

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI GIDA RENKLENDİRİCİLERİNİN *Zea mays* L. var.  
*saccharata* Sturt. ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİ**

**SALİH DİKİLİTAŞ**

**KOCAELİ 2016**

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

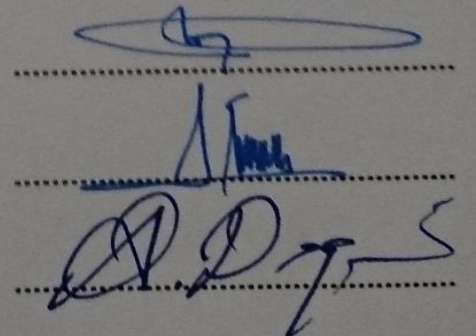
BAZI GIDA RENKLENDİRİCİLERİNİN *Zea mays* L.var.  
*saccharata* Sturt. ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİ

SALİH DİKİLİTAŞ

Doç.Dr. Özlem AKSOY  
Danışman, Kocaeli Üniv.

Prof.Doç.Dr. Fazıl ÖZEN  
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Yrd.Doç.Dr. Ali DOĞRU  
Jüri Üyesi, Sakarya Üniv.



Tezin Savunulduğu Tarih: 26.12.2016

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Dünya nüfusunun ve buna paralel olarak kentleşmenin hızla artması sonucu tarım alanları azalmış, yetiştirilen gıda ürünlerinin miktarı genişleyen populasyonun besin ihtiyaçlarını karşılamakta yetersiz kalmıştır. Besin/insan dengesinin tekrar sağlanması için çalışmalar yapılmış, teknolojinin de kaydettiği büyük ilerleme sayesinde bitki ıslah çalışmalarında büyük bir yol katedilmiştir. Zararlılara karşı daha dirençli ve verimi daha yüksek yeni genotipler geliştirilmiştir. Bunların yanında besin ihtiyacını karşılamak için endüstriyel ürünler marketlerde insanların hizmetine sunulmuştur. Kentleşmenin az olduğu ve nerdeyse her ailenin bahçesinde kendi ihtiyacını karşılayan ürünleri yetiştirdiği zamanlarda market raflarında şu anda gördüğümüz hazır gıdalara ve dolayısıyla katkı maddelerine bu kadar ihtiyaç yoktu. Gıda katkı maddeleri, gıda ürünlerinin üreticiden tüketiciye olan yolculuğunda kalitesini, rengini, kokusunu, görünüşünü, özetle ürünün albenisini koruması için gıda ürünlerinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Renklendiriciler de bu kapsamda, gıda ürünlerinin rengini dolayısıyla görünüşünü daha ilgi çekici hale getirmek için kullanılan gıda katkı maddelerindedir.

Bu kadar sıklıkla kullanılan gıda katkı maddelerinin muhtemel zararlarının tespit edilmesi için çeşitli model organizmalar üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Çocuklarda hiperaktivite ve dikkat eksikliği gibi rahatsızlıklara neden olduğu ve organizmalar üzerinde toksik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

Bitkiler üzerinde yeterince çalışılmamış renklendiricilerin *Zea mays* bitkisi tohumları üzerindeki olası toksik etkilerinin tespiti için yapılan bu çalışmamızda, yapraklardaki klorofil içeriğinde azalma, enzim aktivitesinde değişme ve genotoksik etkiler tespit edilmiştir.

Tezimin planlanması ve gerçekleşmesinde bilgi, beceri, özveri ve deneyimleriyle her an yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Özlem AKSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Öğretim Görevlisi Burcu YÜKSEL'e, Araş. Gör. Arda ACEMİ'ye, Araş. Gör. Serdar AKSAN'a ve doktora öğrencisi Burçak TÜTÜNOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bana her koşulda inanıp güvenerek, her daim desteklerini ve sevgilerini hissettiğim ve varlığından güç aldığım sevgili babam Necmetin DİKİLİTAŞ'a, sevgili annem Gülsüm DİKİLİTAŞ'a ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık - 2016

Salih DİKİLİTAŞ

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ .....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
GİRİŞ .....	1
1. GENEL BİLGİLER .....	5
1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması ve Özellikleri .....	5
1.1.1. Renklendiriciler .....	6
1.2. Model Organizma Olarak Mısır.....	8
1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	10
1.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD).....	11
2. LİTERATÜR BİLGİSİ .....	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. Bitki Materyali.....	20
3.2. Karmosin (E 122) Hakkında Genel Bilgi .....	20
3.3. Sunset Sarısı (E 110) Hakkında Genel Bilgi .....	21
3.4. Test Materyalinin ve Kimyasalların Hazırlanması .....	21
3.4.1. <i>Zea mays</i> tohumlarının hazırlanması.....	21
3.4.2. Karmosin çözeltilerinin hazırlanması.....	22
3.4.3. Sunset sarısı çözeltilerinin hazırlanması.....	22
3.5. Kök İnhibisyon Testi ve EC <sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi.....	22
3.6. Biyokimyasal Analizler .....	23
3.6.1. Yapraklarda pigment tayini .....	23
3.6.2. α-amilaz enziminin tespiti .....	24
3.6.3. Nişasta standart grafiğinin çıkarılması .....	25
3.7.1. Genomik DNA izolasyonu, DNA saflık ve miktar tayini .....	26
3.7.2. RAPD PZR ve verilerinin değerlendirilmesi.....	28
3.8. Deneylerde Kullanılan Cihazlar .....	30
3.9. Verilerin İstatiksel Analizi.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Morfolojik Bulgular .....	31
4.1.1. Karmosin için belirlenen EC <sub>50</sub> değeri.....	31
4.1.2. Sunset sarısı için belirlenen EC <sub>50</sub> değeri .....	32
4.1.4. Fide uzunlukları yüzdeleri .....	33
4.2. Biyokimyasal Bulgular .....	35
4.2.1. Yapraklarda pigment miktarları.....	35
4.2.2. α-amilaz enzim aktivitesi.....	36
4.3. Moleküler Bulgular.....	37
5. TARTIŞMA .....	46
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	54

KAYNAKLAR .....	58
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER .....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	67



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mısırın yer aldığı <i>Zea</i> cinsinin tahıl ürünleriyle olan evrimsel ilişkisi.....	10
Şekil 1.2. PZR Diyagramı .....	11
Şekil 3.1. Karmosin molekül formülü.....	21
Şekil 3.2. Sunset sarısı molekül formülü .....	21
Şekil 3.3. Enzim tespitinde kullanılan nişasta standart eğrisi .....	26
Şekil 3.4. DNA izolasyonunda izlenen adımlar .....	27
Şekil 4.1. Karmosinin farklı dozlarının <i>Z. mays</i> tohumlarına uygulanması sonucu belirlenen EC <sub>50</sub> değeri .....	32
Şekil 4.2. Sunset sarısının farklı dozlarının <i>Z. mays</i> tohumlarına uygulanması sonucu belirlenen EC <sub>50</sub> değeri.....	33
Şekil 4.3. 2 hafta süre ile karmosin uygulaması yapılan <i>Z. mays</i> tohumlarında gözlenen ortalama fide uzunluğu yüzdeleri.....	33
Şekil 4.4. 2 hafta süre ile karmosin dozları uygulanan <i>Z. mays</i> tohumlarında kök ve fide gelişimleri .....	34
Şekil 4.5. 2 hafta süre ile sunset sarısı uygulaması yapılan <i>Z. mays</i> tohumlarında gözlenen ortalama fide uzunluğu yüzdeleri.....	34
Şekil 4.6. 2 hafta süre ile sunset sarısı dozları uygulanan <i>Z. mays</i> tohumlarında kök ve fide gelişimleri .....	35
Şekil 4.7. OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9 ve OPA-10 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri.....	37
Şekil 4.8. OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9 ve OPA-10 primerleri kullanılarak sunset sarısı uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri .....	38
Şekil 4.9. Çalışmada kullanılan primerlerle karmosin uygulama gruplarına ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları.....	39
Şekil 4.10. Kullanılan primerlerle sunset sarısı uygulama gruplarına ait monomorfik ve polimorfik primer sayıları .....	40
Şekil 4.11. Karmosin uygulanan gruplarda RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri.....	41
Şekil 4.12. Sunset sarısı uygulanan gruplarda RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri.....	41
Şekil 4.13. Karmosin uygulanan gruplar ve kontrol grubu ile oluşturulan dendrogram .....	44
Şekil 4.14. Sunset sarısı uygulanan gruplar ve kontrol grubu ile oluşturulan dendrogram .....	45

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1.	Ülkemizde kullanımına izin verilen renklendiriciler .....	7
Tablo 3.1.	$\alpha$ -amilaz enziminin tespitinde tüplerin hazırlanması .....	24
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan RAPD primerleri .....	28
Tablo 3.3.	RAPD PZR tekniğinde kullanılan bileşenler .....	29
Tablo 3.4.	Optimize edilen RAPD PZR döngüsü .....	29
Tablo 3.5.	Deneylerde kullanılan cihazlar.....	30
Tablo 4.1.	Karmosinin farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilen <i>Z. mays</i> tohumlarında ölçülen kök uzunluğu değerleri .....	31
Tablo 4.2.	Sunset sarısının farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilen <i>Z. mays</i> tohumlarında ölçülen kök uzunluğu değerleri .....	32
Tablo 4.3.	Karmosin uygulaması sonucu <i>Z. mays</i> yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil değerleri .....	35
Tablo 4.4.	Sunset sarısı uygulaması sonucu <i>Z. mays</i> yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil değerleri.....	36
Tablo 4.5.	Farklı karmosin dozlarının <i>Z. mays</i> tohumlarında $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	36
Tablo 4.6.	Farklı sunset sarısı dozlarının <i>Z. mays</i> tohumlarında $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi.....	37
Tablo 4.7.	Karmosin uygulamasında monomorfizm ve polimorfizm görülen RAPD primerleri.....	39
Tablo 4.8.	Sunset sarısı uygulamasında monomorfizm ve polimorfizm görülen RAPD primerleri.....	40
Tablo 4.9.	OPA serisi RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve karmosin uygulanan grupta polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü (baz çifti, bp).....	42
Tablo 4.10.	OPA serisi RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve sunset sarısı uygulanan grupta polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü (baz çifti, bp).....	43
Tablo 4.11.	Kontrol grubu ve karmosin uygulamam grupları arasındaki benzerlik indisi .....	44
Tablo 4.12.	Kontrol grubu ve sunset sarısı uygulama grupları arasındaki benzerlik indisi .....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abs	: Absorbans değeri
bp	: Baz çifti
cm	: Santimetre
g	: Gram
g/mol	: Gram/mol
µl	: Mikrolitre
mg/L	: Miligram/Litre
mg/mL	: Miligram/mililitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
ng	: Nanogram
ng/µl	: Nanogram/mikrolitre
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
U	: Ünite/birim
°C	: Santigrat derece

### Kısaltmalar

EC <sub>50</sub> değeri	: Etkin Konsantrasyon Değeri
dH <sub>2</sub> O	: Distile Su
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
gDNA	: Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
GKS	: Genomik Kalıp Stabilitesi
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum Klorür
MI	: Mitotik İndeks
MI (%)	: Mitotik İndeks Yüzdesi
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)



## **BAZI GIDA RENKLENDİRİCİLERİNİN *Zea mays* L. var. *saccharata* Sturt. ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİ**

### **ÖZET**

Karmosin ve sunset sarısı gıdadan kozmetiğe kadar çok geniş bir kullanım alanına sahip, renklendirici sınıfında yer alan gıda katkı maddeleridir. Yüksek dozda kullanıldığında organizmalar üzerinde toksik etkiye sahip olan bu renklendiricilerin çocuklarda hiperaktiviteye neden olduğu gözlenmiştir. Bu tezde amaçlanan, bazı renklendiricilerin *Zea mays* üzerindeki toksik etkilerini kök ve sürgün inhibisyon testi, klorofil içeriği, alfa amilaz aktivitesi ve RAPD PZR yöntemiyle değerlendirmektir. *Zea mays* kök inhibisyon testinde karmosin ve sunset sarısı için EC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 20 g/L ve 22.5 g/L olarak tespit edildi. Karmosin için 10, 20 ve 40 g/L konsantrasyonda dozlarla, sunset sarısı için 11,25, 22,5 ve 45 g/L konsantrasyonda dozlarla yapılan pigment miktarı tayini testinde, kontrol grubuna göre iki gıda boyasının da uygulandığı *Z. mays* fidelerinde, klorofil a ve klorofil b miktarlarında azalma tespit edilmiştir. Artan dozla birlikte klorofil seviyelerindeki azalmanın arttığı görülmüştür.  $\alpha$ -amilaz testinde, 10 g/L ve 20 g/L karmosin uygulanan gruplarda enzim aktivitesinde çok az bir artış görülürken, 40 g/L karmosin uygulanan grupta enzim aktivitesinde azalma tespit edildi. Sunset sarısı için ise 11,25 g/L, 22,5g/L ve 45 g/L uygulama gruplarında dozla ters orantılı olarak enzim aktivitesinde azalma tespit edildi. RAPD için kullanılan 10 baz çiftlik 10 primerden karmosin uygulama gruplarında 94 adet bant elde edildi. Bu bantlardan 67 tanesinin polimorfik olduğu tespit edildi. Polimorfik bant veren primerler değerlendirildiğinde; karmosin uygulanan gruplarda en fazla polimorfik bant veren primerin % 100 oranıyla OPA-4; en fazla monomorfik bant veren primerin ise % 56 oranıyla OPA-8 olduğu gözlemlendi. Elde edilen polimorfik bantların oranı % 71 olarak belirlendi. Sunset sarısı uygulanan gruplarda en fazla polimorfik bant veren primerin % 89 oranıyla OPA-4; en fazla monomorfik bant veren primerin ise % 60 oranıyla OPA-3 olduğu gözlemlendi. Elde edilen polimorfik bantların oranı % 53 olarak belirlendi

**Anahtar Kelimeler:** Genotoksisite, Karmosin, RAPD PZR, Sunset Sarısı, *Zea mays*.

## **THE GENOTOXIC EFFECTS OF SOME FOOD COLORANTS ON *Zea mays* L. var. *Saccharata* Sturt.**

### **ABSTRACT**

Carmoisine and sunset yellow are food additives in the coloring class, which have wide range of usage from food industry to cosmetics. It has been observed that these colorants, which have toxic effects on organisms when used in high doses, cause hyperactivity in children. The objective of this paper was to evaluate toxic effects of the some colorants to *Zea mays* by the method of root and shoot inhibition test, chlorophyll content, alfa amylase activity and RAPD PCR. In the *Z. mays* root inhibition test, EC<sub>50</sub> values for carmosine and sunset yellow were determined to be 20 g / l and 22.5 g/L, respectively. In pigment analysis test, it is found that amounts of clorophyll a and chlorophyll b were decreased compare to control group for all of the carmoisine(10, 20 and 40 g/L) and sunset yellow (11.25, 22.5 and 45 g/L) doses. With increasing dose, the reduction in chlorophyll levels increased. In the  $\alpha$ -amylase test, a slight increase was observed in enzyme activity in groups treated with 10 g/L and 20 g/L of carmosine, while a decrease in enzyme activity was observed in the group treated with 40 g/L of carmosine. For sunset yellow, a decrease in enzyme activity was observed in the inverse proportion to the doses in the application groups of 11.25 g/L, 22.5 g/L and 45 g/L. In RAPD test, 94 bands were obtained from the 10 primers in the carmosine application groups. 67 of these bands were found to be polymorphic. When evaluating polymorphic banding primers; OPA-4 with 100 % ratio of primer giving the most polymorphic band in carmosine treated groups whereas the primer giving the most monomorphic band was OPA-8 with 56 %. The proportion of polymorphic bands obtained was determined as 71 %. OPA-4 with 89 % ratio of primer giving the most polymorphic band in carmosine treated groups whereas the primer giving the most monomorphic band was OPA-3 with 60 %. The proportion of polymorphic bands obtained was determined as 53 %.

**Key Words:** Genotoxicity, Carmoisin, RAPD PCR, Sunset Yellow, *Zea mays*.

## **GİRİŞ**

Gıda güvenliğinin sağlanması günümüzün en önemli konularından biridir. Gıdaların kalitesinde azalma olmadan uzun süre muhafaza etmek için ise gıda katkı maddeleri büyük önem kazanmaktadır. Dolayısıyla gıda katkı maddelerinin kullanımı kaçınılmaz olmuştur.

Tek başına gıda olarak tüketilmeyen, gıda hammaddesi veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, gıdanın üretiminden tüketimine kadar olan süreçte fiziksel ve kimyasal deformasyonunu önlemek ve gıda ürününün sahip olduğu niteliklerini korumak için gıdalarda kullanılmasına izin verilen maddeler gıda katkı maddesi olarak tanımlanırlar.

Son yıllarda çikolata, kurabiye, pasta gibi yiyecekler ve limonata, meyve suyu ve soda gibi içeceklerde sıklıkla kullanılan gıda katkı maddelerinin her biri için Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanmış olan tebliğ mevcuttur. Bu tebliğe göre, ülkemizde kullanımı yasak olan ve belli miktarlarda kullanımına izin verilen katkı maddeleri yer almaktadır. Bu sayede, izin verilen miktarlarda ve uygun şekilde kullanılan gıda katkı maddelerinin sağlık üzerine olan riskleri minimum seviyeye indirilmektedir. Renklendiriciler de bu tebliğde kullanımına izin verilen, gıdaların renklendirilmesinde kullanılan gıda katkı maddeleridir. Renklendiriciler, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı tarafından Resmi Gazete'de yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği'nde, tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdalarda ana bileşen olarak kullanılmayan, gıdaya renk arttırıcı veya renk düzenleyici olarak katılan maddeler olarak tanımlanmaktadır (URL-1).

Renklendiriciler, tüketicinin beğenisini kazanmak, orjinal rengini kuvvetlendirmek, imalat sürecinde ürünün kaybolan rengini kazandırmak ya da bir ürünü renklendirmek amacıyla kullanılırlar. Bunların bir kısmı yapılan testler sonucunda toksik etki göstermesi sebebiyle yasaklanırken, bir kısmı ise belli ölçülerde olmak

şartıyla kullanımına izin verilmiştir. Karmosin ve sunset sarısı ülkemizde kullanımına izin verilen renklendiricilerdendir.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (1981) tarafından maksimum günlük alım miktarı 4 mg/kg olarak belirlenen karmosin, ya da diğer isimleriyle Azorubin, Food Red 3, Azorubin S, Brilliant karmosin O, Asit Kırmızısı 14 veya C.I. 14720 azo boya grubundan suda çözünebilen sentetik kırmızı bir gıda boyasıdır. Fermantasyondan sonra gıdalarda ısı etkisiyle kırmızı renk sağlanır. Hazır çorba, galeta unu, paket jöle, şekerleme, kek, dondurma, meyveli yoğurt, hazır reçeller gibi günlük olarak tüketilen birçok gıda ürünüde kullanılmaktadır. Karmosinin yıkım ürünleri naftiyonik asit ve bir sodyum tuzu olan 1-naftalen-sülfonik asit-3-amin-4-hidroksildir. Bu aromatik aminlerin gıda boyası lisansına sahip olmadıkları ve bazılarının sağlığa zararlı oldukları tespit edilmiştir (El-Sadat, 2000). Karmosinin etkilerinin sıçanlar üzerinde test edildiği bir çalışmada kontrol grubuna nazaran vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Amin ve diğ., 2010). Vücut ağırlığındaki azalma ise güvenilir ve hassas bir toksisite belirtisi olarak kabul görmektedir (Ezeuko ve diğ., 2007). Aynı çalışmada karmosinin serum proteinlerinde (ALT, AST, ALP, T Protein, Albumin, Globulin) önemli bir artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda 30 gün yüksek ve düşük dozda karmosine maruz bırakılan sıçanlarda kreatinin ve üre konsantrasyonunda artış görülmüştür. Bu artışın sebebinin de böbrek fonksiyonlarındaki bozulmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Karmosinin oksidatif stresi arttırdığı da aynı çalışmada tespit edilmiştir. Karmosin azo boya grubundan olduğu için bağırsak florası tarafından aromatik amine dönüştürülürler ve bu aromatik aminler gıdalardaki ya da midedeki nitrit ya da nitratlarla etkileşime geçerek reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturabilirler. Süperoksit anyon, hidroksil radikal ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri nitrosamin metabolizmasında üretilebilir ve oksidatif stresi arttırabilirler (Bansal, 2005).

JECFA, (1981) tarafından maksimum günlük alım miktarı 2,5 mg/kg olarak belirlenen sunset Sarısı, ya da diğer isimleriyle CI Food Yellow 3, Orange Yellow S, CI (1975) No. 15985, INS No. 100, azo boya grubundan suda çözünebilen sentetik sarı-turuncu arası renkte bir gıda boyasıdır. Kozmetik, ilaç ve gıda sanayi gibi çok geniş bir alanda kullanılmaktadır. Şekerler, tatlılar, soslar, içecekler, hazır çorbalar

ve konserve balık gibi birçok gıda ürününde bulunmaktadır. Sunset sarısının yıkım ürünleri sülfanilik asit ve sodyum tuzu olan 2-naftalen-sülfonik asit-5 amin-6 hidroksildir. Bu aromatik aminlerin gıda boyası lisansına sahip olmadıkları ve bazılarının sağlığa zararlı oldukları tespit edilmiştir (El-Sadat, 2000). Sülfanilik asit ve onun azotla asetillenmiş türevlerinin sıçan ciğerlerindeki glutatyon S-transferaz (GST) izoenzimleriyle etkileşime geçtiği ve inhibe ettiği tespit edilmiş (Diericki ve diğ., 1982). Başka bir çalışmada sunset sarısının insan eritrositlerini ve kolinesteraz plazmasını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Osman ve diğ., 2002). İnsanlarda aspirin intoleransında alerjik reaksiyonlara sebep olduğu düşünülen sunset sarısı, mide rahatsızlığı, diyare, kusma, kurdeşen, anjioödem gibi semptomlarla sonuçlanmaktadır (Ghoneim ve diğ., 2011). Yeterli çalışma yapılmış olmamasına rağmen, mevcut çalışmalara göre, temel olarak bakteriler ve mantarlar üzerinde mutajenite testlerinde ve fare, sıçan ve hamsterda kemik iliği üzerine yapılan klastojenite testleri sonucunda, sunset sarısının genotoksik ve kanserojenik olmadığı ifade edilmiştir (JECFA, 1981). Fareler üzerinde yapılan mikronukleus testinde sunset sarısının 2000 mg/kg dozunda genotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir (Poul ve diğ., 2009).

*Zea mays* dünyanın önemli tahıllarından biridir. İnsan gıdası olarak kullanımın yanı sıra hayvan yemi, şurup, etanol, biyoplastik, nişasta ve viski yapımında kullanılmaktadır. Tarımsal öneminin yanı sıra, *Z. mays* temel araştırmalar için de model organizma olarak yaygın kullanılan bitkilerden biridir (Strable ve Scanlon, 2016). Mutant stokların fazla miktarda koleksiyonu, büyük heterokromatik kromozomları, geniş nükleotid çeşitliliği gibi özellikleri sayesinde *Z. mays*, genetik, sitogenetik ve genomik araştırmalarda diğer model organizmalar arasında merkezi bir konum almaktadır. Model bir organizma olarak *Z. mays*, bitki ıslahı, genom evrimi, gelişimsel fizyoloji, epigenetik, zararlı direnci, heterozis, nicel kalıtım ve karşılaştırmalı genomik gibi geniş yelpazeli biyolojik araştırmalara konu olmuştur (Strable ve Scanlon, 2016).

Çevresel kirleticilere maruz kalan organizmaların nükleik asit ve protein içeriklerinde değişimler olabilir ve biyosentez metabolizmasındaki değişimler kirleticiler için bir belirteç olarak kullanılabilir (Singh ve Tewari, 2003). Pigment tayini, enzim aktivitesinin belirlenmesi ve RAPD PZR (Rastgele Çoğaltılmış

Polimorfik DNA) tekniği ile genetik polimorfizmin belirlenmesi canlılar üzerindeki bu değişikliklerin gözlenmesinde kullanılan yöntemlerdendir.

RAPD PZR, kolay ve hızlı bir teknik olmasına ek olarak kullanılan primer ve sarf malzemelerinin diğer moleküler tekniklere göre daha ekonomik olması gibi birçok avantaja sahiptir (Rafalski ve diğer., 1991; Mathieu-Daude ve diğer., 1997; Waugh ve Poweil, 1992). Ancak, belirteçlerin dominant olması nedeniyle heterozigotların teşhisinde zorluk (Mathieu-Daude ve diğer., 1997), farklı koşullarda farklı sonuçlar vermesi; hatta örneklerin saklanma koşullarının bile sonuçları etkilemesi (Muralidharan ve Wakeland, 1993; Schierwater ve Ender, 1993) gibi dezavantajları da mevcuttur.

Çalışmamızda, renklendiricilerden karmosin ve sunset sarısının olası yan etkilerinin, *Z. mays* üzerindeki biyokimyasal ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesine yer verilmiştir. Genetik hasarın belirlenmesinde RAPD PZR tekniği uygulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan karmosin ve sunset sarısının *Z. mays* üzerinde meydana getirebileceği genotoksik etkilerinin tespit edileceği düşünölmektedir. Böylece ölkemizde yaygın olarak kullanılan bu renklendiricilerin bilinçsiz ve yanlış kullanımından kaynaklanabilecek zararların organizmalar üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

## 1. GENEL BİLGİLER

Gıda katkı maddeleri Sağlık Bakanlığı tarafından Resmi Gazete'de belirtildiği ifadeyle “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen, gıda hammaddesi ve/veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın hazırlanması, tasnifi, işlenmesi, ambalajlanması, taşınması, depolanması ve dağıtımını sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeler” olarak ifade edilmektedir (URL-1).

### 1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması ve Özellikleri

Gıda katkı maddeleri kullanım amaçlarına göre 4 grupta toplanabilir.

1. Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar
  - Antimikrobiyaller (nitrit, nitrat, benzoik asit, propiyonik asit, sorbik asit)
  - Antioksidanlar
2. Yapıyı hazırlama, pişme özelliğini geliştirenler
  - pH ayarlayıcılar
  - Topaklanmayı önleyenler (silikat, magnezyum oksit, magnezyum karbonat)
  - Emülsifiyerler (lesitin, mono ve digliseridler)
  - Stabilizörler, kıvam arttırıcılar, tatlandırıcılar
  - Mayalanmayı sağlayıcı ajanlar
  - Nem ayarlayıcılar
  - Olgunlaştırıcılar
  - Ağartıcılar, dolgu maddeleri, köpük ayarlayıcılar, parlaticılar
3. Aromayı ve rengi geliştiriciler
  - Çeşni arttırıcılar
  - Çeşni vericiler (Aroma maddeleri)

- Renklendiriciler (karmosin, sunset sarısı vb.)

4. Besin değerini koruyucu, geliştiriciler

- İşleme sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koyma

- Diyetle eksik olabilecek besin öğelerini ekleme (A, D vitaminleri) (URL-2).

### **1.1.1. Renklendiriciler**

Renklendiriciler kromofor ve okzokromlardan oluşan önemli kirleticilerdendir (Cuiping ve diğ., 2012). Kromofor renk üretiminden sorumlu iken oksokrom kromoforun özelliklerini artırır, destekler ve suda çözünebilir olmasını sağlar. Renklendiriciler önemli ölçüde yapısal farklılık gösterirler. Bunların arasında, yapılarında bir ya da daha fazla azo bağı bulunduran azo boyalar sentetik boyaların en büyük grubudur. Yapılarında aynı zamanda sülfonik asit de içerebilmektedirler (Gupta ve Susah, 2009; Behnajady ve diğ., 2007). Bu boyalar tekstil, plastik, kozmetik ve gıda endüstrisi gibi çok geniş bir alanda kullanılmaktadırlar.

Renklendiriciler; tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdalarda ana bileşen olarak kullanılmayan, gıdaya renk artırıcı veya renk düzenleyici olarak katılan maddeleri olarak tanımlanmaktadır. Ülkemizde kullanımına izin verilen renklendiricilerin EC kodları ve renk indeks numaraları Tablo 1.1' de listelenmiştir. (URL-1). Bunların kullanımı ve kısıtlamalarına dair bütün bilgiler bu tebliğde yer almaktadır.

Gıda maddelerinden ve diğer kaynaklardan fiziksel ve kimyasal ekstraksiyonla elde edilen diğer besleyici veya aromatik bileşenleri içermeyecek şekilde pigmentlerin seçici ekstraksiyonuyla oluşturulan maddeler bu tebliğ kapsamında renklendirici olarak nitelendirilirler.

Ancak bir gıda maddesinin üretiminde aromatik veya besleyici özellikleri nedeni ile kullanılan, ancak ikinci etkisi renk vermek olan paprika, turmerik, safran gibi maddeler renklendirici sınıfına girmezler.



Tablo 1.1. Ülkemizde kullanımına izin verilen renklendiriciler

EC KODU	GENEL ADI	RENK İNDEKS NUMARASI VEYA TANIMI
E 100	Kurkumin	75300
E 101	(i) Riboflavin (ii) Riboflavin-5'-fosfat	
E 102	Tartrazin	19140
E 104	Kinolin sarısı	47005
E 110	Sunset sarısı FCF Orange yellow	15985
E 120	Koşineal, Karminik asit, Karminler	75470
E 122	Azorubin, Karmosin	14720
E 123	Amarant	16185
E 124	Ponso 4R, Koşineal Red A	16255
E 127	Eritrosin	45430
E 128	Red 2G	18050
E 129	Allura Red AC	16035
E 131	Patent Blue V	42051
E 132	İndigotin (İndigo Karmin)	73015
E 133	Brilliant Blue FCF	42090
E 140	Klorofiller ve Klorofilinler	75810
E 141	Klorofiller ve Klorofilinlerin bakır kompleksleri	75815
E 142	Green S	44090
E 150a	Sade Karamel	
E 150b	Kostik sulfit karamel	
E 150c	Amonyum karamel	
E 150d	Amonyum sulfit karamel	
E 151	Brilliant Black BN, Black PN	28440
E 153	Bitkisel karbon	
E 154	Brown FK	
E 155	Brown HT	20285

Tablo 1.1. (Devam) Ülkemizde kullanımına izin verilen renklendiriciler

EC KODU	GENEL ADI	RENK İNDEKS NUMARASI VEYA TANIMI
E 160a	Karotenler (i) Karışım halindeki karotenler (ii) Beta karoten	75130 40800
E 160b	Anatto, Biksin, Norbiksin	75120
E 160c	Paprika ekstraktı Kapsantin, Kapsorubin	
E 160d	Likopen	
E 160e	Beta-apo-8'karotenol(C30)	40820
E 160f	Beta-apo-8'-karotenoik asitin etil esteri (C30)	40825
E 161b	Lutein	
E 161g	Kantaksantin	
E 162	Pancar kökü kırmızısı, Betanin	Meyve ve sebzeden fiziksel yollarla hazırlanan 77220
E 163	Antosiyaninler	77891
E 170	Kalsiyum karbonat	77491
E 171	Titanyum dioksit	77492
E 172	Demir oksit ve hidroksitler	77499
E 173	Aluminyum	
E 174	Gümüş	
E 175	Altın	
E 180	Litolrubin BK	

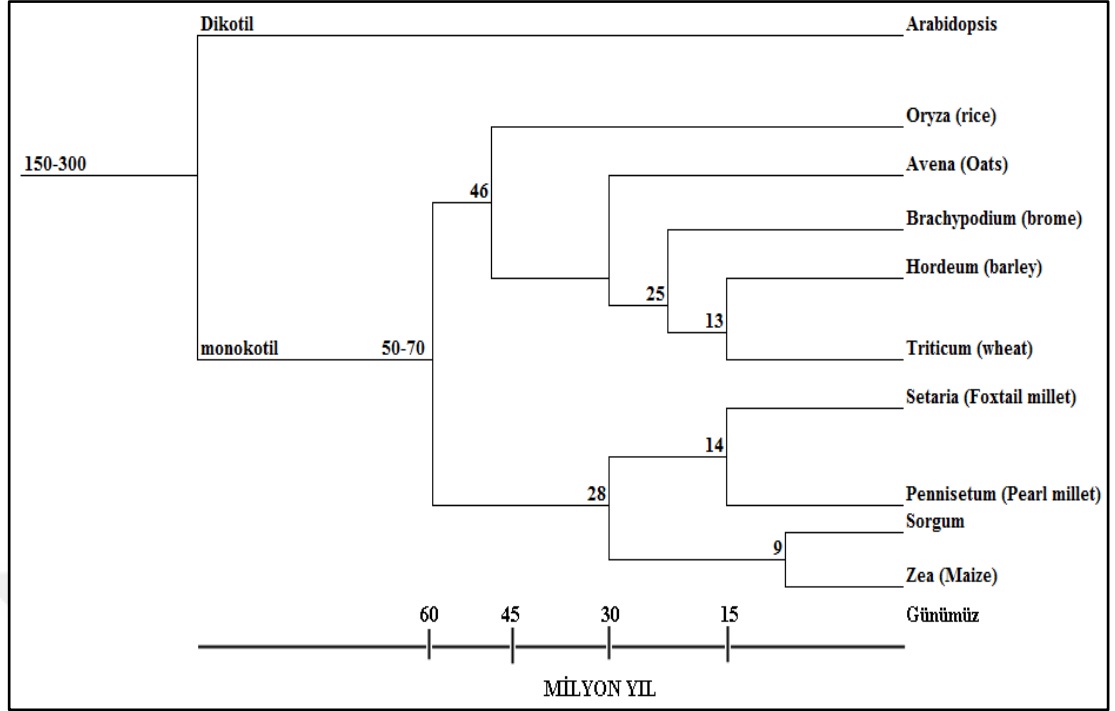
## 1.2. Model Organizma Olarak Mısır

*Poaceae* familyasının bir üyesi olan mısır, dünyadaki en önemli tahıllardan biridir. Mısır toksisite çalışmalarında kullanılan önemli bitki türlerindedir (Plewa, 1982; Grant, 1999).

*Z. mays*, çimenlerinde yer aldığı *Poaceae* familyasına ait bir bitkidir. Çimenler 55 - 70 milyon yıl önce ortaya çıkmış ve bunların farklılaşmasıyla günümüzde kullanılan bütün önemli tahıllar ve yaklaşık 10.000 adet yabancı akrabaları meydana gelmiştir (Şekil 1.1 Kellogg, 2001; Bolot ve diğ. 2009). Mısır genomu 4.8 milyon yıl önce 2 progenitör genomun segmentel allotetraploidizasyonu sonucu ortaya çıkmıştır (Gaut ve Doebley 1997; Swigonova ve diğ. 2004).

Mısırın model organizma olarak kullanılması 1869 yılında Gregor Mendel'in *Pisum sativum* ile çalışmasından hemen sonrasına dayanmaktadır. Bezelye ıslah çalışmalarının sağlaması niteliğinde deneyler için kullanılmıştır (Rhoades 1984; Coe 2001). Bezelye gibi mısırdaki büyük bir bitkidir ve fenotipik analizler için uygundur ve bu yüzden morfolojik farklılıkların genetik analizi için avantaj sunmaktadır.

30 yıl sonrasında Correns ve de Vries, xenia (tohumda erkek bitki poleninden gelen dominant vasıfların görünmesi) üzerindeki çalışmaları için mısırdaki yaygın olarak kullanılmış ve bu çalışmalardan çıkan sonuçlar Mendel'in orjinal genetik çalışmalarının tamamlayıcı ve genişletilmiş olduğu olmuştur ve Mendel'in tarihi nitelikteki çalışmalarının tekrar keşfedilmesinin tamamlayıcısı olmuştur. Correns ve de Vries mısır araştırmalarının öncüleri arasındayken, Cornell Üniversitesinden R.A. Emerson ve onun Harvard üniversitesinden tez danışmanı E.M. East modern mısır genetiğinin kurucuları olarak görülmüştür. Cornell grubu, 1920 ve 1930'lu yıllarda mısırın model bir genetik sistem olarak kullanılmasına yönelik bir çerçeve sağlayan transmisyon genetiği ve sitolojisinde sağlam bir temel oluşturmuştur (Strable ve Scanlon, 2009)

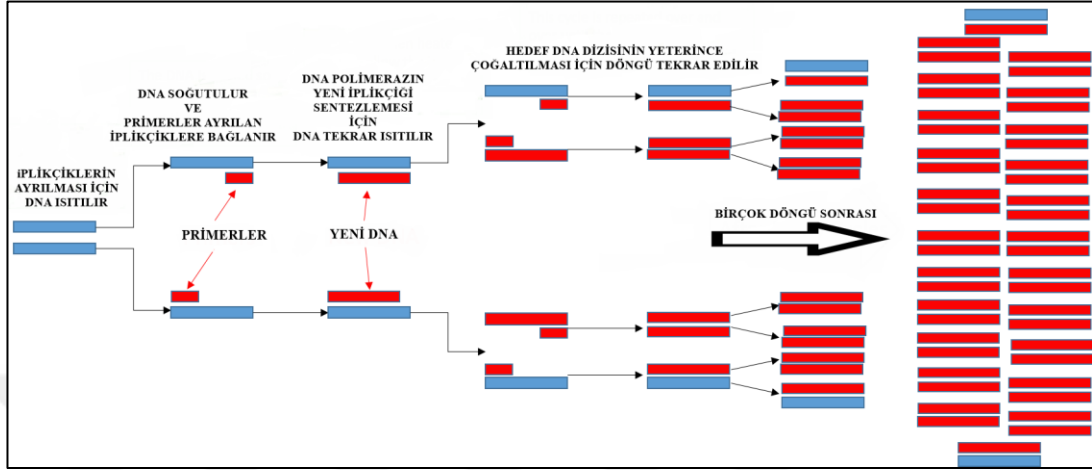


Şekil 1.1. Mısırın yer aldığı *Zea* cinsinin tahıl ürünleriyle olan evrimsel ilişkisi

### 1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR, DNA polimeraz enziminin tek iplikli DNA'yı kalıp aldığı ve deoksiribonükleotitleri substrat olarak kullandığı moleküler bir tekniktir. DNA polimeraz, 5'-3' yönünde sentez yapar ve senteze başlaması için serbest 3'-OH grubuna ihtiyaç duyar. PZR'da kullanılan primerler, enzimin senteze başlaması için bu 3'-OH grubunu sağlarlar. Kalıp DNA, DNA polimeraz enzimi, dört çeşit deoksiribonükleotit (dNTP) ve primerlerin bulunduğu bir karışım, uygun koşullar sağlandığında, primerler kalıp DNA üzerinde kendilerine komplementer olan bölgelerle eşlenirler ve enzimin senteze başlaması için başlatıcı görev yaparlar. Daha sonra DNA polimeraz, primerlerin ucuna serbest deoksiribonükleotitleri ekleyerek komplementer DNA ipliğini sentezler. Bir PZR döngüsü üç aşamadan oluşur. Birinci aşamada, yüksek sıcaklıkta çift zincirli kalıp DNA açılır (denatürasyon), ikinci aşamada, sıcaklık 40-65 °C'ye düşürülerek primerlerin kalıp DNA ile eşleşmesi (annealing) sağlanır. Üçüncü aşamada ise, sıcaklık 72 °C'ye yükseltilerek *Taq* DNA polimerazın çalışması için optimum ortamın sağlanmasıyla primerlerin uzaması (extension) ve yeni DNA ipliğinin sentezlenmesi sağlanarak döngü sonlanır (Şekil 1.2). Bu döngünün tekrarlanmasıyla DNA parçaları  $2n$  ( $n$ =döngü sayısı) şeklinde artar.

PZR tekniği DNA klonlamasında, tanı ve teşhiste, DNA baz dizilerinin belirlenmesinde, adli tıpta, genetik akrabalık ilişkilerinin tesbitinde ve evrimin aydınlatılması çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Arı, 2004).



Şekil 1.2. PZR Diyagramı

#### 1.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Sekans bilgisine gereksinim duyulmayan RAPD yöntemi Williams ve diğ., (1990) tarafından tanımlanan ve DNA'yı temel alan bir PZR tekniğidir. RAPD yöntemi basit, kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın tesadüfi olarak dağılmış segmentlerle çoğaltılması esasına dayanır (Williams ve diğ., 1990). Bu teknikte primerler (9 – 10 baz çifti uzunluğunda) kullanılarak genomik DNA düşük primer bağlanma sıcaklığında PZR ile çoğaltılmaktadır. Çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforezde ayrılabilir ve etidyum bromid boyaması ile görüntülenebilmektedir.

Diğer PZR uygulamalarının aksine, RAPD yönteminde genomik bölgelerin çoğaltılması için tek primer kullanılır. RAPD özellikle akraba organizmalar arasındaki DNA dizi farklılığının ortaya çıkarılmasında yaygın şekilde kullanılmakta ve elde edilen nükleotit farklılıkları RAPD markörleri olarak isimlendirilmektedir. Genomlar arasında RAPD markör farklılığının nedenleri, primer bağlanma bölgesini değiştiren tek baz değişiklikleri ya da inversiyonlar/delesyonlar olabileceği gibi, çoğaltıma imkan vermeyecek şekilde primer bağlanma bölgelerini ayıran genomik dizilerde meydana gelen inversiyonlar da olabilmektedir (Parmaksız, 2004).

RAPD tekniğinin başlıca kullanım alanları, genetik haritalama, istenilen özelliklere bağlı genetik markörlerin geliştirilmesi, bitki ve hayvan ıslahı, popülasyon genetiği ve moleküler evrimdir (Bardakçı, 2001). Çabuk sonuç vermesi, az iş gücü gerektirmesi, düşük maliyetli olması, az miktarda DNA'nın yeterli olması ve polimorfizm oranının yüksek olmasından dolayı otomasyona uygunluk göstermesi gibi avantajları varken, tekrarlanabilirliğinin sınırlı olması ve dominant bir markör olması gibi dezavantajları da vardır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).



## 2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Bu çalışmada, karmosin ve sunset sarısı renklendiricilerinin *Z. mays* üzerindeki genotoksik etkileri klorofil tayini,  $\alpha$ -amilaz testi ve RAPD PZR teknikleri kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma öncesinde, bu renklendiriciler ve uygulanacak testler hakkında literatür taramaları yapılmıştır. Bu bölümde çalışmaya referans olabilecek birtakım bilimsel araştırmalara yer verilmiştir.

Renklendiricilerin sıçanlar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada kullanılan tüm gıda renklendiricilerinin, vücut ağırlığı, hemogloblin konsantrasyonu ve alyuvar sayısında belirgin bir düşüşe yol açtığı, ayrıca glutatyon içeriğinde önemli bir düşüş gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, kontrol grubuna kıyasla, tüm test gruplarında serum alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalın fosfataz aktiviteleri, bilirubin, üre, kreatinin, total protein ve albumin miktarlarında belirgin bir artış gözlenmiştir (El-Wahab., 2012).

Karmosinin yıkım ürünleri naftiyonik asit ve bir sodyum tuzu olan 1-naftalen-sülfonik asit-3-amin-4-hidroksildir. Bu aromatik aminlerin gıda boyası lisansına sahip olmadıkları ve bazılarının sağlığa zararlı oldukları tespit edilmiştir (El-Sadat, 2000).

Düşük konsantrasyonda ( $8,8 \times 10^{-5}$  mol/L) karmosinin, insan kolinesteraz ve psödo kolinesteraz aktivitesini % 31,6 ve % 17,6 oranında inhibe ettiği, kolinesteraz için  $1,73 \times 10^{-4}$  mol/L, psödo kolinesteraz için  $3,38 \times 10^{-4}$  mol/L konsantrasyonda inhibisyonun % 50'ye ulaştığı tespit edilmiştir (Osman ve diğ., 2004).

Düşük konsantrasyonda ( $2,0 \times 10^{-4}$  mol/L) naftiyonik asit, insan psödo kolinesteraz aktivitesini % 20 oranında inhibe ettiği,  $25 \times 10^{-4}$  mol/L konsantrasyonda inhibisyonun % 50'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Naftiyonik asidin kolinesteraz aktivitesine etkisi olmamıştır (Osman ve diğ., 2004).

Karmosin ve sunset sarısının farklı konsantrasyonlarının sıçanlarda total lipid, trigliserit, total protein, globulin ve serum transaminaz miktarlarında anlamlı artışlara sebep olduğu görülmüştür (Aboel-Zahab ve diğ., 1997)

Sıçan ciğer homojenatı ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, karmosinin (0,4 mg/mg doku) suksinik oksidaz sistemi üzerine etkisi araştırılmış ve sonuç olarak karmosinin bu enzimin aktivitesini yaklaşık % 40 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Sikorska ve Krauze, 1962).

50 dişi ve erkekten oluşan fare grupları 3.000 ve 6.000 ppm konsantrasyon karmosinle 103-104 hafta beslenmiş, yüksek doz uygulanan farelerin ortalama vücut ağırlıkları kontrol grubundakilere oranla düşmüş fakat klinik belirtiler gözlemlenmemiştir. Ölüm oranında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Dozla ilişkili olmamasına rağmen dişi farelerde dalakta lenfoid hiperplazisi (büyüme), karaciğerde hematopoezis (kan hücrelerinin oluşumu) ve idrar kesesi submukozasında lenfoid hiperplazisi tespit edilmiştir (Anon., 1982).

50 erkek F344 sıçanı 6.000 ve 12.500 ppm konsantrasyonda, 50 dişi F344 sıçanı 12.500 ve 25.000 ppm konsantrasyonda karmosin ile 103-104 hafta beslenmiş, ortalama vücut ağırlığının deney süresi boyunca kontrol grubuna benzerlik gösterdiği belirlenmiş ancak klinik bir farklılık tespit edilmemiştir. Düşük doz uygulanan grubun yaşama oranı kontrol ve yüksek doz grubuna oranla daha yüksek çıkmıştır. Kontrol ve yüksek doz grubunda anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Yüksek doz grubundaki dişilerin uterusunda anlamlı şekilde yüksek endometriyal stromal polipler (uterus mukozasında ur oluşumu) tespit edilmiştir (kontrol % 10, düşük doz % 22 ve yüksek doz % 26). Bununla birlikte, dozlanan gruplardaki polip görülme sıklığı, uygulama yapılmamış dişi F344 sıçanlarında tarihsel orana benzer (% 23; % 10-37 arasında) çıkmıştır. Bu yüzden bu artışın karmosin uygulanmasından kaynaklandığının savunulamayacağı ifade edilmiştir. Histopatolojik çalışmalar karmosinin F344 sıçanları için kanserojen olmadığı sonucunu vermiştir (Anon., 1982)

*E. coli* kültürleri üzerinde 5 g/L konsantrasyonda karmosin uygulaması yapılmış ve mutajenik etki tespit edilmemiştir (Lück ve Rickerl, 1960).



*Salmonella typhimurium* TA-1538 üzerinde 50 µg/petri konsantrasyonda yapılan çalışmada ciğer enzim preparasyonunun varlığında ya da yokluğunda mutajenik bir etkiye rastlanmamıştır (Garner ve Nutman, 1977).

5 mg/ml konsantrasyonda uygulanan karmosin *Saccharomyces cerevisiae* BZ 34'te mitotik gen konversiyonuna neden olmamıştır. Anlamlı hücre ölümleri ve hücre bölünmesi inhibisyonu gözlemlenmemiştir (Sankaranarayanan ve Murthy, 1979).

180 gün süre ile 25 dişi 25 erkek sıçana % 1 konsantrasyonda karmosin, toplamda her hayvan için 55 gram, içme sularında verilmiştir. 50 sıçan da kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Vücut ağırlığı, ölüm oranı ve genel durumlarında bir farklılık görülmemiş. 7 ay sonra hayvanlar çiftleştirilmiş ve F1 jenerasyonu üretilmiştir. Yavrular süten kesildikten sonra % 1'lik karmosin tekrar verilmiş ve 4 ay sonra F2 jenerasyonu elde etmek için hayvanlar tekrar çiftleştirilmiştir. Bir batında doğan yavru sayısında ve doğurganlıkta herhangi bir anormallik gözlenmemiştir. İkiyüz gün % 1'lik karmosin verilen F2 jenerasyonu iki yıl süre ile karmosin verilmeden beslenmiş. Ölüm oranında ya da tümör oluşumunda yan etki görülmemiştir (Hecht, 1966).

Sıçanlara hamilelik sürecinin 6-15 günleri arasında, 100 (22 hayvan), 300 (24 hayvan) ve 1.000 (22 hayvan) mg/kg/gün dozda karmosin verilmiş 66 hayvan da kontrol grubu olarak kullanılmış ve metil selüloz verilmiştir. Pozitif kontrol olarak da 22 hayvana 30 mg/kg/gün dozda trypan blue verilmiştir. Karmosin uygulanan hayvanlarda embriyotoksik ya da teratojenik bir etki görülmemiştir (Smith ve diğ., 1972b).

Dişi yeni zelanda beyaz tavşanlara hamilelik sürelerinin 6-18 günleri arasında 40 (15 hayvan), 120 (15 hayvan) ve 400 (20 hayvan) mg/kg/gün dozda karmosin verilmiştir. Negatif kontrol olarak 47 hayvan kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak da 15 tavşana 150 mg/kg/gün dozda talidomit verilmiştir. Karmosin verilen hayvanların vücut ağırlığında etki görülmemiştir. Yüksek doz uygulanan hayvanların ölümlerinde istatistiksel olarak anlamsız bir artış olmuştur. Karmosin uygulanan dişilerin hepsinde implantasyon etkinliğinde azalma tespit edilmiş fakat uygulanan madde ile ilgili bir durum olmadığı varsayılmıştır. Toksikite belirtisi ya da fetal anormallikler

görülmemiştir. Bu yüzden uygulanan dozlarda karmosinin teratojenik olmadığı tespit edilmiştir (Smith ve diğ.,1972a).

16 sıçanla gerçekleştirilen çalışmada, % 0,05- 0,10- 0,50 ve % 1 konsantrasyonda karmosin 90 gün süre ile hayvanlara verilmiş ve bu dozlardaki karmosinin vücut ağırlığında, besin tüketiminde, hematoloji, böbrek veya hepatik fonksiyon parametrelerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. % 1 konsantrasyon uygulanan dişilerin böbrek ağırlıklarında artış görülmü fakat bu organda patolojik bir bulguya rastlanmamıştır. Karmosin kaynaklı tümör anormal patolojik bulgular bulunmamış (Gaunt ve diğ., 1967).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada % 2, 4, 6 ve 8 konsantrasyonda karmosin 9 hafta süre ile uygulanmıştır. % 6 ve daha yüksek dozlarda toksik etki tespit edilmiş, vücut ağırlıklarında azalma olmuştur. Bunun haricinde toksik etki görülmemiştir (Holmes ve diğ.,1978a).

Üç dişi üç erkek minyatür domuza, 250, 500 ve 1.000 mg/kg/gün dozda karmosinin 90 gün süre ile uygulandığı çalışmada toksik ve patolojik bulguya rastlanmamış ve kontrol ve test grupları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Gaunt ve diğ.,1969).

Karmosinin 30 dişi 30 erkek fareye günlük besin tüketimlerinin % 0,01-0,05-0,25 ve 1,25'i oranında verildiği çalışmada kontrol grubunda 60 erkek 60 dişi kullanılmış, doz uygulanan hayvanların davranışlarında, vücut ağırlıklarında ya da organ ağırlıklarında bir farklılık görülmemiştir. % 1,25 konsantrasyonda karmosin uygulanan dişilerin hemoglobin seviyelerinde 12. ve 52. haftalarda anlamlı bir düşüş yaşanmıştır. % 0,25 ve 1,25 dozlarıyla beslenen erkeklerde ise 52. haftada paketlenmiş hücre hacminde küçülme tespit edilmiş. Minimum toksik etki % 1,25 dozda görülmüş, 80. haftada anemi belirtileri tespit edilmiş. % 0,25 dozda 80 hafta süre ile toksik bir etki tespit edilmemiştir (Mason ve diğ., 1974).

Multijenerasyon üreme yapılan bir çalışmada, sıçanlar günlük besin miktarının % 0,35, % 0,8 ve % 2'si oranında karmosinle beslenmiş, üreme parametreleri üzerinde (doğurganlık, yaşama, laktasyon) negatif bir etki görülmemiştir. Vücut ağırlığında

etkisi olmamasına rağmen doz uygulanan hayvanlarda besin tüketiminde artış eğilimi görülmüştür (Holmes ve diğ., 1978a).

Sunset sarısının yıkım ürünleri sülfanilik asit ve sodyum tuzu olan 2-naftalen-sulfonik asit-5 amin-6 hidroksildir. Bu aromatik aminlerin gıda boyası lisansına sahip olmadıkları ve bazılarının sağlığa zararlı oldukları tespit edilmiştir (El-Sadat, 2000).

Düşük konsantrasyonda ( $1,3 \times 10^{-4}$  mol/L) sunset sarısı, insan kolinesteraz ve psödo kolinesteraz aktivitesini % 16 ve % 5 oranında inhibe etmiş, kolinesteraz için  $2,4 \times 10^{-4}$  mol/L, psödo kolinesteraz için  $3,3 \times 10^{-4}$  mol/L konsantrasyonda inhibisyonun % 50'ye ulaştığı tespit edilmiştir (Osman ve diğ., 2004).

Düşük konsantrasyonda ( $7,71 \times 10^{-4}$  mol/L) sülfanilik asit, insan kolinesteraz ve psödokolinesteraz aktivitesinde % 14,58 ve % 12,73 inhibisyona neden olmuştur. Kolinesteraz için  $122 \times 10^{-4}$  mol/L, psödo kolinesteraz için  $129 \times 10^{-4}$  mol/L konsantrasyonda inhibisyonun % 50'ye ulaştığı tespit edilmiştir (Osman ve diğ., 2004).

Sunset sarısının üreme ile ilgili problemlere ve davranışsal etkilere sebep olduğu (Tanaka, 1996) ve mitokondriyal solunumu % 28 oranında inhibe ettiği görülmüştür (Chance ve diğ., 1965).

Sıçanlar üzerinde Price ve diğ., (1978) tarafından yapılan çalışmada, sunset sarısının embryo fibroblastlarında hücre transformasyonuna neden olmadığı, morfolojik değişiklikleri teşvik etmediği ve tümörijenik olmadığı rapor edilmiştir.

5g/L konsantrasyonda uygulanan sunset sarısının *E. coli* kültürleri üzerinde (Luck ve Rickerl, 1960) ve *S. typhimurium*'un TA 1538, TA 98 ve TA 100 ırkları üzerinde mutajenik bir etkiye neden olmadığı tespit edilmiştir (Garner ve Nutman, 1977)

Sunset sarısının *E. coli* ve *S. typhimurium* DNA'larına etkisinin araştırıldığı çalışmalarda genotoksik bir etki tespit edilmemiştir (Haveland-Smith ve Combes, 1980).

Sıçanlara gebelik süresince 100, 300 ve 1.000 mg/kg/gün miktarlarında sunset sarısının verildiği bir çalışmada, 300 ve 1.000 mg/kg/gün dozlarla beslenen

sıçanların yavrularının ortalama ağırlıklarında düşüş gözlemlendiği tespit edilmiştir. Anne sıçanda ve ceninde (iç, dış ve iskeleta dair anormallikler) etki görülmemiştir. Yavrularda terata (değişime uğramış fetüs) gözlenmemiştir (International Research and Development Corporation, 1972a).

Aynı dozlarda sunset sarısının hamilelik süresince verildiği tavşanda, anne ya da ceninde bir etki tespit edilmemiştir. 1.000 mg/kg/gün dozda kusurlu bir ikiz görülmüş fakat bileşikle ilişkili olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir (International Research and Development Corporation, 1972b).

10 tane tam olgunlaşmamış dişi sıçana deri altından günde 2 defa olmak üzere 3 gün sunset sarısı enjekte edilmiş ve her enjeksiyonda 250 mg/kg sulu çözelti uygulanmıştır. Dördüncü günde öldürülen sıçanlarda östrojenik aktiviteye (uterus ağırlığı) rastlanmamıştır (Graham ve Allmark, 1969).

16 sıçana 10 ay süre ile % 2 konsantrasyonda sunset sarısı solüsyonu içme suyu olarak verilmiş ve kontrol grubun nazaran doz uygulanan genç sıçanların büyümesinde hızlanma ve yaşamda kalma oranlarında artış tespit edilmiştir. Ciğerlerinde histopatolojik bir değişime rastlanmamıştır (Manchon ve Lowy, 1964).

15 erkek 15 dişi sıçanın 90 gün süre ile % 0,5, 1, 2 ve 3 konsantrasyonda sunset sarısı ile beslendiği bir çalışmada, büyümelerinde ya da gıda tüketimlerinde yan etki görülmemiş fakat % 3 konsantrasyon uygulanan sıçanlarda deney süresince, % 2 konsantrasyon uygulanan sıçanlarda da ilk haftalarda diare görülmüştür. Hematolojik incelemelerde ve böbrek fonksiyon testlerinde bir anormallek görülmemiştir. Yapılan otopsi sonucunda % 2 ve % 3 konsantrasyon uygulananların çekumlarında (kör bağırsak) ve % 3 konsantrasyon uygulananların testislerinde büyüme tespit edilmiştir (Gaunt ve diğ., 1967).

3 erkek 3 dişi domuzun 98 gün süre ile 250, 500 ve 1.000 mg/kg/gün şeklinde beslendiği bir çalışmada kontrol grubu ile test grubu arasındaki hayvanların ağırlıklarında, hematolojik belirtilerinde, idrar içeriğinde ve organ ağırlığında bir farklılık bulunmamıştır (Gaunt, 1969).

30 farenin 52 hafta süre ile % 0,05 konsantrasyonda sunset sarısını maruz bırakıldığı bir çalışmada, her fare haftalık 17 mg, toplamda ise 884 mg boya ile beslenmiştir ve yaşamları süre ile kapalı tutulmuşlardır. Yaşayan 7 tane farede 9 lenfoma ve 1 adet bağırsak tümörü tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise başlangıçta sayısı 60 olan farelerin 13 tanesi hayatta kalmış ve bunlarda toplamda 5 lenfoma ve 1 bağırsak tümörü tespit edilmiştir (Bonser ve diğ., 1956).

2 farklı ırkta ( $C_{57}$  ve  $C_{3H}$ ) farenin, kullanıldığı çalışmada % 1 ve 2 konsantrasyonda sunset sarısı ile beslenmiştir. Kontrol grubu için 200 adet, her bir doz için ise 100 adet farenin kullanıldığı çalışmada tümör oluşumuna dair bir etki tespit edilmemiştir (FDA, 1964).

Kontrol grubunda 60 dişi 60 erkek farenin, test grubunda ise 30 dişi 30 erkek farenin kullanıldığı çalışmada fareler % 0,2-0,4-0,8 ve 1,6 konsantrasyonda sunset sarısı ile 80 hafta süre ile beslenmişler. Ölüm oranında, vücut ağırlığında, organ ağırlığında ya da hematolojik bulgularda yan etkiye rastlanmamıştır. Histopatolojik bulgular da kontrol grubundakilere benzer çıkmış ve tümör oluşumunu arttırıcı bir etki tespit edilmemiştir (Gaunt, 1974).

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

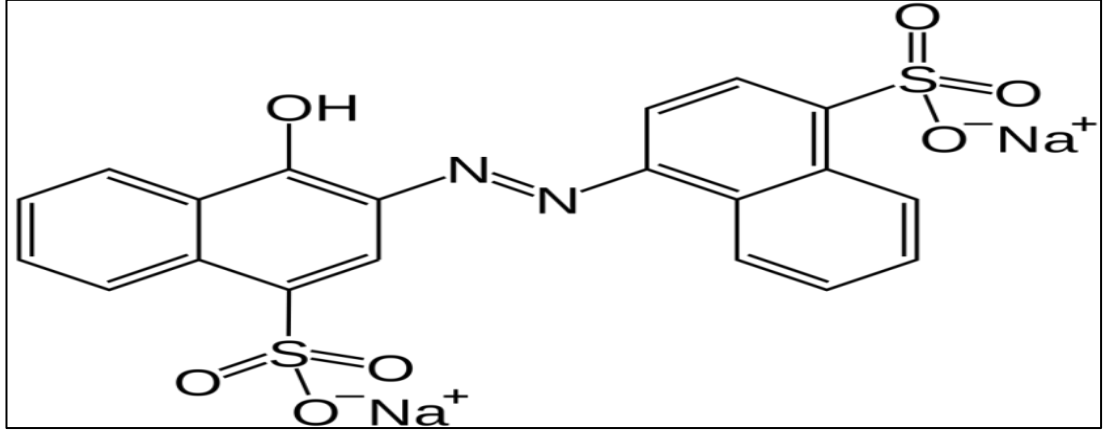
#### 3.1. Bitki Materyali

Model organizma olarak ticari olarak temin edilen *Z. mays* L. ( $2n=20$ ) kullanıldı. Kullanılan mısır çeşidi May tohum firması tarafından üretilen "merit" isminde bir tatlı mısır çeşididir (URL-3). Biyolojik çalışmalarda kullanılan mısırın sistematik olarak sınıflandırması şu şekildedir (URL-4);

- Alem (Kingdom): *Plantae* –Bitkiler
- Alt alem (Subkingdom): *Tracheobionta* - Damarlı bitkiler
- Süper bölüm (Superdivision): *Spermatophyta* - Tohumlu bitkiler
- Bölüm (Division): *Magnoliophyta* - Çiçekli bitkiler
- Sınıf (Class): *Liliopsida* - Monokotiledonlar
- Alt sınıf (Subclass): *Commelinidae*
- Takım (Order): *Cyperales*
- Familya (Family): *Poaceae*
- Cins (Genus): *Zea*
- Tür (Species): *Zea mays*
- Varyete (Variety): *Zea mays* L. var. *saccharata* Sturt.

#### 3.2. Karmosin (E 122) Hakkında Genel Bilgi

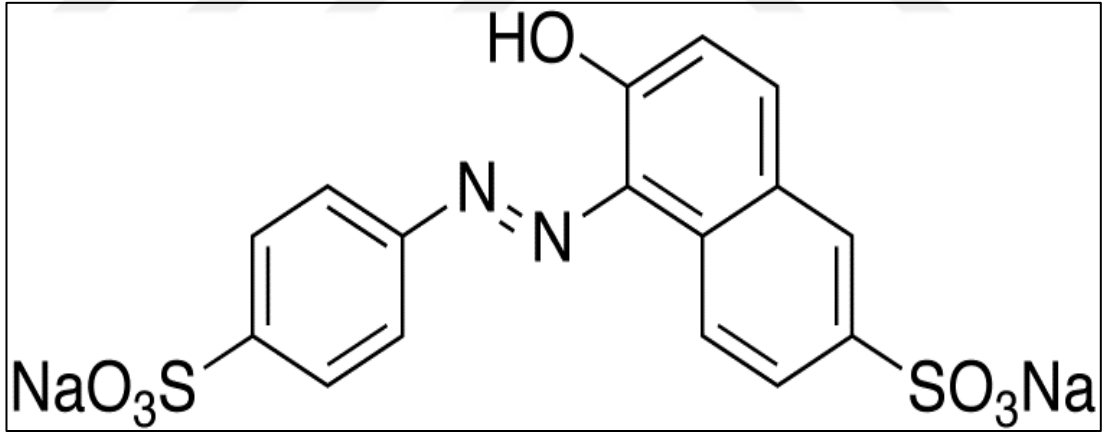
Karmosin (E122) ticari olarak İzmit kent merkezindeki aktarlardan temin edilmiştir. Karmosin gıdalara kırmızı renk vermek için kullanılan, azo boya grubundan sentetik bir gıda boyasıdır. Suda çözünebilen karmosin birçok gıda ürünüde kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılmak üzere, karmosin saf suda çözdürülerek 10 g/L, 20 g/L ve 40 g/L oranlarında çözeltiler hazırlandı.



Şekil 3.1. Karmosin molekül formülü

### 3.3. Sunset Sarısı (E 110) Hakkında Genel Bilgi

Sunset sarısı (E 110) ticari olarak İzmit kent merkezindeki aktarlardan temin edilmiştir. Sunset sarısı gıdalara sarı renk vermek için kullanılan, azo grubundan sentetik bir gıda boyasıdır. Suda çözünebilen sunset sarısı birçok gıda ürününde kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılmak üzere, sunset sarısı saf suda çözdürülerek, 11,25 g/L, 22,5 g/L ve 45 g/L oranlarında çözeltiler hazırlandı.



Şekil 3.2. Sunset sarısı molekül formülü

### 3.4. Test Materyalinin ve Kimyasalların Hazırlanması

#### 3.4.1. *Zea mays* tohumlarının hazırlanması

Deney için May Tohum firmasından ürettiği *Zea mays* var. *saccharata* Sturt cinsi *Z. mays* tohumları kullanıldı. *Z. mays* tohumları İzmit kent merkezinden ticari olarak temin edildi. Testlerde kullanılmadan önce, tohumlar yüzey sterilizasyonu için ilk

olarak % 3'lük sodyum hipoklorit çözeltisinde 2 dakika bekletildikten sonra % 70'lik alkol çözeltisinde de 2 dakika bekletildi. Son olarak saf su ile 3 defa yıkama işlemi uygulandı ve tohumların su alıp şişmesini ve dolayısıyla daha çabuk çimlenmesini sağlamak amacıyla 24 saat saf suda bekletildi.

#### **3.4.2. Karmosin çözeltilerinin hazırlanması**

Toz halinde olan karmosinden 40 g tartıldı ve 1 litre saf su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülerek, konsantrasyonu 40 g/L olan çözeltimiz hazırlandı. Konsantrasyonu 20 g/L ve 10 g/L olan çözeltiler ise bu çözeltinin seyreltilmesiyle elde edildi.

#### **3.4.3. Sunset sarısı çözeltilerinin hazırlanması**

Toz halinde olan sunset sarısından 45 g tartıldı ve 1 litre saf su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülerek, konsantrasyonu 45g/L olan çözeltimiz hazırlandı. Konsantrasyonu 22,5 g/L ve 11,25 g/L olan çözeltiler ise bu çözeltinin seyreltilmesiyle elde edildi.

#### **3.5. Kök İnhibisyon Testi ve EC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi**

Etki konsantrasyonu (EC<sub>50</sub>) belirlenirken karmosin ve sunset sarısı için 6 farklı konsantrasyon (15, 17,5, 20, 22,5, 25, 27,5 ve 30 g/L) kullanıldı. Kontrol grubu (saf su), karmosin ve sunset sarısının her biri dozu için, tabanına filtre kağıdı yerleştirilmiş petri kaplarına 20'şer adet *Z. mays* tohumu konuldu. Tohumların üstüne de filtre kağıdı konduktan sonra her bir petriye eşit miktarda ilgili çözeltiden eklendi ve petriler laboratuvar ortamında 23±2 °C sıcaklıkta direk güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde üstleri kapatılarak denemeler gerçekleştirildi. Petriler her gün kontrol edilerek periyodik olarak ilgili çözeltilerden ekleme yapıldı. Denemeler üç tekrar halinde gerçekleştirildi. Genotoksik etkiler ve diğer biyokimyasal incelemeler için EC<sub>50</sub> değerleri belirlendi.

EC<sub>50</sub> değerleri karmosin için 20 g/L, sunset sarısı için 22,5 g/L olarak belirlendikten sonra, uygulama konsantrasyonları olarak karmosin için 10 g/L (EC<sub>50/2</sub>), 20 g/L (EC<sub>50</sub>) ve 40 g/L (2x EC<sub>50</sub>), sunset sarısı için 11,25 g/L (EC<sub>50/2</sub>), 22,5 g/L (EC<sub>50</sub>) ve



45 g/L (2x EC<sub>50</sub>), olmak üzere üçer farklı konsantrasyon kullanılarak deneylere devam edildi.

Kontrol grubu ve her bir konsantrasyondaki tohumların her birinin kök uzunlukları ve fide uzunlukları 24, 48 ve 72, 96, 120, 144 ve 168 saat sonunda ölçülerek kök uzunlukları ve fide uzunlukları hesaplandı. Denemeler üç tekrar halinde gerçekleştirildi.

### 3.6. Biyokimyasal Analizler

#### 3.6.1. Yapraklarda pigment tayini

Karmosin ve sunset sarısı için EC değerleri belirlendikten sonra EC<sub>50</sub>/2, EC<sub>50</sub> ve 2xEC<sub>50</sub> dozlarıyla muamele edilen edilen *Z. mays* tohumları 7 gün süreyle 23±2 °C sıcaklıkta laboratuvar koşullarında petri kaplarının üstü kapalı olacak şekilde büyümeye bırakıldı. Her 24 saatte bir uzunlukları ölçülen fideler yedinci gün sonunda pigment analizi yapılmak üzere toplandı. Saf su ile yıkanan yaprak örnekleri kurutma kağıdı üzerinde kurutulduktan sonra, her bir dozdan 100 mg tartıldı ve % 80'lik aseton ilave edilerek havanda ezilerek iyice parçalandı. Elde edilen ekstraksiyon Whatman filtre kağıdı yardımıyla erlenmayer şişelere süzüldü. Falcon tüplerine aktarılan ekstraksiyonlar Hettich EBA 20 santrifüj cihazında 10 dakika süre ile 3000 rpm'de santrifüj edildi.

Ham klorofil ekstraktlarının absorpsiyon değerleri, 645 ve 663 nm dalga boyları kullanılarak Shimadzu UVmini-1240 marka spektrofotometrede ölçüldü. Klorofil a ve klorofil b miktarları Arnon (1949)'a göre hesaplandı;

$$\text{Klorofil a} \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{[(12,7 \times D_{663}) - (2,69 \times D_{645})] \times V}{W} \quad (3.1)$$

$$\text{Klorofil b} \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{[(22,9 \times D_{645}) - (4,68 \times D_{663})] \times V}{W} \quad (3.2)$$

Eşitliklerde D, ekstraktların belirtilen dalga boylarındaki optik yoğunluğunu (absorbans değerini); V, % 80'lik asetonun hacmini (10 ml); W, ekstre edilen yaprak

dokusunun gram cinsinden yaş ağırlığını (0,1 g) göstermektedir (Witham ve diğ. 1971).

### 3.6.2. $\alpha$ -amilaz enziminin tespiti

$\alpha$ -amilaz aktivitesi ölçümü dekstrojenik yöntemle yapıldı. Esası, iyotun nişasta ile verdiği reaksiyona dayanan bu yöntemde, nişasta iyot ile muamele edildiğinde mor renk açığa çıkmakta ve nişasta parçalandıkça bu renk açılmaktadır. Aktivite ölçümlerinde enzim kaynağı olarak, muamelesiz ve farklı karmosin ve sunset sarısı dozlarıyla muamele edilmiş tohumlardan elde edilen ekstraktlar, substrat olarak da % 0,1 konsantrasyonda nişasta kullanıldı. Aktivite ölçümleri, enzim substrat karışımındaki renk açılmasının spektrofotometrik olarak izlenmesi ile gerçekleştirildi.  $\alpha$ -amilaz aktivitesi, azalan substrat (nişasta) miktarının hesaplanması ile ölçüldü. Bunun için, her aktivite ölçümünde, kör, kontrol ve örnek tüpleri hazırlandı (Ekinci, 1996). Kör, kontrol ve örnek tüpleri Tablo 3.1'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

Steril edilmiş *Z. mays* tohumları laboratuvar koşullarında 48 saat çimlendirildikten sonra kök ve koleoptilleri çıkartıldı. 0,4 gr *Z. mays* tohumu ve 2 ml malat tamponu havanda homojenize edildi. Elde edilen bu kaba homojenat 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 500 rpm hızda 8 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Tablo 3.1.  $\alpha$ -amilaz enziminin tespitinde tüplerin hazırlanması

	Kör	Kontrol	Örnek
Malat tamponu	9	7	7
Nişasta % 0,1		2	2
Amilaz	0,1	0,1	0,1
HCl 1N		0,9	0,9*

\* İnkübasyondan sonra eklenir.

Hazırlanan tüplerin tamamı 30 °C'de 3 dakika inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonunda örnek tüplerine 0,9 ml 1 N HCl eklendi ve tüplerin hepsine 1 ml iyot eklendi. Shimadzu UV mini-1240 marka spektrofotometre cihazında 620 nm dalga boyunda tüm örneklerin kör tüpüne karşı absorbans ölçümleri yapıldı. Örnek

tüplerinin verdiği OD değerinden, kontrol tüpünün verdiği OD değeri çıkartılarak fark OD, yani enzim tarafından parçalanan nişastanın OD değeri bulundu. 620 nm dalga boyunda taze iyot çözeltisi kullanılarak elde edilen nişasta standart grafiğinden yararlanılarak parçalanan nişasta miktarı önce mg'a ve daha sonra da ünite/ml'ye dönüştürüldü.

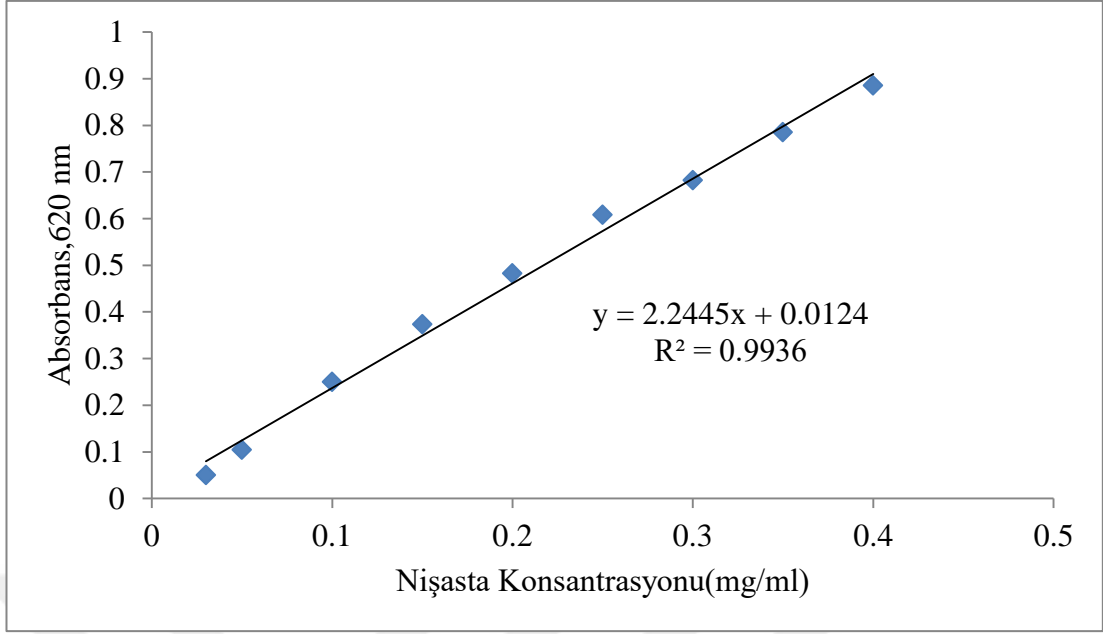
Bir ünite  $\alpha$ -amilaz aktivitesi, dakikada 0,1 mg nişastayı 30 °C'de parçalayan enzim miktarı olarak tanımlandı (Yarkın, 2007).

### **3.6.3. Nişasta standart grafiğinin çıkarılması**

Standart grafik (Şekil 3.3) oluşturmak için miktarı bilinen standart bir maddenin (nişasta, vb.) çeşitli konsantrasyonlarda absorbansı ölçülür ve miktarı bilinmeyen örneğin absorbansı standart maddenin absorbansı ile karşılaştırılır.

Nişasta standart grafiğinin oluşturulması şu şekilde yapılmıştır;

- Malat tamponu (pH 5,2) ve % 0,1 nişasta ile farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı.
- Her çözeltiliye 1 ml iyot çözeltisi eklendi.
- Köre karşı farklı konsantrasyonların 620 nanometre dalga boyunda absorbans değerleri ölçülür.
- Elde edilen değerler kullanılarak grafik oluşturulur.



Şekil 3.3. Enzim tespitinde kullanılan nişasta standart eğrisi

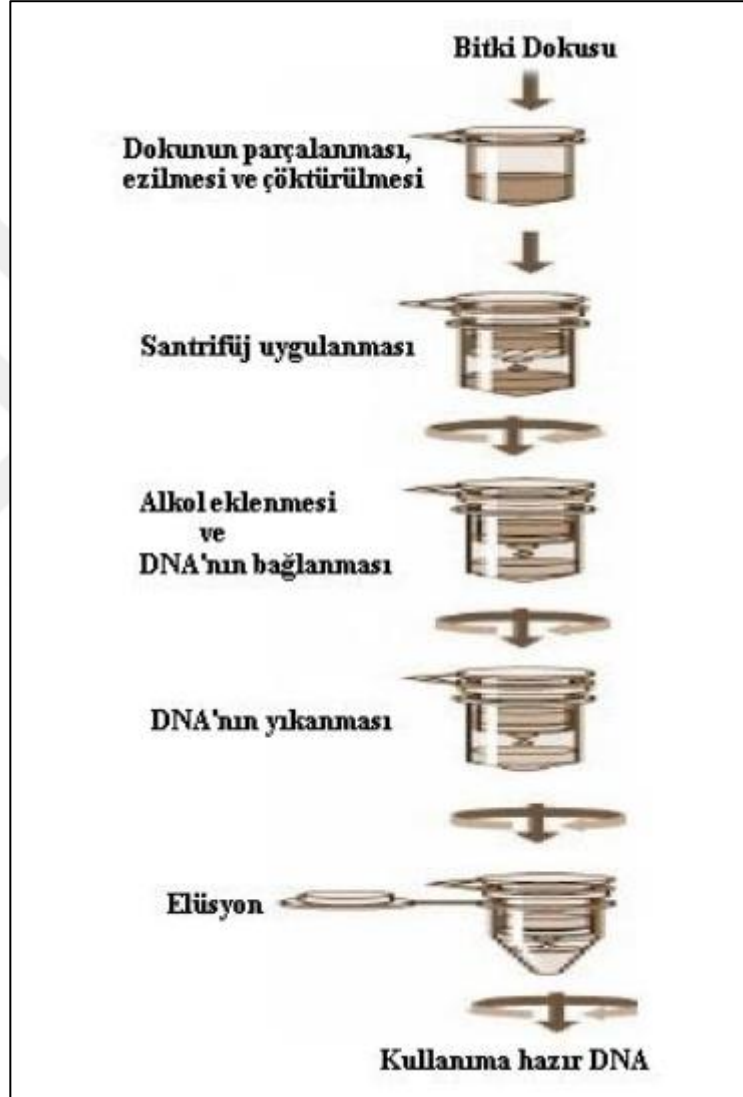
### 3.7. RAPD PZR ile Moleküler Analizler

#### 3.7.1. Genomik DNA izolasyonu, DNA saflık ve miktar tayini

Karmosin ve sunset sarısının üç farklı dozu ve kontrol grubu (saf su) uygulaması sonrasında gelişen kök uçları alınıp DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) yardımıyla genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bu yöntemde ilk olarak her bir uygulama için yaklaşık 300 mg kök ucu örneği sıvı azot kullanılarak havan içinde ezilerek toz haline getirildi. Toz haline gelen örnekler santrifüj tüplerine konarak 400 µl Tampon AP1 ve 4 µl RNase A eklendi ve 65 °C'de 20 dakika süre ile inkübasyon yapıldı. 10 dakika içerisinde karışım ara ara vortekslendi. Bu karışıma 130 µl Tampon AP2 eklenip vortekslendikten sonra 10 dakika -20 °C'de bekletildi. 14.000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra üst sıvı mor santrifüj tüpüne (QIA Shredder Mini Spin Column) pipet aracılığıyla aktarıldı ve 14.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen sıvı yeni 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 1,5 katı Tampon AP3/E eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı.

Karışım beyaz santrifüj tüpüne (DNeasy Mini Spin Column) aktarılarak 8.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre yeni toplama tüpüne geçirilip üzerine 500 µl tampon AW eklendi ve 8.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı atılarak filtrenin üzerine tekrar 500 µl

tampon AW eklendi ve 14.000 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüj edildi. Filtre 2 ml'lik yeni santrifüj tüpüne aktarıldı ve filtrenin üzerine 100 µl tampon AE eklenip 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 8.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre atıldı, filtreden aşağıya geçen tampon AE içerisinde genomik DNA (gDNA) elde edildi (Şekil 3.4). İzole edilen gDNA'lar, kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 3.4. DNA izolasyonunda izlenen adımlar

İzole edilen gDNA'ların gözlemlenmesi için % 0,8'de konsantrasyona sahip jel ile agaroz jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jel hazırlanırken; 0,4 g agaroz tartıldı ve 50 mL 1x Tris-Asetat-EDTA (TAE, AppliChem) içinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Karışım 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 4 µl Etidyum Bromid

ilave edildi. Önceden tarak yerleştirilen kasete jel döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra tarak kasetten dikkatlice çıkarıldı.

Hazırlanan jel, yatay elektroforez tankına yerleştirildi ve jelin üzeri kapanıncaya kadar tanka 1x TAE tamponu ilave edildi. 1 µl örnek gDNA, 4 µl dH<sub>2</sub>O ve 1 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jelde oluşturulan kuyucuklara mikro pipet yardımı ile yüklendi. İlk kuyucuğa 1kb DNA standardı (Intron) yüklendi. Örnekler 100 voltta 1 saat yürütüldü. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV jel görüntüleme cihazı (UVP-GelDoc-it, imaging system) yardımıyla gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi. İzole edilen gDNA'ların saflık ve miktar tayinleri BMG Labtech Spectrostar Nano marka cihaz ile ölçüldü.

### 3.7.2. RAPD PZR ve verilerinin değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan primerler Elips firmasından temin edildi (Tablo 3.2). PZR bileşenleri miktarları, toplam hacim 25 µl (Tablo 3.3.) olacak şekilde optimum miktarlarda kullanılarak RAPD prosedürü uygulandı. RAPD reaksiyon döngü koşulları Tablo 3.4'deki gibi düzenlendi. Reaksiyon için 10 primer kullanıldı ve reaksiyon her primer için ayrı ayrı ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Çoğaltım termal döngü cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyonda kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için gDNA içermeyen bir negatif kontrol kullanıldı. Çoğaltım sonrasında reaksiyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde 1x TAE tamponu kullanılarak 100 voltta 1 saat yürütüldü. İlk kuyucuğa 1000 bp DNA marker (INtRON) yüklendi. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV jel görüntüleme cihazı yardımıyla görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan RAPD primerleri

Primer Sayısı	Primer	Sekans 5'-----3'	T <sub>m</sub> (°C)	GC Oranı (%)
1	OPA 01	CAGGCCCTTC	34	70
2	OPA 02	TGCCGAGCTG	34	70
3	OPA 03	AGTCAGCCAC	32	60
4	OPA 04	AATCGGGCTG	32	60
5	OPA 05	AGGGGTCTTG	32	60

Tablo 3.2. (Devam) Çalışmada kullanılan RAPD primerleri

Primer Sayısı	Primer	Sekans 5'-----3'	Tm (°C)	GC Oranı (%)
6	OPA 06	AGGGGTCTTG	32	60
7	OPA 07	GAAACGGGTG	32	60
8	OPA 08	GTGACGTAGG	32	60
9	OPA 09	GGGTAACGCC	34	70
10	OPA 10	GTGATCGCAG	32	60

Tablo 3.3. RAPD PZR tekniğinde kullanılan bileşenler

RAPD PZR Bileşenleri	Miktar	Konsantrasyon
Tampon (1X One Taq MM)	12,5 µl	1X
Distile su	9,5 µl	-
MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl	25 mM
Primer	1 µl	0,3 µM
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl	1 U
gDNA	1 µl	20 ng
Toplam	25 µl	-

Jel fotoğrafları üzerinden görüntülenen PZR ürünlerine ait bantların okunmasında yalnızca net görünen bantlar değerlendirmeye alındı. RAPD profilinde gözlenen polimorfizm; kontrol RAPD profiliyle karşılaştırıldığında ekstra bir bandın varlığı ya da normal bandın yokluğu şeklinde değerlendirildi (Ouzounidou, 1997).

Tablo 3.4. Optimize edilen RAPD PZR döngüsü

RAPD PZR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	3 dakika	1
Denatürasyon	94	1 dakika	} 46
Bağlanma	35	1 dakika 45 saniye	
Uzama	72	2 dakika	
Son Uzama	72	6 dakika	1
Saklama	4	-	-

### 3.8. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazların marka ve modelleri Tablo 3.5'te verildi.

Tablo 3.5. Deneylerde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka ve Modeli
Hassas Terazi	Radwag, AS 220.R2
pH-metre	Ohaus, Starter 3000
Mikrodalga Fırın	Arçelik, Intellowave MD 554
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, MR-Hei Standart
Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı	Thermo EC330 - Cleaver, CS-300
Vorteks	IKA, GENIUS 3
Saf Su Cihazı	Milipore, Direct-Q UV
Buzdolabı	Arçelik, 5243-NEB, NO-FROST
Derin Dondurucu	Arçelik
Sıvı azot tankı	MVE
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Thermal Döngü Cihazı	Biorad Cfx Connect Real-Time System
UV Transilüminatör	UVP-GelDoc-it, imaging system
UV Visible Spektrofotometre	Shimadzu UVmini-1240
Mini Santrifüj	Biosan, Microspin 12
Santrifüj	Hettich EBA 20
Mikropipet Takımı	Eppendorf
PZR kabini	ISOCIDE PCR Cabinet
Isıtıcı tabla	Grant BTB

### 3.9. Verilerin İstatiksel Analizi

Karmosin ve sunset sarısı uygulanan *Z. mays* tohumlarının 24, 48 ve 72 saatlik kök uzunlukları değerleri için SPSS 22'de ANOVA, Duncan testi yapıldı. Önemlilik değeri  $P < 0,05$  olarak değerlendirildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Morfolojik Bulgular

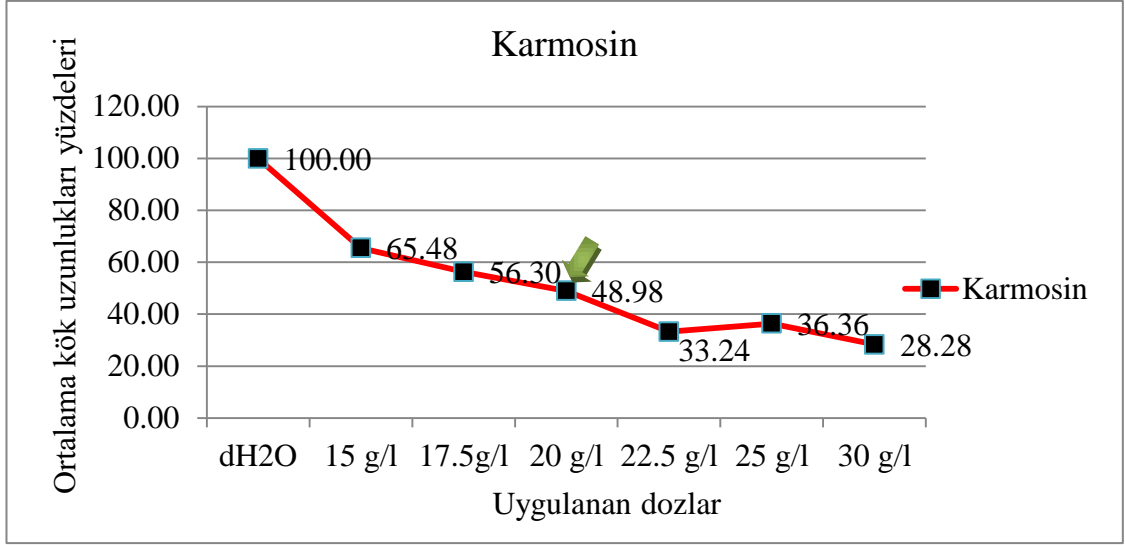
#### 4.1.1. Karmosin için belirlenen EC<sub>50</sub> değeri

*Z. mays* tohumlarına farklı konsantrasyonlarda karmosin çözeltilerinin uygulanmasıyla EC<sub>50</sub> değeri belirlendi. Bu değer belirlenmesinde 6 farklı konsantrasyon kullanıldı. Karmosin için EC<sub>50</sub> değeri 20 g/L olarak hesaplandı (Tablo 4.1; Şekil 4.1). Bu değer yarı (EC<sub>50/2</sub>) ve 2 katı (2xEC<sub>50</sub>) da kullanılarak çalışmalara devam edildi. Sonraki deneylerde 10 g/L (EC<sub>50/2</sub>), 20 g/L (EC<sub>50</sub>) ve 40 g/L (2xEC<sub>50</sub>) konsantrasyonlarda karmosin çözeltileri kullanıldı.

Tablo 4.1. Karmosinin farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilen *Z. Mays* tohumlarında ölçülen kök uzunluğu değerleri (72. saat)

Konsantrasyon (g/L)	Kök uzunluğu (mm) X ±SS*
Kontrol	26,4± 5,09 <sup>a</sup>
15	17,29±1,13 <sup>b</sup>
17,5	14,86±2,28 <sup>b</sup>
20	12,93±2,19 <sup>bc</sup>
22,5	8,78±1,58 <sup>cd</sup>
25	9,6±0,77 <sup>cd</sup>
30	6,08±0,23 <sup>d</sup>

\*X ±SS (*Z. mays* kök uzunluğu ortalaması ± Standart sapma) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05), SS; Standart sapma, x; Ortalama.



Şekil 4.1. Karmosinin farklı dozlarının *Z. mays* tohumlarına uygulanması sonucu belirlenen EC<sub>50</sub> değeri

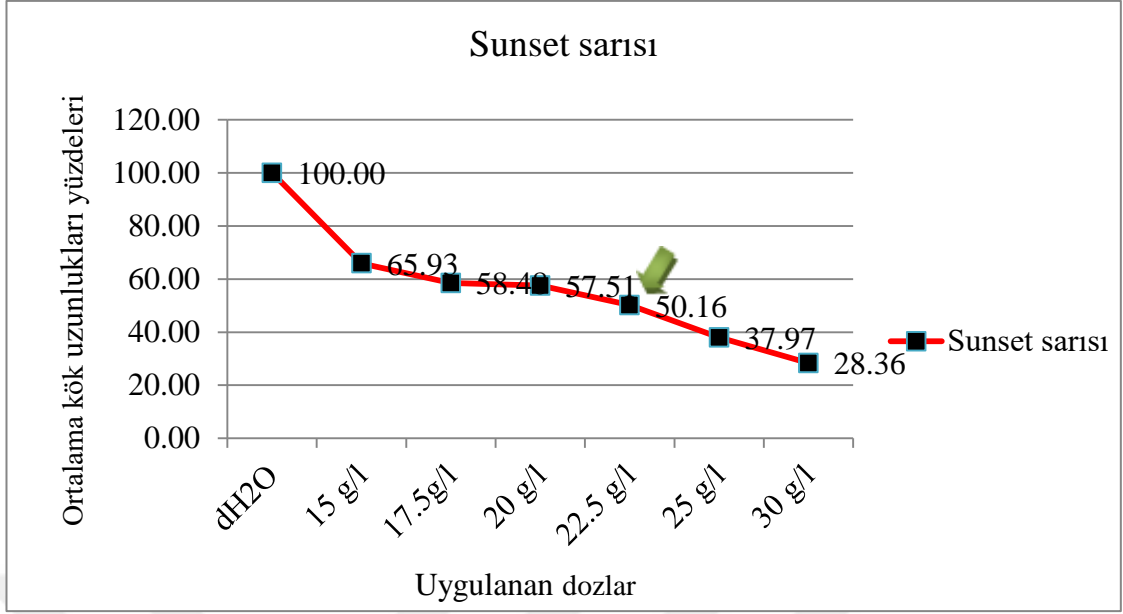
#### 4.1.2. Sunset sarısı için belirlenen EC<sub>50</sub> değeri

*Z. mays* tohumlarına farklı konsantrasyonlarda sunset sarısı çözeltilerinin uygulanmasıyla EC<sub>50</sub> değeri belirlendi. Bu değer belirlenmesinde 6 farklı konsantrasyon kullanıldı. Sunset sarısı için EC<sub>50</sub> değeri 22,5 g/L olarak hesaplandı (Tablo 4.2; Şekil 4.2). Sonraki deneylerde 11,25 g/L (EC<sub>50</sub>/2), 22,5 g/L (EC<sub>50</sub>) ve 45 g/L (2xEC<sub>50</sub>) konsantrasyonlarda sunset sarısı çözeltileri kullanıldı.

Tablo 4.2. Sunset sarısının farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilen *Z. mays* tohumlarında ölçülen kök uzunluğu değerleri (72. saat)

Konsantrasyon (g/L)	Kök uzunluğu (mm) X ±SS*
Kontrol	26,4± 5,09 <sup>a</sup>
15	17,06±3,16 <sup>b</sup>
17,5	15,44±0,68 <sup>b</sup>
20	15,18±2,35 <sup>b</sup>
22,5	13,24±2,62 <sup>bc</sup>
25	10,02±2,15 <sup>cd</sup>
30	7,33±1,26 <sup>d</sup>

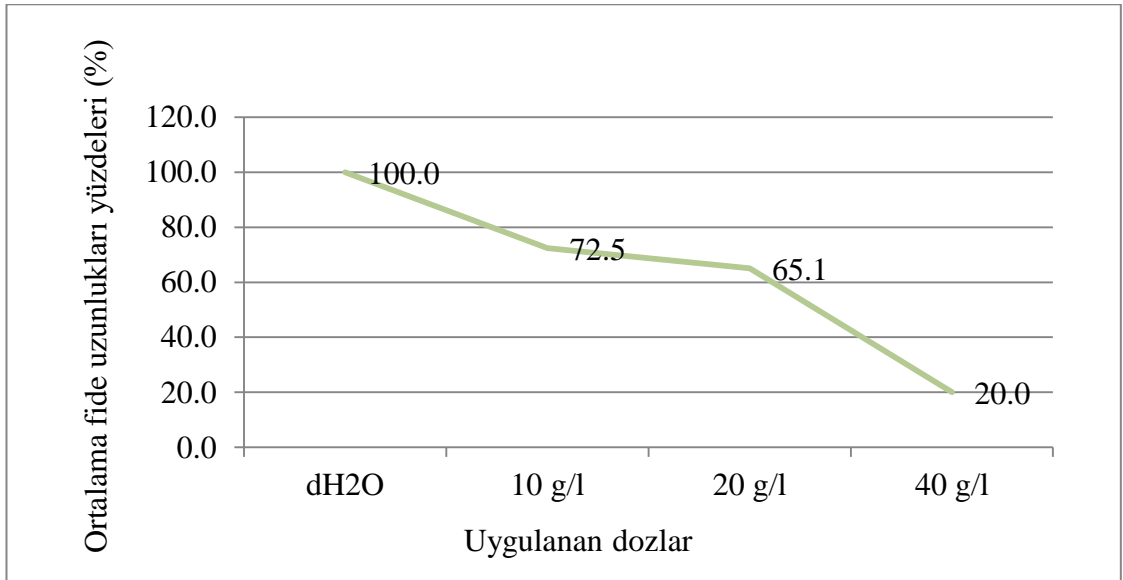
\*X ±SS (*Z. mays* kök uzunluğu ortalaması ± Standart sapma) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05), SS; Standart sapma, x; Ortalama.



Şekil 4.2. Sunset sarısının farklı dozlarının *Z. mays* tohumlarına uygulanması sonucu belirlenen  $EC_{50}$  değeri

#### 4.1.4. Fide uzunlukları yüzdeleri

İki hafta süre ile kontrol grubu ve karmosinin üç farklı konsantrasyonunun uygulandığı *Z. mays* tohumlarında, ortalama fide uzunluklarında kontrol grubuna oranla anlamlı bir düşüş görülmüştür (Şekil 4.3; Şekil 4.4).

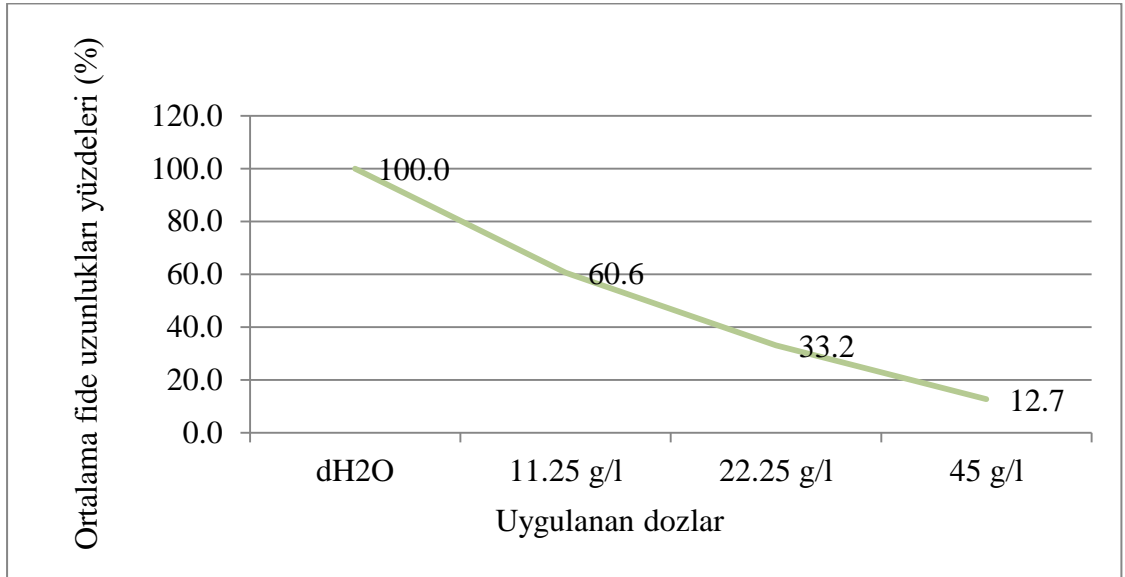


Şekil 4.3. 2 hafta süre ile karmosin uygulaması yapılan *Z. mays* tohumlarında gözlenen ortalama fide uzunluğu yüzdeleri



Şekil 4.4. 2 hafta süre ile karmosin dozları uygulanan *Z. mays* tohumlarında kök ve fide gelişimleri (a: Kontrol, b: 10 g/L, c: 20 g/L, d: 40 g/L)

İki hafta süre ile kontrol grubu ve sunset sarısının üç farklı konsantrasyonunun uygulandığı *Z. mays* tohumlarında, ortalama fide uzunluklarında kontrol grubuna oranla anlamlı bir düşüş görülmüştür (Şekil 4.5; Şekil 4.6). Sunset sarısının karmosine göre fide uzunluklarında daha fazla azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. 2 hafta süre ile sunset sarısı uygulaması yapılan *Z. mays* tohumlarında gözlenen ortalama fide uzunluğu yüzdeleri



Şekil 4.6. 2 hafta süre ile sunset sarısı dozları uygulanan *Z. mays* tohumlarında kök ve fide gelişimleri (a: Kontrol, b: 11,25 g/L, c: 22,5 g/L, d: 45 g/L)

## 4.2. Biyokimyasal Bulgular

### 4.2.1. Yapraklarda pigment miktarları

Karmosin (Tablo 4.3) ve sunset sarısı tohum uygulaması sonucu *Z. mays*'in yapraklarında (Tablo 4.4), klorofil a ve klorofil b içeriğinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlemlendi. İki renklendiricinin de klorofil biyosentezini negatif yönde etkilediği görüldü. Klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil için en düşük değerler karmosinin 40 g/L konsantrasyonunda tespit edildi.

Tablo 4.3. Karmosin uygulaması sonucu *Z. mays* yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil değerleri

Uygulanan doz (g/L)	Klorofil a (mg/g) ± S.S	Klorofil b (mg/g) ± S.S	Toplam klorofil(mg/g) ± S.S
Kontrol	7,10±1,26	0,95 ± 0,22	8,04±1,15
10	5,30±1,25	0,47±0,25	5,77±1,01
20	4,39±0,48	0,38±0,15	4,76±0,56
40	3,04±0,23	0,25±0,10	3,29±0,31

Tablo 4.4. Sunset sarısı uygulaması sonucu *Z. mays* yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil değerleri

Uygulanan doz (g/L)	Klorofil a (mg/g) ± S.S	Klorofil b (mg/g) ± S.S	Toplam klorofil (mg/g) ± S.S
Kontrol	7,10±1,26	0,95 ± 0,22	8,04±1,15
11,25	5,48±0,0	0,57±0,0	6,05±0,0
22,5	3,50±0,14	0,39±0,08	3,90±0,10
45	3,24±0,12	0,30±0,06	3,55±0,15

#### 4.2.2. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi

Çalışmamızda, karmosin uygulanan dozlarda kontrol grubuna göre 10 ve 20 g/L dozlarda enzim aktivitesinde çok az miktarda artış görülürken 40 g/L dozda enzim miktarında azalma saptandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Farklı karmosin dozlarının *Z. mays* tohumlarında  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Uygulanan Doz (g/L)	Fark OD	U/ml	mg/ml nişasta ± S.S
Kontrol	0,030	64,34	0,012 ± 0,007
10	0,022	65,00	0,011 ± 0,006
20	0,023	65,75	0,011 ± 0,002
40	0,068	43,00	0,042± 0,005

Sunset sarısı uygulamaları ise, doz artışına bağlı olarak tohumlardaki  $\alpha$ -amilaz aktivitesini kontrol grubuna göre azaltmıştır (Tablo 4.6). Karmosin ve sunset sarısı uygulamalarının  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında, enzim üzerinde en fazla inhibisyon % 37'lik oranla 40 g/L karmosin uygulamasında tespit edildi. Sunset sarısının en yüksek dozunda ise % 23'lük bir inhibisyon saptandı.

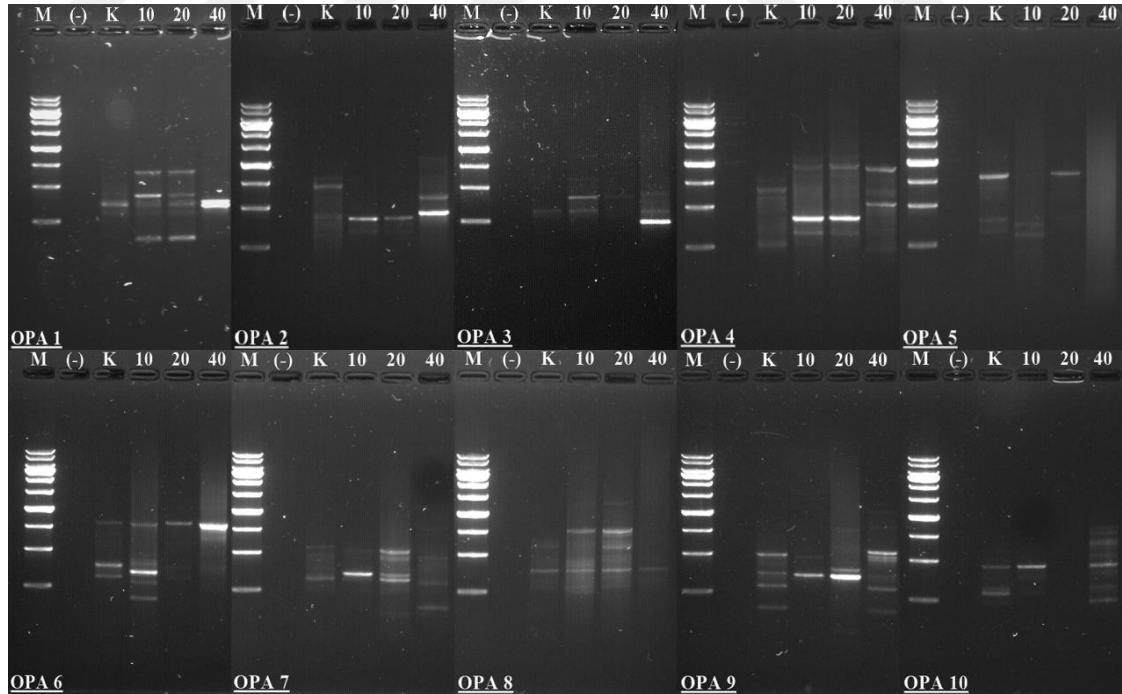
Tablo 4.6. Farklı sunset sarısı dozlarının *Z. mays* tohumlarında  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

Uygulanan Doz (g/L)	Fark OD	U/ml	mg/ml nişasta $\pm$ S.S
Kontrol	0,012	72,5	0,001 $\pm$ 0,001
11,25	0,012	70,80	0,003 $\pm$ 0,001
22,5	0,024	64,34	0,012 $\pm$ 0,004
45	0,047	56,91	0,022 $\pm$ 0,003

### 4.3. Moleküler Bulgular

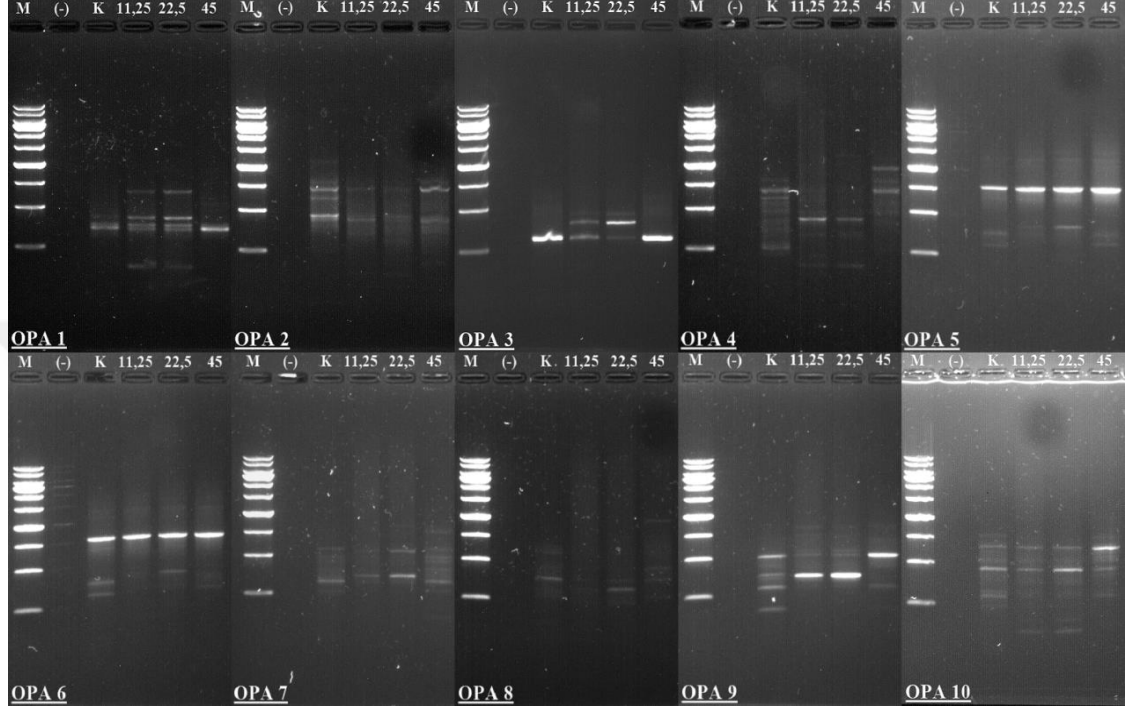
RAPD PZR analizi için 10 bazlık 10 adet primerin kullanıldığı deneylerden elde edilen çoğaltım ürünleri % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UVP-GelDoc-it jel görüntüleme cihazında incelenerek fotoğrafları çekildi. Sonuçların analizi ve değerlendirilmesi çekilen fotoğraflar üzerinden yapıldı.

Karmosinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş mısır tohumlarından izole edilen gDNA'ların 10 adet RAPD primeri ile reaksiyonu sonucunda primerlerin tamamı polimorfik bant profili göstermiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9 ve OPA-10 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri (M: Markör, (-): Negatif Kontrol, K: Kontrol, 10: 10 g/L karmosin, 20: 20 g/L karmosin, 40: 40 g/L karmosin)

Sunset sarısının farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş mısır tohumlarından izole edilen genomik DNA'larının 10 adet RAPD primeri ile reaksiyonu sonucunda 7 adet primer polimorfik bant profili gösterirken 3 adet primer monomorfik bant profili göstermiştir (Şekil 4.8).

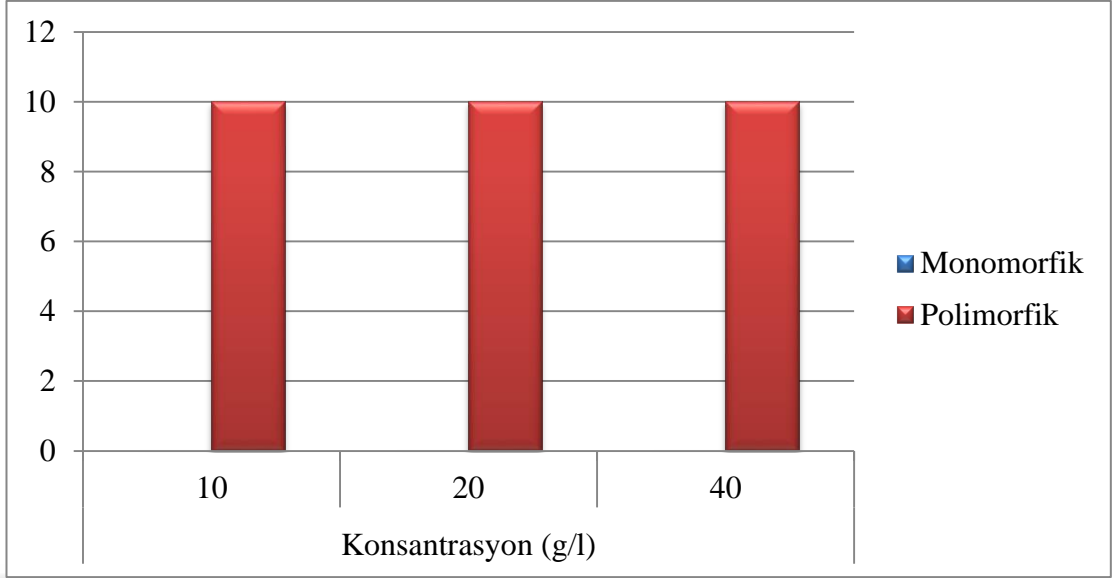


Şekil 4.8. OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9 ve OPA-10 primerleri kullanılarak sunset sarısı uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri (M: Markör, (-): Negatif Kontrol, K: Kontrol, 11,25: 11,25 g/L sunset sarısı, 22,5: 22,5 g/L sunset sarısı, 45: 45 g/L sunset sarısı)

Uygulama gruplarından izole edilen genomik DNA'lar ile yapılan PZR analizleri sonucunda kontrol grubuna göre polimorfizm ve monomorfizm görülen primerlerin uygulama grupları arasındaki dağılımları da incelenmiştir.

Analizler sonucunda karmosin uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün primerlerde polimorfizm gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.7; Şekil 4.9)



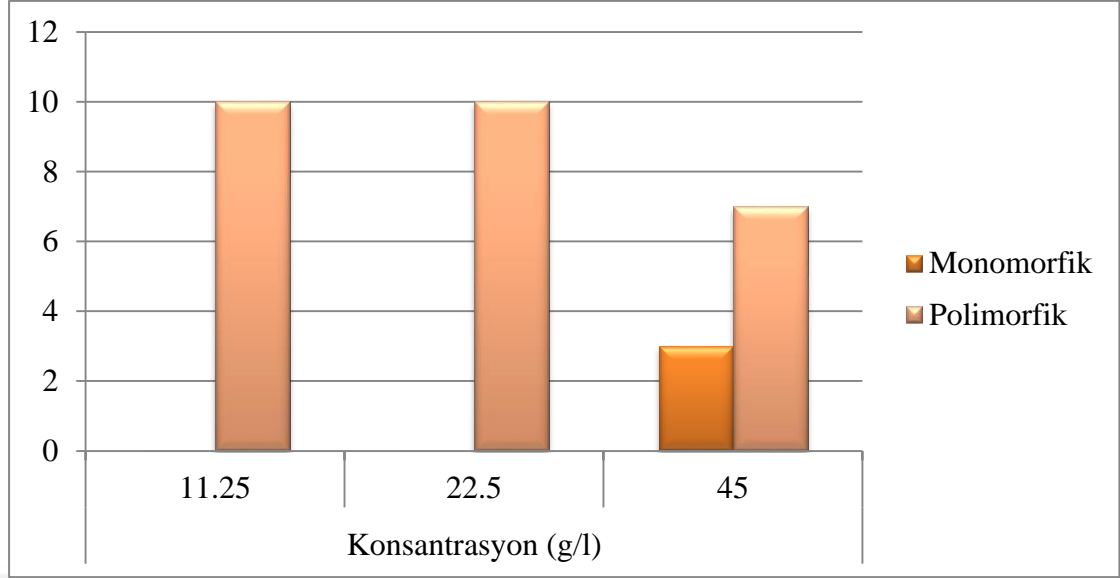


Şekil 4.9. Çalışmada kullanılan primerlerle karmosin uygulama gruplarına ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları

Tablo 4.7. Karmosin uygulamasında monomorfizm ve polimorfizm görülen RAPD primerleri

Konsantrasyon (g/L)	Monomorfizm Görülen Primerler	Polimorfizm Görülen Primerler
10	-	OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9, OPA 10
20	-	OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9, OPA 10
40	-	OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9, OPA 10

Analizler sonucunda kontrol grubuna göre sadece 45 g/L sunset sarısı uygulanan grupta OPA-3, OPA-5 ve OPA-10 primerlerinde monomorfizm görülmüştür. Diğer uygulama gruplarında 10 primerde de polimorfizm görülmüştür (Tablo 4.8; Şekil 4.10).

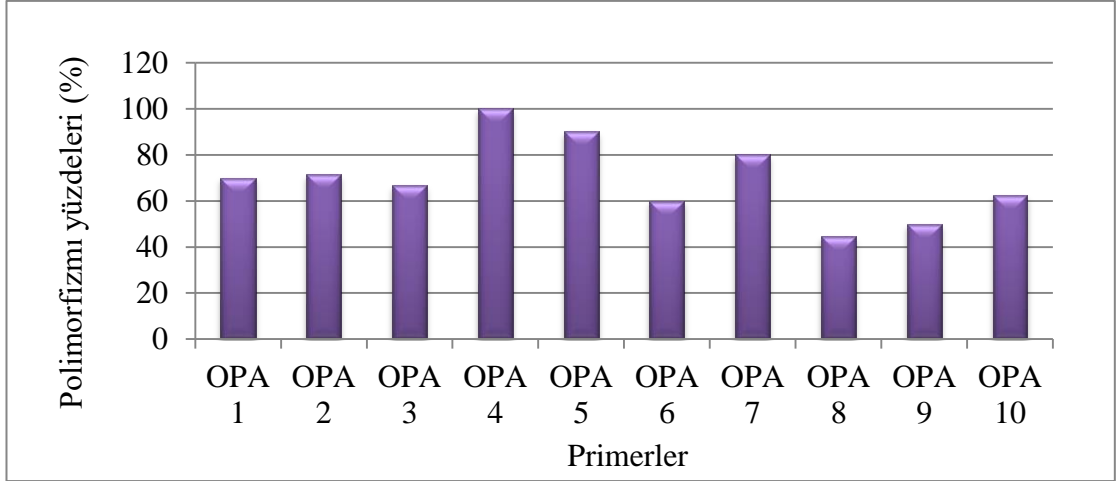


Şekil 4.10. Kullanılan primerlerle sunset sarısı uygulama gruplarına ait monomorfik ve polimorfik primer sayıları

Tablo 4.8. Sunset sarısı uygulamasında monomorfizm ve polimorfizm görülen RAPD primerleri

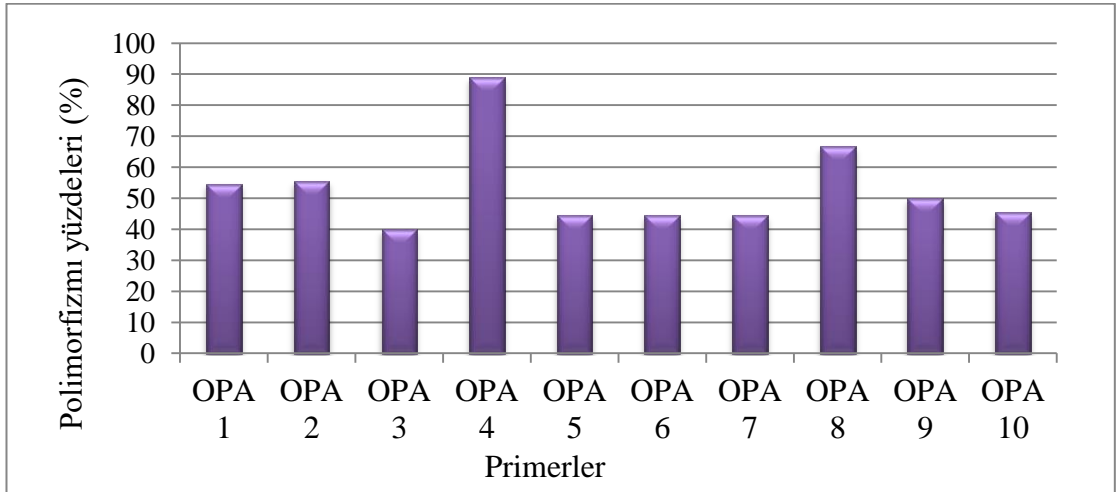
Konsantrasyon (g/L)	Monomorfizm Görülen Primerler	Polimorfizm Görülen Primerler
11,25	-	OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9, OPA 10
22,5	-	OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPA-5, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9, OPA 10
45	OPA-3, OPA-5, OPA-10	OPA-1, OPA-2, OPA-4, OPA-6, OPA-7, OPA-8, OPA-9

Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda değerlendirmeye alınan 10 RAPD primeri, karmosin uygulanan örneklerde toplam 94 adet bant vermiştir. Bu bantlardan 27 adedi monomorfik, 67 adedi polimorfik bantlardır. Polimorfik bant veren primerler değerlendirildiğinde; karmosin uygulanan gruplarda en fazla polimorfik bant veren primerin % 100 oranıyla OPA-4; en fazla monomorfik bant veren primerin ise % 56 oranıyla OPA-8 olduğu gözlenmiştir. Elde edilen polimorfik bantların oranı % 71 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Karmosin uygulanan gruplarda RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri

Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda değerlendirmeye alınan 10 RAPD primeri, sunset sarısı uygulanan örneklerde toplam 90 adet bant verdi. Bunlardan 42 adedi monomorfik, 48 adedi polimorfik bantlardır. Polimorfik bant veren primerler değerlendirildiğinde; sunset sarısı uygulanan gruplarda en fazla polimorfik bant veren primerin % 89 oranıyla OPA-4; en fazla monomorfik bant veren primerin ise % 60 oranıyla OPA-3 olduğu gözlenmiştir. Elde edilen polimorfik bantların oranı % 53 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Sunset sarısı uygulanan gruplarda RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri

Uygulama grupları arasındaki kontrol grubuna göre en polimorfik RAPD primerlerini saptamak için, polimorfik bant profili gösteren primerlerin RAPD çoğaltımı sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren bütün primerler

için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü hesaplanmıştır (Tablo 4.9 ve Tablo 4.10). Karmosin uygulanan gruplarda 367 ile 1977 baz çifti büyüklüğü arasında 97 adet, sunset sarısı uygulanan gruplarda ise 314 ile 1884 baz çifti büyüklüğü arasında değişen toplam 88 adet polimorfik bant tespit edilmiştir.

Tablo 4.9. OPA serisi RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve karmosin uygulanan gruplarda polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü (baz çifti, bp)

Primerler	Kontrol (0 g/L)		Karmosin Konsantrasyonları (g/L)		
			10	20	40
OPA 1	1	-	0	0	0
		+	1328; 846;367	1346; 836; 372	754;
OPA 2	2	-	1432	1432	1432;851
		+	0	0	917
OPA 3	1	-	0	607	0
		+	1201;824	824	883;493
OPA 4	3	-	1338;1164;531	1338;1164;531	1338;1164;531
		+	1955;797;643	1977;806;643	1888;1026
OPA 5	3	-	1621;765;645	1621;765;645	1621;765;645
		+	720;600	1713	0
OPA 6	3	-	1617;740;608	1617;740;608	1617;740;608
		+	1557;760;649;520;390	1577	1500
OPA 7	2	-	1100;596	1100	1100;596
		+	668	1000;882;660	849;567;347
OPA 8	2	-	1127	0	1127
		+	1517	2635;1517	0
OPA 9	4	-	964;698;552;367	964;698;552;367	698;552;367
		+	917;665	734;640	917;862;519;341
OPA 10	2	-	565	907;565	565
		+	0	0	1484;1374;638;488
Toplam	25		18(-); 19(+)	18(-); 16(+)	18(-); 18(+)

Tablo 4.10. OPA serisi RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve sunset sarısı uygulanan gruplarda polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü (baz çifti, bp)

Primerler	Kontrol (0 g/L)		Sunset Sarısı Konsantrasyonları (g/L)		
			11,25	22,5	45
OPA 1	1	-	711	711	711
		+	1305;843;756;678;356	1305;843;756;678;360	686
OPA 2	3	-	1218;909	1218	1218;909
		+	856	0	835
OPA 3	1	-	0	0	0
		+	956;836	956;826	0
OPA 4	3	-	1351;1190;512	1351;1190;512	1190;512
		+	823;364	803;373	1932
OPA 5	3	-	703;576	703;576	703
		+	977	782	0
OPA 6	3	-	823;661	823;661	823;661
		+	0	1010	775
OPA 7	2	-	1131;627	1131;627	1131
		+	685	1090;685	963;882
OPA 8	2	-	1110;716	1110;716	1110;716
		+	0	665;573	1884;851;681
OPA 9	4	-	596;399	596;399	758
		+	0	0	347;310
OPA 10	4	-	586;541	586;541	541
		+	314	317	0
Toplam	26		18(-); 13(+)	17(-); 16(+)	13(-); 11(+)

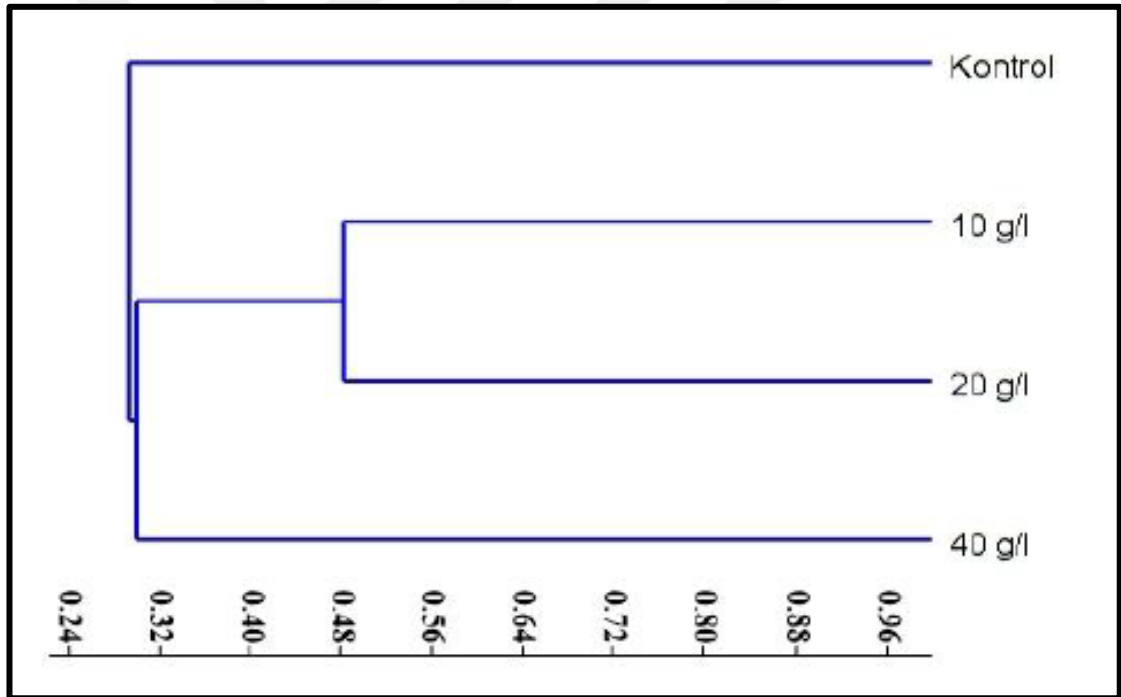
Past programı (Hammer ve diğ., 2001) kullanılarak kontrol grubuna göre uygulama gruplarında bantların var (1) ya da yok (0) olmasına dayalı olarak dendrogramlar elde edilerek kontrol grupları ve uygulama grupları arasındaki genetik mesafe belirlenmiştir.

Karmosin uygulanan gruplar ve kontrol grubunun analizleri sonucu edilen dendrogramlarda, 10 ve 20 g/L dozların aynı profili gösterdiği ve genetik mesafe olarak birbirlerine en yakın iki grup olduğu görülmüştür. 40 g/L doz uygulanan grubun

10 ve 20 g/L doz uygulanan gruplara benzerliğinin daha az olduğu görüldü. Uygulama grupları içerisinde genetik mesafe olarak kontrol grubuna en yakın olan uygulama grubunun 40 g/L uygulama grubu olduğu görülmüştür (Tablo 4.11; Şekil 4.13).

Tablo 4.11. Kontrol grubu ve karmosin uygulamam grupların arasındaki benzerlik indisi

	Kontrol	10 g/L	20 g/L	40 g/L
Kontrol	1			
10 g/L	0,2941	1		
20 g/L	0,2424	0,4827	1	
40 g/L	0,3437	0,2857	0,3125	1

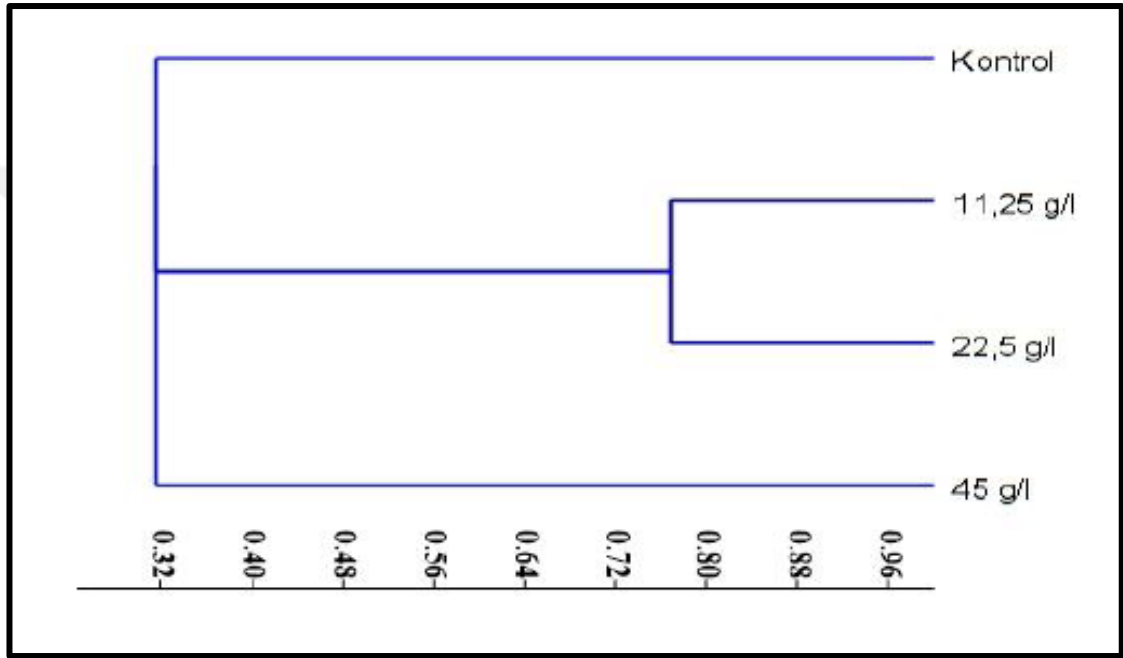


Şekil 4.13. Karmosin uygulanan gruplar ve kontrol grubu ile oluşturulan dendrogram

Sunset sarısı uygulama grupları ve kontrol grupları ile elde edilen dendrogramda da, karmosin uygulamasındaki benzer olarak genetik mesafe bakımından en yüksek doz olan 45 g/L'nin kontrol grubuna en yakın doz olduğu, diğer iki dozun da birbirine en yakın genetik mesafede olduğu görülmüştür (Tablo 4.12; Şekil 4.14). Dendrogramda çıkan bu benzerlik RAPD bant profillerinde de görülmektedir. Kontrol grubuyla en fazla monomorfizm gösteren grupların en yüksek dozlar olduğu görülmüştür.

Tablo 4.12. Kontrol grubu ve sunset sarısı uygulama grupları arasındaki benzerlik indisi

	Kontrol	11,25 g/L	22,5 g/L	45 g/L
Kontrol	1			
11,25 g/L	0,297	1		
22,5 g/L	0,333	0,769	1	
45 g/L	0,645	0,286	0,289	1



Şekil 4.14. Sunset sarısı uygulanan gruplar ve kontrol grubu ile oluşturulan dendrogram

## 5. TARTIŞMA

Karmosin ve sunset sarısı yaygın kullanılan renklendiricilerden olup, birçok organizma üzerinde çeşitli testlerle olası toksik etkilerinin tespit edilmesi için çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda bu renklendiriciler ve diğer azo boyaların sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak bitki sistemleri üzerine yapılan çalışmalar birkaç bitki türü ile sınırlı kalmıştır.

Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilere göre, karmosin ve sunset sarısı uygulanan *Z. mays* tohumlarında kontrol grubuna göre kök uzunluğunda azalmalar tespit edilmiş ve kök uzunluklarının konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Karmosin, sunset sarısı ve diğer azo boyaların bitkiler üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirildiği önceki çalışmalarda, bu renklendiricilerin kök uzamasını ve hücre bölünmesini azaltarak DNA hasarlarına, apoptotik hücre ölümlerine ve mitotik anormalliklere neden olduğu saptanmıştır (Vazhangat ve Thoppil, 2016; Dwivedi ve Kumar, 2015; Gomes ve diğ., 2013) Kök uzunluklarındaki maksimum inhibisyon en yüksek dozlarda görülmüştür. Kök uzamasında tespit edilen azalma, Vazhangat (2016) tarafından *A. cepa* üzerinde yapılan çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarlarında kontrol grubuna göre karmosin ve sunset sarısında düşüş saptanmıştır. Karmosin ve sunset sarısı renklendiricilerinin de içinde bulunduğu azo boyaları, endüstriyel olarak en çok kullanılan kimyasal boya sınıfıdır (Fitzgerald ve Bishop, 1995), biyolojik olarak parçalanmaz ve kalıcı olarak kabul edilir (Mohan ve diğ., 2005).

Karanlık (2001) tarafından da açıklandığı gibi, bitkilerin strese maruz kaldıkları durumda sentezlenen serbest radikallerin düzeylerinde artışlar olmakta ve bu serbest radikaller hücelere zarar vermekte, özellikle yavaşlama sürecine giren fotosentezin etkinliği daha da sınırlanmaktadır. Sentezlenen serbest oksijen radikalleri, protein membran lipitleri ve nükleik asitler ile klorofil gibi hücre komponentlerini de



bozduğu için (Fridovich, 1986; Davies, 1987) klorofil seviyelerinde azalmalara neden olmaktadır.

Bitkilerin çeşitli streslere maruz kaldıkları durumlarda klorofil seviyelerinde azalmalar olduğu önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Gadallah, 1996; Soltangheisi ve diğ., 2013; Abd-el Ghany ve diğ., 2015; Homaoyun ve diğ., 2011; Ecem N., 2010).

Gadallah (1996) tarafından *Helianthus* bitkisi üzerinde yapılan çalışmada, endüstriyel atık suların bitkinin klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Klorofil seviyesindeki bu azalmanın sebebi olarak ise, klorofil yıkımından sorumlu bir enzim olan klorofilazın artışı ya da klorofil sentezini uyaran endojen sitokininlerin azalması ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir. Yapraklardaki endojen absisik asit (ABA) artışının, klorofilin yıkımını ve klorofil sentezinin inhibisyonunu hızlandırdığı tespit edilmiştir. Bu nedenle endojen ABA düzeyini etkileyen faktörler de yapraklardaki klorofil içeriğini etkileyebilir.

*Z. mays* üzerinde yapılan ve bitkinin strese maruz bırakıldığı çalışmalarda genel olarak klorofil içeriğinde azalmalar tespit edilmiştir. *Z. mays* üzerinde yapılan çalışmalarda çinko (Zn) ve fosfat (P) uygulamasının klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu ve bu azalmanın da çinkonun büyüme ortamındaki demir (Fe) ile etkileşime girmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Soltangheisi ve diğ., 2013; Soltangheisi ve diğ., 2014)

Abd El-Ghany ve diğ., (2015) tarafından yapılan ve tuz stresinin *Z. mays* üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada, tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin klorofil içeriğinde düşüş tespit edilmiştir. Aliu ve diğ.(2015) tarafından *Z. mays* üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek tuz konsantrasyonunda klorofil a ve klorofil b değerlerinde kontrole oranla düşüş görülmüştür. Homayoun ve diğ. (2011) tarafından yapılan ve kuraklık stresinin 5 farklı *Z. mays* genotipinin klorofil içeriğine etkisinin araştırıldığı çalışmada, tüm genotiplerde kuraklık stresine bağlı olarak klorofil içeriğinde azalma tespit edilmiştir.

Bir azo boya olan RP<sub>2</sub>B'nin *Anabeana* sp. üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada, artan konsantrasyonla birlikte klorofil a seviyesinde azalma gerçekleştiği

tespit edilmiştir (Hu ve Wu, 2001). Anyonik bir boya olan Metomega Krom Orange GL (MCO) boyasının 20 mg/L konsantrasyonda *Nostoc muscorum*'a uygulanması sonucu klorofil a düzeyinde azalma saptanmıştır (Shukla ve diğ., 1994). Bazı anyonik boyalar, fizyolojik olarak önemli olan  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  gibi önemli metalik iyonlarla etkileşime girebildiği için siyanobakterilerin büyümesini engelleyebilmektedir (Shukla ve diğ., 1994).

Karmosin ve sunset sarısı da anyonik boyalardandır ve klorofilin yapısında bulunan Mg ile etkileşime girerek klorofil miktarında azalmalara neden oldukları düşünülmektedir.

$\alpha$ -amilaz enzimi (1,4-A-D-glukanglukanohidrolaz, EC 3.2.1.1), tohum çimlenmesi sırasında  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağların hidrolizini katalize ederek, nişastanın şekere dönüşmesinde rol oynayan, giberellik asit tarafından uyarılan bir enzimdir ve gıda endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Gupta ve diğ., 2003).

Amilaz enzimleri bitkilerde çok yaygın olup, endoamilaz ve ekzoamilaz olmak üzere iki temel amilaz türü vardır. Endo amilazlar, polimerlerde alfa-1,4 bağına hedef alırken; ekzoamilazlar alfa-1,4 bağına substrat zincirinin yalnızca indirgenmeyen bitiminden saldırır (Davies ve diğ., 1969).

Amilazlar hayvanlarda, bitkilerde ve mikroplarda bulunan tipik sindirim enzimleridir. Özellikle, tahıl tanelerinin çimlenmesi sırasında alfa ve beta amilazlar çok bulunur. Alfa ve beta amilaz seviyeleri tahıl tanelerinin çimlenmesi sırasında belirgin olarak artar. Alfa-amilazın etkisi, substratın viskozitesinde hızlı bir düşüşe, iyot ile renklendirme kompleksinde bir değişikliğe ve reaksiyon karışımında çok yavaş etkili bir azalmaya neden olur. Alfa-amilaz enzimlerinin aktifleşmesinde,  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cl^-$  iyonları rol alır (Toczko ve Grzelińska, 1997). Alfa amilaz enzimi sentezindeki bir artış filizlenme sırasında tahıl tanelerinin olgunlaşmasına neden olabilir (Dinh ve Masojæ, 1994).

Literatürde karmosin, sunset sarısı ve bu iki renklendiricinin ait olduğu azo grubu boyaların *Z. mays* üzerinde  $\alpha$ -amilaz aktivitesine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bitki savunmasında rol alan organik bir bileşik olan metil jasmonatın (MeJa), *Z. mays* üzerindeki inhibe edici etkilerinin araştırıldığı bir

çalışmada, 100 µM ve üzeri MeJa konsantrasyonlarında α-amilaz aktivitesinde anlamlı bir azalma görülmüştür (Norastehnia ve diğ., 2007). Çeşitli streslere maruz bırakılan bitkilerde genel olarak α-amilaz aktivitesinde ve kök uzunluklarında azalmalar tespit edilmiştir (Ashraf ve diğ., 2002; Khan ve diğ., 1989)

α-amilaz, tahıl tohumu çimlenmesinde anahtar bir enzimdir. Çözünmeyen nişasta granüllerini embriyonik eksene doğru yer değiştiren çözünebilir glikoz parçalarına indirgemektedir. Böylece, azalan çimlenme yüzdesi ve kök uzamasının, solunum için sınırlı miktarda substrat üretimi ve bunun sonucu olarak sınırlı enerji üretiminden kaynaklandığı sonucu çıkarılabilir. Sınırlı enerji üretimi, plazma membranı proton pompalayan ATPaz (H<sup>+</sup>-ATPaz) aktivitesinin daha düşük olmasına ve hücre duvarı ve depolarizasyonun daha düşük asidifikasyonuna ve düşük ΔpH koşullarına neden olur. İyon absorpsiyonunun keskin bir şekilde azalması ve hücre duvarı gevşemesinin yavaşlaması sonucunda kök uzaması azalmaktadır (Canellas ve diğ., 2002).

Uygulama gruplarındaki tohumların kök uzunluğundaki azalmanın α-amilaz enzimi miktarındaki azalma ile paralellik gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak, verilerimiz, azalmış α-amilaz aktivitesinin fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde önemli roller oynadığını göstermiştir. Artan renklendirici konsantrasyonlarının α-amilaz aktivitesini ve dolaylı olarak tohum çimlenmesi ve kök gelişimini olumsuz etkilediği tespit edilmiştir.

Birçok organizma üzerinde farklı method ve teknikler kullanılarak canlılar üzerindeki olası toksik etkileri çalışılan karmosin ve sunset sarısının RAPD PZR tekniği kullanılarak toksisitesinin değerlendirildiği yeterli çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda 10 adet RAPD primeri kullanılarak bu renklendiricilerin toksik etkilerinin moleküler düzeyde tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Karmosin ve sunset sarısının etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda farklı bitki ve yöntemler kullanılmış ve bu maddelerin toksik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Vazhangat (2016) tarafından *A. cepa* ile yapılan bir çalışmada tartrazin ve orange red (karmosin+sunset sarısı), *A. cepa* kök hücrelerinde DNA hasarına, micronükleus, oluşumuna, kromozomal anormalliklere ve kök uzamasının ve hücre bölünmesinin inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır. Benzer sonuçlar, Gomes (2013) tarafından

sunset sarısının *A. cepa* kök hücrelerine uygulandığı çalışmada ve Kumar ve Srivasta (2011) tarafından sunset sarısının *Trigonella foenum-graceum* kök hücrelerine uygulandığı çalışmada da saptanmıştır. *Brassica campestris* L. bitkisinin kök ucu hücrelerinde sunset sarısının etkilerinin araştırıldığı çalışmada, benzer şekilde mikronükleus oluşumu, kromozom yapışması, kromozomal köprü oluşumu, ekvator düzleinde kayma gibi mitotik anormallikler tespit edilmiştir. Doz artışına paralel olarak bu etkilerin seviyelerinde artış görülmüştür (Dwivedi ve Kumar, 2015)

Bazı çalışmalarda renklendiricilerin, böbrek rahatsızlıklarına, alerjilere, gastrointestinal hastalıklara ve kanser sorunlarına neden olabileceği tespit edilmiştir (Tuormaa,1994; Tsuda ve diğ., 2001).

Azo boya grubunda yer alan amaranth, allura red ve new coccine boyalarının, fare ve sıçanlar üzerindeki olası genotoksik etkilerinin comet assay yöntemi kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, 10 mg/kg konsantrasyonda verilen üç boya da 3 saat sonrasında farede DNA hasarına neden olmuştur (Shimada ve diğ., 2010).

Uzun süre (30-45 gün), günlük alım miktarı kadar (50 mg/kg) karmosin verilen albino sıçanlarında, şişmiş hepatositler ve tıkanık hepatik kan sinuzoidlerinin yanı sıra, yağ damlaları depolayan şişmiş hepatosit balonları oluşmuştur (Montase ve Alkafafy, 2013)

Sunset sarısının insan üreme hücrelerindeki DNA hasarının comet assay kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, kontrole göre kuyruklu DNA yüzdesinde ve kuyruk uzunluğunda doza bağlı olarak artış saptanmış (Pandir, 2014)

Sitotoksik olmayan bir konsantrasyonda (250 ug/mL) sunset sarısının splenositlerin mitojen kaynaklı çoğalmasını anlamlı şekilde bastırdığı tespit edilmiştir (Yadav, 2013)

Karmosin ve sunset sarısının insan lenfosit hücreleri üzerindeki etkilerinin Sitokinesis Siyah Mikronükleus (Cytokinesis Black Micronucleus, CBMN) testi ile araştırıldığı çalışmada, izin verilen miktarda renklendiricilerin(100 ppm) insan lenfositlerinde genotoksisiteye neden olduğu tespit edilmiştir (Swaroop ve diğ., 2011)

Karmosin ve sunset sarısının insan ve sıçanda kolinesteraz enzimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, gerçek ve psödo-kolinesteraz enzimlerini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Osman ve diğ., 2004). Kolinesteraz, kolin esterlerini bozan ve otonomik ve somatik sinir sisteminde nörotransmisyonunda rol oynayan bir enzim grubudur. Bu enzimlerin inhibisyonu asetilkolin birikimine neden olur (Taylor 1991).

Albino sıçanlarında tiroid hormonları ve tiroid uyarıcı hormonları üzerine karmosinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yüksek dozda karmosinin (0,14 g/kg ve üstü) hipertiroidizmi arttırdığı, tiroid uyarıcı hormunu azalttığı tespit edilmiştir (Elekima ve Ollor, 2013). Tiroit hormonları büyüme ve gelişmeyi etkilemekte, yaşam boyunca kalorigenez ve metabolik hızı düzenlemektedir (Fisher ve Klein, 1981; Gyamfi ve diğ., 2009).

Albino sıçanları kullanılarak yapılan çalışmada, karmosin ve tartrazinin nefrotoksisiteye ve kalp fonksiyonunda sorunlara sebep olduğu saptanmıştır (Oyewole, 2016)

Karmosin ve tartrazinin genç erkek sıçanlar üzerinde çalışıldığı bir araştırmada, karaciğer ve böbrek gibi organlarda fonksiyon bozukluklarına neden olduğu tespit edilmiştir (Amin, 2010).

Fijer (2016) tarafından yapılan çalışmada, karmosinin sıçanlarda oksidatif strese etkileri araştırılmış ve farklı dozlarda uygulanan karmosinin SOD, GST, GPx ve TAOC seviyesini düşürdüğü tespit edilirken, NO ve MDA seviyelerinde artış tespit edilmiştir.

Ticari olarak satılan meyve sularının fare üzerinden etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, fare kan hücrelerine kontrol grubuna göre komet testinde daha uzun kuyruk, mikronükleus testinde mikronükleus frekansında artma ve DNA fragmentasyonunda artma tespit edilmiştir (Hassanane ve diğ., 2014).

İçme suyu olarak farklı konsantrasyonlarda karmosine maruz kalan gine domuzlarının karaciğer ve böbreklerinde staz (kan dolaşımının durması), ödem, konjesyon (kan toplanması), hepatosit ve böbrek apoptosizi tespit edilmiş ve doza bağlı olarak artış gerçekleşmiştir (Rus ve diğ., 2010).

Saatlo ve diğ. (2015) tarafından *Artemia salina* üzerinde yapılan bir çalışmada, karmosin, sunset sarısı ve Brillant blue renklendiricileri aspartamla karıştırılarak organizmaya verilmiş ve 1.000 ppm konsantrasyonda karmosin-aspartam uygulamasında % 91, brillant blue-aspartam uygulamasında % 75, sunset sarısı-aspartam uygulamasında ise % 55,4 ölüm oranı saptanmıştır. Kontrol grubunda ölüm oranı % 23 olarak belirlenmiştir. Bazı renklendiricilerin *Vicia faba* ve insan lenfositleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, renklendiricilerin hem bitki hem de insan hücreleri üzerinde ölümcül etkiler olduğu saptanmıştır (Macioszek ve Kononowicz, 2004).

RAPD profilleri, PCR reaksiyonlarının kullanımı yoluyla genomik DNA'daki değişiklikleri tespit eder. Bu çalışmada, uygulama gruplarından elde edilen genomik DNA'larla yapılan RAPD PCR reaksiyonu sonucunda, kontrol grubunda mevcut olan bantların kaybolmasının yanısıra, yeni bantlar da ortaya çıkmıştır. Bu etkiler, DNA'daki farklı hasarların sebep olduğu yapısal yeniden düzenlemelerle ilişkilendirilebilir (Becerril ve diğ., 2002).

Band yoğunluğundaki değişim ve bazı bantların kaybolması, uygulama sonrasında DNA kalıplarındaki ürünlerin seviyesi ile korelasyon gösterebilir ve bu da Taq polimeraz için bağlama alanlarının sayısını azaltabilir. Yeni bantların görünümü, DNA'da gerçekleşen yapısal değişikliklerinin (kopmalar, transpozisyonlar, delesyon vb.) sonucu olarak açıklanabilir (Atienzar ve diğ., 2001). Farklı numuneler arasındaki varyasyon, renklendiricilerin farklı kimyasal bileşimlerine ve aynı zamanda üretim süreçlerine bağlı olabilir (Abdelmigid, 2009).

Bu araştırmanın sonuçları, DNA hasarının RAPD profilinde görünür bir değişime neden olduğunu ortaya koymaktadır. Renklendirici uygulamalarının baz çiftlerindeki değişikliklerle birlikte mutasyonların üretilmesine yol açabileceği (Srikanth ve diğ., 1994; Maccubin ve diğ., 1997) ve bunun da primerlerin yeni bağlanma bölgeleri bulmalarına ve farklı sekanslarda benzer moleküler ağırlıkta ürünler vermesine neden olabileceği belirlenmiştir (Riesenberg, 1996).

Amaranth, eritrosin ve tartrazinin *in vitro* olarak insan periferik kan hücrelerinde genotoksik, sitotoksik ve sitostatik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu renklendiricilerin CT-DNA'ya (calf thymus DNA) ve dsDNA'ya bağlanabildikleri ve

insan lenfositleri için toksik potansiyel oluşturabileceği saptanmıştır (Mpountoukas ve diğ., 2010).

DNA da dahil olmak üzere biyomoleküllerle reaksiyona girdiği ve yapılarına ve biyolojik aktivitelerine zarar verdiği için, renklendiriciler en iyi bilinen kimyasal mutajenlerden biri olarak rapor edilmiştir (Tuormaa, 1994; Tsuda ve diğ., 2001; Das ve Mukherjee, 2004). Bu yüzden, karmosin ve sunset sarısının DNA molekülleri üzerinde genetik değişiklikler meydana gelmesine neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Azo boyaları için gözlenen tüm sitotoksik etkilerin, boyaların, özellikle azo bağların indirgenmesiyle oluşan metabolitlerin hücreler üzerinde doğrudan etki göstermesi sebebiyle olabileceği bildirilmiştir (Lin ve Leu, 2008). Bu metabolitlerin DNA molekülüyle tepkimeye girerek, DNA'nın yapısına ve fonksiyonuna zarar verebileceği bildirilmiştir (Oliviera ve diğ., 2010).

Çalışmamız sonucunda elde edilen RAPD verilerine göre uygulama grupları ile muamele edilmiş kök uçlarındaki genomik DNA'ların bazı özel bağlanma bölgelerinde DNA hasarı sebebiyle gerçekleşen yapısal modifikasyonlar sonrası bazı primerlere karşı erişilebilir hale gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Beslenmemizin ayrılmaz bir parçası haline gelen hazır gıdalar, cam, plastik ve teneke kutularda market raflarında geniş bir yelpazede insanların hizmetine sunulmaktadır. Pratik olması ve iş yükünü azaltması sebebiyle hazır gıdalar günlük hayatımızda sıklıkla tercih edilmektedir. Uzun süre raflarda kalan bu ürünlerin ilk günlük kalitesini, kokusunu ve tadını koruyabilmesi için birçok gıda katkı maddesi kullanılmaktadır. Raflardan herhangi bir ürünün içindekiler kısmına bakacak olursak birden fazla katkı maddesinin ismi görülmektedir. Bunlar genellikle, emülgatör, kıvam arttırıcı, asitliği düzenleyici, kabartıcı, parlaticı, aroma verici ve renklendiriciler olarak yer almaktadır.

Renklendiriciler, ürüne renk vererek daha canlı ve güzel bir görünüm kazanmasını sağlayan, gıda ürünlerinde sıklıkla kullanılan gıda katkı maddelerindedir. Birçok çeşidi olan bu renklendiricilerin kullanımına ilişkin bütün uygulamalar ve sınırlamalar bakanlıklar tarafından yayınlanan bir tebliğ ile açıkça belirtilmiştir. Bu tebliğe göre, ürünlerin "E" kodları, hangi renklendiricilerin hangi ürünlerde ne miktarda kullanılabileceği gibi bilgiler yer almaktadır. E122 kodlu karmosin ve E100 kodlu sunset sarısı da bu tebliğde yer alan ve kullanımına dair sınırlamaları olan renklendiricilerdendir.

Bu çalışmada karmosin ve sunset sarısının *Z. mays* üzerindeki toksik etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, söz konusu renklendiricilerin *Z. mays* bitkisi kök ve fidelerinin gelişmesi üzerindeki inhibisyonuna, klorofil ve alfa-amilaz enzimi üzerindeki etkilere ve RAPD PCR yöntemiyle genomik DNA üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çimlenme yüzdesi, fidenin canlılığını sürdürmesi ve fide yüksekliği gibi bitki büyüme parametreleri, belirli kirleticilere karşı bitki yanıtını değerlendirmek için kullanılan kriterlerdendir (Puvaneswari ve diğ., 2006). Bitki büyümesi ve gelişimi,



tekstil boyaları dahil (Kaushik ve diğ., 2005; Patil ve diğ., 2009), birçok çevresel stres faktöründen olumsuz etkilenebilmektedir (Aksoy ve Dane, 2011; Atik ve diğ., 2011; Makbul ve diğ., 2011).

Çalışmamızda, karmosin ve sunset sarısının kök uzaması ve fide gelişimini inhibe ettiği belirlendi. Kök uzamasının engellenmesi,  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin inhibe edilmiş olmasından kaynaklanabilir.  $\alpha$ -amilaz, tahıl tohumu çimlenmesinde anahtar bir enzimdir. Çözünmeyen nişasta tanelerini embriyonik eksene doğru yer değiştiren çözünebilir glikoz parçalarına indirgemektedir.

Karmosin ve sunset sarısı çözeltilerinin farklı dozlarının uygulandığı fide uzunluklarında da konsantrasyon artışına zıt olarak fide uzunluklarında anlamlı ölçüde azalmalar tespit edilmişti. Karmosin için bu değerler 10 g/L, 20 g/L ve 40 g/L uygulama grupları için kontrol grubuna göre sırasıyla % 72,5, % 65,1 ve % 20 olarak belirlendi. Sunset sarısı için bu değerler, 11,25 g/L, 22,5 g/L ve 45 g/L uygulama grupları için kontrol grubuna göre sırasıyla % 60,6, % 33,2 ve % 12,7 olarak belirlendi.

Kontrol grubundaki ve uygulama gruplarındaki tohumlardan çıkan yapraklardan elde edilen ekstraktlarla klorofil analizi yapıldı. Karmosin ve sunset sarısı uygulanan tohumlardan uygulaması sonucu yapraklarda, klorofil a ve klorofil b içeriğinde kontrol grubuna göre düşüş gözlenmiştir. İki gıda boyasının da klorofil biyosentezini negatif yönde etkilediği görülmüştür. Klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil için en düşük değerler karmosinin 40 g/L konsantrasyonunda görülmüştür. Klorofil miktarındaki bu azalmalar, fide uzunluklarıyla doğru orantı göstermektedir.

10 adet primer kullanılarak yapılan RAPD PZR analizlerinde, karmosin ve sunset sarısı renklendiricilerinin ikisi için de uygulama gruplarında kontrol grubuna göre polimorfizm tespit edildi.

Karmosinin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı *Z. mays* köklerinden izole edilen genomik DNA'ların RAPD primerleri ile reaksiyonu sonucunda, primerlerin tamamında polimorfizm görülürken, sunset sarısının farklı konsantrasyonlarının uygulandığı *Z. mays* köklerinden izole edilen genomik DNA'ların RAPD primerleri

ile reaksiyonu sonucunda primerlerin 7 adedinde polimorfizm, 3 adedinde ise monomorfizm tespit edildi.

Uygulama gruplarına ait DNA'lar ile yapılan PZR analizleri sonucunda kontrol grubuna göre polimorfizm ve monomorfizm görülen primerlerin uygulama grupları arasındaki dağılımları da incelendi. Analizler sonucunda karmosin uygulanan dozlarda kontrol grubuna göre bütün primerlerde polimorfizm görülmüştür. Sunset sarısı uygulanan dozlarda kontrol grubuna göre sadece 45 g/L doz uygulanan grupta OPA-3, OPA-5 VE OPA-10 primerlerinde monomorfizm görülmüştür. 11,25 g/L ve 22,5 g/L doz uygulanan gruplarda 10 primerle de polimorfizm görülmüştür.

Değerlendirmeye alınan 10 RAPD primeri, karmosin uygulanan örneklerde toplam 94 adet bant verdi. Bu bantlardan 27 adedi monomorfik, 67 adedi polimorfik bantlardır. En fazla polimorfizm görülen primerin, % 100 oranıyla OPA-4; en fazla monomorfizm görülen primerin ise % 56 oranıyla OPA-8 olduğu gözlemlendi. Elde edilen polimorfik bantların oranı % 71 olarak belirlendi.

Değerlendirmeye alınan 10 RAPD primeri, sunset sarısı uygulanan örneklerde toplam 90 adet bant verdi. Bunlardan 42 adedi monomorfik, 48 adedi polimorfik bantlardır. Sunset sarısı uygulanan gruplarda en fazla polimorfizm görülen primerin % 89 oranıyla OPA-4; en fazla monomorfizm görülen primerin ise % 60 oranıyla OPA-3 olduğu gözlemlendi. Elde edilen polimorfik bantların oranı % 53 olarak belirlendi.

Uygulama grupları arasındaki kontrol grubuna göre en polimorfik RAPD primerlerini saptamak için, polimorfik bant profili gösteren primerlerin RAPD çoğaltımı sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren bütün primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü hesaplandı. Karmosin uygulanan gruplarda 367 ile 1977 baz çifti büyüklüğü arasında 94 adet, sunset sarısı uygulanan gruplarda ise 314 ile 1884 baz çifti büyüklüğü arasında değişen toplam 90 adet polimorfik bant tespit edildi.

Bant profilleri kullanılarak elde edilen, kontrol grubu ve uygulama grupları arasındaki genetik mesafelerin tespitinde kullanılan dendrogramda, karmosin uygulama grupları arasında, kontrol grubuna en yakın olan grubun 40 g/L uygulama

grubu olduğu tespit edilirken, 10 g/L ve 20 g/L uygulama gruplarının genetik mesafe bakımından kontrol grubuna daha uzak olduğu tespit edildi. Birbirlerine en yakın iki grubunda 10 g/L ve 20 g/L uygulama grupları olduğu görüldü.

Karmosin uygulamasındakine benzer olarak, sunset sarısı uygulamalarında da, en yüksek doz olan 45 g/L uygulama grubunun genetik mesafe bakımından kontrol grubuna en yakın doz olduğu, diğer iki dozun da birbirine en yakın genetik mesafede olduğu görüldü. Dendrogramda çıkan bu benzerlik RAPD bant profillerinde de görülmektedir. Kontrol grubuyla en fazla monomorfizm gösteren grupların en yüksek dozlar olduğu görüldü.

Beslenme ihtiyacının karşılanması her aşamasında karşımıza çıkan, neredeyse bütün gıda ürünlerinde kullanılan renklendiricilere ve diğer gıda katkı maddelerine sürekli maruz kalmaktayız. Her ne kadar bu maddeler için toksisite çalışmaları yapılmış olsa ve günlük azami alım miktarı belirlenmiş olsa da, gerek gıda imalathanelerinin denetimlerin yetersiz oluşu, gerekse toplumdaki farkındalığın eksik oluşu gibi sebepler dolayısıyla bu maddeler insan sağlığı üzerinde bir tehdit olmaya devam etmektedir. Yüksek dozda organizmalar üzerinde toksik etkiler gösteren ve çocuklarda hiperaktivite ve davranış bozukluğuna neden olabilen bu renklendiriciler ve diğer gıda katkı maddelerinin, özellikle de çocukların kullandığı yiyeceklerde kullanımına sınırlandırmalar getirilmesi önerilebilir.

## KAYNAKLAR

Abd El-Ghany T. M., Masrahi Y. S., Mohamed A., Alawlaqi M. M., Nadeem I. E., Maize (*Zea mays* L.) Growth and Metabolic Dynamics with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria under Salt Stress, *J. Plant Pathol. Microb.*, doi:10.4172/2157-7471.1000305.

Abdelmigid H. M., Risk Assessment of Food Coloring Agents on DNA Damage Using RAPD Markers, *The Open Biotechnology Journal*, 2009, **3**, 96-102.

Aboel-Zahab H., El-Khyat Z., Physical effects of some synthetic food colouring additives on rats, *Biol. Chem.*, 1997, **136**(10), 615–27.

Aksoy Ö., Dane F., Ultrastructural changes in the root tip and leaf cells of *Lens culinaris* treated with fl uazifop-p-butyl, *Turkish Journal of Botany*, 2011, **35**, 389-402.

Aliu S., Rusinovic I., Fetahu S., Gashi B., Simeonovska E., Rozman L., The effect of salt stress on the germination of maize (*Zea mays* L.) seeds and photosynthetic pigments, *Acta agriculturae Slovenica*, DOI: 10.14720/aas.2015.105.1.09.

Amin K. A., Abdel Hameid H., Abd Elsttar A. H., Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats, *Food and Chemical Toxicology*, 2010, **48**, 2994–2999.

Arı Ş., DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, 101-120. Editörler, Temizkan G., Arda N., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Kitabevi, Ankara, 57-67, 1999.

Arnon D. I., Copper Enzymes in Isolated Chloroplast Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.*, 1949, **24**, 1-5.

Ashraf M. Y., Sarwar G., Ashraf M., Afaf R., Sattar A., Salinity induced change in  $\alpha$ -amilase activity during germination and early cotton seedling growth, *Biologia Plantarum*, 2002, **45**(4), 589-591.

Atienzar F. A., Conradi M., Evenden A. J., Jha A. N., Depledge M. H., Qualitative Assessment of Genotoxicity Using Random Amplified Polymorphic DNA: Comparison of Genomic Template Stability with Key Fitness Parameters in 60 *Daphnia magna* Exposed to Benzo[a]pyrene, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, **18**, 2275–2282.

Atienzar F. A., Cordi B., Donkin M. E., Comparison of Ultraviolet-induced Genotoxicity Detected by Random Amplified Polymorphic DNA with Chlorophyll Fluorescence and Growth in a Marine Macroalgae *Palnaria palnata*, *Aquat. Toxicol.*, 2000, **50**, 1-12.

Atienzar F. A., Development of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to measure the effects of genotoxins in aquatic organisms, Ph.D. Thesis, (DXN034438), UK, University of Plymouth, 2000.

Atienzar F. A., Cheung V. V., Jha A. N., Depledge M. H., Fitness parameters and dna effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*, *Toxicol. Sci.*, 2001, **59**, 241-50.

Atik A. E., Bozdağ G. O., Akıncı E., Kaya A., Koc A., Yalcın T., Karakaya H. C., Proteomic changes during boron tolerance in barley (*Hordeum vulgare*) and the role of vacuolar protontranslocating ATPase subunit E, *Turkish Journal of Botany*, 2011, **35**, 379-388.

Bansal A. K., Modulation of N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress by vitamin E in rat erythrocytes, *Human Exp. Toxicol.*, 2005, **24**, 297–302.

Bardakçı F., Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers, *Turkish Journal of Biology*, 2001, **25**, 185-196.

Becerril C., Ferrero M., Castaño A., Detection by RAPD of genetic alterations *in vitro*: amplification and conservation conditions of DNA extracts, *Toxicol. Mech. Methods*, 2002, **12**(2), 155-67.

Behnajady M. A., Modirshahla N., Ghanbary F., A kinetic model for the decolorization of C.I. acid yellow 23 by Fenton process, *J. Hazard. Mater.*, 2007, **148**, 98–102.

Canellas L. P., Olivares F. L., Okorokova-Facanha A. L., Facanha A. R., Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots, *Plant Physiol.*, 2002, **130**, 1951–1957.

Chance B, William G. R., The respiratory chain and oxiditave phosphorylation, *Adv Enzymol.*, 1965, **171**, 65–134.

Coe E. H., The origins of maize genetics, *Nat. Rev. Genet.*, 2001, **2**, 898–905.

Cuiping B., Wenqi G., Dexin F., Mo X., Qi Z., Shaohua C., Zhongxue G., Yanshui Z., Natural graphite tailings as heterogeneous Fenton catalyst for the decolorization of rhodamine B, *Chem. Eng. J.*, 2012, **197**, 306–313.

Das A., Mukherjee A., Genotoxicity testing of the food colours amaranth and tartrazine, *Int. J. Hum. Genet.*, 2004, **4**(4), 277-80.

Davies D., Giovanelli J., Rees T., *Biochemistry of Plants* (in Polish), PWRiL, Warsaw, 1969.

Davies K. J. A., Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals, *General Aspects. J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 9895-9901.

Dinh T. V. and Masojæ P., Alpha amylase activity and sprouting resistance of spring wheat varieties, *Bull. Plant Breeding Acclim. Institute*, 1999, **211**, 91-95.

Diericki P. J., Yde M. V., *In vitro* interaction of aminobenzenesulfonic acid and their N-acetylated derivatives with rat liver glutathione S-transferase, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1982, **37**(3), 385–394.

Dwivedi K., Kumar G., Genetic Damage Induced by a Food Coloring Dye (Sunset Yellow) on Meristematic Cells of *Brassica campestris* L., *Journal of Environmental and Public Health*, DOI:10.1155/2015/319727.

Ekinci F., Buğday (*Triticum aestivum* L.)  $\alpha$ -Amilazının bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve enzim aktivitesi üzerine endosülfanın etkisi, Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi, Fen-Ed. Fak. Biyoloji Bölümü, Edirne, 1996, 57303.

Elekima I., Ollor A. O., Effect of Carmoisine Orally Administered on Thyroid Hormones and Thyroid Stimulating Hormone of Albino Rats, *International Journal of Science and Research*, 2016, **5**(10), 2319-7064.

El-Sadat I. A., Photochemical and fluorescence studies of some environmental problems in Egypt, MSc. Thesis, Tanta University, Faculty of Science, Egypt, 2000.

El-Wahab H. M., Moram G. S., Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats, *Toxicol. Ind. Health*, 2013, **29**(2), 224-32.

Ezeuko V. C., Nwokocha C. R., Mounmbegna P. E., Nriagu C. C., Effect of Zingiber officinale on liver function of mercuric chloride induced hepatotoxicity in adult male Wistar rats, *Electron. J. Biomed.*, 2007, **3**, 40–45.

Fijer A. N., Al-Mashhedy L. A. M., Influence of Carmosine (E 122) on oxidative stress status and the protective effect of vitamins C and E in male rats, *International Journal of Pharm. Tech. Research*, 2016, **9**(9), 261-270.

Fisher D. A., Klein A. H., Thyroid development and disorders of thyroid function in the new born, *New England Journal of Medicine*, 1981, **12**(2), 702-712.

Fitzgerald S. W., Bishop P. L., Two-stage anaerobic/aerobic treatment of sulfonated azo dyes, *Journal of Environmental Science and Health*, 1995, **30**, 1251-1276.

Fridovich I., Biological Effects of The Superoxide Radical, *Arch. Biochem. Biop.*, 1986, **274**, 1-11.

Gadallah M. A. A., Phytotoxic effects of industrial and sewage waste waters on growth, chlorophyll content, transpiration rate and relative water content of potted sunflower plants, *Water Air Soil Pollut.*, 1996, **89**, 33-39.

Gaut B. S., Doebley J. F., DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, **88**, 2060–2064.

Ghoneim M. M., El-Desoky H. S., Zidan N. M., Electro-Fenton oxidation of Sunset Yellow FCF azo-dye in aqueous solutions, *Desalination*, 2011, **274**, 22–30.

Gomes K. M. S., Oliveira M. V. G., Carvalho F. R. S., Menezes C. C., Peron A. P., Citotoxicity of food dyes Sunset Yellow (E-110), Bordeaux Red (E-123), and Tartrazine Yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells, *Food Sci. Technol.*, 2013, **33**(1), 218-223.

Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K., Chauhan B., Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry*, 2003, **38**, 1599-1616.

Gupta V. K., Application of low cost adsorbents for dye removal, *J. Environ. Manage.*, 2009, **90**, 2313–2342.

Gyamfi C., Wapner R. J., Dalton, M. A., Thyroid dysfunction in pregnancy the basic science and clinical evidence surrounding controversy in management, *Obstetrics and gynaecology*, 2009, **12**(34), 702- 707.

Hammer  $\check{R}$ ., Harper D. A. T., Ryan P. D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontologia Electronica*, 2001, **4**(1), 1-9.

Hassanane M. M., Girgis S. M., Shoman M. T., Assessment Of Potential Mutagenic Effect Of Colorant Of Some Commercial Fruit In Mice, *J. Nutr. Food Sci.*, DOI:10.4172/2155-9600.1000320.

Homayoun H., Daliri S. M., Mehrabi P., Effect of Drought Stress on Leaf Chlorophyll in Corn Cultivars (*Zea mays*), *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2011, **9**(3): 418-420.

Hu T. L., Wu S. C., Assessment of the effect of azo dye RP<sub>2</sub>B on the growth of a nitrogen fixing cyanobacterium-Anabaena sp., *Bioresource Technology*, 2001, **77**, 93-95.

Jaspars E. M., Pigmentation of tobacco crown-gall tissues cultured in vitro in dependence of the composition of the medium, *Physiol. Plant.*, 1965, **18**, 933-940.

JECFA, Evaluation of certain food additives (Twenty-fifth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), *WHO Tech. Rep. Ser.*, 683,1981.

Karanlık S., Değişik buğday genotiplerinde tuz stresine dayanıklılık ve dayanıklılığın fizyolojik nedenlerinin araştırılması, Doktora tezi, Ç.Ü. Fen Bil. Enst., Adana, 2001, 112473.

Khan A. H., Azmi A. R., Ashraf M. Y., Influence of NaCl on some biochemical aspects of two sorghum varieties, *Pak. J. Bot.*, 1989, **21**(1), 74-80.

Kumar G., Srivastava N., Genotoxic Effects Of Two Commonly Used Food Additives Of Boric Acid And Sunset Yellow In Root Meristems Of *Trigonella Foenum-Graecum*, *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, 2011, **8**(4), 361-366.

Lin Y. H., Leu J. Y., Kinetics of reactive azo dye decoloration by *Pseudomonas luteola* in a biological activated carbon process, *Biochem Eng J.*, 2008, **39**, 457-467.

Maccubbin A. E., Mudipalli A., Nadadur S. S., Ersing N., Gurtoo H. L., Mutations induced in a shuttle vector plasmid exposed to monofunctionally activated mitomycin C., *Environ. Mol. Mutagen*, 1997, **29**,143-51.

Macioszek V. K., Kononowicz A. K., The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors; Quinoline Yellow (E104) and Brilliant Black BN (E151), *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2004, **9**,107-22.

Makbul S., Saruhan G. N., Durmuş N., Guven S., Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. *Turkish Journal of Botany*, 2011, **35**, 369-377.

Mathieu-Daudé F., Ralph D., McClelland M., *Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for The Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*, CRS Press, New York, 1997.

Mohan S. V., Prasad K. K., Rao N. C., Sarma P. N., Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*, 2005, **58**, 1097-1105.

Montaser M. M., Alkafafy M. E., Effects of Synthetic Food Color (Carmoisine) on Expression of Some Fuel Metabolism Genes in Liver of Male Albino Rats, *Life Sci J.*, 2013, **10**(2), 2191-2198.

Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V., Lialiaris T., Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine, *Food and Chemical Toxicology*, 2010, **48**, 2934–2944.

Muralidharan K., Wakeland E. K., Concentration of Primer and Template Qualitatively Affects Products in Random-Amplified Polymorphic DNA PCR, *BioTechnology*, 1993, **14**, 362-364.

Norastehnia A., Sajedi R. H., Nojavan-Asghari M., Inhibitory Effects Of Methyl Jasmonate On Seed Germination In Maize (*Zea mays*): Effect On A-Amylase Activity And Ethylene Production, *Gen. Appl. Plant Physiology*, 2007, **33**(1), 13-23.

Oliveira G. A., Ferraz E. R., Chequer F. M., Grando M. D., Angeli J. P., Tsuboy M. S., Marcarini J. C., Mantovani M. S., Osuqi M. E., Lizier T. M., Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. *Mutat. Res.*, 2010, **703**, 200-208.



Osman M. Y., Sharaf I. A., Abd EL-Rehim W. M., EL-Sharkawi A. M., Synthetic organic hard capsule colouring agents: *in vitro* effect on human true and pseudo-cholinesterase, *Br J Biomed Sci.*, 2003, **60**, 52–58.

Osman M. Y., Sharaf I. A., Osman H. M. Y., El-Khouly Z. A., Ahmed E. I., Synthetic organic food colouring agents and their degraded products: effects on human and rat cholinesterases, *British Journal of Biomedical Science*, 2004, **61**(3), 128-132.

Ouzounidou G., Moustakas M., Eleftheriou E. P., Physiological and Ultrastructural Effects of Cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves, *Arc. Env. Toxic.*, 1997, **32**, 154-159.

Oyewole O. I., Oladele J. O., Assessment of Cardiac and Renal Functions in Wistar Albino Rats Administered Carmoisine and Tartrazine, *Advances in Biochemistry*, 2016, **4**(3), 21-25.

Panda S. K., Choudhury S., Chromium stress in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005, **17**, 95–102.

Pandir D., DNA damage in human germ cell exposed to the some food additives in vitro, *Cytotechnology*, 2016, **68**, 725–733.

Parmaksız İ., *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonunun Türkiye’de Yetişen Türlerinde Genetik Çeşitliliğin RAPD Markörleri ile Analizi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004, 151060.

Persing H. D., Polymerase Chain Reaction: Trends to benches, *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 1281-1285.

Plewa M. J., Specific-locus mutation assays in *Zea mays*. A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program, *Mutat. Res.*, 1982, **99**, 317–337.

Poul M., Jarry G., Elhkim M. O., Poul J. M., Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 2009, **47**, 443–448.

Rafalski J. A., Tingey S., Williams J. G. K., RAPD Markers a New Technology for Genetic Mapping and Plant Breeding, *AgBiotech News and Information*, 1991, **3**, 645-648.

Rhoades M. M., The early years of maize genetics, *Annu. Rev. Genet.*, 1984, **18**, 1–29.

Riesenberg L. K., Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons, *Mol. Ecol.*, 1996, **5**, 99-105.

Rus V., Gherman C., Miclăuş V., Mihalca A., Nadăş G. C., Comparative Toxicity Of Food Dyes On Liver And Kidney In Guinea Pigs: A Histopathological Study, *Annals of RSCB*, 2010, **15**(1), 161-165.

- Saatloo N. V., Sadighara P., Khaniki G. J., Ebrahimi N., Nabizadeh S., Evaluating the interaction effects of using common synthetic food dyes and aspartame by *Artemia salina* toxicity test, *Journal of Food Safety and Hygiene*, 2015, **1**(1), 7-13.
- Schierwater B., Ender A., Different Thermostable DNA Polymerases May Amplify Different RAPD Products, *Nucleic Acids Res.*, 1993, **21**, 4647-4648.
- Scoccianti V., Crinelli R., Tirillini B., Mancinelli V., Speranza A., Uptake and toxicity of Cr(III) in celery seedlings, *Chemosphere*, 2006, **64**, 1695–1703.
- Shimada C., Kano K., Sasaki Y. F., Sato I., Tsuda S., Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice, *The Journal of Toxicological Sciences*, 2010, **35**(4), 547-554.
- Shukla S. P., Gupta G. S., Toxicity potential of a textile dye toward the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum*, *Environmental Toxicology*, 1994, **9**(3), 179-181.
- Singh P. K., Tewari R. K., Cadmium Toxicity Induced Changes in Plant Water Relations and Oxidative Metabolism of *Brassica juncea* L. Plants, *J. Environ. Biol.*, 2003, **24**, 107– 112.
- Soltangheisi A., Ishak C. F., Musa H. M., Phosphorus and Zinc Uptake and Their Interaction Effect on Dry Matter and Chlorophyll Content of Sweet Corn (*Zea mays* var. *saccharata*), *Journal of Agronomy*, 2013, **12**(4), 187-192.
- Soltangheisi A., Rahman Z. A., Ishak C. F., Interaction Effects of Zinc and Manganese on Growth, Uptake Response and Chlorophyll Content of Sweet Corn (*Zea mays* var. *saccharata*), *Asian Journal of Plant Sciences*, 2014, **13**(1), 26-33.
- Srikanth N. S., Mudipalli A., Maccubbin A. E., Gurtoo H. L., Mutations in a shuttle vector exposed to activated mitomycin C., *Mol. Carcinog.*, 1994, **10**, 23-9.
- Strable J., Scanlon M. J., Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology, *Cold Spring Harb Protoc.*, DOI:10.1101/pdb.emo132.
- Swaroop V. R., Roy D. D., Vijayakumar T., Genotoxicity of Synthetic Food Colorants, *Journal of Food Science and Engineering*, 2011, **2**, 128-134.
- Swigonova Z., Lai J., Ma J., Ramakrishna W., Llaca V., Bennetzen J. L., Messing J., Close split of sorghum and maize genome progenitors, *Genome Res.*, 2004, **14**, 1916–1923.
- Tanaka T., Reproductive and neurobehavioural effects of sunset yellow FCF administrated to mice in diet, *Toxicol Ind Health*, 1996, **12**, 69–79.
- Taylor P., The cholinesterases, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**(7), 4025-8.
- Toczko M. and Grzelińska A., *Material to Exercise from Biochemistry* (in Polish), Warsaw Univ. Agriculture Press, Warsaw, 1997.

Tsuda S., Murakami M., Matsusaka N., Kano K., Taniguchi K., Sasaki Y. F., DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice, *Toxicol. Sci.*, 2001, **61**, 92-99.

Tuormaa E., The adverse effects of food Additives on health (Booklet), *J. Mol. Med.*, 1994, **9**(4), 225- 243.

URL-1:<http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-467/rg-tarihi07111995--rg-sayisi22456-4128-sayili-kanun-ile-.html>, (Ziyaret tarihi: 13 Eylül 2016).

URL-2:<http://www.zootekni.org.tr/upload/File/GIDA%20KATKI%20MADDELERI.pdf>, (Ziyaret tarihi: 15 Eylül 2016).

URL-3: <http://www.may.com.tr/urun/merit>, (Ziyaret tarihi: 15 Eylül 2016).

URL-4: [http://archive.gramene.org/species/zea/maize\\_taxonomy.html](http://archive.gramene.org/species/zea/maize_taxonomy.html), (Ziyaret tarihi: 08 Ekim 2016).

Vajpayee P, Tripathi R. D., Rai U. N., Ali M. B., Singh S. N., Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L., *Chemosphere*, 2000, **41**, 1075–1082.

Vazhangat P., Thoppil J. E., Apoptotic induction via membrane/DNA damage and metabolic inactivation by synthetic food colorants in *Allium cepa* roots, *Turk. J. Biol.*, 2016, **40**, 922-933.

Waugh R., Poweil W., Using RAPD Markers for Crop Improvement, *Focus*, 1992, **10**, 186-191.

Williams J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(22), 6531-5.

William F. G., Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals, *Mutation Research*, 1999, **426**, 107–112.

Yadav A., Kumar A., Tripathi A., Das M., Sunset yellow FCF, a permitted food dye, alters functional responses of splenocytes at non-cytotoxic dose, *Toxicology Letters*, 2013, **217**(3), 197– 204.

Yarkın Z., İki Farklı Fermantasyon Tekniği ile *Aspergillus sclerotiorum*'dan Amilaz Üretimi ve Nisasta Hidrolizinde Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 2007, 199985.

Yurttagül M., Ayaz A., *Gıda Katkı Maddeleri: Yanlışlar ve Doğrular*, 3000, Kolasmata Matbaacılık, Ankara, 2008.

## KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

Rind N. A., Aksoy Ö., Dahot M. U., **Dikilitaş S.**, Rafiq M., Tütünoğlu B., Evaluation Of Genetic Diversity Among *Melia Azedarach* L. (Meliaceae) With Rapid Markers, *Fresenius Environmental Bulletin*, 2016, **25**(7), 2374-2382

Rind N. A., **Dikilitaş S.**, Aksoy Ö., Dahot M. U., Rafiq M., Tütünoğlu B., Study of Genetic Diversity among *Melia azedarach* L. Collected from Various Areas of Turkey, *Plant Genome Evolution*, Amsterdam, Netherlands, 6-8 September 2015.

Tütünoğlu B., **Dikilitaş S.**, Aksoy Ö., Rind N. A., Benzoik Asit ve Kumarinin *Allium cepa* Üzerindeki Sitotoksik Etkileri, *1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi*, Bolu, Türkiye, 2-4 Eylül 2015.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2006 yılında girdiği Abant Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji(İngilizce) bölümünden 2011 yılında mezun oldu. 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji bölümünde başladığı Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir. 2014 yılından beri Kocaeli Üniversitesi Biyoloji bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

