

**TC.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**BRILLANT BLUE VE SUNSET YELLOW'UN *ALLIUM CEPA* L.
KÖK UCU MERİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNE TOKSİK
ETKİLERİ**

Kemal KOÇ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Dilek PANDIR**

Yozgat 2018

**TC.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Yüksek Lisans Tezi

**BRILLANT BLUE VE SUNSET YELLOW'UN *ALLIUM CEPA* L.
KÖK UCU MERİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNE TOKSİK
ETKİLERİ**

Kemal KOÇ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dilek PANDIR

**Bu çalışma, Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 6601-FBE/17-115 kodu ile desteklenmiştir.**

Yozgat 2018

T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Biyoloji Ana Bilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı 70110315008 numaralı öğrencisi Kemal KOÇ'un hazırladığı "Brillant Blue ve Sunset Yellow'un *Allium cepa* L. Kök Ucu Meristem Hücreleri Üzerine Toksik Etkileri" başlıklı tezi ile ilgili tez savunma sınavı, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri gereğince 24/05/2018 günü saat 15.30'da yapılmış, tezin onayına oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Sedat PER

Üye : Prof. Dr. Dilek PANDIR (Danışman)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet CEYLAN



ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun .21./5./2018 tarih ve .22 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.21.5./2018



Prof. Dr. Fatma KÖKSAL
Müdür

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Gıdalarda Bulunan Katkı Maddeleri	1
1.1.1. Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması	2
1.2. Brillant Blue Boyasının Özellikleri	3
1.3. Sunset Yellow Boyasının Özellikleri	4
1.4. Güvenlik Sınırı	6
1.5. <i>Allium cepa</i> ile İlgili Genel Bilgi	7
2. MATERYAL VE YÖNTEM	10
2.1. EC ₅₀ 'nin Belirlenmesi	10
2.2. Sitogenetik Etki ve Mitotik İndeks (MI) Tayini	10
2.3. FRAP (demir azaltıcı antioksidan güç) ve TEAC (Troloks eşdeğer antioksidan kapasite) testleri	11
2.4. Canlılık Testi	11
2.5. Komet Testi ile DNA Hasarının Belirlenmesi	11
2.6. DNA İzolasyonu	12
2.7. RAPD-PCR Yöntemi	12
2.8. İstatistik	13
3. BULGULAR	14
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	25
5-KAYNAKLAR	29
6-ÖZGEÇMİŞ	34

**BRILLANT BLUE VE SUNSET YELLOW'UN *ALLIUM CEPA* L. KÖK UCU
MERİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİ**

Kemal KOÇ

**Yozgat Bozok Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

2018; Sayfa: 35

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek PANDIR

ÖZET

Gıdalara eklenen katkı maddeleri koruma, tatlandırma, renklendirme için kullanılan en eski teknolojilerden biridir. Bu çalışma, Sunset Yellow (SY) ve Brilliant Blue (BB) gıda katkı maddelerinin *Allium cepa* kök meristematik hücreleri üzerindeki toksisitesini değerlendirmek için yapılmıştır. Kontrol ve uygulama grupları çimlendirilmiş köklerden oluşturulmuştur. 1. gruba (kontrol grubu) herhangi bir kimyasal madde verilmemiştir. 2. gruba ise (SY veya BB-uygulama grubu), 24, 48 ve 72 saat zaman periyodları için artan dozlarda SY (25, 50, 100 ve 500 ppm) ve BB (100, 200, 400 ve 500 ppm) verilmiştir. Farklı uygulama sürelerinden sonra tüm gruplardan elde edilen köklerde, EC₅₀ konsantrasyonları, hücre ölümü, kromozom aberasyonları ve mitotik indeks ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Köklerin antioksidan kapasitelerindeki değişimler FRAP ve TEAC testi ile belirlenmiştir. DNA hasarı ayrıca Comet Yöntemi ve RAPD-PCR tekniği ile de ölçülmüştür. SY ve BB için EC₅₀ değeri yaklaşık olarak sırasıyla 50 ve 200 ppm olarak belirlenmiştir. Kromozom bozulmaları her iki grupta da; kromozom köprüsü, C-mitoz, mikronükleus, kromozom yanlış ayrılması gibi artan konsantrasyonlarda ve daha uzun uygulama sürelerinde elde edilmiştir. SY ve BB'nin artan doz uygulamaları, 72 saatlik süreçte mitotik indeks değerlerinin azalmasına neden olmuştur. FRAP ve TEAC testi, artan SY ve BB konsantrasyonlarının köklerin antioksidan kapasitesini azalttığını göstermiştir.

Kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu, kontrol grubuna kıyasla tüm maruz kalma sürelerinde belirgin bir ölçüde artmıştır. SY ve BB'nin 50 ve 200 ppm dozlarının 72 saatlik uygulamalarında genetik materyal üzerinde genotoksik etkiye neden olduğu RAPD-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. SY ve BB dozlarının arttırılması, *A. cepa*'nın çalışılan tüm parametrelerinde toksisitenin artması ile sonuçlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada SY ve BB'nin sitotoksik ve mutajenik potansiyeli test edilmiş olup, SY'nin *A. cepa* kök meristematik hücrelerindeki kullanımının BB'den daha zararlı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: BB, DNA hasarı, RAPD-PCR, Genotoksisite, *Allium* test

**TOXIC EFFECT OF BRILLIANT BLUE AND SUNSET YELLOW ON ROOT
TIPS OF MERISTEMATIC CELL IN *ALLIUM CEPA* L.**

Kemal KOÇ

**Yozgat Bozok University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master of Science Thesis**

2018; Page: 35

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Dilek PANDIR

ABSTRACT

Substances added to food are the oldest technologies used in preservation, sweetening and coloring. This work was conducted to evaluate the toxicity of the food additives Sunset Yellow (SY) and Brilliant Blue (BB) on *Allium cepa* root meristematic cells. Control and treatment groups were created from germinated roots. Group 1 (control group) did not give any chemicals. Group 2 (SY or BB-treatment group), received increasing doses of SY (25, 50, 100 and 500 ppm) and BB (100, 200, 400 and 500 ppm) with time periods of 24, 48 and 72 h. After different treatment periods, the roots were obtained from all groups and EC₅₀ concentrations, cell death, chromosome aberrations, mitotic index were observed by a light microscopy. Changing antioxidant capacity of roots was determined by FRAP and TEAC assay. Also, DNA damage was measured by comet assay and RAPD-PCR technique. Approximately 50 and 200 ppm were detected as EC₅₀ value for SY and BB, respectively. Chromosome aberrations were obtained with increasing concentrations and longer treatment times such as chromosome bridge, C-mitosis, micronucleus, chromosome mis-segregation in both groups. Increasing exposure doses of SY and BB caused decreasing mitotic index values at 72 h. FRAP and TEAC assay showed that antioxidant capacity of roots was decreased by increasing concentrations of SY and BB. The tail DNA% and tail length significantly increased for all exposure times when compared to the

control group. 50 and 200 ppm of SY and BB caused a genotoxic effect on genetic material at 72 h according to RAPD–PCR. Increasing the doses of SY and BB resulted in increased toxicity to all studied parameters of *A. cepa*. In conclusion, the SY and BB tested in this study have cytotoxic and mutagenic potential. Furthermore, SY is more harmful than BB for use in the *A. cepa* root meristematic cells.

Key words: BB, DNA damage, RAPD-PCR, Genotoxicity, Allium test



TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca bana yardımcı olan Sayın hocam Prof. Dr. Dilek PANDIR'a, Arő. Gör. Ali DEMİRBAĞ'a ve arkadaşım Biyolog Fatih OĞuz BEKDEMİR'e; tüm çalıőmam boyunca maddi ve manevi yönden desteklerini esirgemeyen aileme teőekkürlerimi borç bilirim.



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Katkı maddelerinin sınıflandırılması.....	3
Tablo 3.1. Artan dozlarda uygulanan SY ve BB'nin kontrol ve uygulama gruplarında kök büyüme inhibisyon testi	15
Tablo 3.2. SY ve BB'nin farklı dozlarda ve sürelerde oluşturduğu kromozomal anormaliler ve mitotik indeks.....	18
Tablo 3.3. SY ve BB'nin artan konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>A. cepa</i> köklerinden alınan hücrelerde DNA hasarının (\pm SD) % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin ortalama değerleri	23

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.1.** Brilliant Blue'nun açık formülü4
- Şekil 1.2.** Sunset Yellow'un açık formülü 5
- Şekil 3.1.** *A. cepa*'nın kök hücresinde SY'nin meydana getirdiği kromozom anomalileri. (A) Normal metafaz, (B) Çoklu nükleer lezyonlar, (C) Anafazda yapışma, (D) Düzensiz metafaz, (E) C şekilli metafaz, (F) Kromozom köprüsü, (G) Kromozom kayması, (H) Kromozomlarda yanlış ayrılma, (I) C-mitoz, (İ) Diyagonal anafaz, (J) Mikronükleus, (K) Anafaz köprüsü, (L) Dağınık kromozom, (M) Çok kutuplu anafaz, (N) Kromozom halkalanması.....166
- Şekil 3.2.** *A. cepa*'nın kök hücresinde BB'nin meydana getirdiği kromozom anomalileri. (A) Normal Metafaz, (B) Anafaz köprüsü, (C) Kromozom kırılması, (D) Kromozomlarda yanlış ayrılma, (E) Mikronükleus, (F) Düzensiz metafaz, (G) Kromozom halkalanması, (H) Kromozom parçaları, (I) Gecikmiş anafaz, (İ) Anafazda yapışma, (J) Kümelenmiş kromozom, (K) Kromozom kaybı, (L) Çok kutuplu anafaz, (M) C-mitoz, (N) Çoklu nükleer lezyon.....177
- Şekil 3.3.** 72 saatlik sürede artan dozlarda SY ve BB'ye maruz bırakılan *A. cepa* kök dokusunda FRAP ve TEAC sonuçları..... 200
- Şekil 3.4.** Farklı konsantrasyonlarda (A) SY ve (B) BB ile muamele edilen *A. cepa* köklerinin histokimyasal boyama ile canlılığının gösterilmesi. 21
- Şekil 3.5.** 72 saat süreyle artan dozlarda uygulanan SY'nin *A. cepa*'nın kök hücrelerinin DNA'sına etkisinin Komet analizi... 222
- Şekil 3.6.** Artan dozlarda uygulanan BB'nin *A. cepa*'nın kök hücrelerinin DNA'sına etkisinin Komet analizi..... 222
- Şekil 3.7.** (A) BB ve (B) SY'nin artan dozlarıyla muamele edilen *A. cepa*'nın kök hücrelerindeki OPC-20 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantları.. 244

KISALTMALAR

BB	: Brilant Blue
SY	: Sunset Yellow
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
ADI	: Kabul Edilebilir Günlük Doz
MI	: Mitotik İndex
RAPD	: Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FRAP	: Demir Azaltıcı Antioksidan G
TEAC	: Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
WHO	: Dünya Sağlık rgt

1. GİRİŞ

Çevresel faktörlerin, insan sağlığına önemli ölçüde etkisi olduğu bilinmektedir. Çeşitli biyolojik sorunlara ve hastalıklara öncü olan; bilmeyerek maruz kaldığımız birçok sentetik veya doğal kimyasal maddeler bulunmaktadır. Günümüzde endüstriyel alanların artması ile meydana gelen çevre kirliliği, kimyasal maddelere maruz kalma olasılığını arttırmaktadır. Kimyasal maddelerin artışı ile oluşan toksik etkiler, insan sağlığını tehdit eden sorunlar doğurmaktadır [1]. Bu çalışmada, gıdalarda sıkça kullanılan katkı maddelerinin zararlı etkilerini ortaya koymak için bazı gıda boyaları belirlenmiştir. Bu doğrultuda gıda boyası olarak kullanılan Brillant Blue ve Sunset Yellow'un toksik etkiye sahip olup olmadığı, *Allium cepa* L. kök ucu meristem hücreleri üzerinde araştırılmıştır.

1.1. Gıdalarda Bulunan Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri; tüketime sunulacak olan gıdaların renk, lezzet ve görünümünü cazip kılmak ve bozulmasını önleyerek raf ömrünü uzatmak amacıyla ilave edilen maddelere denilmektedir [2].

Gıda katkı maddeleri, gıdaların vitamin ve besin değerini arttırmak, tadını, rengini ve görünüşünü değiştirmek amacıyla kullanılır. Bu maddeler üretim, işletme, paketlenme ve depolama gibi süreçlerde besinlere eklenmektedir [3].

Gıda katkı maddeleri, sentetik veya doğal maddeler olarak 2 gruba ayrılır. Gıdaların mikrobiyolojik, kimyasal ve enzimatik değişiklikleri gıda koruyucuları tarafından engellenmektedir [4]. Doğal boyaların yanı sıra sentetik boyalar, pH, mikrobiyal kontaminasyon ve düşük üretim maliyeti gibi nedenlerden dolayı yüksek kullanım alanlarına sahiptir [5, 6].

Gıdalarda kullanılan katkı maddeleri, üreticiler için olumlu etkiler gösterse de tüketiciler için aynı şey söylenememektedir. Kullanılan bazı katkı maddeleri sürekli veya yüksek dozlarda tüketildiği takdirde çeşitli hastalıklara zemin oluşturmaktadır. Katkı maddesi kullanılan gıdalar, uzun süre raflarda bekletildiği için toksik etkilere zemin hazırlamaktadır [7].

Katkı maddelerinin kullanımı ile tarihsel süreç incelendiğinde en eski yöntemlerin tuz ve odun tütsüsü olduğu anlaşılmaktadır. Gıda boyalarının eski Mısır tarihinden itibaren kullanıldığı görülmektedir. Geçmiş tarihlerde, etlere nitrat konularak botulizmin önlenmesi sağlanmış ve etin renginin daha sağlıklı bir görünüme sahip olması istenmiştir [1].

Yeni ve gelişmiş teknolojinin getirmiş olduğu üretim teknikleri ürün çeşitliliğinde artış sağlamıştır. Mevsimlik gıdaların her dönemde elde edilmesi, ürünlerin raf ömrünün uzatılması, tüketim oranlarının artmasına sebep olurken, gıda katkı maddelerinin kullanımını da arttırmıştır [8]. Gıdalarda kullanılan katkı maddelerinin cinsi ve ölçüsü sağlık kuruluşları tarafından belirlenen ölçülerde kullanılmalıdır [3].

Katkı maddelerinin belirli bir kısmı doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Diğer kısmı ise doğada bulunmayıp, insanlar tarafından sentezlenmektedir. Katkı maddelerini sentetik olarak elde etmek ekonomiktir ve her zaman istenilen kalitede temin edilebilmektedir. Katkı maddelerinin doğal kaynaklı veya sentetik olması katkı maddesinin sağlıklı veya zararlı olup olmadığının göstergesi değildir [8].

1.1.1. Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Katkı maddelerinin kullanımlarına göre üç sınıfta toplanmaktadır [9];

1. Raf ömrünü uzatmak için kullanan koruyucular;
 - Antioksidanlar.
 - Antimikrobiyaller.
2. Gıda yapısını düzenleyenler;
 - Tortulanmayı önleyenler.
 - pH ayarlayıcılar.
 - Emülsifiyeler.
 - Nem ayarlayıcılar.
 - Olgunlaştırıcılar.
 - Parlaticılar.
 - Dolgu maddeleri.
 - Tatlandırıcılar.

3. Renk ve aroma ekleri;

- Aroma maddeleri.
- Renklendiriciler.
- Besin değerini geliştiriciler.
- Vitamin ekleri.
- Besin değerini koruyucular.

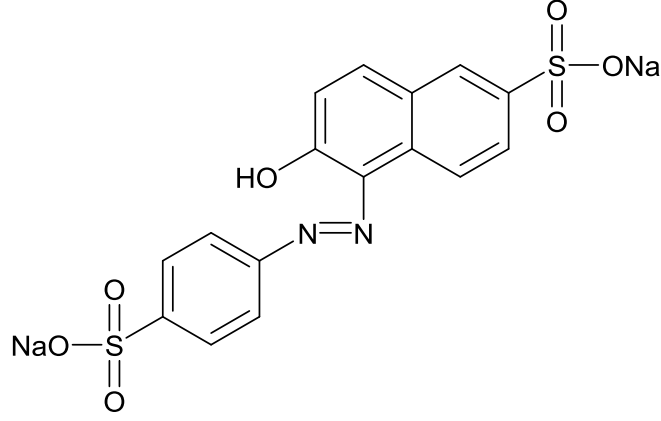
Katkı maddelerinin çok fazla sayıda olmasından dolayı; amaçlarına, içeriklerine ve kullanım şekillerine göre sınıflandırılmaktadır.

Tablo 1.1. Katkı maddelerinin sınıflandırılması [10].

Renklendiriciler	E100-200
Koruyucular	E200-300
Antioksidanlar	E300-400
Emülsifiyer ve Stabilizatörler	E400-500
Muhtelif fonksiyonlar	E500-600
Lezzet artırıcı ve koku verenler	E600-700
Geniş amaçlı gıda katkı maddeleri	E900-1000
Tatlandırıcılar	E1400-1500
Yapay lezzet çözücüler	E1500-1525

1.2. Brilliant Blue Boyasının Özellikleri

Brillant Blue (BB), ABD’de kişi başına düşen günlük kullanım miktarı 16 mg değerinde olduğu bilinen ve suda çözüldüğünde parlak mavi renk veren bir gıda boyasıdır. Kimyasal formülü $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$ olup; suda çözünebilir ve mavi-mor renkli toz halinde bulunur. BB, katkı maddesi, gıda koruyucuları olarak gıda teknolojisinde en fazla kullanılan katkı maddelerinden biridir. BB, dondurmalarda, hazır çorbalarda, buzlu yiyeceklerde, kuruyemişlerde ve ayrıca renklendirici madde



Şekil 1.2. Sunset Yellow'un açık formülü [14]

Gıda koruyucuları olarak gıda teknolojisinde en fazla kullanılan katkı maddelerinden biri olan SY sentetik bir boyadır. Günlük kullanımda kabul edilebilirlik miktarı vücut ağırlığına göre 2,5 mg/kg'dır. Kullanım alanları ise; bazı şurup cinsi ilaçların üretiminde, unlu gıdalarda, pasta ve tatlı imalatında kullanılır. Bunun yanı sıra günlük gıdalardan çerezler, dondurmalar, içecekler, hazır çorba ve konserve balıklarda kullanılmaktadır.

SY'nin fazla tüketimi sonucunda karın ağrısı, bulantı, kusma, halsizlik ve iştahsızlık gibi etkiler görülmektedir. Vücudun maruz kaldığı doza bağlı olarak burun akması, burun tıkanıklığı, alerji, hiperaktivite, böbrek tümörü ve kromozom bozukluklarına yol açabilmektedir.

Katkı maddelerinin kullanım miktarı arttığında hastalıkların görülme olasılığı yükselmektedir. Bu hastalıkların başında alerji ve kanser gelmektedir. Katkı maddelerinin kullanımı, çeşitli alerjik problemleri beraberinde getirmekte ve özellikle alerjik bünyelerde ve aspirin duyarlılığı olan kişilerde daha fazla risk taşımaktadır. Katkı maddelerinin tetiklediği hastalıklar [9, 15];

- Dikkat bozukluğu.
- Astım.
- Hiperaktivite sendromu.
- Gelişimsel bozukluk.
- Enüresis.

- Davranış bozuklukları.
- Depresyon ve durum değişiklikleri.
- Göz problemleri.
- Kulak, baş ve mide ağrısı.
- Migren.
- Cilt problemleri.
- Uyku problemleri.

1.4. Güvenlik Sınırı

Güvenlik sınırı, günlük olarak tüketilmesine müsaade edilen ve tüketildiği zaman sağlık açısından bir problem yaratmayan maddenin miligram düzeyindeki değeridir. Uluslararası tanımlamalarda ADI (Acceptable Daily Intake) yani kabul edilebilir günlük doz, kullanılabilir değerleri içermektedir [9]. Doğada bulunan her madde yüksek dozlarda kullanıldığı zaman zehir etkisi gösterebilir. Doz miktarı; çocuklar, gebeler ve hasta kişiler dikkate alınarak, güvenlik sınır değerlerinin düşük tutulması gerekmektedir. Bunun dışında, maddelerin özelliklerine, toksik etkilerine ve kullanımına göre değişiklik göstererek ayarlanması gerekmektedir [15].

Katkı maddelerinin tüketimi ile ilgili Joint Expert Committee for Food Additives (JECFA) Kurumu, kontrollü deneyler yaparak günlük alım miktarını belirlemektedir. Katkı maddelerinin kullanımını JECFA Kurumu tarafından belirlenen formül ile hesaplanmaktadır;

Günlük Maksimum Alım = ADI x Vücut Kütlesi (kg)

JECFA, katkı maddelerinde çapraz buluşma, etkisiz doz ve doğal toksinler gibi araştırmalar yapmakta ve bu katkı maddelerini sınıflandırmaktadır. İnsanlarda günlük alım miktarı mg/kg olarak belirlenmiştir [10].

Son yıllarda birçok çalışma, gıda katkı maddelerinin sitotoksik, kanserojen, mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur [13, 16].

Bazı gıda katkı maddelerinin kan ve dokularda genotoksisite oluşturduğu yaygın olarak bilinmektedir ve bu nedenle toksisitesi nedeniyle bazı gıda katkı maddeleri

yasaklanmıştır ancak hepsinin toksik olup olmadığı bilinmemektedir [5, 17]. WHO [18] benzoatın bazı hayvanlar için tehlikeli olduğunu göstermiştir. Sodyum sülfid ve sodyum benzoat, *Vicia faba* köklerinde DNA ipliklerini ve kromozom yapısını parçalamaktadır. Dönbak ve ark. [17] borik asidin *A. cepa*'ya toksik olduğunu, mitotik anormallikler yarattığını ve hücrenin mitotik indeksini (MI) değiştirdiğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, bazı gıda katkılarının sadece en yüksek konsantrasyonda zararlı etkilere sahip olduğunu ve insan erkek üreme hücrelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir [13].

1.5. *Allium cepa* ile İlgili Genel Bilgi

Allium cepa testi; hassas, hızlı ve üzerinde çalışılması kolay olup, (WHO) tarafından onaylanmış bir testtir [19, 20].

A. cepa'nın test amaçlı kullanımı, ilk kez 1938'lerde ortaya atılmıştır. İlk uygulama işlemi ise 1985 yılında yapılmıştır [21, 22]. *A. cepa* ile 1985 tarihinden itibaren çok çalışma yapılmıştır ve halen test materyali olarak kullanılmaktadır.

A. cepa, genel olarak maliyeti düşük ve temini kolay olduğu için laboratuvar çalışmalarında sıkça tercih edilen bir materyaldir. Ayrıca laboratuvar şartlarında kolayca çimlendirilebilir ve kolayca elde edilebilir bir materyaldir. Kromozomlarının büyük olması mikroskop görüntülemeye avantaj sağlamaktadır. Çimlendirme işlemi ve kök elde etme süresi kısa olup; bölünme hızının yüksek oluşu çalışmalarda kolaylık sağlayan, tercih edilen ve tekrarlanabilirliği kolay bir materyal olarak yer almasını sağlamıştır [23].

A. cepa, çevre kirliliği için bir biyoindikatör olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Çevresel kirlenmelerin toksik etkilerini değerlendirmek için *A. cepa*'nın in vivo bir model olarak seçilmesinin nedenleri ise şunlardır [23]:

- Kökleri kimyasal maddelerden etkilenebilir.
- Belli sayıda kromozom ve karyotipe sahiptir.
- Açık bir mitotik faz gösterir.
- Spontan kromozom hasarlarının oluşumu nadirdir.
- Genotoksik maddelere hızlı tepki gösterir.

- Kromozomal morfolojisinin çeşitliliğini sergiler.
- Düşük maliyetli bir test materyali olarak kabul edilir.

Genotoksik etkiler, DNA üzerinde hasara neden olan etkilere dir. DNA üzerinde oluşan hasarlar, kansere sebebiyet verebilmektedir [24]. Kromozom anomalileri de üreme, gelişim gibi yaşamsal olaylara etki göstermekte ve kanser oluşumuna sebep olabilmektedir [25].

Mitotik indeks (MI), hücre döngüsünde, toplam bölünen hücrelerin sayısını ifade etmektedir. Toplam hücre sayısındaki artma veya azalma olayları ile kimyasal maddelerin sitotoksik etkisi belirlenebilmektedir [19].

Kromozom anomalileri ve mitotik indeks testleri, *A. cepa* gibi yüksek yapılı bitkilerde yapılabilmektedir. *A. cepa* kromozom hasarlarının ve mitotik indeksin belirlenmesi için önemli bir bitkidir [19, 20].

ABTS/TEAC yöntemi, ABTS (2,2'-azinobis-3-Etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) oksidasyonunu içeren, ABTS radikal solüsyonuyla sonuçlanan ve en yaygın kullanılan antioksidan aktivite ölçüm yöntemidir. Antioksidan içeren numuneler, radikal ilavesi ve 600-750 nm dalga boyunda tayin edilen mavi/yeşil renk oluşturur. Referans sonucu, trolox değerine göre hesaplanır ve eşdeğer antioksidan kapasite olarak ifade edilir [26]. Bu yöntem, hem biyolojik sıvıya hem de gıdaya uygulanabilir niteliktedir [27].

FRAP yöntemi nispeten basit bir yöntem olup, bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesindeki değişimini göstermek için kullanılmaktadır [28].

Prokaryotik ve ökaryotik organizmalara, DNA hasarını oluşturan birçok ksenobiyotik ve bazı serbest radikaller verilmiştir ve oluşan hasar, genellikle DNA'daki tek iplikli ve/veya çift iplikli kopmalar şeklinde elde edilmiştir [29]. Bu teknik, DNA hasarının tahmini için çok hassas ve çok hızlıdır. Genotoksik etki gösteren ajanlar; kardeş kromatid değişimi, mikronükleus, hücre ölümü ve mutasyonlara neden olan karsinogeneze veya kromozomal sapmalara neden olabilmektedir [30].

RAPD-PCR (Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA) genellikle moleküler araç olarak genotoksisite değerlendirmesi için kullanılır. RAPD yöntemi, hem bitki hem de hayvan gıdalarındaki toksisite etki çalışmalarını üzerine birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır [31].Aksakal ve ark. [32] 2,4-D herbisitinin RAPD analizi ile mısır kökünde genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Tedeschi ve ark. [31] belirli alanlarda yetiştirilen Tropea kırmızı soğanı (*A. cepa*) karakterize etmek için RAPD analizini kullanmışlardır.

Tripathy ve Rao [33] gıda boyası olan Orange Red'in genotoksik etkisini *A. cepa* bitkisi üzerinde çalışmışlardır. Çalışma sonucunda, metafaz ve anafazdaki kromozomal kodlarda yoğunlaşmalar, eşit olmayan sitokinez, karyokinez ve çift çekirdekli hücreler belirlenmiştir. Bezerra ve ark. [34] toz meyve sularının *A. cepa* bitkisi üzerindeki etkisini çalışmışlar ve bu çalışma sonucu mitotik iplik tahribatı ve mikronükleus oluşumunu gözlemlemişlerdir.

Türkoğlu [35] katkı maddelerinden monosodyum fosfat, disodyum fosfat ve trisodyum fosfat genotoksik ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, katkı maddelerinin DNA içeriğinde zararlara neden olduğu gözlemlenmiş ve kromozomal anormallikler saptanmıştır.

Bununla birlikte, SY ve BB'nin *A. cepa* üzerindeki fizyolojik süreçler üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu çalışmada, *A. cepa*'da SY ve BB'nin EC₅₀ konsantrasyonları, hücre ölümleri, kromozom aberasyonları, mitotik indeks değişimi, antioksidan kapasitesi, DNA hasarı ve RAPD-PCR analizi ilk kez belirlenmiştir. Kullanılan bu parametreler BB ve SY'nin toksik etkisini belirlemek üzere birbirini tamamlayıcı niteliktedir. Bu nedenle, bu çalışmada *A. cepa* kök hücrelerinde SY ve BB toksisitesinin neden olduğu genotoksik, sitolojik ve mutajenik değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. EC₅₀'nin Belirlenmesi

Yerel bir pazardan temin edilen *A. cepa* (Yozgat/Türkiye *A. cepa*, 2n=16) uygun popülasyonda yetiştirilmiş ve botanik analizle (botanik taksonomisi) standartlaştırılmıştır. Soğanlar temizlendikten sonra, 24 saat boyunca damıtılmış su ile doldurulmuş test tüpünde bekletilmiştir. Kök büyüme inhibisyonu için (% inhibisyon=büyüme/toplam büyüme X 100) Fiskesjö'nun (1985) metodu kullanılmıştır [22]. Bir gün sonra oda sıcaklığında EC₅₀ değerlerini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda SY ve BB test tüplerine ilave edilmiştir. Üç günlük etkiden sonra her soğandan kök ucu kesilmiş ve kök uzunluğu ölçülmüştür. Kök büyümesi kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %50 düşüren doz, EC₅₀ konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. 1/2x EC₅₀, EC₅₀, 2x EC₅₀ ve 500 ppm SY ve BB konsantrasyonları olarak belirlenmiş ve *Allium testi* için hazırlanmıştır.

2.2. Sitogenetik Etki ve Mitotik İndeks (MI) Tayini

Kontrol ve uygulama grupları için altı soğan seçilmiş ve 24 saat test tüplerinde çimlendirilmiştir. 1/2x EC₅₀, EC₅₀, 2x EC₅₀ ve 500 ppm dozlarında ve aynı laboratuvar koşullarında 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulama yapılmıştır. Güneşli günlerde maksimum mitotik aktivite periyodunda 1-2 cm kök alınmıştır ve etanol: glasiyal asetik asitte (3:1) soğutulmuş Carnoy fiksatifinde 24 saat süreyle bekletilmiştir. Daha sonra 7 saat süreyle 60 °C'de 1 N HCl'de hidrolize edilmiştir [22]. Sitogenetik değerlendirme için asetokarminde 4 saat tutularak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hasarlı ve toplam hücreler, mikroskop altında 40x'lık objektif ile (Olympus BX53 DP72) altı farklı preparat olmak üzere incelemeye alınmıştır.

Mitotik indeksi (MI) belirlemek için her bir konsantrasyon için yaklaşık 5,000 hücre sayılmıştır ve daha sonra %MI aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\%MI = \text{Bölünen hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı} \times 100 \text{ formülasyonu}$$

2.3. FRAP (demir azaltıcı antioksidan güç) ve TEAC (Troloks eşdeğer antioksidan kapasite) testleri

Kök ucu hücrelerinin redüksiyon kapasitesi, Benzie ve Strain (1996) 'ın FRAP analiz yöntemi ile ölçülmüştür [36]. FRAP analizi, renksiz oksitlenmiş Fe^{III} formundan, antioksidanların elektron vererek mavi renkli Fe^{II}-tripiryridiltriazine bileşiğinin üretilmesine dayanılarak 593 nm'de absorbanın değişimi ile belirlenmektedir. Yeni hazırlanmış FRAP reaktifi (1 hacim TPTZ 2,4,6-tripiridil-s-triazin, 10 hacim asetat tamponu, pH=3,6 hidroklorid asit ve 1 hacim ferrik klorür ile) 37 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra, örnekler FRAP reaktifine eklenerek 593 nm absorbanın ölçümleri alınmıştır.

TEAC analizi, ABTS^{·+} radikalinin 734 nm dalga boyunda inhibisyonuna dayanmaktadır [37]. ABTS stok solüsyonunun potasyum persülfat ile reaksiyona sokulması ve karışımın 25 °C'de kullanılmadan önce 12-16 saat boyunca karanlıkta bekletilmesiyle oluşturulmuştur. Bu çalışmada, ABTS çözeltisi, pH=7.4 fosfat tamponu ile 734 nm'de 0.70 bir absorbanı tabii tutulmuştur. Ardından, seyreltilmiş ABTS çözeltisine biyolojik numuneler eklenmiştir ve bu karışım 6 dakika, 30 °C'de inkübe edilmiştir. Absorpsiyon, 734 nm'de doku numuneleri için ilk karıştırılmadan sonra gözlemlenmiştir. Bu analizler Shimadzu UV 1800 spektrofotometre (Kyoto, Japonya) ile yapılmıştır.

2.4. Canlılık Testi

Hücre ölümlerini tespit etmek için kontrol ve uygulama gruplarının eşit 10 mm uzunluğundaki kökleri, 3 ml N,N-dimetilformamid içine transfer edilmiş ve Evans mavisinin % 0.25 (w/v) sulu çözeltisi içinde 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kökler yarım saat boyunca musluk suyu ile yıkanmıştır [38]. Ölü hücrelerin ve canlı hücrelerin kök renkleri, canlılıklarına göre mavi ve mavinin tonlarında değişiklikler göstermiştir. Köklerin bu görünüşleri stereo mikroskop ile görüntülenmiştir.

2.5. Komet Testi ile DNA Hasarının Belirlenmesi

Soğan kökleri, deney tüpleri içerisinde 72 saat boyunca uygulama dozlarına maruz bırakılmıştır. Her soğandan kökler kesilmiş ve bistüri yardımıyla soğan kökleri ince

parçalar halinde doğranmıştır. Kesilen kökler 5 dk süreyle 500 rpm'de santrifüj edilmiş ve daha sonra PBS içerisinde 20 dakika dinlendirilmiştir. Elde edilen süpernatant, düşük erime ısıları agaroz (% 0.65'lik) ile karıştırılarak, hazırlanan süspansiyonun 75 µl'si düşük erime noktalı agaroz (% 0.05'lik) ile önceden kaplanan preparatlar üzerine aktarılmıştır. Elektroforez tamponunda 200 V'da 5 dk yürütülmüştür. Preparatlar, elektroforez tamponundan sonra 1 saat süreyle soğuk lizis çözeltisine aktarılmıştır [39]. Lizis çözeltisinden çıkan preparatlar 5 dk saf su içerisinde yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra preparatlar 80 µl etidyum bromür ile boyanmıştır. Boyama sonrası görüntü analizi (BS 200 ProP, BAB Görüntüleme Sistemi) ile BS 200 ProP kullanılarak yapılmıştır. DNA hasarını gözlemlmek için floresan mikroskopta 40x'lik objektif kullanılmıştır. Görüntüleme sonucu 50 komet hücresi için kuyruk DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti tespit edilmiştir ve gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

2.6. DNA İzolasyonu

SY ve BB uygulamasından 72 saat sonra total genomik DNA ekstraksiyonu, Qiagen DNeasy bitki mini kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak *A. cepa* köklerinden elde edilmiştir. Ekstraksiyon yöntemi kullanım talimatına göre gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler, optik yoğunluk (OD) ölçümleri, örneklenen DNA için 260 ve 280 nm'de (ACTGene Micro-Spectrophotometer) gerçekleştirilmiştir ve DNA saflığı için OD260 / OD280 kullanılmıştır. A260 / A280 oranı DNA saflığını ve 1.8-2.0 değerleri "saf DNA" yı göstermektedir [40].

2.7. RAPD-PCR Yöntemi

Kontrol ve uygulama gruplarının ekstraksiyonu ve genomik total DNA'nın PCR uygulamaları, Per ve Ercan'ın [40] çalışmasına göre gerçekleştirilmiştir. 1.5 µL 10x PCR tamponu ((NH₄)₂ SO₄, Fermentas), 0.5 µl 10mM dNTP (Thermo), 2 µl rastgele primer seçilmiştir [10 µM, OpC 20 (5'→3'ACTTCGCCAC)]. 0.25 µl Taq Polimeraz (5 U/µl, Fermentas), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM stok solüsyonu, Fermentas), 1.2 µl BSA (10 mg/ml) ve son hacim 15 µl'ye distile su ile tamamlanmıştır [31]. PCR koşulları: Başlangıç denatürasyonu 94 °C 1 dk, denatürasyon 72 °C 30 sn, primer bağlanma 37 °C 1 dk, uzama 72 °C 1 dk, son uzama 72 °C 5 dk (RAPD-PCR 45 döngü şeklinde

yapılmıştır). PCR ürünleri % 1'lik agaroz jel (Tris asetik asit EDTA- μ l EtBr) ile 250 V 1 saat yürütülmüştür ve DNA bant profilleri jel syngene cihazı altında görüntülenmiştir.

2.8 İstatistik

Elde edilen tüm veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve istatistiksel önemi belirlemek için Tukey testi ile hesaplanmıştır. Ortalama değerler için standart sapma (SD) kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi için $p < 0.05$ seçilmiştir. Tüm ölçümler üçer kez yapılmış olup, sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.



3. BULGULAR

SY ve BB'nin sitotoksik aktivitesi için *Allium test* sistemi kullanılmıştır. SY ve BB'nin etkisi, 72 saat boyunca kök büyümesine göre belirlenmiştir. SY ve BB'nin 50 ve 200 ppm konsantrasyonu için elde edilen sonuçlar, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kök uzunluğunu yaklaşık % 50 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Artan dozlara ve sürelerle bağlı olarak kök gelişimi olumsuz etkilenmiş, diğer bir deyişle kök büyümesinin azaldığı görülmüştür. SY ve BB uygulama grupları ile kontrol grupları kök büyümesi açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 3.1.).

SY uygulama gruplarında 72 saat sonunda farklı tipte kromozomal bozulmalar belirlenmiştir. Bu anomaliler, çoklu nükleer lezyonlar, anafazda yapışma, düzensiz metafaz, C-şekilli metafaz, kromozom köprüsü, kromozom kayması, kromozomlarda yanlış ayrılma, C-mitoz, diyagonal anafaz, mikronükleus, anafaz köprüsü, dağınık kromozom, çok kutuplu anafaz, kromozom halkalanması olarak tespit edilmiştir. BB uygulama gruplarında ise, anafaz köprüsü, kromozom kırılması, kromozomlarda yanlış ayrılma, mikronükleus, düzensiz metafaz, kromozom halkalanması, kromozom kayması, gecikmiş anafaz, anafaz yapışması, kümelenmiş kromozom, kromozom kaybı, çok kutuplu anafaz, C-mitoz gibi kromozomal değişimler elde edilmiştir (Tablo 3.1, Şekil 3.1 ve 3.2).

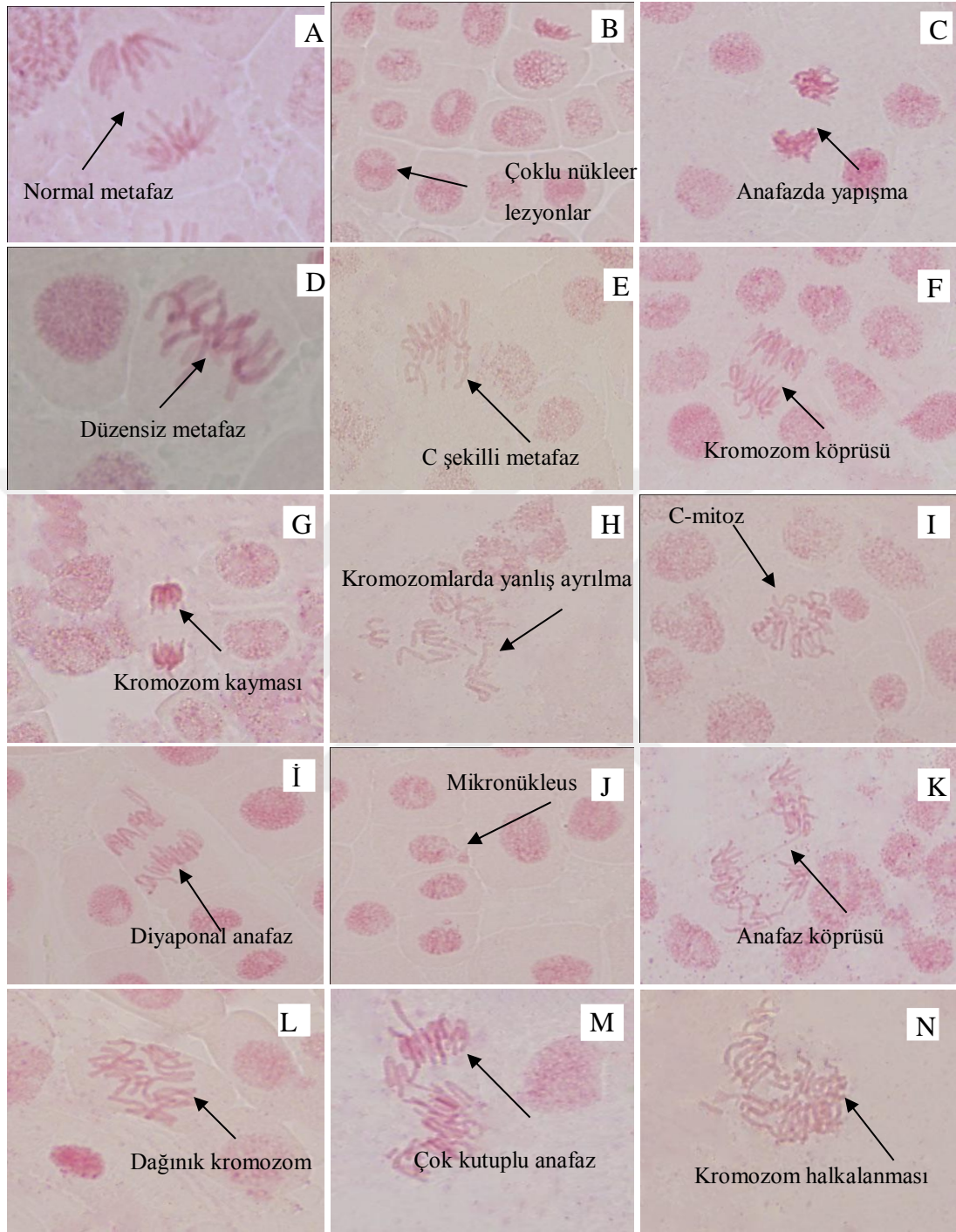
EC_{50} (50 ppm) uygulanan SY gruplarında % 31.7'lik anomaliler 72 saatlik uygulama sonucunda elde edilirken, EC_{50} (200 ppm) uygulanan BB gruplarında % 29.6 anomali elde edilmiştir (Tablo 3.2).

A. cepa kök meristem hücrelerinin (%) MI kontrol ve uygulama gruplarında belirlenmiştir. MI, kontrol grubuna kıyasla maruziyet sürelerine bağlı olarak SY ve BB uygulama grubunun farklı konsantrasyonlarında belirgin şekilde azalmıştır. SY ve BB'nin en düşük % MI değerleri, 500 ppm'lik 72 saatlik uygulamalarında sırasıyla 6.81 ± 0.09 ve 7.31 ± 1.85 olarak elde edilmiştir (Tablo 3.2).

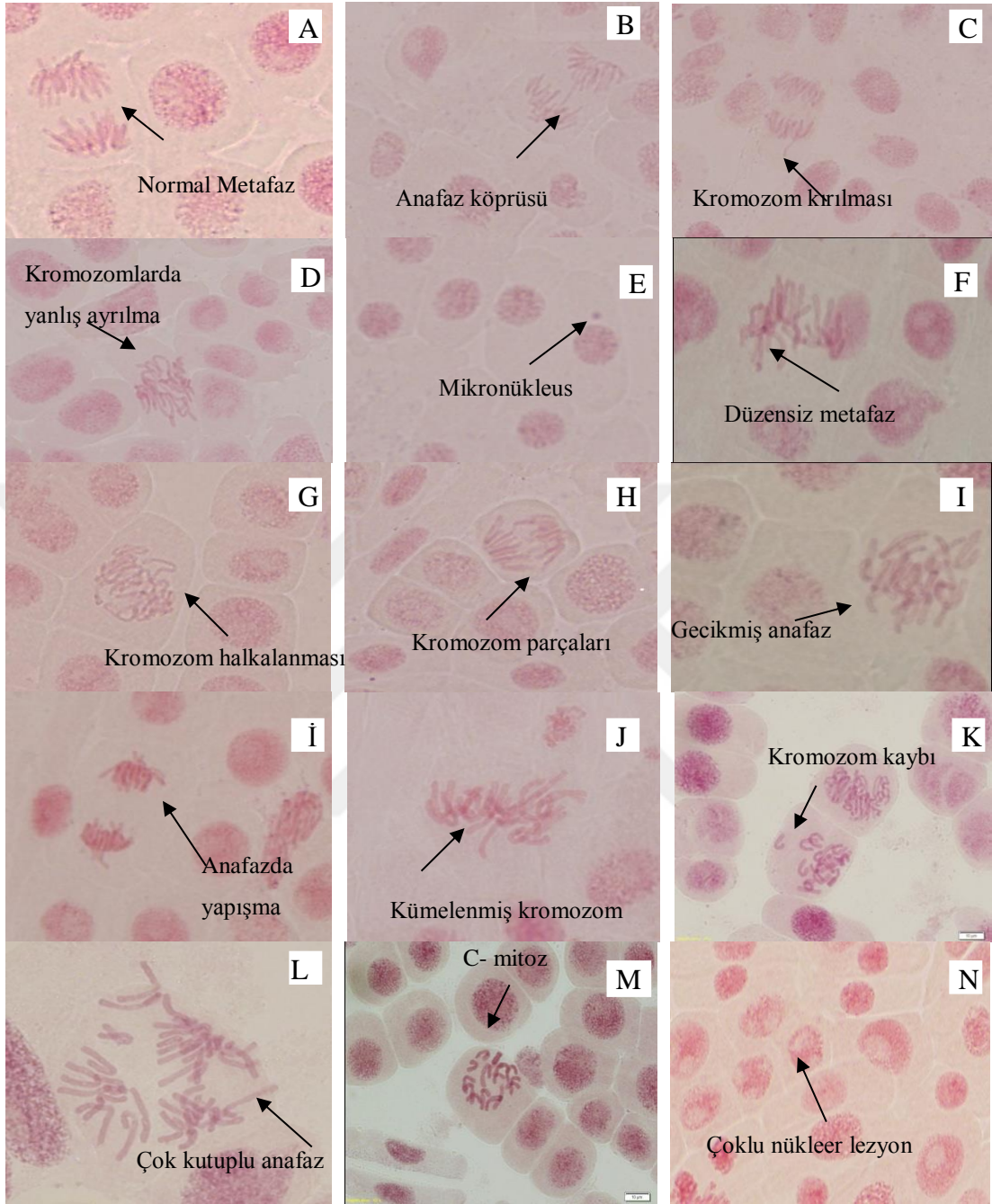
Tablo 3.1. Artan dozlarda uygulanan SY ve BB'nin kontrol ve uygulama gruplarında kök büyüme inhibisyon testi

Gıda Katkı Maddeleri	Konsantrasyonlar (ppm)	Zaman (s)	Kök uzunluğu ortalaması (cm) ± SD	% İnhibisyon
SY	Kontrol	72 s	5.20±1.23	-
	100		4.40±0.45*	36.53
	200		3.30±0.12*	51.92
	400		2.70±0.32*	63.46
	500		1.90±0.01*	84.61
BB	Kontrol	72 s	4.95±1.75	-
	25		4.20±1.02*	25
	50		2.80±0.03*	46.15
	100		2.40±0.05*	53.84
	500		1.30±0.01*	80.76

*SY ve BB'nin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *A. cepa* hücreleri arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir. P <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 3.1. *A. cepa*'nın kök hücresinde SY'nin meydana getirdiği kromozom anomalileri. (A) Normal metafaz, (B) Çoklu nükleer lezyonlar, (C) Anafazda yapışma, (D) Düzensiz metafaz, (E) C şekilli metafaz, (F) Kromozom köprüsü, (G) Kromozom kayması, (H) Kromozomlarda yanlış ayrılma, (I) C-mitoz, (İ) Diyagonal anafaz, (J) Mikronükleus, (K) Anafaz köprüsü, (L) Dağınık kromozom, (M) Çok kutuplu anafaz, (N) Kromozom halkalanması.



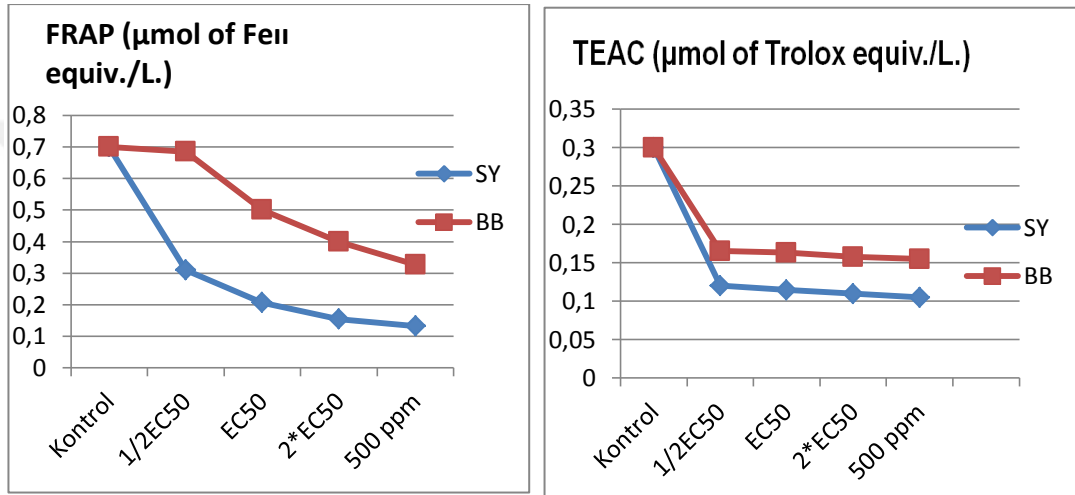
Şekil 3.2. A. *cepa*'nın kök hücresinde BB'nin meydana getirdiği kromozom anomalileri. (A) Normal Metafaz, (B) Anafaz köprüsü, (C) Kromozom kırılması, (D) Kromozomlarda yanlış ayrılma, (E) Mikronükleus, (F) Düzensiz metafaz, (G) Kromozom halkalanması, (H) Kromozom parçaları, (I) Gecikmiş anafaz, (İ) Anafazda yapışma, (J) Kümelenmiş kromozom, (K) Kromozom kaybı, (L) Çok kutuplu anafaz, (M) C-mitoz, (N) Çoklu nükleer lezyon.

Tablo 3.2. SY ve BB'nin farklı dozlarda ve sürelerde oluşturduğu kromozomal anomaliler ve mitotik indeks

SY konsantrasyo	Kontrol	Mitotic indeks	Çok kutuplu anafaz	Anafaz köprüsü	Kromozom yanlış	Mikronükleu s	Kromozom kayması	Anafazdayap ışma	Kromozom kaybı	C-mitoz	Kromozom parçaları	Toplam anomali
Kontrol-24	4200	12.84±3.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 ppm	4150	12.35±1.65*	0.3	3.2	0.6	0.1	0.1	3.8	1	2.8	0.8	12.7
50 ppm	4310	11.23±0.42*	0.6	3.6	1.2	0.3	0.3	4.4	3	4.2	1.4	19
100 ppm	4220	10.22±1.48*	0.8	5.2	2.4	0.3	0.6	6.6	5	8.2	3.2	32.3
500 ppm	4500	10.11±1.24*	1	6.4	3.6	0.6	0.7	8.8	7	15.4	4.8	48.3
Kontrol-48	4220	12.72±2.21	-	-	0.3	-	-	1.2	2	-	-	3.5
25 ppm	4300	12.12±2.63*	0.5	3.6	0.8	-	0.2	3.8	4	3.2	1.2	17.3
50 ppm	4220	10.58±1.29*	1.2	4.2	1.6	0.3	0.6	4.6	5	4.2	1.6	23.3
100 ppm	4350	9.75±1.45*	1.8	5.6	2.8	0.4	0.8	6.8	6	8.8	3.8	36.8
500 ppm	4400	8.89±0.03*	2.6	8.8	4.2	0.5	0.8	9.2	8	17.4	5.6	57.1
Kontrol-72	4300	12.50±2.45	-	-	1.2	-	-	1.6	2	-	-	4.8
25 ppm	4250	10.34±1.85*	0.8	4.8	1.8	0.2	0.4	4.2	5	3.4	1.3	21.9
50 ppm	4400	9.10±2.78*	1.6	6.8	3.2	0.5	0.8	5.4	6	4.6	2.8	31.7
100 ppm	4350	8.11±3.26*	2.8	9.2	4.8	0.7	1.2	9.2	10	9.2	4.2	51.3
500 ppm	4500	6.81±0.09*	3.8	12.2	5.4	0.9	1.8	12.2	13	18.6	6.4	74.3

BB konsantrasyonları (ppm)	Kontrol	Mitotic endeks %±SD	Çok kutuplu anafaz	Anafaz köprüsü	Kromozom sonu	mikronükleus	Kromozom sapması	Yapışkan anafaz	Kromozom kaybı	C-mitoz	Kromozom parçalanması	Toplam anomali (%±SD)
Kontrol-24	4310	13.72±3.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 ppm	4305	12.50±2.56	0.3	2.8	0.8	0.1	0.2	3.8	2	2.6	0.8	13.4
200 ppm	4300	12.12±2.15	0.5	3.2	1.2	0.2	0.4	4.2	3	3.8	1.2	17.7
400 ppm	4350	11.90±2.36	0.8	4.8	2.2	0.3	0.6	6.2	5	8.2	2.8	30.9
500 ppm	4300	11.11±1.02	0.9	6.2	3.4	0.5	0.6	8.6	6	14.4	4.8	45.4
Kontrol-48	4200	13.74±2.20	-	-	0.2	-	-	1.2	1	-	-	2.4
100 ppm	4220	12.14±3.25	0.3	3.2	0.8	-	0.2	3.4	3	2.8	0.8	14.5
200 ppm	4225	11.10±2.55	0.8	3.8	1.4	0.2	0.6	4.6	3	3.8	1.4	19.6
400 ppm	4260	9.95±1.45	1.8	5.2	2.6	0.4	0.8	6.6	5	8.6	3.2	33.2
500 ppm	4250	8.13±1.22	2.4	8.4	3.4	0.6	0.8	8.8	8	16.4	5.2	53.4
Kontrol-72	4320	13.96±3.28	-	-	0.8	-	-	1.4	1	-	-	3.2
100 ppm	4300	10.13±2.41	0.6	4.6	1.4	0.2	0.4	3.8	4	2.8	1.2	19
200 ppm	4350	9.09±2.36	1.4	6.8	2.8	0.4	0.6	4.6	6	4.2	2.8	29.6
400 ppm	4300	8.18±1.97	2.4	8.6	4.2	0.6	0.8	8.2	8	8.8	3.6	45.2
500 ppm	4320	7.31±1.85	3.8	10.2	4.8	0.8	1.2	10.2	10	16.6	6.4	64

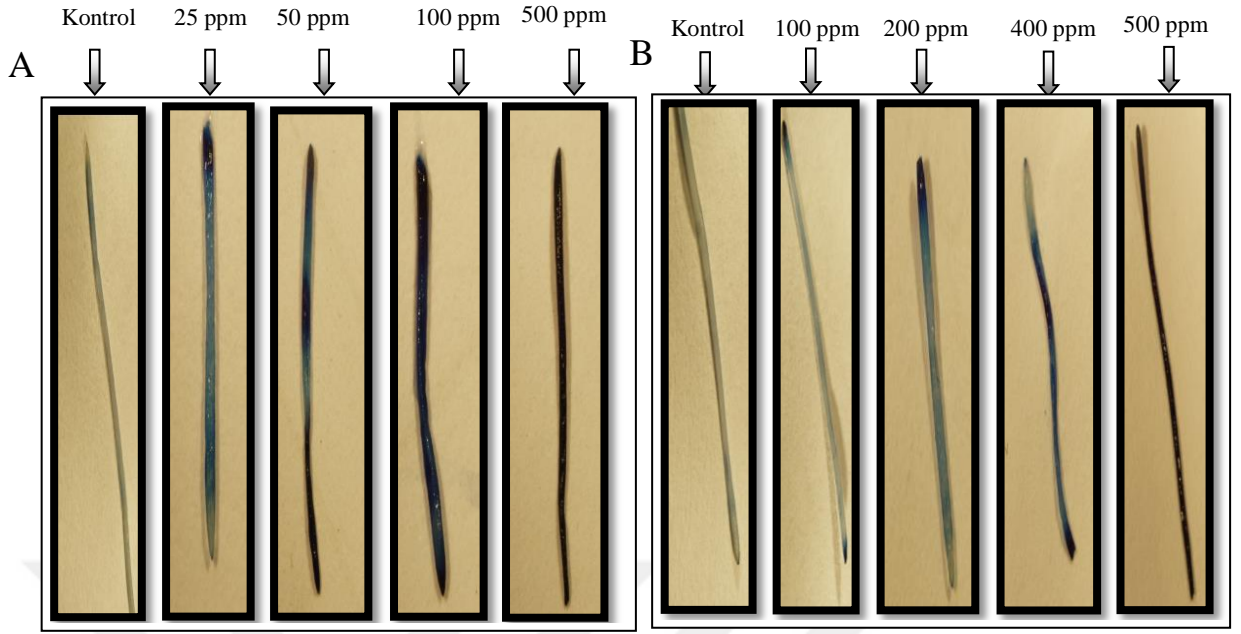
Soğan köklerinin antioksidan kapasite değişimlerini belirlemek için kontrol ve uygulama gruplarının FRAP ve TEAC değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 3.3'te gösterilmiştir. *A. cepa* köklerinin antioksidan kapasitesi FRAP ve TEAC yöntemlerine göre, BB ve SY'nin uygulama gruplarında, kontrol grubuna kıyasla azalma göstermiştir. SY uygulanan grup ile BB uygulanan grubu karşılaştırdığımızda, SY uygulanmış gruptaki FRAP ve TEAC değerleri, 72 saat boyunca BB grubuna göre daha düşük olarak bulunmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. 72 saatlik sürede SY ve BB'nin artan dozlarına maruz bırakılan *A. cepa* kök hücrelerinin FRAP ve TEAC sonuçları.

Ölü hücrelere boyanın nüfuz etmesi temeline dayanan hücre ölümünü tespit etmek için Evans mavisini ile boyama yöntemi kullanılmıştır. SY ve BB uygulanan grupla, kontrol gruplarındaki kök hücrelerinin canlılık analizi bu yöntem ile belirlenmiştir. Kökler boyaya maruz kaldıklarında köklerin yoğun renkte boyanması için beklenmiştir. Canlı olmayan hücreler, Evans mavisini emerek boyayı almış, ancak canlı hücreler bu boyayı almamıştır (Şekil 3.4). Hücre ölümü, köklerin uygulama dozlarına göre boyayı alıp almamasına göre tespit edilmiştir.

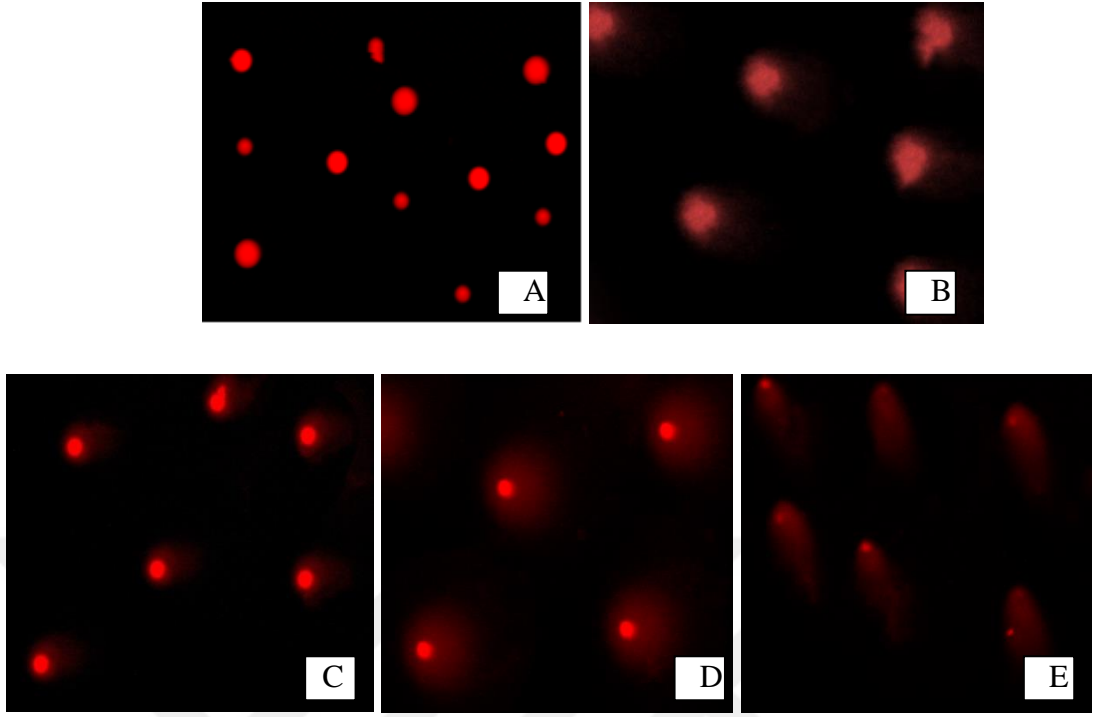
SY ve BB'ye 72 saat maruz bırakılan *A. cepa* kök meristem hücrelerindeki kuyruk DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentleri tablo 3.3, şekil 3.5 ve 3.6'da gösterilmiştir. SY ve BB uygulama gruplarının artan konsantrasyonlarına bağlı olarak çalışılan bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir artış olduğu görülmüştür.



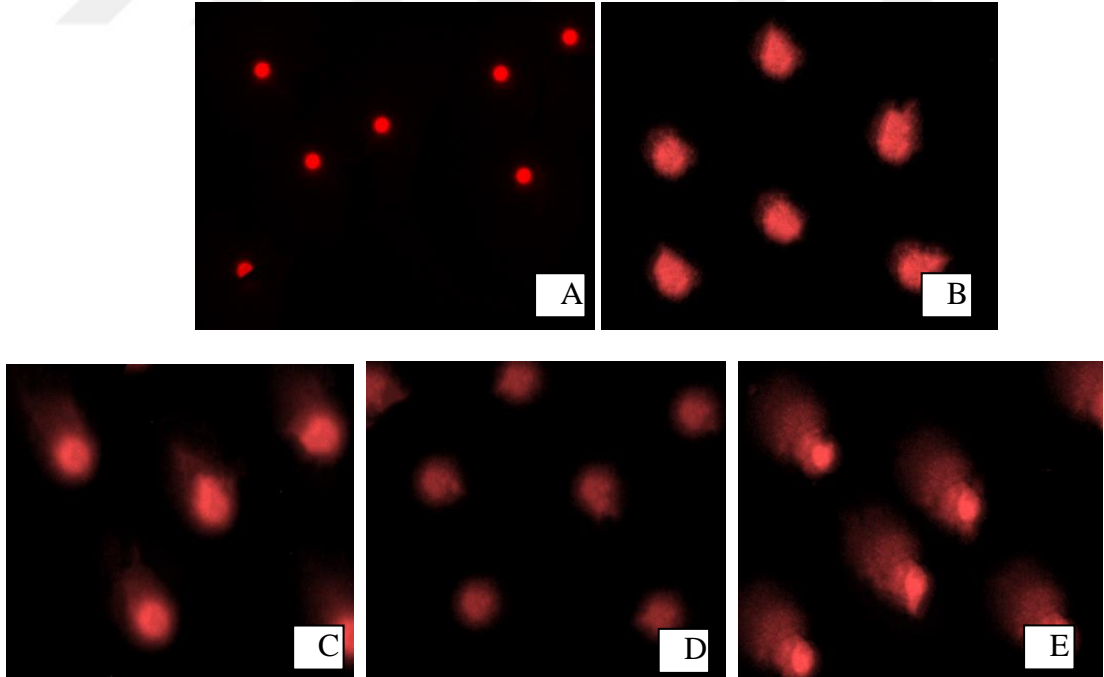
Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda (A) SY ve (B) BB ile muamele edilen *A. cepa* köklerinin histokimyasal boyama ile canlılığın gösterilmesi.

SY uygulama gruplarında, kuyruk DNA yüzdesi değerleri 50.09 ± 2.74 ile 107.33 ± 22.15 arasında; kuyruk uzunluğu değerleri 1.18 ± 0.55 ile 85.05 ± 8.75 arasında değişmektedir. BB uygulama gruplarında kuyruk DNA yüzdesi 47.64 ± 9.65 'den 95.65 ± 15.10 'a, kuyruk uzunluğu 4.79 ± 0.11 ile 69.42 ± 9.42 arasında değişmiştir ($p < 0.05$).

SY ve BB'nin artan konsantrasyonlarına göre RAPD sonuçları Şekil 3.7'de gösterilmiştir. SY ve BB'nin uygulama gruplarıyla kontrol grubu karşılaştırıldığında normal bantların kaybolduğu ve yeni bantların oluştuğu tespit edilmiştir. RAPD sonuçlarına göre SY'nin bant görünümüleri BB'ye göre kıyaslandığında bu değişimlerin daha çok olduğu tespit edilmiştir.



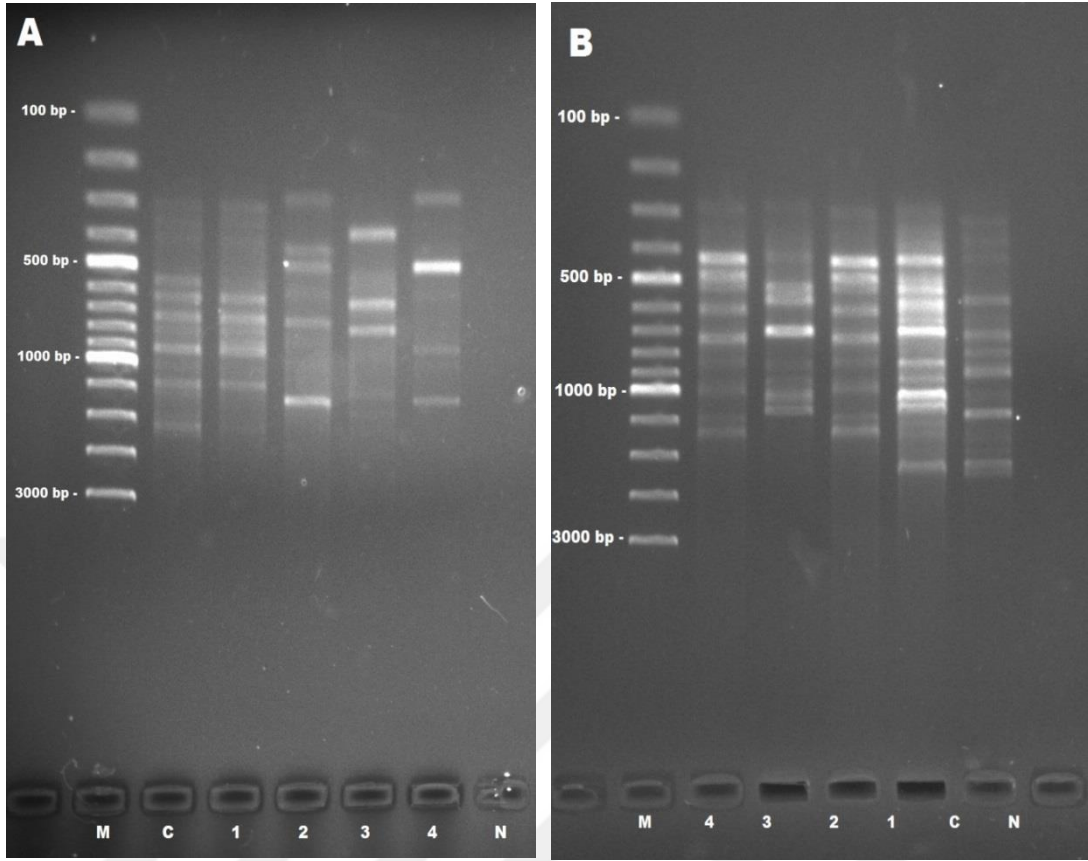
Şekil 3.5. 72 saat süreyle artan dozlarda uygulanan SY'nin *A. cepa*'nın kök hücrelerinin DNA'sına etkisinin Komet analizi. (A) kontrol, (B) 25 ppm, (C) 50 ppm, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm.



Şekil 3.6. Artan dozlarda uygulanan BB'nin *A. cepa*'nın kök hücrelerinin DNA'sına etkisinin Komet analizi. (A) kontrol, (B) 100 ppm, (C) 200 ppm, (D) 400 ppm, (E) 500 ppm.

Tablo 3.3. SY ve BB'nin artan konsantrasyonlarına maruz bırakılan *A. cepa* köklerinden alınan hücrelerde DNA hasarının (\pm SD) % DNA, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin ortalama değerleri

Farklı dozlardaki SY ve BB	Kuyruk DNA% \pm SD	Kuyruk Uzunluğu \pm SD	Kuyruk Momenti \pm SD
SY için			
Kontrol	50.09 \pm 2.74 ^a	1.18 \pm 0.55 ^a	0.59 \pm 0.01 ^a
25 ppm	63.83 \pm 5.21 ^b	8.78 \pm 2.41 ^b	5.60 \pm 0.12 ^b
50 ppm	76.63 \pm 8.32 ^c	15.84 \pm 1.20 ^c	12.13 \pm 0.09 ^c
100 ppm	93.86 \pm 11.28 ^d	59.65 \pm 3.56 ^d	55.98 \pm 0.40 ^d
500 ppm	107.33 \pm 22.15 ^e	85.05 \pm 8.75 ^e	91.28 \pm 1.93 ^e
BB için			
Kontrol	47.64 \pm 9.65 ^a	4.79 \pm 0.11 ^a	2.28 \pm 0.01 ^a
100 ppm	63.29 \pm 11.58 ^b	16.4 \pm 3.25 ^b	10.37 \pm 0.37 ^b
200 ppm	74.35 \pm 9.20 ^c	29.35 \pm 7.52 ^c	21.82 \pm 0.69 ^c
400 ppm	84.9 \pm 17.20 ^d	47.18 \pm 4.26 ^d	40.05 \pm 0.73 ^d
500 ppm	95.65 \pm 15.10 ^e	69.42 \pm 9.42 ^e	66.40 \pm 1.42 ^e



Şekil 3.7. (A) BB ve (B) SY'nin artan dozlarıyla muamele edilen *A. cepa*'nın kök hücrelerindeki OpC 20 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantları. (1) 1/2x EC₅₀ ppm, (2) EC₅₀ ppm, (3) 2x EC₅₀ ppm (4) 500 ppm, (C) Kontrol, (M) Marker, (N) Negatif.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

SY ve BB'nin etkisi, insan sağlığına olan riski ile yakından ilişkilidir. Bazı çalışmalar, bu maddelerin dokudaki birikimini ve doku hasarı oluşturmasını açıkça ortaya koymaktadır [6, 18]. Kimyasalların sitotoksik ve genotoksik etkilerini belirlemek için *A. cepa* testi hassas olup bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır [41, 42]. Ayrıca *A. cepa*, ökaryotik hücrelerin etkilerini belirlemede iyi bir korelasyon da oluşturmaktadır [22, 43]. Bu çalışmada, SY ve BB toksik kimyasallar olarak belirlenmiş olup, *A. cepa*'nın kök büyümesi, hücre ölümü, antioksidan kapasitedeki değişimi ve DNA yapısına etkisi ortaya konulmuştur.

EC₅₀ değeri etkin konsantrasyonu belirlemek için kullanılan bir parametredir. SY ve BB uygulama gruplarından alınan her bir kökün ortalama büyüme uzunluklarına göre sırasıyla EC₅₀ (50 ve 200 ppm), 2 x EC₅₀ (100 ve 400) ve 1/2 x EC₅₀ (25 ve 100 ppm) değerleri elde edilmiştir. Bu çalışmada, SY ve BB'nin soğan kök hücrelerinde olası toksik etkilerini belirlemek için EC₅₀, 2xEC₅₀, 1/2xEC₅₀ ve 500 ppm konsantrasyonları kullanılmıştır.

Bhagyanathan ve Thoppil [44] *A. cepa* köklerinde canlı ve canlı olmayan hücreleri belirlemek için *Cynanchum sarcomedium* kullanmıştır. Ölü hücreler canlı hücrelerden inkübasyon zamanına ve süresine göre farklı olarak boyanmıştır. Gıda katkı maddelerinin yüksek konsantrasyonları daha çok hücre ölümüne neden olmuştur ve Evans mavisini boyama yöntemi ile bu sonuçlar elde edilmiştir. Carlson ve Donald [45] çalışmalarında *Cirsium arvense* bitkisine verilen Glifosfat'ın artan dozlarında, bitkinin kök büyümesini azaltıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, artan konsantrasyonlardaki SY ve BB'nin, *A. cepa* köklerinde boyanma seviyeleri belirlenmiştir. Bu yöntemle göre aynı konsantrasyonda hangi gıda katkı maddesinin daha toksik olduğu ortaya konulmuştur. Altı farklı örnekte kesilen kökler, hücre ölümünün belirlenmesi için kullanılmıştır. Kök boyamaları, 72 saatlik uygulamalar içinde SY ve BB'nin artan dozlarında istatistiksel olarak artmıştır (p <0,05), ancak kullanılan konsantrasyonlara göre SY'nin BB'den daha etkili olduğu da belirlenmiştir.

Bazı çalışmalar, gıda katkı maddelerinin *A. cepa*'nın kök meristematik hücrelerinin mitotik indeksi üzerine etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Pandey ve ark. [16] butil hidroksitoluen, butil hidroksianisol, sorbik asit, propil gallat ve sodyum nitrat gibi gıda koruyucularının farklı konsantrasyonlarda ve maruz kalma sürelerinde *A. cepa*'nın kök uçlarında toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Birçok sitolojik çalışmalarda, uygulama grupları ile kontrol grupları karşılaştırıldığında mitotik indeksin azaldığı ve sitolojik anormalliklerin arttığını göstermiştir. Türkoğlu [46] sodyum benzoat (SB), borik asit (BA), sitrik asit (CA), potasyum sitrat (PC) ve sodyum sitrat (SC) gibi gıda koruyucularının *A. cepa*'nın kök hücrelerinde mitoz bölünmeyi azalttığı ve kromozomal değişikliklere yol açtığını göstermiştir. Gomes ve ark. [47] çalışmalarında Sunset Sarısı, Bordo Kırmızısı ve Tartazin Sarısının *A. cepa* kök hücrelerinde MI oranını azalttığını tespit etmişlerdir. Dönbak ve ark. [17] çalışmalarında borik asidin doza bağlı olarak *A. cepa* kök ucu hücrelerinde C-mitoz oluşumuna sebep olduğu ve MI'inde düşme olduğu tespit edilmiştir. İnceer ve ark. [48] tarafından yapılan çalışmada Bakır Klorür'ün *Helianthus annuus* bitkisinin kök ucu hücrelerinde kromozom hasarlarına neden olduğu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, SY ve BB'nin artan dozlarında *A. cepa* kök hücrelerinin kromozomlarında meydana gelen değişikliklerle genotoksik değişimler ortaya konulmuştur. 24, 48 ve 72 saat boyunca SY ve BB'ye maruz bırakılan *A. cepa* kök meristem hücrelerinin mitotik indeksindeki (MI) değişimler uygulanan konsantrasyona bağlı olarak istatistiksel olarak değiştiği belirlenmiştir. Sitolojik ve kromozomal anomaliler de artan konsantrasyonlarla ve zamana bağlı olarak değişmiştir. Kullanılan koruyucuların neden olduğu kök hücrelerinde meydana getirdikleri etkiler sitolojik, kromozomal ve MI açısından karşılaştırdığımızda BB <SY olarak tespit edilmiştir.

FRAP ve TEAC testi gıdaların antioksidan kapasitelerini ölçmek için gıda endüstrisi ve tarım alanında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. FRAP ve TEAC testi, bitkilerin radikalleri yok etme kabiliyetini ölçmek için basit, hızlı, ucuz ve sağlam bir yöntemdir [43]. TEAC yöntemi, hem hidrojen hem de tek elektron transferi temeline dayanan bir yöntemdir, çünkü radikaller, elektron indirgemesi veya hidrojen transferiyle temizlenebilmektedir [49, 50]. Buna karşılık FRAP ise tek bir elektron

transferi yöntemidir [49]. Lu ve ark. [51] çalışmalarında, kızılötesi spektroskopisi kullanarak soğan ve arpacık üzerinde kullanılan kimyasalın toksik etkisini, antioksidan kapasitesindeki değişimleri FRAP ve TEAC testi kullanarak belirlemişlerdir. Çalışmamızın bir amacı da, *A. cepa* köklerinde SY ve BB'nin sebep olduğu kök hücrelerinin antioksidan aktivitelerindeki değişimini ortaya koymaktır. FRAP ve TEAC yöntemi, SY ve BB maruziyetinde *A. cepa* köklerinin antioksidan kapasitesindeki değişimler uygulama grupları ile kontrol grupları karşılaştırıldığında uygulama gruplarında daha düşük olduğunu göstermiştir. FRAP ve TEAC sonuçlarına göre, SY'nin köklerdeki antioksidan kapasiteyi daha çok düşürdüğü tespit edilmiştir.

Komet testi, çeşitli kimyasalların hücrenin DNA'sı üzerindeki etkilerini tespit etmek için kullanılmaktadır [52]. Yapılan bir çalışmada, gıda katkı maddesi olarak kullanılan genotoksik etkiye sahip 39 kimyasal, komet testi ile 8 fare organı üzerinde etkileri gösterilmiştir. Bu maddeler, doku üzerinde artan konsantrasyonlarda kullanılmış ve DNA hasarı, uygulama grupları ile kontrol grupları karşılaştırılarak gösterilmiştir [53]. Başka bir çalışmada, tartazin ve karvakrolün genotoksik etkisi, farklı dokularda komet testi kullanılarak araştırılmıştır [54, 55]. Tartrazin ve karvakrol, sıçan dokusunda doza bağımlı olarak DNA hasarına neden olmamıştır. Peycheva ve ark. [56] yapmış oldukları çalışmada gıda katkı maddelerinin sitotoksik etkilerini araştırmışlar ve toksik etkileri komet testi ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada, maruziyet süresine bağlı olarak, tek ve/veya çift DNA zincir kırıkları, komet testi kullanılarak incelenmiştir. Tek ve/veya çift sarmal DNA kopmaları, kuyruk DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti olarak ölçülmüştür. SY ve BB'nin *A. cepa*'nın kök hücreleri üzerindeki etkileri, kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu ile ilgili olarak ortaya konulmuştur. SY ve BB'nin 72 saatlik uygulama gruplarında, kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğunun arttığı görülmüştür. SY uygulanan grupta kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu değerleri uygulanan konsantrasyonlara bağlı olarak, BB uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur.

RAPD yöntemi, çeşitli DNA hasarı ve mutasyonlarını kanıtlamak için kullanılan bir yöntemdir [32, 57]. Yapılan bir çalışmada mantarlara karşı kullanılan *Fungicide flusilazole*'nin *A. cepa* somatik hücreleri üzerindeki toksik etkisi RAPD-PCR yöntemiyle gösterilmiştir [57]. Aksakal ve ark. [32] 2,4-diklorofenoksiasetik asitin mısır üzerindeki genotoksik etkilerini RAPD analizi kullanarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da artan dozlarda SY ve BB'nin *A. cepa* kök hücresindeki toksik etkisini göstermek için, RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır. SY ve BB'nin artan dozları bazı DNA bantlarının kaybolmasına ve DNA foto-produksiyonlarına bağlı olarak bant şiddetlerinde değişikliğe neden olmuştur. 72 saat boyunca 500 ppm'lik SY ve BB'ye maruz kalan gruplarda genetik yapıda değişim olduğu görülmüştür. RAPD yöntemine göre, kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında bantların kaybolması, yeni bantların oluşması ve bant şiddetinin azalması/artması, *A. cepa* köklerinde SY ve BB'nin genotoksositeye neden olabileceğini göstermiştir. Ayrıca SY'nin BB uygulanan gruplara göre DNA üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür.

Kullanılan gıda katkı maddelerinin *A. cepa* kökleri üzerindeki sitogenetik ve mutajenik etkileri daha önce çalışılmamıştır. Bulgularımız SY ve BB uygulamasının, konsantrasyonlara ve zamana bağlı olarak kök hücreleri üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Maruz kalma süresinin artmasıyla hücrelerin gıda katkı maddelerine duyarlılığı, kök hücrelerinde farklı kromozom anomalileri ve DNA hasarına sebep olmuştur. BB, çalışılan parametrelere göre SY ile kıyaslandığında kök hücreler üzerinde daha az etkili olduğu görülmüştür. Ancak, kökler üzerinde SY ve BB'nin toksik etkilerini tam olarak belirleyebilmek için ileri araştırmalara gerek bulunmaktadır.

5-KAYNAKLAR

1. Altuğ, T., Gıda Katkı Maddeleri, Mega Basım, İzmir, 2001.
2. Ekici, H., et al., Gıda Katkı Maddelerinin Toksikolojik Yönde İncelenmesi, Türk Veterinerler Hekimleri Birliği Dergisi, 8(1-2), 60-66, 2008.
3. Besinlerdeki Katkı Maddeleri <http://www.populermedikal.com/saglikguvenlik/katkimadde.asp> (Kasım 2017)
4. Zengin, N., et al., The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate, Food Chem Toxicol, 49, 763-769, 2011.
5. Rencüzoğulları, E., et al., Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite a food preservative, Mutat Res Gen Toxicol Environ Mutagen, 490, 107-112, 2001.
6. Nair, B., Final report on the safety assessment of benzylalcohol, benzoicacid, and sodium benzoate, Int J Toxicol, 20, 23-50, 2001.
7. Saldamlı, İ., Food Additives and Ingredients. Hacettepe University Faculty of Engineering Department of Food Engineering, Ankara, Turkey, 1985.
8. Erdoğan, Ş., Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Analizleri ve Beslenme Bilim Dalı, Ankara, 2007.
9. Gıda katkı maddeleri, <http://www.zootechni.org.tr/>. (Kasım 2017)
10. Yurttagül, M., Ayaz, A., Katkı Maddeleri: Yanlıklar Ve Doğrular, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, 2008.
11. Mital, A., Use of HenFeathers as PotentialAdsorbentforTheRemoval of A Hazardous Dye, Brilliant Blue FCF, FromWastewater, J. Hazard Mater, 128, 233-239, 2006.
12. Gupta, V.K., et al., Adsorption Treatment and Recovery of The Hazardous Dye Brilliant Blue FCF Over Bottom Ash and De Oiled Soya, J. ColloidInterf. Sci., 293, 16-26, 2006.
13. Pandır, D., DNA damage in human germ cell exposedto the some food additives *in vitro*, Cytotechnology, 68(4), 725-733, 2016.

14. Nazik, H., Bir Toz İçecek Numunesinde Bulunan Renk Maddelerinin Spektrofometrik Yöntemle Simultane Tayini, Yüksek Lisans, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2012.
15. En Çok Dikkat Edilmesi Gereken Gıda Katkı Maddeleri Nelerdir, <http://tiktikkimo.blogcu.com/en-cok-dikkat-edilmesi-gereken-gida-katki-maddeleri-nelerdir/160773>. (Kasım 2017)
16. Pandey, H., et al., Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant, Toxicol Rep, 1, 300-308, 2014.
17. Dönbak, L., et al., The Cytogenetic effects of the food additive boric acid in *Allium cepa* L., Cytologia, 67, 153-157, 2002.
18. WHO, Food additive series, No.5, 1974.
19. Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., *Allium cepa* Test in Environmental Monitoring: A Review on its Application. Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 682(1), 71–81, 2009.
20. Saxena, P.N., et al., Cytogenetic Effects of Commercial Formulation of Cypermethrin in Root Meristem Cells of *Allium sativum*: Spectroscopic Basis of Chromosome Damage, Toxicology, 216(2–3), 244–252, 2005.
21. Levan, A., The Effect of Colchicine on Root Mitoses in *Allium*. Hereditas, 24, 471– 486, 1938.
22. Fiskesjö, G., The *Allium* Test as a Standard in Environmental Monitoring, Heraditas, 102,99–112, 1985.
23. Grant, W.F., Chromosome Aberration Assays in *Allium*, A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen, 99(3), 273-91, 1982.
24. Salama, S.A., et al., Biomonitoring Using Accessible Human Cells for Exposure and Health Risk Assessment, Mutation Research, 436, 99–112, 1999.
25. Goldoni, A., et al., Cytotoxic and Genotoxic Evaluation and Chemical Characterization of Sewage Treated Using Activated Sludge and a Floating Emergent-macrophyte Filter in a Municipal Wastewater Treatment Plant: A Case Study in Southern Brazil, Environmental Earth Sciences, 72(5), 1503–1509, 2014.
26. Garcia-Alonso, M., et al., Evaluation of the antioxidant properties of fruits, Food Chem, 84, 13-18, 2004.

27. Villano, D., et al., The antioxidant activity of wines determined by the ABTS⁺ method: Influence of sample dilution and time, *Talanta*, 64, 501-509, 2004.
28. Guo, C., et al., Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay, *Nutr Res*, 23, 1719-1726, 2003.
29. Pandır, D., Protective effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on capsaicin-induced DNA damage and oxidative stress in human erythrocytes and leucocytes *in vitro*, *Cytotechnology*, 67(2), 367-377, 2015.
30. Hirose, H., et al., Phosphorylation and gene expression of p53 are not affected in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW or W-CDMA modulated radiation allocated to mobile radio base stations, *Bioelectromagnetics*, 27, 494-504, 2006.
31. Tedeschi, P., et al., Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint and antioxidants profile as markers for Tropea red onion (*Allium cepa* L.) authenticity, *J Food Comp Anal*, 36, 98-103, 2014.
32. Aksakal, O., et al., Assessment of genotoxic effects of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis, *Ind Crops Prod*, 42, 552-557, 2013.
33. Tripathy, S.K., Rao, D.A., Mitotic Aberrations Induced by Orange Red (A Food Additive Dye) as a Potential Genotoxicant on Root Tip Cells of Onion (*Allium cepa* L.), *International Food Research Journal*, 22(1), 383-392, 2015.
34. Bezerra, M.S., et al., Cytotoxic and Genotoxic Potential of Powdered Juices, *Food Science and Technology*, Campinas, 36(1), 49-55, 2016.
35. Türkoğlu, Ş., Genotoxic Effects of mono-, di-, and trisodium Phosphate on Mitotic Activity, DNA Content, and Nuclear Volume in *Allium cepa* L. *Caryologia*, 2009.
36. Iris, F.F., Benzie, J.J., Strain The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay Analytical Biochemistry, 239(1), 70-76 1996.
37. Re, R., et al., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237, 1999.
38. Baker, C.J., Mock, N.M., An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue springer, 39(1), 7-12 1994.

39. Özkan, D., et al., Evaluation of the cytogenetic damage induced by the organophosphorous insecticide acephate, *Cytotechnology*, 59, 73-80, 2009.
40. Per, S., Sümer-Ercan, F., Comparison of three methods of DNA extraction from *Parachipteria willmanni* (Acari: Oribatida) collected in Turkey, *J Biotech Res*, 1(4), 16-20, 2015.
41. Panda, K.K., et al., In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants, *Toxicol In Vitro*, 25(5), 1097-1105, 2011.
42. Barberio, A., et al., Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test, *Ecotoxicol*, 20, 927-935, 2011.
43. Yıldız, M., et al., Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assay, *Chemosphere*, 75, 934, 2009.
44. Bhagyanathan, N.K., Thoppil, J.E., Pre-apoptotic activity of aqueous extracts of *Cynanchum sarcomedium* Meve & Liede on cells of *Allium cepa* and human erythrocytes, *Protoplasma*, 253(6), 1433-1438, 2016.
45. Carlson, S.J., Donald, W.W., Glyphosate effects on Canada thistle (*Cirsium arvense*) roots, root buds, and shoots, *Weed Research*, 28, 37-45, 2006.
46. Türkoğlu, S., Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L., *Mutation Research*, 626(2), 4-14, 2007.
47. Gomes, K.M.S., et al., Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells, *Food Sci Technol*, 33(1), 2013.
48. Inceer, H., et al., Cytogenetic Effects of Copper Chloride on Root Tip Cells of *Helianthus annuus* L., *Turkish Journal of Biology*, 27, 43-46, 2003.
49. Prior, R.L., et al., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J Agric Food Chem*, 53(10), 4290-4302, 2005.
50. Jimenez, A., et al., Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols, *Organic Letters*, 6(24), 4583-4586, 2004.
51. Lu, X., et al., Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy, *Food Chemistry*, 129(2), 637-644, 2011.

52. Pandır, D., Assesment of the genotoxic effect of the diazinon on root cells of *Allium cepa* (L.), Brazilian Archives of Biology and Technology, (accepted) 2017.
53. Sasaki, Y.F., et al., The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutat Res*, 519, 103-119, 2002.
54. Bastaki, M., et al., Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Tartrazine, *Food Chem Toxicol*, 105, 278-284, 2017.
55. Ruiz-Cabello, et al., Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay, *Food Chem Toxicol*, 98, 240-250, 2016.
56. Peycheva, E., et al., Application of the yeast comet assay in testing of food additives for genotoxicity *LWT – Food, Science and Technology*, 59(1), 510-517, 2014.
57. Özakça, D.U., Silah, H., Genotoxixity effects of Flusilazole on the somotic cell of *Allium cepa*, *Pestic Biochem Physiol*, 107(1), 38-43, 2013.

6-ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Yozgat ilinin Sarıkaya İlçesinin Karahallı köyünde doğan Kemal KOÇ, ilk ve orta öğretimini Fatih İlköğretim okulunda tamamlamıştır. Lise öğrenimini Yunus Emre Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. 2011’de başladığı Yozgat Bozok Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2015’de bitirmiştir.

2015 yılında Yozgat Bozok Üniversitesi Eğitim Fakültesi’nden formasyon eğitimini başarıyla tamamlamıştır.

2016 yılında Yozgat Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana bilim Dalı’nda başladığı Yüksek Lisans öğrenimine halen devam etmektedir.

Yayınlar

1. **Koç, K.**, Pandır, D., All aspect of toxic effect of brilliant blue and sunset yellow in *Allium cepa* roots. *Cytotechnology*, 70 (1), 449–463, 2018.

Bildiriler

1. **Koç K**, Pandır D. Effect of catechin on lead nitrate-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. International Symposium Ecology. 11-13 May 2017, Kayseri.
2. **Koç K**, Pandır D. Assesment of the ecotoxic effect of the UV radiations via micro gel electrophoresis. International Symposium Ecology. 11-13 May 2017, Kayseri.
3. Per S, **Koç K**, İlçe F, Pandır D. Changing membran morphology induced by dichlorvos and protective role of lycopene. International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2017). 05-08 July 2017, Belarus.
4. Demirbağ A, **Koç K**, Doğanyiğit Z, Pandır D. Hydrogen peroxide induced damage in blood cell genomic DNA. International DNA Day and Genome Congress (IDDGC). 24-28 April 2017, Kırşehir.
5. Demirbağ A, **Koç K**, Doğanyiğit Z, Pandır D. Genotoxicity assessment of imidacloprid using RAPD-PCR in human blood. International DNA Day and Genome Congress (IDDGC). 24-28 April 2017, Kırşehir.
6. Demirbağ A. Doğanyiğit Z. Bekdemir FO. İlçe Z. **Koç K**. İlçe F. Pandır D. Per S. Usage random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint in liver tissue

- on male rats. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018). 26-27 April 2018 Ankara, Turkey.
7. Demirbağ A. Doğanyığıt Z. Bekdemir FO. İlçe Z. **Koç K.** İlçe F. Pandır D. Per S. Endotoxemia Induced DNA Damage in Rat Lung. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018). 26-27 April 2018 Ankara, Turkey.
 8. Demirbağ A. Bekdemir FO. İlçe Z. **Koç K.** İlçe F. Pandır D. Determination of effect of Ultraviolet (UV) radiation using spectrophotometer in human blood. 9th Ecology Symposiums 2018, 19-23 June, 2018 Kastamonu, Turkey.
 9. Demirbağ A. Per S. Bekdemir FO. İlçe Z. **Koç K.** İlçe F. Pandır D. Doğanyığıt Z. Effect of lipopolysaccharide on antioxidant capacity of rat brain. 9th Ecology Symposiums 2018, 19-23 June, 2018 Kastamonu, Turkey.
 10. Demirbağ A. İlçe Z. Bekdemir FO. **Koç K.** İlçe F. Per S. Pandır D. Doğanyığıt Z. Determination toxicity of lipopolysaccharide with antioxidant capacity in rat pancreas. 9th Ecology Symposiums 2018, 19-23 June, 2018 Kastamonu, Turkey.
 11. Demirbağ A. Bekdemir FO, İlçe F. **Koç K.** İlçe Z. Pandır D. Determination toxicity of lead nitrate with antioxidant capacity in *A. cepa*. 9th Ecology Symposiums, 19-23 June, 2018 Kastamonu, Turkey.
 12. Demirbağ A. Bekdemir FO. İlçe F. **Koç K.** İlçe Z. Pandır D. Protective effect of sodium selenite against H₂O₂ in *A. cepa*. 9th Ecology Symposiums, 19-23 June, 2018 Kastamonu, Turkey.
 13. **Koç K.** Pandır D. Evaluate the toxicity of Sunset Yellow on *Allium cepa* root meristematic cells with comet assay. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018). 26-27 April 2018 Ankara, Turkey.
 14. Demirbağ A. **Koç K.** İlçe F. Bekdemir FO. İlçe Z. Pandır D. Evaluate the toxicity of mercury chloride on human erythrocytes form *in vitro*. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018). 26-27 April 2018 Ankara, Turkey.

Projeler

Birillant Blue ve Sunset Yellow'un *Allium cepa* L. Kök Ucu Meristem Hücreleri Üzerine Toksik Etkileri Bozok Üniversitesi BAP Projesi 6601-FBE/17-115, Proje Araştırmacısı (7.000,00 TL)