğan, G., Işıkdag, İ., Özkay, Y., "Bazı 9-Süstitüe Fenantren Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Testi ile Araştırılması", *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C*, 1(1): 83-94 (2011).

Laidlaw, S.A., Diwtrich, M.F., Lamtenzan, M.P., "Antimutagenic Effects of Taurine in a Bacterial Assay System", *Cancer Research*, 49:6600-6604 (1989).

Le Curieux, F., Marzin, D., Erb, F., "Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals", *Mutat. Res.*, 319:223-236 (1993).

Lee, H., Bian, S.S. ve Chen, Y.L., "Genotoxicity of 1,3-Dithiane and 1,4-Dithiane in the CHO/SEC Assay and the Salmonella / Mikrosomal Test", *Mutat. Res.*, 312:213-218 (1994).

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., "Principles of biochemistry", *Worth Publishers*, New York, 962-963 (2000).

Leifer, Z., Kada, T., Mandel, M., Zeiger, E., Stafford, R., Rosenkranz, H. S., "An evaluation of test using DNA repair deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity", *Mutat. Res.*, 87: 211-297 (1981).

Leonard, A., Gerber, G.B., "Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Antimony Compounds", *Mutat. Res.*, 366: 1-8 (1996).

Levin, D. E., Yamasaki, E., Ames, B. N., Salmonella tester strain, TA 97 for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hotspot. *Mutat. Res.*, 94: 315-330 (1982).

Levin, D., E., Hollstein, M., Christman, M. F., Ames, B. N., "Detection of oxidative mutagens with a new Salmonella tester strain TA 102", *Meth. Enzymol.*, 105: 249-254 (1984).

Levin, D. E., Ames, B. N., "Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transistions and tranversions: a simple analysis using the Salmonella mutagenicity assay", *Environ. Mutagen.*, 8: 9-28 (1986).

Li, Y., Noblitt, T. W., Dunipace, A. J., Stookey, G. K., Evaluation of mutagenicity of restorative dental materials using the Ames Salmonella / Microsome test", *Journal of Dental Research*, 69: 1188-1192 (1990).

Liman, R., Eren, Y., Akyıl, D., Konuk, M., "Determination of mutagenic potencies of aqueous extracts of *Thermopsis turcica* by Ames test", *Turkish Journal of Biology*, 36: 85-92 (2012).

Loprieno, G., Boncristiani, G., "Genotoxicity studies in vitro and in vivo on carminic acid (natural red 4)", *Food Chemistry Toxicology*, 30 (9): 759-764 (1992).

Lumbey, C.E., Parkinson, C., Walker, S.R., "An International Appraisal of the Minimum Duration of Chronic Animal Toxicity Studies", *Human & Experimental Toxicology*, 11: 155-162 (1992).

Majeed, A., Asghari, B., "Role of growth promoting substances in breaking potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber dormancy", *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 2 (3):175-178 (2006).

Maron, D.M., Ames, B.N., "Revised methods for the mutagenicity test", *Mutat. Res.*, 113:173-215 (1983).

Majone, F., Brunetti, R., Fumagalli, O., Gabriela, M. ve Levis, A.G., "Induction of Micronuclei by Mitomycin C and Colchicine in the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis*", *Mutat. Res.*, 244, 147-151 (1990).

Menevşe, S., Kustimur, S., Menevşe, A., Ekmekçi, A., Ergin, M., "Çevremizdeki mutajenik ve karsinojenik maddelerin *Salmonella typhimurium* TA 104 suşu ile saptanması", *Mikrobiyoloji Bülteni*, 18: 99-106 (1984).

Mc Cann, J., Ames, B. N., "Detection of Carcinogens as Mutagens in The Salmonella/microsome Test: Assay of 300 chemicals: Discussion", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73:950-954 (1976).

Mc Daniels, C. C., Stelma, G. N. Jr., Comparison of the Salmonella (Ames) test, UMU tests and SOS chromotests for detecting genotoxines", *Environ. And Mol. Mutagenesis*, 16, 204-215 (1990).

Meng, Z. ve Zhang, L., "Cytogenetic Damage Induced in Lymphocytes by Sodium Bisulfite", *Mutation Research*, 298, 63-69 (1992).

Moreu, P., Bailone, A., Devoret, R., "Induction in *E.coli* K12 uvrA uvrB a highly sensitive test for potential carcinogens", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 3700-3704 (1976).

Moriya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K., Shirasu, Y., "Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems", *Mutation Research*, 116(3-4):185-216 (1983).

Morsünbül, T., Solmaz, S.K.A, Üstün, G.E., Yanar?, T., ” Bitki gelişim düzenleyici (BGD)’lerin çevresel etkileri ve çözüm önerileri”, *U.Ü., Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 15(1) (2010).

Mortelmans, K., Zeiger, E., “The ames salmonella/microsome mutagenicity assay”, *Mutat. Res.*, 455: 29-60 (2000).

Munzner, R., Wever, J., “Mutagenic activity of the feces of rats following oral administrion of tartrazine”, *Arch. Toxicol.*, 60 (4): 328-330 (1987).

Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, U.W., ”Harper’s Biochemistry”, *Appleton&Lange press.*, U.S.A, 799-806 (1996).

Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, U.W., ”Harper’in Biyokimyası”, Çev. Gülriz Menteş, *Barış Kitabevi*, İstanbul, 811- 917 (1993).

Nickell, L.G., ”Controlling Biological Behavior of Plant with Synthetic Plant growth Regulating Chemicals. Plant Growth Substances”, *Beltsville Agricultural Research Center*, 263-277, England (1973).

Olson, L.J. Hinsdill, R.D. ”Influence of Feeding Chlorocholine Chloride and Glyphosine on Selected Immune Parameters in Deer Mice, *Peromyscus maniculatus*”, *Toxicology* 30:103-114 (1984).

Oraller, G., ”Genetik”, *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi*, İstanbul 125-177 (1990).

Öksüzoglu, E., Diril, N., Durusoy, M., ”Mutagenic effects of planth growth hormones with the Salmonella/microsome test and the SOS chromotest”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 65:691-698 (2000).

Öncül, Ö., ”Bazı Gıda Boyalarının Mutajenik Potansiyellerinin Ames/Mikrozom Testi ile Araştırılması ve β –Galaktozidaz Üzerine Etkileri”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara 1-50 (2009).

Öner, C., “Genetik Kavramlar”, *Palme Yayıncılık*, 6. baskıdan çeviri, Türkiye, 27-32 (2003).

Özbek, S.A., ”Hormonlar ve bağ bahçe ziraatı”, *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*, 418, 145, 316 (1947).

Özen, H.Ç., Onay, A., ”Bitki Büyüme ve Gelişme Fizyolojisi”, *Dicle Üniversitesi Basımevi*, Diyarbakır (1999).

Özen, H.Ç., Onay, A., ”Bitki fizyolojisi”, *Nobel yayınevi*, Ankara, 1. baskı 100-150 (2007).

Özmen, M. Topçuoğlu, Ş.F. Bozcuk, S. Bozcuk, A.N. "Effects of Abscisic Acid and Gibberellic Acid on Sexual Differentiation and Some Physiological Parameters of Laboratory Mice", *Tr. J. of Biology* 19:357-364 (1995).

Pai, C.A., "Foundation of Genetics, A Science for Society", *Keyford Press*, Singapur, 28-33 (1985).

Pandita, T. K., "Assesment of the mutagenic potential of a fungicide bauistin. using multipl assay", *Mutat. Res.*, 204, 627-643 (1988).

Paolini, M., Forti, G. C., "On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays a review", *Mutat. Res.*, 387: 17-34 (1997).

Parkinson, G.R., "Berelex: Acute toxicity and local irritancy", ICI *Central Toxicology Laboratory* Report No. CTL/P/168 (1975).

Peck, H.M., Mc Kinney, S.E., Tytell, A., Byham B.B., "Toxicologic evaluation of gibberellic acid", *Science*, 126(3282):1064-5 (1957).

Perry, P., Evans, H., "Cytological detection of mutagens-carcinogens exposure by sister chromatid Exchange", *Nature* (London), 258:121-125 (1975).

Pienta, R.J., Poiley, J.A., Leebheiz, W.B., "Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens", *International Journal of Cancer*, 19:624-655 (1977).

Preston, R.J., Bender, A.W., Breven, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolf, S., Wassom, J.S., "Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays", *Mutation Research*, 143-188 (1981).

Prival, M. J., Davis, V. M., "Evulation of azo dyes for mutagenicity", *Mutat. Res.*, 206 (2): 247-259 (1988).

Prival, M. J., Simmon V. F., "Bacterial mutagenecity testing of 49 food ingredients gives very few pozitive results", *Mutat. Res.*, 260 (4): 312-329 (1991).

Pollastrini, M. T., Barea, M., "Genotoxic study of commercial dyes wih tartrazine", *Rev. Sanid Hig. Publica*, 64 (3): 203-209 (1990).

Ramel, C., Rannung, U., "Short term mutagenicity test", *Environ. Healt.* 6:1065-1076 (1980).

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., "Regulating growth and development: The plant hormones (in: Biology of Plants)", *Worth Publishers*, New York, USA 545-571 (1992).

Ren, T.R., Xie, Y.H., Zhu, W.W., Li, Y.H., Zhang, Y., "Activities and toxicity of a novel plant growth regulator 2-Furan-2-yl-[1,3] Dioxolane", *J Plant Growth Regul.*, 26:362-368 (2007).

Rollas, S., "İlaçların Metabolizması (Biyotransformasyon)", *Marmara Üniversitesi Yayını*, 525, İstanbul (1992).

Rosenkranz, H.S., Mermelstein, R., "The Salmonella mutagenicity and the *E. coli* Pol A+ / Pol A1 repair assays: evaluation of relevance to carcinogenesis. The predictive value of short-term screening test in the evaluation of carcinogenicity", *Elsevier*, 5-26 (1980).

Ruiz, M. J., Marzin, D., "Genotoxicity of six pesticides by Salmonella mutagenicity test and SOS chromotest", *Mutat. Res.*, 390:245-255 (1997).

Quillardet, P., Hofnung, M., "The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures", *Mutat. Res.*, 147, 65-78 (1985).

Quillardet, P., Hofnung, M., "The screening, diagnosis and evaluation of genotoxic agents with batteries of bacterial tests", *Mutat. Res.*, 216:251-257 (1988).

Sağlam, N., "Bitki Büyümesini Düzenleyiciler ve Kullanım Alanları", *Tarımda Kaynak*, 2: (3), 52-55 (1991).

Salisbury, F.B., Ross, W.C., "Plant Physiology", *Wadsworth Publishing Company* Belmont, California. A Division of Wadsworth, Inc. 382-406 (1991).

Sarrif, A.M., Arce, G.T., Krahn, D.F., O'Neil, R.M., Reynolds, V.L., "Evaluation of carbendazim for gene mutations in the *Salmonella*/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities", *Mutat. Res., Genetic Toxicology*, 321(1):43-56 (1994).

Seçer, M., "Doğal büyüme düzenleyicilerin (bitkisel hormonların) bitkilerdeki fizyolojik etkileri ve bu alanda yapılan araştırmalar", *Derim* 6(3): 109-124 (1989).

Seino, Y., Nagao, M., Yahagi, T., "Mutagenicity of Several Classes of Antitumor Agents to *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, and TA92", *Cancer Res.*, 38:2148-2156 (1978).

Sekizawa, J., Shibamoto, T., "Genotoxicity of safrole related chemicals in microbial test systems", *Mutat. Res.*, 14:405-408 (1982).

Shukla, Y., Taneja, P., Arora, A., Sinha, N., "Mutagenic potential of mancozeb in *Salmonella typhimurium*" *Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 23(4):297-302 (2004).

Sipes, I. G., Mcqueen C. A., Gandolfi, A. J., "Comprehensive toxicology General Principles", *Copyright by Elsevier Sci. Ltd.*, 1: 4-8 (1997).

Slater, E. E., Anderson, M. D., Rosenkranz, H. S., "Rapid detection of mutagens and carcinogens", *Cancer Res.*, 31: 970-973 (1971).

Smith, C.J., Mc Karns, S.C., Davis, R.A., Livingston, S.D., Bombick, B.R., Avalos, J.T., Morgan, W.T., Doolittle, D.J., "Human Urine Mutagenicity Study Comparing Cigarettes Which Burn or Primarily Heat Tobacco", *Mutat. Res.*, 361:1-9 (1996).

Sümer, S., Diril, N., İzbrak, A., "Salmonella / Mikrozoom test sistemi ile bazı insektisitlerin mutajeniteleri üzerine bir çalışma", *Mikrobiyoloji Bülteni*, 24: 103-110 (1990).

Sümer, S., İzbrak, A., Diril, N., "Bazı klorlu insektisitlerin mutajenik etkilerinin Ames testi ile saptanması" *Doga-Türkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 5:114-121 (1991).

Strachan, T., Read, A.P., "Human Molecular Genetics", *Bios Scientific Publishers Limited* (1996).

Sussmuth, R., Lingens, F., "Mutagenic actions of chlorocholine chloride", *Mutat. Res.*, 40(3):229-35 (1976).

Suzuki, A., Griffiths M. , Lewontin, J.H., "An Introduction to Genetic Analysis", *Fourth Edition*, New York, USA, 139-155 (1989).

Svehu, S.S., Waters, M.D., Mortelmans, K.E., Evans, E.L., Jotz, M.M., Mitchell, A.D., Kasica, V., "Evaluation of diallate and triallate herbicides for genotoxic effects in a battery of *in vitro* and short-term *in vivo* tests" *Mutat. Res.*, 136(3):173-183 (1984).

Temizkan, G.O., "Moleküler Genetik", *İ.Ü. Yayınları*, 281 (1996).

Thomas, T.H., "Hormonal changes during senescence, ripening and regrowth of stored and processed vegetables and fruit" *Academic Press*, 253-265 (1981).

Tiaz, L., Zeiger, E., "Bitki fizyolojisi", 3. baskıdan çeviri, çev; İsmail Türkan, *Palme Yayıncılık* (2008).

Trosko, J.E., "Challenge to the Simple Paradigm that "Carcinogens" are "Mutagens" and to the In Vitro and In Vivo Assays, Used to Test the Paradigm", *Mutat. Res.*, 373, 245-249 (1997).

Tortora, G. J., Christine L., Funke, B. R., "Microbiology in Introduction", Fourth Edition, *Appleton&Lange*, Connecticut, 207-215 (1992).

Tomatis, L., "The Predictive Value of Rodent Carcinogenicity Tests in The Evaluation of Human Risks", *Ann. Rev. Pharmacol, Toxicol*, 19: 511-530 (1979).

Tutgun, S., "Kadın ve Erkeklerde Yaşlanmayla Birlikte Artan Mikronükleus Oranının Saptanması", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir 1-15 (1996).

Tübitak, "Postgraduate Summer Course Notes on Molecular Biology and Genetics Engineering (in Turkish)" *Tübitak*, 29 July-16 August M.E.T.U. Department of Biology (1985).

Tzoneva, M., Kappas, A., Georgieva, V., Vachkova, R., Tziolas, V., "On the genotoxicity of the pesticides endodan and kilacar in 6 different test systems", *Mutat. Res., Genetic Toxicology*, 157(1):13-22 (1985).

UNEP, Mediterranean Action Plan Med. Pol. United Nations Environment Programme (UNEP), "Assessment of the State of Pollution in the Mediterranean Sea by Carcinogenic, Mutagenic and Teratogenic Substance, World Health Organization", *MAP Technical Reports Series*, 92, Athens (1995).

Uysal, A., Bazı Bitki Gelişim Düzenleyicilerin Salmonella / Mikrozom Test Sisteminde Mutajenik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya 1-60 (2006).

Vogel, E., Sobels, F. H., "The function of drosophyla in genetic toxicology testing, chemical mutagens, principles and methods for their detection", A. Halaender ed., London, *Plenum Press*, 4: 93-142 (1976).

Vural, N.; "Toksikoloji", *A.Ü., Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 56: 42-56 (1984).

Vural, N., "Toksikoloji", *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, 344- 363 (1996).

Wagner, E.D., Wasilewska, A.C., Connoly, S., Plewa, M.J., "Mutagenic Analysis of 2,3-Diaminophenazine and 2-Amino-3-Hydroxyphenazine in Salmonella Strains Expressing Different Levels of O-Acetyltransferase with and without Plant and Mamalian Activation", *Mutat. Res.*, 372:65-74 (1996).

Walsh, C.S., "Plant Hormones, Concise Encyclopedia of Temperate Tree Fruit.", *Haworth Press.*, 245-250 (2003).

Watanabe, K., Sakamoto, K., Sasaki, T., "Comparisons Chemically-Induced Mutagenicity Among Four Bacterial Strains, Salmonella Typhimurium TA 102 and TA 2628 and E.Coli Wp2, PKM 101 and WP2A CPKM 101 Collaborative Study I." *Mutat. Res.*, 361:143-155 (1996).

Watson, J.D., Gilman, M., Witowski, J., Zoller, M., "Recombinant DNA", 2.baskı, **W. H. Freeman**, New York (1997).

Weichman, J., "Postharvest physiology of vegetables", **Marcel Dekker, Inc.**, 1:597 (1987).

Westwood, M.N. "Hormones and growth regulators. In: Westwood MN (ed) Temperate-zone pomology, physiology and culture", 3rd ed. **Timber Press Inc.**, Portland, Oregon,USA, 364-381 (1993).

Wever, J., "Testing of sunset yellow for genotoxicity in different laboratory animal species", **Environ Mol Mutagen.**, 13 (3): 271-276 (1989).

Wyszyn Ska, K. ve Liro, W.C., "The Use of Cytogenetic Tests for Evolution of Mutagenic Properties of Selected Dyes Applied in Textile and Cosmetic Industry", **Genetica Polonica**, 32(3) (1991).

Wyszyn Ska, K., Przybojewska, B., Spiechowicz, E., Liro, W.C., Dziubaltowska, E. ve Rydzynski, K., "Cyanuric Chloride Has No Genotoxic and Mutagenic, Properties In Bacteria and Bone Marrow Cells", **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, 7(3), 281-289 (1994).

Yeşilada, E., "Drosophila melanogaster'de EMS ile indüklenmiş somatik mutasyon ve rekombinasyon üzerine kinetin, gibberellik asit ve indol asetik asitin etkisi", **Turkish Journal of Biology**, 24: 279-284 (2000).

Yılmaz, R., Yüksel, E. "İndol 3 Asetik Asitin 3. Nesil Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik İndeks Üzerine Etkisi", **S.D.Ü Tıp Fakültesi Dergisi**, 12(2): 46-49 (2002).

Yoon, J.Y., Oh, S., Yoo, S., Lee, S., Lee, H., Choi, S., Moon, C., Lee, B., "N-Nitrosocarbofuran, but not Carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells", **Toxicology**, 169:153-161 (2001).

Yüksel, S., "Bazı Sübsitüe Benziladenin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Salmonella Mikrozom Testi İle Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, **Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Eskişehir (2005).

Zdzienicka, M., Zielenska, M., Tudek, B., Szymczyk, T., "Mutagenic activity of thiram in Ames tester strains of *Salmonella typhimurium*" **Mutation Research**, 68(1):9-13 (1979).

Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., "Salmonella Mutagenicity test 3:Results from the testing of 255 chemicals", **Environ. Mutagen.**, 9(9): 1-110 (1987):

Zhuleva, L.Y. ve Dubinin, N.P., "Use of the Micronucleus Test for Ecological Monitoring in Astrachan Oblast", **Tehtnka**, 30(7):999-1004 (1994).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YAPICI, Sevilay
 Uyuşu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 06.05.1986 Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (530) 040 57 25
 e-mail : sy8624@hotmail.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2012
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Bahçelievler Deneme Lisesi	2003

Yabancı Dil

İngilizce

Poster Sunumları

1. Uraz, G., Akkuzu, S., Türkmen, L., Yapıcı, S., “*Proteus vulgaris* inoküle edilen kefir mikroflorasındaki değişiklikler”, **4. Türkiye Ekmud Kongresi**, Mayıs, 2012, İstanbul, Türkiye.
2. Uraz, G., Akkuzu, S., Türkmen, L., Yapıcı, S., , ‘Kefir mikroflorasının *Morganella morganii* bakterisi üzerine etkileri“ **11. Türkiye Gıda kongresi** Ekim 2012, Hatay, Türkiye.
3. Uraz, G., Akkuzu, S., Türkmen, L., Yapıcı, S., “ The Life Span of *Pseudomonas areuginosa* in Kefir Microflora”, **International Eurobiotech Symposium**, Nisan 2012 Kayseri, Türkiye.
4. Güven Uraz, Pınar Aytop, Sevilay Yapıcı, ‘Çiğ sütlerden izole edilen *Candida* türlerinde biyofilm varlığı’, **21. Ulusal Biyoloji Kongresi**, Eylül, 2012, İzmir, Türkiye.

Hobiler

Sinema, Kitap, takı tasarımı