

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TRADESCANTIA PALLIDA H., ALLIUM CEPA L.,
VICIA FABA L. BİTKİLERİNDE BAZI
GENOTOKSİK BİLEŞİKLERİN GENETİKSEL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Doğan İLHAN

Danışman:

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Haziran, 2008

ÇANAKKALE

**TRADESCANTIA PALLIDA H., ALLIUM CEPA L.,
VICIA FABA L. BİTKİLERİNDE BAZI
GENOTOKSİK BİLEŞİKLERİN GENETİKSEL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Doğın İLHAN

Danışman:

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Haziran, 2008

ÇANAKKALE

**Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Fonu
tarafından desteklenmiştir.**

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

Doğan İLHAN tarafından Doç. Dr. Cüneyt AKI yönetiminde hazırlanan “*TRADESCANTIA PALLIDA* H., *ALLIUM CEPA* L., *VICIA FABAE* L. BİTKİLERİNDE BAZI GENOTOKSİK BİLEŞİKLERİN GENETİKSEL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yönetici

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi:...../...../.....

Müdür

Fen Bilimleri Entitüsü

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında bilimsel birikimini benimle paylaşan, fikirleriyle beni yönlendiren ve olumlu düşünceleriyle bana her daim destek olan değerli danışman hocam; Moleküler Biyoloji Anabilimdalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Cüneyt AKI 'ya, sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım süresince büyük emekler sarfedip bana zaman ayıran değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Nurşen ÇÖRDÜK, Arş. Gör. Sibel YILMAZ, Arş. Gör. Sefer DEMİRBAŞ, Arş. Gör. Rıza AKGÜL, Arş. Gör. Ersin KARABACAK, Meltem TEZCAN, Öznur TANRIVERDİ ve Hakan ÇAM'a teşekkür ederim.

2007- 63 no'lu Yüksek Lisans Tez Projemizi 12 ay süre ile 2500 YTL ödenekle destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na da tüm katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda destek olan, maddi ve manevi varlıklarını esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Doğan İLHAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	:	Anafaz Aberasyon
BB	:	Brilliant Black (E110)
CAC	:	Gıda Kodeks Komisyonu
CrO ₃	:	Chromium trioksit
Cs	:	Sezyum
Cyt-B	:	Cytochalsin-B
DEHP	:	di(2-ethylhexyl)phthalate
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
FAO	:	Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
SY	:	Sunset Yellow (E151)
FDA	:	Gıda İlaç Dairesi
FISH	:	Floresan In Situ Hibridizasyon
g/l	:	gram/litre
HCl	:	Hidroklorik asit
INS	:	Uluslararası Numaralandırma Sistemi
WHO	:	Dünya Sağlık Teşkilatı
M	:	Molar
MH	:	Maleik asit hidrazit
MNU	:	N-metil-N-nitroz-üre
NO	:	Azot monoksit
NO ₂	:	Nitrit (Azot dioksit)
PCP	:	Pentaklorofenol
ppm	:	parts per million (Milyonda bir)
SCGE	:	Tek Hücre Jel Elektroforezi
Trad-MCN	:	Tradescantia Mikronükleus
Trad-SHM	:	Tradescantia Stamen tüyü mutasyonu
UV	:	Ultraviyole
μR	:	Mikro röntgen

**TRADESCANTIA PALLIDA H., ALLIUM CEPA L., VICIA FABA L.,
BİTKİLERİNDE BAZI GENOTOKSİK BİLEŞİKLERİN GENETİKSEL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZET

Bu çalışmada, genotoksik aktiviteye sahip olduğu düşünölen ve gıda sanayinde renklendirici olarak yaygın şekilde kullanılan Sunset Yellow (E110) ve Brilliant Black (E151) adlı maddelerin *Tradescantia pallida* H., *Allium cepa* L. ve *Vicia faba* L. bitkileri üzerinde oluşturduğu genetiksel değışikliklerin kök ucu hücreleri testi, *Tradescantia* Stamen Tüyü analizi (Trad-SHM) ve Mikronökleus Testi (MCN) ile değeriendirilmesi amaçlanmıştır. Kontrollü koşullar altında laboratuvarında yetiştirilen bitkilere her iki boya maddesinin 4 farklı konsantrasyonu (10-200-1000-2000 ppm) spreyleme ve sulama suyuna ekleme yolu ile uygulanmıştır.

Uygulama sonrası kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda, tüm bitkiler için yapılan mutasyon testlerinde doz miktarı artışına bağılı olarak mutasyon seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca *Tradescantia* stamen tüyü analizi (Trad-SHM) ve mikronökleus testlerinin (MCN) kullanılan boya maddeleri için farklı duyarlılıklara sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır. Her iki boya maddesinin de genotoksik potansiyelinin olduğu ve yapılan analizlerde Sunset Yellow'un stamen tüyü analizi ile Brilliant Black'in ise mikronökleus testi ile teşhisinin daha uygun olarak tespit edildiğı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Sunset Yellow (E110), Brilliant Black (E151), *Vicia faba* L., *Allium cepa* L., *Tradescantia pallida* H., stamen tüyü mutasyonu, mikronökleus testi

Hazırlanan bu yüksek lisans tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi BAP tarafından 2007/63 numaralı projeden desteklenmiştir.

ABSTRACT

The aim of this study to evaluate Sunset Yellow (E110) and Brilliant Black (E151) food coloring substances which has putative to genotoxicological activity and can be used as common in food industry. With this purpose, *Tradescantia pallida* H., *Allium cepa* L. and *Vicia faba* L. plants were used for finding the genetical damage levels with root tip mitosis, *Tradescantia* stamen hair mutation analysis (Trad-SHM) and *Tradescantia* micronucleus test (Trad-MCN). Basic of our research project getting knowledge from this aim, four different concentrations (10-200-1000-2000 ppm) of both food colors were applied to the plants with spraying and adding to the irrigation water. All of our experiments were realized under the controlled conditions in the laboratory.

According to the obtained knowledges, it was observed that mutations levels has increased depending on using dose amounts for root tip cell test and *Tradescantia* mutation tests in all of the plant groups which we treated. In addition, it was detected that both of the food colors have genotoxic potential on the plants with different sensitivities. It was revealed that potential effect of sunset yellow can analysis better with Trad-SHM and effect of brilliant black can analysis better with Trad-MCN tests.

Key words: Sunset Yellow (E110), Brilliant Black (E151), *Vicia faba* L., *Allium cepa* L., *Tradescantia pallida* H., stamen hair mutation, micronucleus analysis.

The present M.Sc. thesis was supported by Çanakkale Onsekiz Mart University BAP under the project no of 2007/63.

İÇERİK

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	İV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	Vİ
BÖLÜM 1- GİRİŞ.....	1
1.1. Sunset Yellow (E110).....	11
1.1. Brilliant Black (E151).....	11
1.3. Genotoksik Maddeler ve Genotoksosite.....	12
1.4. Bitkisel Organizmalarda Kullanılan Bazı Testler.....	17
1.4.1. Kök ucu hücreleri testi	17
1.4.1.1. Mitotik analiz.....	17
1.4.1.2. Mitotik aktivitenin hesaplanması	20
1.4.2. Mikronükleus oluşumu ve analizi	21
1.4.2.1. Mikronükleus tekniğinin gelişimi	21
1.4.2.2. Mikronükleus tekniğinin kullanım alanları	24
1.4.3. Stamen tüyü analizi	26
BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	28
BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM	43
3.1. Materyaller	43
3.1.1. Bitkisel materyaller	43
3.1.1.1. <i>Allium cepa</i> L. (Soğan).....	43
3.1.1.2. <i>Tradescantia pallida</i> H. (Telgraf çiçeği).....	45
3.1.1.3. <i>Vicia faba</i> L. (Bakla)	47
3.1.2. Kimyasal maddeler	49
3.1.3. Sarf malzemeler	49
3.2. Yöntem	49
3.2.1. Bitki yetiştirme.....	49
3.2.2. Kimyasalların uygulanması	50

3.2.3. Stok çözeltilerin hazırlanması	50
3.2.4. Genotoksisite testleri	51
3.2.4.1. <i>Allium cepa</i> L. ve <i>Vicia faba</i> L. bitkilerinde kök ucu hücreleri testi	51
3.2.4.1.1. Çözeltilerin hazırlanması	53
3.2.4.2. <i>Tradescantia pallida</i> H., bitkisinde stamen tüyü analizi	54
3.2.4.3. <i>Tradescantia pallida</i> H., bitkisinde mikronükleus analizi	55
3.2.4.3.1. <i>Tradescantia</i> mikronükleus slayt hazırlama prosedürü	56
BÖLÜM 4- SONUÇ VE TARTIŞMA	58
4.1. Sonuçlar	58
4.1.1. Mitotik sonuçlar	58
4.1.1.1. Mitotik indeks ile ilgili sonuçlar	75
4.1.2. <i>Tradescantia pallida</i> H. stamen tüyü analizi sonuçları	78
4.1.3. <i>Tradescantia pallida</i> H. mikronükleus analizi sonuçları	82
KAYNAKLAR	94
TABLolar	I
ŞEKİLLER	II
YAŞAM ÖYKÜSÜ	VI

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Canlılığın tüm yaşamsal gereksinimlerinin karşılandığı ve sürekli etkileşim halinde bulunduğu bir çevrenin varlığı kuşkusuz ki onu bütünleyici kılmaktadır. Bu çevre ile onun en önemli rolünü üstlenen canlılar arasındaki ekolojik dengenin kurulması ise bu birlikteliğin temel basamağını oluşturmaktadır. Yeryüzünde bulunan tüm canlıların hayatta kalabilmesi, beslenme, büyüme ve çoğalarak neslinin devamını sağlayabilmesi gibi temel gereksinimlerinin karşılanabilmesi için yaşadığı çevre ile uyum halinde olması gereklidir. Her türlü potansiyel tehdit'e açık olan çevrede, bu tehditlerden kaçınmak ya da onları minimum düzeye indirmek canlıların belki de en önemli görevlerinden birisi olarak nitelendirilebilir.

İnsan da dahil olmak üzere birçok canlı türüne ev sahipliği yapan cansız ortam çevrede canlılığı etkileyen olumlu faktörlerin yanı sıra pek çok olumsuz faktörün de varlığından söz etmek mümkündür. Gerek canlıların kendi faaliyetleri sonucu gerekse değişen çevresel koşulların etkileri sonucu özellikle yaşamı tehdit edici boyutta olabilen pek çok etmenin ortaya çıktığı bilinmektedir. İnsan'ın ön plana çıktığı ve aktif olarak yer aldığı çevresinde bu etmenlerden etkilenmesi kuşkusuz ki kaçınılmazdır.

Günümüzde artan insan nüfusu ile birlikte sanayileşme, endüstriyel faaliyetler, tarımsal faaliyetlerde kullanılan kimyasallar, yakıt ve benzeri amaçlarla kullanılan zehirli gazlar, gıda ürünlerinde kullanılan her türlü katkı maddeleri ve doğaya bırakılan atık maddelerinin gittikçe artan bir şekil alması başta insan sağlığı olmak üzere her türlü organizmanın doğal dengesinin bozulmasına neden olmaktadır.

Çağımızın en önemli sorunlarından biri hiç kuşkusuz, tüm canlıları, özellikle de insanı olumsuz yönde etkileyen çevresel tehlikelerin her geçen gün artmasıdır. Bu tehlikeler içinde belki de en önemlisi, modern yaşamımızın vazgeçilmezi, iç içe

yaşadığımız kimyasal maddelerdir. Bundan dolayı; çevreyi kirleten, doğal dengeyi bozarak yeni sorunların ortaya çıkmasına neden olan, canlıları değişik şekillerde ve değişik oranlarda zehirleyen kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki etkileri sorunu günümüz araştırmacılarının son derece ilgisini çekmektedir. Yapılan araştırmalar doğal çevremize bulaştırdığımız pek çok kimyasal maddenin kanserojenik ya da mutajenik etkiye sahip oldukları gerçeğini ortaya koymaktadır. Kanserojen (ya da karsinojen) kansere neden olan, mutajen mutasyona yani kalıtsal materyalde (DNA) herhangi bir değişikliğe neden olan anlamına gelmektedir. Genler üzerinde toksik etkisi olan kimyasal maddelere ise genotoksik maddeler ismi verilmektedir (<http://www.nadidem.net/bmk/Genotok04.pdf>).

Özellikle son yıllarda, artan insan taleplerini karşılamak amacıyla besin endüstrisinde katkı maddelerinin kullanımı bu endüstri için daha da cazip hale gelmiş durumdadır. Katkı maddelerinin kullanıldığı gerek gıda gerek kozmetik gerekse diğer endüstriyel ürünlerin bilinçsizce tüketimi ise organizmalarda kalıtsal hasarlara ve ilerleyen süreçte kansere sebebiyet vermektedir.

Gıdalardaki katkı maddeleri denince, kendileri gıda maddesi olmadıkları halde gıdaların kalitesini arttırmak, kıvamını tutturmak, tadını ve rengini vermek, yapısını düzeltmek gibi işlevleri yanında onların hazırlanması sırasında da kolaylık ve iyileştirme sağlayan ve bu aşamadan sonra ise bozulmalarına engel olup tezgâh ömürlerini uzatmak gibi birtakım teknolojik fonksiyonları olan maddeler anlaşılır (<http://www.guncelpediatric.com/yazilar.asp?yaziid=420>).

Katkı maddeleri çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Eski insanlar gıdalarını tütsüleyerek (vinil guanikol ve fenol türevleri), sirke ile (asetik asit), yanmış kükürtle (kükürt dioksit), tuzlamak ve salamura yapmak (sodyum klorür ve sulfatlar) suretiyle korumaya çalışmışlardır. Bu insanlar gıdalarını böcek kabuklarını ezerek elde ettikleri kırmızı boya (kokineal-1-metil-2-carboksi-3,5,6,7,8 pentahidroksantakinon-7-glukozid) ve safran (krosetin digentiobiyoz ester) gibi doğal boyalarla da renklendirmişlerdir. Ayrıca arap sakızı (gum arabik) ile besinlerinin kıvamlarını arttırmışlardır. Aynı şekilde safran ise hem renk maddesi

olarak hem de gıdaya özel bir çeşni katmak amacıyla kullanılmıştır. Bu maddelerin birçoğu bugün de üç temel fonksiyon için kullanılmaktadırlar: kozmetik, koruyuculuk ve işleme. Amaçlar bu fonksiyonlarla sınırlı kalsa da zaman içinde katkı maddelerinin sayıları çok artmış ve 4000'li rakamlara ulaşmıştır (Miller, 1985).

Günlük hayatımızda farkında olarak ya da olmayarak yüzlerce çeşidini tükettiğimiz bu maddeler elbette bir kısım yararları için sofralarımızda yer alırlar. Koruyucu, renklendirici, oksitlenmeyi önleyici v.s. işlevi gören bu maddelerin kullanımı son yıllarda çok hızlı bir artış göstermiş ve yıllık 200.000 ton miktarına ulaşmıştır. Batı ülkeleri mutfaklarında yaklaşık %75 oranında işlenmiş gıda ürünleri tüketildiği varsayılarak bu ürünlerle kişilerin her yıl yaklaşık 5-6 kg katkı maddesi aldığı hesaplanmıştır. Tüketimdeki bu hızlı tırmanmaya paralel olarak katkı maddelerine karşı gelişen ve çok değişkenlik gösteren yan etkilerde de artma gözlemlenmektedir (Cohen ve diğ., 1972).

İnsanoğlu için yaşamsal değeri tartışılmaz olan bitki primer metabolitlerinin yanı sıra, tat ve koku verici maddeler de besin endüstrisinde önemli yer tutmaktadır. Sentetik katkı maddelerinin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerinin ortaya çıkışı ile birlikte; et, süt, meyve, sebze, deniz ürünleri ve meşrubat sektörlerinde doğal ürünlere duyulan talep giderek artmaktadır. Tat ve koku vericiler tek bir kimyasal olabildiği gibi, birçok kimyasalın karışımı da olabilmektedir. Örneğin, *Thaumatococcus danielli* bitkisinden elde edilen tatlandırıcı, thaumatin, bir tek kimyasaldan ibarettir. *Zingiber officinale* bitkisinden elde edilen zencefilde ise gingeroller adı verilen aromatik bileşikler, gerenial ve neral gibi uçucu bileşikler için içine girmektedir (Sökmen ve Gürel., 2007).

Gıda katkı maddelerinin gıda endüstrisinde kullanılması, gelişen teknolojilerin getirdiği değişik üretim tekniklerinden ve buna bağlı olarak tüketici beğenisinin çeşitlilik kazanmasından doğmaktadır. Kullanımına izin verilen çeşitli katkı maddelerinin bazıları sağlık açısından herhangi bir sakınca yaratmamakla birlikte, bazıları yüksek miktarlarda ve sürekli alınmalarına bağlı olarak duyarlı kişilerde

çeşitli tehlikeler oluşturabilecek nitelikte görünmektedirler (<http://www.bursakalder.org/bulten1/icerik.php?bulten=haber1&id=39>).

Gıda sanayinde kullanılan ve canlının yaşamı üzerinde potansiyel bir tehlike unsuru olabilen gıda renklendirici maddelerinin de katkı amaçlı olarak gıdalara uygulandığı bilinmektedir. Bu maddeler arasında özellikle sentetik olanlar insan sağlığını doğrudan etkileyebilme özelliğine sahiptirler ve belirlenen uluslararası gıda kodekslerine uygun olarak kullanıma sunulmaları gerekmektedir.

Çeşitli gıda maddelerinin renklendirilmesinde duyulan gereksinim, sosyal, coğrafik, etnik ve tarihsel gelişim faktörleri etkisinde oluşmuştur. Aslında antik çağlarda baharatlar ve meyveler gibi çeşitli maddeler şarap, ekmek gibi maddelerin renklendirilmesinde kullanılmıştır (Altuğ, 2001). On binlerce yıldır, kurkuma, kökboya, anatto, indigo ve çivitotu gibi bitki materyalleri gıdalarda renk maddesi olarak kullanılmaktadır (Henry, 1980). Gıdalarda kullanılan ilk ticari renk maddeler basit bitki ekstraktlarıdır. Kırmızıdan maviye kadar renk aralığı oluşturan antosiyaninler genel olarak üzümlerden, mürver ağacı çiçeğinden ve kırmızı lahanadan ekstrakte edilmiştir. Sarı, turuncu ve kırmızı renk aralığı oluşturan karotenoidler, havuç, kırmızı domates ve biber gibi çok çeşitli meyve ve sebzelerde bulunmuştur. Kadife çiçeğinden, sarı renkli lutein ve kırmızı pancardan da betalainler ekstrakte edilmiştir (Genç, 1999). Kurkumin, açık sarıdan koyu sarı renk aralığı oluşturan ve Asya ülkelerinde yaygın olarak yetiştirilen bir bitkinin toz haline getirilmesiyle elde edilmiştir. Ayrıca, yoğun pembe, kırmızı renk veren karmik asit, kınkanatlılardan bir insektin kurutulmuş gövdesinden elde edilmiştir. Bu pigmentin elde edilmesi azteklerin tarihine kadar uzanmaktadır. Günümüzde de aynı kaynaklar halen renk maddesi ekstrakte edilmesinde kullanılmaktadır (Andres, 1987).

18. yüzyılda başlayan sanayi devrimi ile birlikte hızla şehirleşme başlamış ve buna bağlı olarak hazır gıda tüketimi yaygınlaşmıştır. Hazır gıdaların yüksek miktarda üretilmesine rağmen, bu gıdalarda kullanılacak doğal renk maddelerinin üretim miktarı artan talebi karşılayamamıştır. Bu nedenle de bakır ve kurşun tuzları, bakır sülfat gibi çeşitli kimyasal maddeler renk maddesi olarak kullanılmıştır. Bu

toksik maddelerle gıdaların renklendirilmesi sonucu İngiltere’de birçok ölüm vakası bildirilmiştir. Artan renk maddeleri talebini karşılaması için yapay renk maddeleri üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. Doğal renk maddelerine göre yapay renk maddelerinin renk verme gücü, renk aralıkları ve stabiliteleri daha yüksek ve ayrıca kullanımları daha uygundur. Bu nedenle de yapay renk maddeleri sanayide çok geniş kullanım alanı bulmuştur. Yapay renk maddelerinin keşfedildiği ve üretildiği 19. yüzyılın ortalarından itibaren, bu boyalar geleneksel olarak kullanılan doğal renk maddelerinin yerini almış ve günümüze kadar pek çok yapay renk maddesi sentezlenmiştir (Henry, 1980). Bu nedenle de doğal renk maddelerinin ticari olarak yaygın kullanımı 19. yüzyılın ortalarına kadar devam etmiştir (Karaali ve Özçelik, 1993). Ancak sonraki yıllarda yapılan araştırmalarda çeşitli yapay renk maddelerinin kullanımında sınırlamalar yapılması ve tüketicinin yapay renk maddeleri kullanılan gıdalara şüpheli yaklaşımı nedenleriyle, üreticiler tekrardan doğal renk maddelerini kullanmaya yönelmişlerdir (Henry, 1980). Ayrıca teknolojik gelişmelerle birlikte, başlangıçta üretilen doğal renk maddelerinin mat ve zayıf stabilite özellikleri geliştirilmiş ve böylece üreticilerin doğal renk maddesi kullanım oranı artmıştır (Genç, 1999).

Günümüzde gıdalarda kullanılan renk maddeleri elde ediliş şekillerine göre doğal ve yapay renk maddeleri olarak iki guruba ayrılmaktadır. Doğal renk maddeleri, mikrobiyal, bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklardan elde edilen pigment maddeleridir. Yapay renk maddeleri ise kimyasal yapıları nedeniyle doğada bulunmayan ancak kimyasal sentez yoluyla üretilen renk maddeleridir. Yapay renk maddelerinin çoğunluğunun sentezinde kömür katranı kullanılır. Yapay renk maddeleri çözünürlüklerine göre suda çözünen, yağda çözünen ve lake renk maddeler olarak üç grupta toplanmıştır. Yapay renk maddelerinin yapısında en az bir tuz formunun bulunması nedeniyle suda çözünebilmektedirler. Gıda maddelerinde kullanılan renk maddeleri sadece suda çözünme özelliği gösterenler arasından seçilmiştir. Yağda çözünen renk maddeleri yapılarında tuz formu bulunmadığı için suda çözünmezler. Bu renk maddeleri toksik özellikleri nedeniyle gıdalarda kullanımına izin verilmemektedir. Lake renk maddeleri ise suda çözünen yapay renk maddelerinin alüminyum oksit üzerine alüminyum klorür ilavesi ile

Tablo 1.1. Kullanımı yasaklanan yapay renk maddeleri (www.saglikvakfi.org.tr/)

Yapay renk maddeleri	Yasaklandığı yıl	Oluşturduğu sağlık problemi
Butter yellow	1919	Toksik, sonraları karaciğer kanserine yol açtığı bulundu.
Green 1	1965	Karaciğer kanseri
Orange 1	1956	Organ hasarı
Orange 2	1960	Organ hasarı
Orange B	1978	Kanser
Red 1	1961	Karaciğer kanseri
Red 2	1976	Kanserojen
Red 4	1976	Yüksek düzeyleri köpeklerde adrenal korteks hasarına neden olmakta, 1965 yılından sonra sadece maraschino kirazlarında ve bazı haplarda kullanılmıştır. Halen haricen uygulanan ilaç ve kozmetikte kullanılmasına izin verilmektedir.
Red 32	1956	İç organlarda hasarlar ve zayıf kanserojen, 1956 yılından beri Citrus Red 2 ismi ile sadece turuncu rengi vermek amacıyla kullanılmaya devam edilmektedir.
Sudan	1919	Toksik, daha sonra kanserojen olduğu bulunmuştur.
Violet 1	1973	Kanserojen (Yenilmek üzere kesilmiş Sığır etleri üzerinde Tarım Bölümünün denetim mührü olarak kullanılırdı).
Yellow 1 ve 2	1959	Yüksek dozlarda barsak lezyonları
Yellow 3	1959	Yüksek dozlarda kalp hasarı
Yellow 4	1959	Yüksek dozlarda kalp hasarı

alüminyum tuzu olarak çöktürülmeleri yoluyla elde edilen suda çözünmeyen pigmentlerdir (Altuğ, 2001).

Yapılan çalışmalarda birçok yapay renk maddesinin toksik özellikleri belirlenmiştir. Toksik ve kanserojenik olarak değerlendirilen renk maddelerinin gıdalarda kullanımı yasaklanmıştır (Tablo 1.1.).

Bu nedenle de yapay renk maddelerinin sadece bir bölümünün gıdalarda kullanımına izin verilmiştir. Ancak toksik ve kanserojenik olmadığı belirlenip kullanımına izin verilen renk maddelerinin kullanımında da allerjik reaksiyonlar ve deri döküntüleri, astım ve hiperaktivite gibi sağlık sorunları oluşabilmektedir. (Karaali ve Özçelik, 1993; Yentür ve diğ., 1998). Gıdalarda renk maddelerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, kullanımına izin verilen renk maddelerinin yüksek miktarda kullanıldığı ve ayrıca izin verilmeyen renk maddelerine de rastlanıldığı belirtilmiştir (Demirer, 1974; Yentür ve Karakaya, 1985; Topsoy ve diğ., 1991; Kalyoncu ve Yurttagül, 1995). Tablo 1.1.'de kullanımı yasaklanan yapay renk maddeleri verilmiştir.

Renk maddelerinin sağlık üzerindeki olumsuz etkileri ve uygun olmayan kullanım şekilleri gibi nedenlerle, kullanımında ulusal ve uluslararası bazı yasal düzenlemeler yapılmıştır. 1938 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası çıkartılarak renk maddeleri ile ilgili ilk yasal düzenleme yapılmıştır. Bu yasa ile renk maddeleri sertifikalı ve sertifikasız olarak iki ana gruba ayrılmıştır. Sertifikalı olanlar, gıdalarda kullanılan miktarı sınırlanan suda çözünen yapay organik ve lake renk maddelerini kapsamaktadır. Sertifikasız olanlar ise doğal renk maddeleridir. Ayrıca renk maddeleri, Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası'nda yaygın olarak bilinen isimleri yerine renk verme özellikleri ve numaraları ile adlandırılmıştır. Bunun yanı sıra, her renk maddesi için sertifikasyon işlemi zorunlu hale gelmiş ve Gıda, İlaç İdaresi (FDA)'nın yetkisi altına girmiştir. Daha sonraki yıllarda da düzenlemeler devam etmiştir (Altuğ, 2001). Gıdalarda kullanılması kabul edilen renk maddeleri uluslararası Numaralandırma Sistemine (INS) göre numaralandırılmıştır. Ayrıca FDA'da Gıda, İlaç ve Kozmetik yasasında izin verilen

renk maddelerine FD&C numarası verilmiştir. Avrupa Topluluğu Konseyi tarafından da E kod numarası verilmiştir. Bu nedenle renk maddelerinin gıdalarda kullanımı için FD&C numarası ve E kod numarasına sahip olması gerekmektedir. 1994 yılında Avrupa Birliği, renk maddelerinin gıdalarda kullanım düzeyini belirleyen yasal düzenlemeyi yayınlamış ve 1995 yılında da renk maddelerinin saflık düzeyleri ile ilgili özellikleri bildirilmiştir (Altuğ, 2001).

Gıdalarda kullanımına izin verilen renk maddelerinin sayısı ve tipi ülkeden ülkeye farklılıklar göstermektedir. Örneğin, İskandinav ülkelerinin bazılarında, her türlü sertifikalı boyanın gıda maddelerinde kullanımı tamamen yasaklanmıştır. Avusturya'da 8'i sentetik olmak üzere 27 renk maddesinin kullanımına izin vermektedir. İsviçre'de doğal ve sentetik birkaç renk maddesinin (karotenoidler, kantaksantin, riboflavin, antosiyaninler ve klorofiller, amarant, tartazin ve eritrosin) kullanımı yasal olarak kabul edilmiştir. Amerika da sertifikalı ve sertifikasız olarak guruplandığı renk maddelerinin dışındaki boyaların kullanımına izin vermemektedir (Karaali ve Özçelik, 1993).

Genel olarak günümüzde gıdalarda kullanılacak renk maddeleri, Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ve Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nün oluşturduğu Gıda Kodeks Komisyonu (CAC)'nun yayınlarında belirtilmektedir. Gıda Kodeks Komisyonu ise renk maddelerinin toksik özelliklerini incelemektedirler (Bağdatlıoğlu ve Demirbüker, 1999).

Ülkemizde ise, tüketici taleplerinin yanı sıra gelişen gıda sanayi ve uluslararası gıda ticaretine bağlı olarak 1983 yılında Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği oluşturulmuş, 1997 yılında yürürlüğe giren Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinin 7 no'lu eki renk maddeleri ile ilgili düzenlenmiştir. 2002 yılında ise Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda kullanılan Renk maddeleri Tebliğini yayınlamıştır. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre, renk maddeleri tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdalarda ana bileşen olarak kullanılmayan, gıdaya renk artırıcı veya renk düzenleyici olarak katılan maddeler olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2002).

Tablo 1.2. Türk gıda kodeksinde gıdalarda kullanımına izin verilen doğal renk maddeleri (Anonim, 2002)

Organik doğal renk maddeleri

İnorganik doğal renk maddeleri

Anatto, Biksin, Norbiksin (E 160b)	Alüminyum (E 173)
Antosiyaninler (E 163)	Altın (E 175)
Beta-apo-8'karotenal (E 160e)	Demir oksit ve hidroksitler (E 172)
Beta-apo-8'-karotenik asidin etil esteri (E 160f)	Gümüş (E 174)
Bitkisel karbon (E 153)	Titanyum dioksit (E 171)
Kantaksantin(E 161g)	Kalsiyum karbonat (E 170)
Sade Karamel (E 150a)	
Kostik sülfid karamel(E 150b)	
Amonyum karamel(E 150c)	
Amonyum sülfid karamel(E 150d)	
Karotenler(E160a)	
Karışım halindeki karotenler	
Beta-karoten	
Klorofiller ve Klorofilinler(E 140)	
Klorofiller	
Klorofilinler(E141)	
Klorofilinler bakır kompleksleri	
Koşineal, Karminik asit, Karminler(E 120)	
Kurkumin(E100))	
Likopen(E 160d)	
Lutein(E 161b)	
Pancar koku kırmızısı, Betanin(E 162)	
Paprika ekstraktı, Kapsantin, Kapsorubin(E 160c)	
Riboflavin, Riboflavin-5'-fosfat(E 101)	

Tablo 1.3. Türk gıda kodeksinde gıdalarda kullanımına izin verilen suda çözünen yapay renk maddeleri (Anonim, 2002)

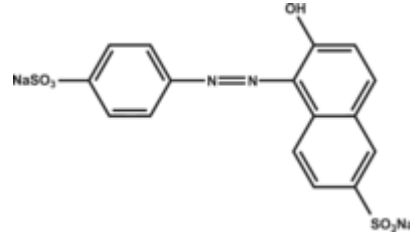
Suda çözünen yapay renk maddeleri

Allura Red AC(E 129)
Amarant(E 123)
Azorubin, Karmosin(E 122)
Brilliant Black BN, Black PN(E 151)
Brilliant Blue FCF(E 133)
Brown FK(E 154)
Brown HT(E 155)
Eritrosin(E 127)
Green S(E 142)
Indigotin (Indigo Karmin(E 132)
Kinolin sarısı(E 104)
Litolrubin BK(E 180)
Patent Blue V(E 131)
Ponso(ponceau) 4R, Kosineal Red A(E 124)
Red 2G(E 128)
Sunset yellow FCF Orange yellow S(E 110)
Tartrazin(E 102)

Bu çalışmada, özellikle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan iki boya maddesi; Brilliant Black ve Sunset Yellow'un *Allium cepa* L., *Vicia faba* L., ve *Tradescantia pallida* H., bitkilerindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Sunset Yellow (E110)

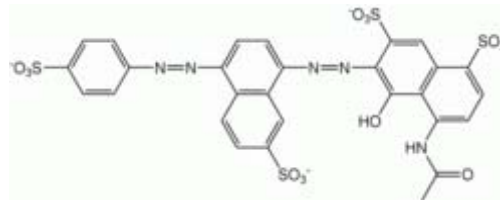
Sentetik bir renklendiricidir. Unlu gıdalar, pasta, tatlı, çerez, dondurma, içecek, konserve balık, hazır çorba ve bazı şurup cinsi ilaçlarda kullanılmaktadır. İnsan sağlığı üzerinde çok fazla yan etkileri bulunmaktadır. Bilinen yan etkileri ise; kurdeşen, rinit (burun akması), burun tıkanıklığı, alerji, hiperaktivite, böbrek tümörü, kromozom hasarı, karın ağrısı, bulantı ve kusma, hazımsızlık ve iştahsızlıktır. Kullanımı Norveç'te yasaklanmıştır (http://www.gidaraporu.com/gida-maddelerinde-kullanilan-renklendiriciler_g.htm).



Şekil 1.1. Sunset Yellow (E110) kimyasal yapısı
(http://en.wikipedia.org/wiki/Sunset_yellow).

1.2. Brilliant Black (E151)

Tatlılar, balık ezmesi, aromalı sütlü içecekler, bebek gıdaları, dondurma, hardal, marmelat, sos, kek ve içeceklerde kullanılmaktadır. İnsan sağlığı üzerinde genotoksik etkileri saptanmış olan bu renklendiriciler birçok Avrupa ülkesinde ve Amerika'da yasaklanmış durumdadır (http://www.gidaraporu.com/gida-maddelerinde-kullanilan-renklendiriciler_g.htm).



Şekil 1.2. Brilliant Black (E151) kimyasal yapısı
(http://en.wikipedia.org/wiki/Brilliant_Black_BN)

Görüldüğü üzere insanların beslenmesinde temel olabilecek nitelikteki tüm gıda maddeleri arasında yer alan bu iki boyalı madde üzerinde yapılacak olan bu araştırma sonucunda genotoksik potansiyelleri ve canlı sistemlerde meydana getireceği genetik hasarlar saptanmış olacaktır. Her araştırmada olduğu gibi bitkisel ya da hayvansal organizmaların ilk model olarak kullanıldığı bu sistemlerden elde edilecek veriler doğrultusunda insan sağlığı ile ilgili bağlantılı çalışmaların yapılması planlanmaktadır. Sonuç olarak; bitki sistemlerine uygulanan bu maddelerin diğer ülkelerde olduğu gibi yasaklanması ya da insan sağlığını tehdit etmeyecek düzeyde uygun miktarlarda kullanılabilmesi yönünde girişimlerde bulunulması planlanmaktadır.

1.3. Genotoksik Maddeler ve Genotoksisite

Sözcük anlamı zehir bilimi olan toksikoloji, kimyasallarla biyolojik sistem arasındaki etkileşimleri zararlı sonuçları yönünden incelemektedir. Toksikoloji kimyasalların zararsızlık limitlerini inceleyen bilim dalıdır ve inceleme alanlarına göre çeşitli alt dallara ayrılmaktadır. Toksikolojinin bir alt dalı olan ve kimyasalların çeşitli hücre genetiği teknikleriyle elde edilen kromozomlar üzerine etkilerini inceleyen bilim dalı “genotoksikoloji” olarak adlandırılmaktadır. Kromozom tekniklerinin gelişmesinden sonra kimyasalların genotoksik etkileri de incelenmeye başlanmıştır (<http://www.nadidem.net/bmk/Genotok04.pdf>).

Genlerde DNA ile toksik ajanların etkileşmesi sonucu ortaya çıkan ve gelecek nesillere taşınan toksisite genotoksisite olarak adlandırılmaktadır (Başaran, 2004). Genotoksisiteye neden olan tüm maddeler ise genotoksik maddeler adını alırlar. Tüm ilaçlar, temizlik ve kozmetik maddeleri, pestisitler, besin katkı maddeleri ve sanayide kullanıldığında insanların maruz kalabileceği kimyasal maddeler toksik potansiyellere sahiptirler ve kullanıma sunulmadan önce toksik potansiyelleri yönünden değerlendirilirler. Bu maddelerin kullanım amaçları, etki yolları ve süreleri göz önüne alınarak toksisite testleri dizayn edilmektedir. Muhtemel toksik etkiler in vivo koşullarda deney hayvanlarında veya in vitro koşullarda hücre kültürlerinde araştırılmaktadır (Saygı, 2003).

Genotoksisite çalışmalarında etkisi araştırılan kimyasal için çok sayıda kromozom preparatlarının hazırlanması, anormallik oranlarının ayrı doz ve süreler için belirlenmesi, bu aşamada yüzlerce hücrenin mikroskopta sayılması, incelenmesi ve istatistiksel hesaplamalarla sonuca gidilmesi gerekmektedir. Bir maddenin potansiyel mutajen olup olmadığının belirlenmesi için kromozomal anormalliklere neden olup olamadığına bakılmaktadır. Kimyasalın çeşitli doz ve muamele sürelerinde hücre kültürüne eklenmesinin ardından, elde edilen kromozom preparatlarının incelenmesiyle sonuca gidilir. Kromozom anormalliklerinin genotoksik maddeler için indikatör olduğu belirtilmektedir. Araştırmaların sonuçlarına göre genotoksik maddeler, uygulanan doz ve süreye bağlı olarak, mitoz bölünme halinde olan hücrelerin toplam hücre sayısına % cinsinden oranı olan mitotik indeksi etkilemektedir. Kimyasalların mitoz bölünme üzerindeki olumlu ya da olumsuz etkileri mitotik indeksin saptanmasıyla belirlenmektedir. Bu etki sitotoksisitenin göstergesi olarak değerlendirilmektedir (<http://www.nadidem.net/bmk/Genotok04.pdf>).

Genotoksik potansiyel durumu ise; kısa zamanlı testlerle mutasyon, kardeş kromatid değişimleri, kromozom anomalileri frekansları gibi değerlerle ölçülebilmektedir. Genotoksik potansiyeli belirlemek amacıyla kullanılan testler arasında özellikle gen mutasyonlarının belirlenmesinde bakteriler, funguslar, *Drosophila* sp., memeli hücreleri, bitkiler ve memelilerin kullanıldığı testler yer almaktadır (Akı ve Karabay, 2004).

Gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan ve canlının yaşamı üzerinde potansiyel bir tehlike unsuru olabilen gıda renklendirici maddelerinin de genotoksik potansiyellere sahip oldukları bilinmektedir. Bu maddelerin organizmalara uygulanması sonucunda konsantrasyonlarına bağlı olarak canlı hücrelerin fenotipik ve genotipik yapılarında değişiklikler gözlenmektedir. Genotoksik potansiyellere sahip maddelerin organizmalarda oluşturduğu genetik hasarların belirlenmesinde ise birtakım testler kullanılmaktadır. Bunlar aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo 1.4. Genetik toksikolojide kullanılan temel testler (Akı ve Karabay, 2004)

I. Temel testler
A. Gen mutasyonları için test
Salmonella/memeli mikrozom testi (Ames testi)
B. İn vivo kromozom hasarı için memeli testi
Rodent kemik iliğinde metafaz analizi ya da mikronükleus testi
II. Yoğun veri tabanı ya da tek son nokta üzerine dayanan diğer testler
A. Gen mutasyonları için testler
E.coli WP2 triptofan reversiyon testi
Kültüre edilmiş memeli hücrelerinde TK ve HPRT ileri mutasyonları testi
Drosophila eşeye bağlı resesif letal test
B. Kültüre edilmiş Çin Hamster ya da insan hücrelerinde sitogenetik analiz
Kromozom aberasyonları ve mikronükleus için testler
Aneuploidi için testler
C. Genetik hasarın diğer indikatörleri
Mayada ya da Drosophila' da mitotik rekombinasyon için testler
Kültüre edilmiş hepatositler ve rodentlerde programsız DNA sentezi
D. Memeli eşey hücre testleri
Fare görülebilir veya elektroforetik spesifik-lokus testleri
İskeletal ya da katarakt mutasyonları için testler
Sitogenetik analizler ve kalıtımsal translokasyon testleri
Rodent eşey hücrelerinde DNA hasarı ve onarımı
Dominant letal test

Tablo 1.5. Gen mutasyonlarının belirlenmesi için kullanılan testler (Akı ve Karabay, 2004)

İzlenen genetik/ biyokimyasal sonuç	Testler
A. Bakteriyal Testler	
1. Okzotrofların dönüşümü	<ul style="list-style-type: none">• <i>Salmonella</i>/ memeli mikrozom testi (Ames Testi) $his^- \rightarrow his^+$• <i>E.coli</i> WP2 triptofan dönüşüm testi (Fluktasyon Testi) $trp^- \rightarrow trp^+$
2. İleri yönlü mutasyonlar	<i>Salmonella</i> ' da arabinoz dayanıklılığı
3. Profaj indüksiyonu	<p>İnhibisyon zonu ölçümü</p> <ul style="list-style-type: none">• Faj sayımı• Konakçı hücre lizisi
B. Fungal Testler	
1. Okzotrofların dönüşümü	Neurospora ya da mayada (<i>S. cerevisiae</i>) okzotrofların dönüşümü
2. İleri yönlü mutasyonlar	Neurospora ya da mayada (<i>S. cerevisiae</i>) koloni rengi ile adenin mutantlarının belirlenmesi ($Ade^- \rightarrow Ade^+$)
C. Memeli Hücre Testleri	
İleri yönlü mutasyonlar	<ul style="list-style-type: none">• Fare lenfoma hücreleri ya da insan hücrelerinde pirimidin analoglarına dayanıklılıkla TK mutantlarının seçilmesi• Çin Hamsteri ya da insan hücrelerinde purin analoglarına dayanıklılıkla HGPRT mutantlarının seçilmesi• Çin Hamsteri AS52 hücrelerinde purin analoglarına dayanıklılıkla XPRT mutantlarının seçilmesi

D. Bitki Testleri	
Çiçek, polen ya da fidelerdeki mutasyonlar	Tradescantia stamen tüy rengi; mısır waxy lokusu; çeşitli bitkilerde klorofil mutasyonları
E. Drosophila Testleri	
Eşey hücrelerinde gen mutasyonları ve küçük delesyonlar	<i>D.melanogaster'</i> de eşeye bağlı resesif letal mutasyon testi
F. Memeli Testleri	
1. Eşey hücrelerinde gen mutasyonları ve delesyonlar	<ul style="list-style-type: none">• Görünür markerler kullanarak fareye spesifik lokus testi• Fare elektroforetik spesifik-lokus testi• Fare iskeletal defektleri ya da katarakta sebep olan dominant mutasyonlar• Fare spot test (somatik hücreye spesifik lokus test)
2. Somatik hücrelerdeki gen mutasyonları	<ul style="list-style-type: none">• Rodent lenfositlerinde 6-tioguanine dayanıklılıkla HGPRT mutasyonlarının belirlenmesi• Fare ve sıçanlarda <i>lac I</i> mutasyonları
3. Transgenik farede bakteriyal hedef genlerdeki gen mutasyonları	<ul style="list-style-type: none">• Farede <i>lac Z</i> mutasyonları

Son dönemde iyi birer monitör sistem olmaları nedeni ile çeşitli bitkiler genotoksik potansiyellerinin saptanması amacı ile sıkça kullanılmaktadır. Bitki biyoanalizlerinde moleküler sitogenetik yaklaşımlar ile bitki genotoksitesini araştırmaları gerçekleştirilmektedir. DNA zararlarının ve onların moleküler şekillerinin biyolojik sonuçlarını anlamak için, çevrenin neden olduğu DNA değişikliklerini önlemek oldukça önemlidir. DNA reaktif bileşiklerini tanımlamak için çok sayıda genotoksitesite analiz sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan en çok kullanılanları mikronükleus analizi, stamen tüy mutasyon analizi, kök ucu hücre testidir. Bu analizler bitki sistemlerindeki gen mutasyonlarını ve kromozom aberasyonlarını içeren genetik zararın büyük bir kısmını ortaya çıkarabilmektedir.

Son zamanlarda hem kromozomal hem de DNA düzeyinde genotoksisite analizlerine izin veren moleküler sitogenetik metodlar da geliştirilmiştir. Bunlardan FISH olarak bilinen bir teknik kromozomların belirlenmesine olanak tanıyan büyük detaylara sahiptir (Maluszynska ve Juchimiuk, 2004).

Kullanışlı olan çoğu biyoanalizler arasında çevresel mutajenlerin in situ değerlendirilmesinde biyoindikatörler olarak yüksek bitkilere dayanan bu analizler bazı avantajlara sahiptirler. Bu analizler genellikle özel yapısal ya da lojistik desteklerden bağımsız olan düşük maliyetli test sistemleridir ve aşırı örnek kullanımına ya da kompleks örnek konsantrasyon prosedürlerine gereksinim göstermezler (Rodrigues, 1999a).

1.4. Bitkisel Organizmalarda Kullanılan Bazı Testler

1.4.1. Kök ucu hücreleri testi

Soğan veya bakla gibi bitkisel organizmaların kök ucu hücreleri testinde kromozom anomalilerinin ve mitotik aktivitenin belirlenmesi gerekmektedir. Mitotik aktivitenin ve kromozomal anomalilerin belirlenmesi için mitotik analiz yöntemi uygulanmaktadır. Bu testin avantajları şunlardır;

1. Kök uçları ile uğraşmak kolaydır.
2. Kök meristemi bölünen bir çok hücre içerir.
3. Kök uçları konsantrasyonu ayarlanabilen kimyasallarla doğrudan etkileştirilebilir.
4. Soğan bütün sene kolay ve ucuz elde edilebilir.
5. Kromozomları sayıca az fakat yapı bakımından büyüktür.

1.4.1.1. Mitotik analiz

Mitoz bölünme bitkilerde meristematik dokularda incelenebilir. Bitkilerdeki meristematik dokular bitkinin tüm yaşamı boyunca bölünebilme yeteneğindedir.

Meristematik dokular kök ucu ve gövde sürgünlerinde bulunmaktadır. Bitkilerde mitoz bölünme incelemesi için en çok kök ucundan, genç yapraklardan ve küçük çiçek tomurcuklarının petal yapraklarından yararlanılmaktadır. Kromozom sayımı yapabilmek için kullanılan materyalde mitotik indeks yüksek olmalıdır yani bölünmekte olan hücrelerin oranı yüksek olmalıdır. Bazı bitkilerde mitozun periyodik değişim gösterdiği saptanmıştır. Yani günün belirli saatlerinde mitotik indeksin daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Mitotik analiz yapmak amacıyla materyalin hazırlanması 4 aşamada gerçekleştirilmektedir ;

1. Ön İşlem
2. Fiksasyon
3. Maserasyon
4. Boyama

Ön işlem: Materyal daha canlı iken uygulanır ve amaçları şu şekilde özetlenebilir; İğ ipliklerini tahrip etmek veya oluşmasını engellemek suretiyle metafaz safhasındaki kromozomların anafaz safhasına geçmesini engellemek ve böylece kromozom sayımı için en uygun safha olan metafaz safhasındaki hücrelerin sayısını arttırmak (kromozomların metafaz safhasında durmasını sağlamak). Yine iğ ipliklerini tahrip etmek suretiyle kromozomların metafazda ekvator plağında toplanmasını engellemek, daha dağınık durmalarını sağlamak ve dolayısı ile sayımı kolaylaştırmak. Protoplazmanın viskozitesini arttırarak ezme preparat yapılırken hücrenin fazla dağılmasını önlemek. Zaten kısalmış olan metafaz kromozomlarını daha da kısaltarak kromozomların birbiri üzerine binmesini azaltmak ya da önlemek, böylece incelemeyi ve sayımı kolaylaştırmak. Ön işlem için kullanılacak kimyasal maddenin yoğunluğu ve uygulama süresi materyale göre değişir. Ön işleme alınacak bitki materyali kısa bir süre su içinde korunabilir, ancak uzun süre su içinde tutmak doğru değildir.

Fiksasyon: Fiksatiflerde etkinlik çok önemlidir ve fiksasyon kromozomların canlının hayatındaki durumuna mümkün olduğu kadar yakın bir durumda olmalıdır. Fiksasyon işlemi hücreleri bozmadan öldürmek amacıyla uygulandığı için, fiksatifin etkisi öldürme işlemini hızlı bir şekilde yapmasına bağlıdır. Fiksatifin hücreler üzerinde hızlı bir sertleştirme etkisi olmalı ve bunun yanında dokulara mümkün olduğunca hızlı girmelidir. Bu yapılırken kromozomların boyanma özellikleri de korunmalıdır. Çok çeşitli fiksatifler kullanılabilir. Çalışmamızda kullanacağımız fiksatif 3 kısım % 96'lık etil alkol : 1 kısım glacial asetik asit'ten oluşan *Farmer Fiksativi*'dir.

Maserasyon: Dokuların yumuşatılması anlamındadır. Hücreleri birarada tutan orta lamelleri ortadan kaldırarak preparat hazırlanırken hücrelerin daha iyi dağılmaları sağlanır. Bu amaçla % 45'lik asetik asit, 1 N HCl veya enzimler kullanılabilir.

Kromozomların boyanması: Normal ışık mikroskobu ile kromozomların incelenebilmesi için bunların özel boyalarla boyanması gerekir. Bu boyalardan en çok kullanılanlar; Carmin (asetokarmin), Orsein (asetoorsein), Nigrosin ve Bazik Fuksin (Feulgen)'dir. Bunlar kromozomlarda solid bir boyama sağlarlar yani kromozomun her tarafı aynı şekilde boyanır. Bunun yanında kromozomları bantlı olarak boyayan yöntemler de geliştirilmiştir. Böylece kromozomların eukromatik ve heterokromatik kısımları belirgin olacak şekilde boyanabilir.

Mitoz Uygulama Yönteminde Bitkilerde mitotik kromozomları incelemek için aşağıdaki basamaklar izlenmektedir (Tijo ve Levan, 1950);

1. Kök uçları ön işlem amacıyla 0.002 M 8-hidroksikinolin içinde 3-4 saat oda sıcaklığında bekletilir.

2. Ön işlem sonrasında alınan kök uçları fiksasyon için 3:1 asetik alkol içerisine konur ve preparat hazırlanmaya kadar buzdolabında (+4 °C' de) bekletilir.

3. Fikse edilmiş kök uçları 60 °C' deki 1 N HCl içerisinde 10 dakika masere edilir (hidroliz yapılır) ve işlem sonunda saf su içerisine alınır.

4. Kök ucu bir lam üzerine konur ve daha koyu beyaz gözlenen uç kısmından yaklaşık olarak 2 mm kadar kesilir. Üzerine asetoorsein damlatılır ve lamel kapatılır. Kök ucu ezilerek hücrelerin tek bir tabaka halinde dağılmaları sağlanır.

5. Mikroskopta incelenir.

1 N HCl içerisinde 10 dk hidroliz yöntemi uygulanmayacaksa, fiksatiften alınan kök uçları porselen bir cezveye aktarılıp üzerini örtecek miktarda asetoorsein dökülür. Bir bek üzerinde 3 kez buhar çıkıncaya kadar ısıtılıp ve daha sonra ezme işlemine geçilerek de preparat hazırlanabilir.

1.4.1.2. Mitotik aktivitenin hesaplanması

Meristematik hücrelerdeki mitotik safhaların sitolojik olarak gözlenmesi ile mitotik aktivite (indeks) hesaplanabilmektedir. Mitotik aktivite, bölünen hücrelerin bölünmeyen meristematik hücrelere göre oranıdır. Genellikle kromozom sayımı çalışmalarında ve toksikolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Böylece eğer bir kimyasal madde ile uygulama varsa maddenin bölünme oranı üzerinde ne şekilde etkili olduğu konusunda bilgi vermektedir. Mitotik indeks % olarak şu formül ile hesaplanmaktadır;

$$\text{Mitotik indeks (\%)} = \frac{\text{Bölünen Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$

Mitotik indeks dışında ayrıca $\frac{M}{A+T}$ oranı da hesaplanmaktadır. Bu katsayının yüksek değerde olması (yani 1' den büyük olması) ve anafaz + telofaz frekansının azalması, karyokinetik iğ ipliklerinin inaktive olduğunu göstermektedir. Bu değer hiç bir madde ile muamele görmemiş materyal ile yapılan sitolojik çalışmalarda ise ortamdaki safsızlıkların kontrolü için önemlidir (Akı ve Karabay, 2004).

1.4.2. Mikronükleus oluşumu ve analizi

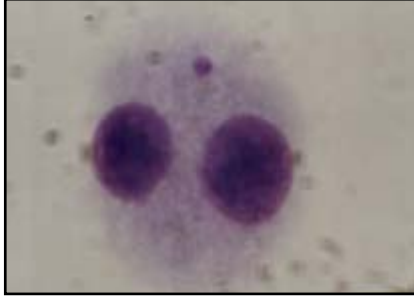
Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar (Zijno ve diğ., 1994, Ford ve diğ., 1988, Vanderkerken ve diğ., 1989, Vanparys ve diğ., 1990). Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (Labay ve diğ., 2001, Majer ve diğ., 2001, Pastor ve diğ., 2001, Schweickl ve diğ., 2001, Hessel ve diğ., 2001, Garewal ve diğ., 1993, Maluf ve Erdtmann., 2001, Schneider ve diğ., 2001, Rozgaj ve Kasuba., 2000, Naccarati ve diğ., 2000).

1.4.2.1. Mikronükleus tekniğinin gelişimi

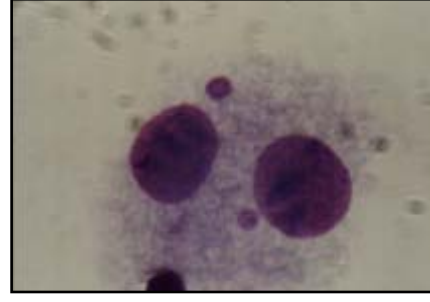
MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde (Widel ve diğ., 2001, Jagetia ve diğ., 2001) ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş (Schmid, 1975) insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bazı araştırmacılar (Von Ledebur ve Schmid., 1973, Heddle ve Countryman., 1976, Höghstedt ve Karlsson., 1985) geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'lerin

asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir. Eastmond ve Tucker (1989) aynı amaçla antikinetokor antikoları kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmanı içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır. Daha sonraları Fenech ve Morley (1985, 1986) tarafından geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın (1976) kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Heddle ve Countryman'ın (1976) kriterlerine göre:

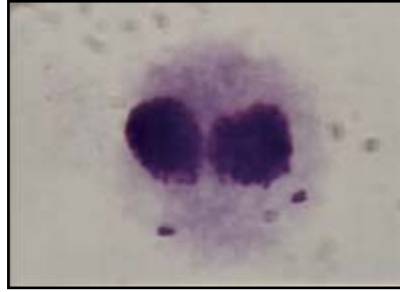
1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır (Şekil 1.3., 1.4. ve 1.5.).



Şekil 1.3. Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus bulunan hücre (Demirel ve Zamani, 2002).



Şekil 1.4. Sitokinezi bloke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre (Demirel ve Zamani, 2002).



Şekil 1.5. Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre (Demirel ve Zamani, 2002).

Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, eksfoliyatif hücrelere 1982 yılında ilk defa Stich ve arkadaşları (1982) tarafından uygulanmıştır. Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal eksfoliyatif hücrelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur (Rosin ve Gilbert., 1990, Stich ve Rosin., 1984). Hızla çoğalan bu epitelyal dokular çevreleriyle sürekli temas halindedir ve epitelin yüzeyel tabakasını oluşturan eksfoliyatif hücreler kolaylıkla elde edilebilmekte, dolayısıyla uğradıkları genotoksik hasar da kolaylıkla gösterilebilmektedir. Böylece bu hücreler ait oldukları dokularda meydana gelen morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiklerinden bir biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser

riskini göstermek amacıyla kullanılabilir (Stich ve Rosin., 1984, Lehucker-Michel ve diğ., 1995, Moore ve diğ., 1996, 1997). Eksfoliyatif hücrelerde uygulanan MN tekniğinde Fielgen-Fast Green boyama yöntemi kullanılmakta, hücrenin çekirdeği parlak pembe, sitoplazması ise açık yeşil boyanmaktadır. MN testi sigara, pestisid ve parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için kolaylıkla kullanılmaktadır (27,29-31 Lehucker-Michel ve diğ., 1995, Moore ve diğ., 1997, Özkul ve diğ., 1997, Rosin ve Anwar., 1992).

1.4.2.2. Mikronükleus tekniğinin kullanım alanları

1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısı çok hızlı bir şekilde arttı. Mavournin ve arkadaşları (1990) 1990 yılına kadar kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için yapılan tüm MN test sonuçlarını toplayarak, ABD Çevre Koruma Grubunun Gen-toks Programı dahilinde değerlendirmeye aldılar. Memelilerin kan ve kemik iliğinde in vivo çalışılmış olan 414 bileşiğin sadece 220'sinin kriterlere uygun test edilebildiği ortaya çıktı. Uygun test edilen kimyasallar arasında karsinojenlerin oranı % 91 olarak saptandı; ancak negatif testlerin azlığı ciddi bir eksiklik olarak bildirildi. Ayrıca bu çalışmalarda esas alınan ve yıllar önce Schmid (1976) tarafından tanımlanan MN test protokolunun modifikasyonuna ihtiyaç duyulduğu ve daha fazla çalışmanın gerekli olduğu vurgulandı.

Fiziksel ajanların etkileri deneysel MN çalışmaları yanında, 13 Eylül 1987'de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kazanın genetik materyalde oluşturduğu hasarı belirlemek için kullanıldı. MN sıklığında iyonizan radyasyonun dozuna bağlı çok anlamlı bir artış gözlemlendi ve MN testinin biyolojik dozimetre olarak kullanılması önerildi. Ayrıca Goiânia kazasına maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler iyonizan radyasyon ile yaş ve hayat tarzı (alkol tüketimi, sigara kullanımı) gibi faktörlerin etkisi birlikte ele alınarak değerlendirildi (Cruz ve diğ., 1994). Daha sonra bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar iyonizan radyasyonun ve

mikro dalga ışınların klastojenik etkisini açıkça ortaya koydu ve ayrıca mikro dalga ışınların, anöploidi uyaran bazı kimyasalların, karakteristik mutajen özelliklerine de sahip olduğu gösterildi (Jagetia ve diğ., 2001, Yoshida ve diğ., 2001, Oliveira ve diğ., 2001, Fucic ve diğ., 1992, Jagetia ve Jacop., 1994).

Yenidoğan bebeklerde ve 18-25 yaş grubu bireylerde yapılan iki ayrı çalışmada (Çora ve diğ., 1992, Acar ve diğ., 1995) MN frekansının erkek ve dişi cinsiyete bağlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır. Ancak yaşlılarda yapılan bir diğer çalışmada (Richard ve diğ., 1994) kadınlarda MN sıklığının yaşlanma ile artış gösterdiği anlaşılmış; ayrıca FISH tekniği ile MN oluşturan kromozomların kimliği belirlenerek; yaşlı kadınlarda X kromozomlarının otozomal kromozomlardan daha sık olarak MN oluşumuna katıldığı gösterilmiştir. X kromozom kaybı, aynı zamanda monozomik hücrelerde karyotip analizleriyle de doğrulanmıştır. Bu çalışma, MN oluşumu ile karyotip analizlerinde saptanabilen kromozom düzensizlikleri arasındaki paralelliği açıkça ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN testi, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir.

Mikronükleusun belirlenmesi insan biyomonitör sistemleri için lenfositler, epitel hücreler ve fibroblastlar gibi farklı hücre tiplerinde gerçekleştirilmiştir (Fenech ve diğ. 2003). Bu tür belirlenmeler aynı şekilde bitkilerde polen ana hücrelerinde de kolaylıkla yapılabilmektedir. *Allium cepa* ve *Vicia faba* gibi bitkilerde oluşan mikronükleus yapıları kök ucu hücreleri testi gerçekleştirilerek gözlenmektedir. Mikronükleuslar *Tradescantia* bitkisinde de polen ana hücrelerinde mayoz bölünmenin erken tetrad safhasında görülmektedir ve analizi için farklı uygulama metodları bulunmaktadır. Bu uygulamalar kullanılarak çeşitli kimyasalların ya da zararlı ışınların genotoksik potansiyelleri hakkında bilgiler elde edilebilmektedir. Bu uygulamalara baktığımızda;

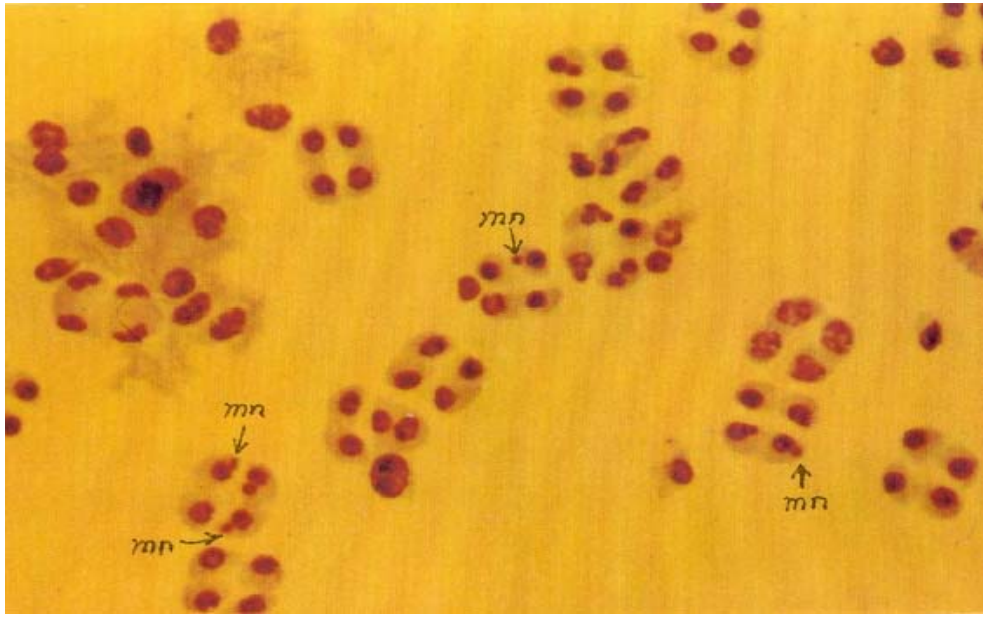
Sıvı denemeleri için: Bilinen kimyasal solüsyonlar, bilinmeyen kirletici karışımları.

Gaz denemeleri için: Bilinen gazlı kimyasallar, bilinmeyen karışımlar

İn situ görüntüleme için: Yüzeysel suları (ırmak, göl, gölet, haliç), dış ortam havası, iç ortam havası (kapalı alanlar) ve dış ortamdan gelen radyasyon.

Toprak ekstraktları: Su çözgeni, organik çözünebilir madde.

Radyasyon: İyonize radyasyon ve UV, nötron ve alfa partikülleri şeklinde olduğu görülmektedir (Ma ve diğ., 1994b).



Şekil 1.6. *Tradescantia* da mayoz bölünmenin tetrad safhasındaki mikronükleuslar (Ma ve diğ., 1994b).

1.4.3. Stamen tüyü analizi

Kimyasalların genotoksitesini test etmede kullanılan, bitkilerde özel lokus mutasyon analizleri bulunmaktadır. Bunlar bir ya da iki lokusta heterozigot olan özel oluşturulmuş test strainleri veya klonlar üzerine temellenir. Bu durum test bileşiklerinin uygulanmasından kısa bir süre sonra somatik mutasyonların ortaya çıkmasına olanak sağlar. Somatik mutasyonlar; yapraklar (soya fasülyesi, tütün, yonca, mısır) ya da çiçek petalleri ve stamen tüyleri (*Tradescantia*) üzerindeki farklı renklerdeki doku bölgeleri olarak ifade edilir (Akı ve Karabay, 2004).

Tradescantia türlerarası melezlerinde stamen tüy analizi, en duyarlı laboratuvar testlerinden biridir; bu test gazlı hava kirleticilerinin in situ izlenmesi için de kullanılmaktadır ve çiçek tomurcuklarının maruzatından 2-3 hafta sonra sonuç vermektedir. Stamen tüyü analizinde somatik resesif mutasyonların varlığı pembe renkli mitotik hücrelerin oluşumu ile ortaya çıkmaktadır.

Tradescantia stamen tüyü mutasyon biyoanalizi için farklı uygulama metodları bulunmaktadır. Bu uygulamalar kullanılarak çeşitli kimyasalların ya da zararlı ışınların genotoksik potansiyelleri hakkında bilgiler elde edilebilmektedir. Bu uygulamalara baktığımızda;

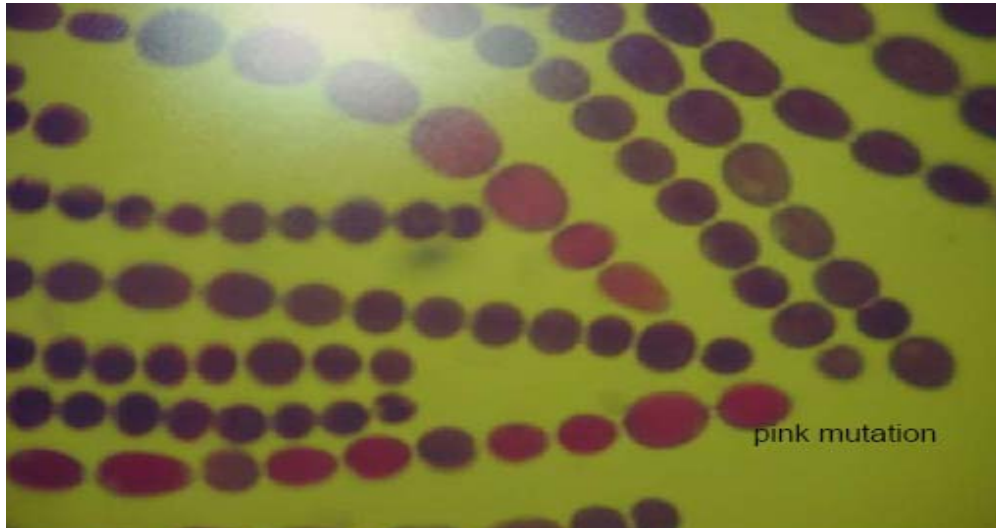
Sıvı denemeleri için: Bilinen kimyasal solüsyonlar, bilinmeyen kirletici karışımları.

Gaz denemeleri için: Bilinen gazlı kimyasallar, bilinmeyen karışımlar

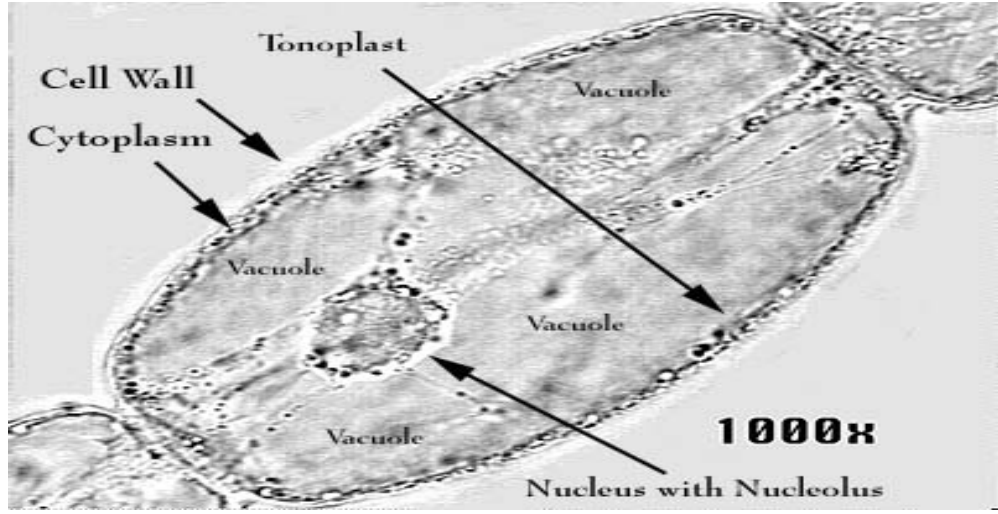
İn situ görüntüleme için: Yüzey suları (ırmak, göl, gölet, haliç), dış ortam havası, iç ortam havası (kapalı alanlar) ve dış ortamdan gelen radyasyon.

Toprak ekstraktları: Su çözgeni, organik çözünebilir madde.

Radyasyon: İyonize radyasyon ve UV, nötron ve alfa partikülleri şeklinde olduğu görülmektedir (Ma ve diğ., 1994a).



Şekil 1.7. Stamen tüyü hücrelerinde mutasyon (Ma ve diğ., 1994a).



Şekil 1.8. Stamen tüyü hücre yapısı (http://botit.botany.wisc.edu/courses/botany_130/Eukaryotic_Cell/Cell.html).

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Günümüze kadar çeşitli kimyasal maddelerin, çevresel ışınımların, atık suların ve stres faktörlerinin canlılar üzerindeki genetiksel ve fizyolojik olarak meydana getirmiş olduğu ve onların yaşamlarını doğrudan etkileyen faktörler ile ilgili pek çok bilimsel araştırmalar yapılmıştır:

1999 yılında yapılan bir çalışmada; UV-B radyasyonun artan seviyesi çevre için potansiyel bir tehlike olarak görülmüş, bu durum ise araştırmaları UV-B radyasyonun sitogenetik etkilerinin belirlenmesi yönüne teşvik etmiştir. Bu amaçla *Tradescantia* bitkisinin polen ana hücreleri üzerinde oluşan hasar mikronükleus testi ile incelenmiştir (Wang ve Wang, 1999). *Tradescantia*'nın üç klonu için yapay UV-B radyasyonu 10 saatlik sürenin yanı sıra artan dozlarda (2, 4, 6, 8 saatlik sürelerde) bitkilere uygulanmıştır. Muamele edilmiş bitkiler ve kontrol bitkilerinin çiçeklenmeleri saptanmıştır. Daha sonra bunlar preparatların hazırlanmasında kullanılmıştır. Mikronükleusların frekansları ve genotoksisitenin derecesi erken tetradların oluşum evresi ile gözlenmiştir. Tekrarlanan bu iki deneyin sonuçları normal gün ışığı altında mikronükleus frekanslarındaki artışın kullanılan UV ışığının dozuna bağlı olarak arttığını göstermiştir. Yağmurlu ve bulutlu bir gün altında yapılan oldukça yüksek bir üçüncü UV-B uygulaması sonucunda ise mikronükleus frekanslarının önceki iki denemeye nazaran daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuçta artan radyasyon oranına bağlı olarak mikronükleus sayısında artış gözlemlenmiş ve mikronükleus testlerinin UV-B radyasyonun etkisinin belirlenmesinde önemli bir yere sahip olduğu saptanmıştır (Wang ve Wang, 1999).

2006 yılında; canlı organizmalar üzerinde karsinogenik etkiye sebebiyet veren Ave önemli bir çevresel mutajen ajan olan iyonize radyasyonun bitkiler üzerindeki biyolojiksel etkilerini belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada radyasyonun olası etkileri değerlendirilmiştir (Yalçın, 2006).

Bitki temelinde farmasötik ve kozmetik risk faktörlerinin taramasının yapıldığı farklı bir araştırmada; tüm bitki ve tohumların analizleri, hücre kültürleri analizleri yapılmış olup, polen oluşumu ve polen büyümesi incelenmiştir. Elde edilen verilerde; yüksek bitkilerdeki toksik etki mekanizmasının bir kimyasal maddenin hücrelerarası bölgedeki birikimine bağlı olduğu, onun özellikle de hücresel yapılara zarar verdiği vurgulanmıştır. Ayrıca çevresel risklerin belirlenmesinde toksikolojik analizlerin uygunluğunu yüksek bitkilerin sağladığı sonucuna da varılmıştır (Kristen, 1997).

Fungusitlerin bitki hücreleri ve memeliler üzerindeki etkileri çevresel kirleticilerin in vivo ve in vitro için genotoksik potansiyelinin belirlenmesinde hızlı yanıt veren tek hücre jel elektroforezi (SCGE) kullanılarak genotoksisite teşviki yolu ile araştırılmıştır. Fenarimol'un DNA üzerinde zarar verici nitelikte olduğu bilinmektedir. Çalışmanın birçok hedefi bulunmaktadır. Bunlar; DNA ile fenarimol'un etkileşimlerinin olasılığını belirlemek, farklı iki memeli türünde lökositlerde fungusit'e karşı özel duyarlılığını belirlemek, fenarimol'un toksik ya da genotoksik potansiyelini belirlemek ve en son olarak da tropikal bölgelerde fenarimol'a duyarlı yabancı tip bitki türlerinin bulunup bulunmadığını belirlemektir. Sonuç olarak, zarar görmüş hücrelerin frekanslarındaki artış, artan fungusit dozlarının kanıtı olmuştur. Fenarimol'un teşviki ile hem sitotoksisite hem de genotoksisite artmıştır (Poli ve diğ., 2003).

Besin endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılan iki farklı boya maddesi ile genotoksisite değerlendirilmesinin yapıldığı araştırmada Quinoline Yellow (E104) ve Brilliant Black BN (E151) boya maddelerinin genotoksik etkileri ve potansiyel sitolojik etkileri in vitro insan lenfositleri ve in vivo *Vicia faba* kök ucu meristemleri kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmada oldukça duyarlı ve hızlı testler olan mikronükleus ve comet analizi testleri yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bilgiler göstermiştir ki; analiz edilen boya maddelerinin genotoksik etkileri, potansiyel olarak genotoksik tarama için mikronükleus ve comet analizi testleri ile belirlenebilmiştir ve in vitro insan lenfositleri ile in vivo *Vicia faba* kök ucu

meristemlerinde kardeş kromatid değişiklikleri, kromozomal aberasyonlar ve mikronükleus oluşumları gözlenmiştir (Macioszek ve Kononowicz, 2004).

Gıdalarla ilgili olarak yapılan bir diğer araştırmada ise antimikrobiyal madde olarak kullanılan sodyum metabisülfıt'in *Allium cepa*'nın mitoz bölünme geçiren kök ucu hücrelerinde sitogenetik etkileri araştırılmıştır. *A. cepa* kökleri 7.5mg/lt, 15mg/lt ve 30mg/lt konsantrasyonlarındaki sodyum metabisülfıt ile 10 ve 20 saat muamele edilmiştir. Sodyum metabisülfıt'in bütün konsantrasyon ve muamele sürelerinde mitotik indeksi kontrol'e nazaran azaltırken mitotik anormallikleri doza bağlı olarak arttırmıştır (Rencüzoğulları ve diğ., 2001).

Allium cepa kök hücrelerinde maleik hidrazid, akridin ve DEHP (di(2-ethylhexyl)phthalate) kimyasal maddelerinin genotoksisitesi iki farklı çalışma grubu tarafından incelenmiştir. Bu araştırmanın amacı; aynı test koşulları altında ve aynı zaman dilimindeki iki laboratuvar ortamı ve kimyasal maddeler kullanılarak *Allium cepa* kromozom aberasyonları analizi sonuçlarını karşılaştırmaktır. Karşılaştırmalı olarak yapılan bu çalışma DEHP için yetersiz görölmesine rağmen maleik hidrazid, akridin ve bunlarla ilişkili olan pozitif kontrol (metil metansülfonat) için başarılı olmuştur (Rank ve diğ., 2002).

Allium sativum ve *Vicia faba*'da sülfür dioksidin kök ucu hücreleri üzerinde genotoksisitesinin belirlenmesi amacı ile yapılan araştırmada, sodyum bisülfıt ve sodyum sülfıt (1:3) karışımı 1×10^{-4} M ile 2×10^{-3} M aralığında değişen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Genotoksisitenin belirlenmesinde *Vicia faba*'da anafaz aberasyon (AA) frekansları ve mikronükleus (MCN) testleri, *Allium sativum*'da ise sadece mikronükleus testleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak negatif kontrol ile karşılaştırıldığında *Vicia faba* kök ucunda anafaz aberasyon (AA) frekansları 1.7-3.9 ve mikronükleus frekansları ise 3.5-4.5 kat artmıştır. Benzer sonuçlara *Allium* MCN testlerinde de rastlanmıştır (Yi ve Meng , 2003).

Radyasyonun bitkiler üzerindeki etkileri ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada, *Vicia* mikronükleus, *Tradescantia* mikronükleus ve *Tradescantia*

stamen tüyü mutasyon biyoanaliz testleri kullanılarak ^{137}Cs radyasyonunun genotoksitesi indelenmiştir. Bu çalışma; ^{137}Cs 'nin düşük dozlarıyla teşvik edilen DNA zararı için üç bitki biyoanalizinin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. Deneyle radyoaktivitenin çeşitli seviyeleri ile katı ya da sıvı ^{137}Cs kaynakları kullanılarak toprakta ya da bir solüsyonda yürütülmüştür. Yürütülen üç biyoanaliz göstermiştir ki; muamelelerde farklı duyarlılıklar ortaya çıkmıştır. Bunun ötesinde karşılaştırılabilir dozlarda, iç kontaminasyonlar üç biyoanaliz için büyük etkilere izin vermiştir. Sonuçta bu biyoanalizlerin radyoaktif ^{137}Cs zararının genotoksik etkileri için etkileyici testler olduğu belirlenmiştir (Minouflet ve diğ., 2005).

Bitki ve insan hücre çekirdeğinde hücreyel olmayan comet analizi ile mutajenler tarafından DNA zararının teşvik edilmesi ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada, fiziksel ve kimyasal mutajenlere bitki ve insan hücrelerinin verdiği yanıtlarda onların hassasiyetlerine bağlı olarak farklılıklar gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada iki kimyasal mutajenin DNA'ya olan zararı belirlenmiştir. Bu kimyasallar maleik asit hidrazit (MH) ve N-metil-N-nitroz-üre (MNU)'dir. Lökositlerin nükleusu ile bitki olarak kullanılan *Nicotina tabacum*'un nükleusunun duyarlılığını karşılaştırmak amacıyla comet analizi yapılmıştır. Sonuçta MH ve MNU kimyasalları ile muamele edilen lökositlerin nükleusunun bitki hücreleri nükleusundan daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Juchimiuk ve diğ., 2006).

Tradescantia mikronükleus testi kullanılarak kendiliğinden oluşan ya da kirlilikle teşvik edilen mutasyon oranları ile ilgili bir araştırmada, değişen sıcaklık durumu ve nem koşullarının etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Araştırmada *Tradescantia* bitkisinin klon 4430'u, maleik hidrazit ve kirlili su örneği materyal olarak seçilmiştir. Düşük sıcaklık mikronükleus sayısında artışa neden olurken, yüksek sıcaklık mayotik polen olgunlaşmasının gecikmesine ve fizyolojik hasarlara neden olmuştur (Klump ve diğ., 2004).

Hayvanlar üzerinde yapılan bir araştırmada, in vivo sitogenetik testler ile 8-Cl-Cyclic adenozin monofosfat'ın genotoksik potansiyeli değerlendirilmiştir. Kullanılan

bu kimyasal madde in vitro ve in vivo kanser hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda büyüme baskılayıcı bir etki göstermiştir. Uygulama için farenin BALB/c straini ve mikronükleus testi kullanılmıştır. İn vivo mikronükleus test sonuçları mikronükleus frekansında ve polikromatik eritrositlerde artışın olduğunu göstermiştir. Ayrıca sayısal ve yapısal kromozom varyasyonları da gözlenmiştir (Bajic ve diğ., 2004).

Atık suların etkisi üzerine yapılan bir araştırmada ise Güneybatı Bulgaristan'daki maden bölgesinde ağır metal ve siyanid ile kirlenmiş nehir suyunun *Allium cepa* üzerindeki sitogenetik etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma mikronükleus ve anafaz analizleri kullanılarak, mitotik ve faz indekslerinin hesaplanması ile Güneybatı Bulgaristan'ın Panagjurishte bölgesinde yürütülmüştür. İn vivo deney materyali olarak *Allium cepa* kullanılmıştır. Elde edilen veriler hücre çoğalmasında bir azalma ve normal mitoz-mikronükleus, anafaz ve telofaz köprüleri ile fragmentler, geç kalan kromozomlar ve bir C-mitotik etkisinin meydana geldiğini göstermiştir. Sitogenetik analizler ağır metal ve siyanid ile kirlenmiş suların biyolojik görüntülenmesinin etkili ve uygun olduğunu kanıtlamak için yapılmıştır (Ivanova ve diğ., 2005).

Toprak genotoksisitesinin araştırıldığı bir diğer çalışma genotoksisite analizleriyle, toprak örneklerini hazırlamada yaygın olarak kullanılan toprakların doğru seçimini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Toprağın; endüstriyel aktivite, motorlu araçlar, tarımsal aktiviteler gibi kirliliklerin potansiyel kaynaklarına göre gruplandırılması yapılmıştır. Ayrıca toprak genotoksisitesinin olası nedenleri de vurgulanmıştır (Watanabe ve Hirayama, 2001).

Sigara kullanımının kardeş kromatid değişimleri ve lenfosit yaşam süresi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; sigara içmeyen bireylere göre sigara içen bireylerdeki kardeş kromatid değişim oranları 5.84 ten - 7.73'e yükseldiği ve mitotik indeks oranında da artışlar olduğu saptanmıştır. Bu artış lenfosit sayısındaki artıştan daha yüksektir. Bu durum ise sigara içenlerde lenfosit yaşam süresinin daha kısa olduğunu göstermektedir (Akbaş ve diğ., 2001).

Yapılan farklı bir çalışmada; gelişimsel bir nörotoksisite testinde yaygın olarak kullanılan besin katkı maddeleri arasındaki sinerjistik etkileşimler incelenmiştir. Bu amaçla dört farklı katkı maddesinin (Brilliant Blue ve L-glutamic acid, Quinoline Yellow ve aspartam) ikili kombinasyonlar halinde nörotoksik etkileri belirlenmiştir ve çalışmada farelerin NB2a neuroblastoma hücreleri için bu maddeler teşvik edilmiştir. Brilliant Blue ile L- glutamic acid arasında, Quinoline Yellow ile de aspartam arasında önemli sinerjistik etkilerin olduğu bulunmuştur (Lau ve diğ., 2006).

Gıdalarda besin renklendirici olarak kullanılan maddelerin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada; farelerin kemik iliğindeki kromozom yapıları incelenmiştir. Renklendirici kimyasal madde olarak carmoisin iki farklı dozda uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre carmoisinin kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyonları çeşitli şekillerde teşvik ettiği bulunmuştur. Ayrıca uygulamanın çeşitli peryotları sırasında nükleik asit ve total protein seviyelerinde de artış saptanmıştır (Ali ve diğ., 1998).

Drosophila melanogaster'de yapılan bir çalışmada; gıdalarda koruyucu madde olarak kullanılan benzoik asit'in genotoksik etkisi somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarına göre mutasyon gözlenen kanat sayısı ile toplam mutasyon arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir. Buna ilave olarak her kanatta gözlenen mutasyonlar sayı ve tipine göre de sınıflandırılmışlardır. Bu çalışma gıda katkı maddelerinin doğru kullanımının insan sağlığı açısından önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Sarıkaya ve Solak, 2003).

Vicia faba kök uçlarında chromium trioksit'in (CrO_3) farklı konsantrasyonlarındaki mutajenik etkilerini belirlemek için yapılan bir çalışmada; *Vicia faba* kök ucu hücrelerindeki kromozom aberasyon oranını, mitotik indeksler ve mikronükleus oranını belirlemek için mikronükleus analizi ve kromozom aberasyon analizi kullanılmıştır. Chromium oksit'in *Vicia faba* kök ucu hücrelerinin mikronükleus oranını artırdığı ortaya çıkmıştır. Fakat aşırı artan chromium trioksit

konsantrasyonu mikronükleus konsantrasyonunu azaltmıştır. Ayrıca artmış chromium trioksit konsantrasyonu ile kromozom aberasyonlarının değişik tiplerinin oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde chromium trioksit'in *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde önemli mutajenik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Xiao-wei, 2004).

Çin'in Guilin bölgesindeki doğal Lijang ırmağından su örnekleri genotoksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada Trad-MCN ve Trad-SHM biyoanalizleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmada 60 farklı bölgeden toplanmış su örneklerinin genotoksisitesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar; ırmağın kollarındaki su örneklerinin çoğunun yüksek derecede mutajenik olduğunu ve endüstriyel etki ile şehir lağımının bulunduğu Guilin şehir bölgesinde ana ırmaktaki kirleticilerin biriktiğini göstermiştir. Hem Trad-MCN hem de Trad-SHM analizleri su örneklerinde mutajenlerin belirlenmesi için oldukça etkileyici analizlerdir (Jiang ve diğ., 1998).

Trad-SHM ve Trad-MCN biyoanalizleri maden tortularından çıkan iki sıvı atığın genotoksisitesini belirlemek için kullanılmıştır. Amaç; atık maddenin bu çeşidi için tarama araçları olarak *Tradescantia* biyoanalizlerinin uygunluğunun test edilmesidir. Çalışmada iki farklı test yöntemi kullanılmıştır. Bunlardan birisi S4 sıvı atık yöntemi diğeri ise pH_{stat}4 sıvı atık yöntemidir. Ph_{stat}4'de ağır metallerin konsantrasyonu S4 sıvı atığındakinden daha fazladır. Bu çalışmada her iki yöntem test edilmiş ve karşılaştırılmıştır. % 1 pH_{stat}4 sıvı atığından daha fazlasını içeren solüsyonlara maruziyet mikronükleusların sayısında önemli bir artışa neden olmuştur. Trad-SHM biyoanalizinde bitkiler % 8 ya da % 16'lık sıvı atık solüsyonlarına maruz bırakıldıklarında artmış pembe mutasyon oranlarını göstermişlerdir. Aksine S4 sıvı atık solüsyonu sadece % 32'den daha fazla oranda atık solüsyonu kullanıldığında artmış mutasyon oranlarına neden olmuştur. pH_{stat}4 sıvı atık maddelerinin düşük pH değeri nitrik asit kontrollerinde önemli mutasyon oranlarının görülmemesiyle belirtildiği gibi her iki biyoanaliz kullanılarak gözlenen genotoksisiteden sorumlu değildir. Bu kanıtlar *Tradescantia* biyoanalizlerinin örnek değişikliklerine gereksinim olmaksızın geniş bir pH aralığında çevresel örneklerin

genotoksik potansiyellerini değerlendirmede önemli araçlar olarak kullanılabildiğini göstermektedir (Fomin ve diğ., 1998).

Yapılan farklı bir çalışmada Çin'in Kunming şehrinden geçen Panlong ırmağında su genotoksisitesini belirlemek amacıyla 20 farklı bölgeden toplanan su örnekleri Trad-MCN ve Trad-SHM analizleri ile değerlendirilmiştir. Trad-MCN analizinde en düşük frekans 3,19 MCN/100 tetrad olarak, Trad-SHM analizinde ise 1,32 Mutasyon/1000 stamen tüyü olarak belirlenmiştir. En yüksek frekans; Trad-MCN analizi için 8,73 MCN/100 tetrad, Trad-SHM analizi için ise 4,30 Mutasyon/1000 stamen tüyü olarak belirlenmiştir. Trad-MCN analizi için zayıf frekanslar atık olarak ırmağa karışan endüstriyel ve kentsel atık su bölgesi yakınındaki bölgelerden elde edilen su örneklerinde gözlenmiştir. Genelde mikronükleus ve stamen tüyü mutasyonlarının frekansı ırmağın Kunming şehri boyunca akan bölgesinde artmaktadır. Elde edilen verilerden Trad-MCN analizinin ırmak suyu kirliliğinin genotoksisitesinin belirlenmesinde Trad-SHM analizinden daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (Duan ve diğ., 1998).

Fransa'nın Metz şehri yakınlarında toprak kirliliğinin genotoksisitesini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada 3 bitki biyoanalizi; *Vicia faba* (Bakla), *Allium cepa* (Beyaz soğan) ve *Tradescantia* mikronükleus testleri kullanılmıştır. Çalışmada iki farklı toprak örneği test edilmiştir. Toprak örneği A; bir endüstriyel atık bölgesinden, toprak örneği B ise kok kömürü atık bölgesinden sağlanmıştır. Pozitif kontrol olarak Maleik hidrazit kullanılmıştır. Toprak örneklerinin sulu ekstraktları *Vicia faba* ve *Allium cepa* köklerine uygulama için ve *Tradescantia* bitki parçaları Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı ve Dünya Sağlık Organizasyonu tarafından belirlenen bu bitki analizleri için kullanılan standart protokol'e göre uygulama için kullanılmıştır. Bu testlerin sonuçları 3 farklı biyoanalizde farklı duyarlılıkların olduğunu göstermiştir. Toprak örneği A'nın Toprak örneği B'den daha fazla toksik olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (Cotelle ve diğ., 1998).

Trad-SHM analizi kullanılarak *Chloroprene rubber* (Kauçuk) bitkisini çevreleyen havanın in situ (yerinde) görüntülenmesi sağlanmıştır. Bu çalışma için *Tradescantia* 02 klon'u kullanılmıştır ve bu bitkiler 1991 yılının Mayıs ve Haziran aylarında endüstriyel kuruluşlar civarındaki 10 farklı bölgede çevresel havaya maruz bırakılmıştır. İn situ görüntüleme denemelerinin 3 serisi gerçekleştirilmiştir. Bu serilerde farklı bölgelere yerleştirilen bitkilerin yanısıra bir de kontrol grubu ayarlanmıştır. İlk seride 1'den 4'e kadar numaralandırılmış bölgelerde bitkiler endüstriyel bitkinin bulunduğu komplekse yerleştirilmiş, ikinci seride 5'den 7'ye kadar numaralandırılmış bölgelerde kauçuk bitkisinden 1-1,3 km uzaklığa yerleştirilmiş ve son seride de bitkiler 8'den 10'a kadar numaralandırılmış bölgelerde kauçuk bitkisinden 1,5 km uzaklığa yerleştirilmiştir. Kontrol grubu ise kimyasal kauçuk bitkisinden yaklaşık 13 km uzaklıktaki bir serada yetiştirilmiştir. Çalışmanın sonuçları ilk serilerde 1, 2 ve 4 no'lu bölgelerde kontrolden daha fazla pembe mutasyon durumunun önemli derece arttığını göstermiştir. İkinci serilerin tüm bölgelerinde pozitif yanıtlar gözlenmiştir. Üçüncü seride ise sadece 8 no'lu bölgede kontrolden daha yüksek oranda pembe mutasyon durumu gözlenmiştir (Arutyunyan ve diğ., 1998).

İN situ görüntüleme için yapılan farklı bir çalışmada *Tradescantia* stamen tüyü analizi kullanılarak Sao Paulo şehrinde hava kirleticilerinin mutajenitesi belirlenmiştir. Bu amaçla Sao Paulo şehrinin farklı bölgelerine maruz bırakılan *Tradescantia* 4430 klonu bölgesel hava kirliliğine paralel olarak mutasyon frekanslarında artış göstermiştir. Atmosferdeki partikül içeriği seviyeleri ve mutasyon frekansları arasında pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir. Bu durum taşımsal emisyonlara özel referans ile Sao Paulo şehrindeki maruziyet bölgelerinde mutasyon frekansı ve atmosferik kirlenme miktarı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Ferreira ve diğ., 2003).

Arjantin'de yapılan bir in situ görüntüleme çalışmasında *Tradescantia* mikronükleus biyoanalizi kullanılarak hava kirliliğinin çevresel düzeylerinin genotoksitesini araştırılmıştır. Çalışmada *Tradescantia pallida* bitkisi 3 farklı bölgede konumlandırılmıştır. Bu bölgelerden birisi yüksek trafik aktivitesine sahip şehir

merkezi, diğeri benzin ve dizel yakıtlı ağır araç trafiğinin yoğun olduğu kampüs alanı, üçüncüsü ise hava kirliliğinin bölgesel kaynaklarının önemli olmadığı konutsal alandır. Her bir örnekleme bölgesinden Kasım, Şubat ve Nisan aylarında 20 genç *Tradescantia pallida* çiçeği toplanmıştır. Polen ana hücrelerinin erken tetradlarında mikronükleus frekansları belirlenmiştir. Aynı zamanda her bir bölge için havada bulunan toplam partiküllerin çevresel düzeyleri belirlenmiştir. Bölgeler arasında mikronükleus frekansında önemli bir fark gözlenmiştir. Konutsal alanın, kampüs bölgesi ve şehir merkezi alanlarına göre daha düşük mikronükleus frekansına sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuçta; çevresel hava kirlilik değışim derecesinin *Tradescantia* polen ana hücrelerinin spontan mikronükleus frekansındaki değışiklikler ile ilgili olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar yüksek bitkiler ile biyogörüntülemenin aletsel görüntüleme teknikleri olmaksızın ya da küçük bir ölçekte hava kirleticilerinin araştırıldığı alanlarda tanımlanan hava kirliliği çalışmaları için kullanışlı olabildiğini göstermektedir (Carreas ve diğ., 2006).

Bratislava da yapılan bir çalışmada hava kirliliğinin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla Trad-MCN testi gerçekleştirilmiştir. İn situ görüntüleme 2 sezon boyunca (2003 ve 2004 yıllarında) 5 farklı bölgede gerçekleştirilmiştir. Bitkisel materyal olarak kullanılan *Tradescantia palludosa* (klon3) bitkisi 6-8 haftalık peryotlar boyunca farklı bölgelere maruz bırakılmıştır. En yüksek mikronükleus düzeyleri tarımsal kimyasal fabrikasının bulunduğu bölge çevresinde gözlemlenmiştir. Kentsel trafik emisyonlarına ya da bir cam fabrikasının yakınlarına maruz bırakılan bitkilerde daha düşük etkiler gözlemlenmiştir. Petrokimyasal bölgenin yakınlarına maruz bırakılan bitkilerde ise önemli boyutlarda etkiler gözlenmemiştir. Ayrıca bu çalışmada 3 yabancı bitki türü kullanılarak da polen aborsiyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda da yine en fazla etki tarımsal kimyasal endüstri çevresinde gözlenmiştir. Kontamine olmuş kentsel havanın yabancı tip bitkilerin verimliliğinde bir etki oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu analiz sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda tıpkı mikronükleus analizinde olduğu gibi çevresel etkenlerin sıralaması etki derecesine göre aynı şekilde olmuştur (tarım kimyasalları endüstrisi – tekniksel cam endüstrisi – petrokimyasal bitki). Bu sonuçlar Trad-MCN testi ve polen aborsiyon analizlerinin hava kirliliğinin

belirlenmesi için hassaslığını doğrulamakta ve kirleticilerin farklı kaynaklarının genotoksisitesinde sınırlı farklılıklar olduğunu göstermektedir (Misik ve diğ., 2005).

Doğal olarak meydana gelen radyasyon ile teşvik edilen biyolojiksel in situ yanıtları değerlendirmek için yapılan farklı bir çalışmada bir bitkisel mutajenite testi olan Trad- SHM biyoanalizi kullanılmıştır. Mutasyonların oluşumu $1,5 \mu\text{R min}^{-1}$ den $100 \mu\text{R min}^{-1}$ e kadar derecelenen bir çevrede ortaya çıkan gama radyasyonuna maruziyet ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar yüksek radyasyon zeminine maruz bırakılmamış bitkiler ile karşılaştırıldığında yüksek zemine maruz bırakılan bitkilerin mutasyon frekanslarında orta derecede artış gösterdiğini ortaya koymuştur. Aşırı duyarlı Trad- SHM biyoanalizi'nin ve mutasyon değerlendirme testi'nin doğal radyasyon maruziyeti için kullanışlı bir görüntüleme sistemi olmasına rağmen Paços de Caldas Plateau şehrindeki yaygın doğal radyasyon seviyelerinin mutasyon oranlarında önemli derecedeki artışları teşvik etmek için yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır (Gomes ve diğ., 2002).

Tradescantia klon BNL 4430'dan daha fazla temel bilgi elde etmek amacıyla çevresel mutajenler için en uygun test edici yöntemlerden birisi olan stamen tüylerindeki spontan somatik pembe mutasyonların oluşumları belirlenmiştir. Çalışma kapsamında 12 Aralık 1998 yılından 10 Aralık 1999 yılına kadar 52 haftalık bir süreçte skorlama işlemi yapılmıştır ve bir büyüme odasında besin solüsyonunda kökler ile genç çiçekleri taşıyan sürgünler yetiştirilmiştir. Büyüme odasında çevresel koşullar 16 saat gündüz periyodunda $22,0 \pm 0,5^0 \text{ C}$ de beyaz floresan tüplerden çıkan $7,5\text{klx}$ ışık yoğunluğunda, gece ise $20,0 \pm 0,5^0\text{C}$ 'de olacak şekilde ayarlanmıştır. Skorlama periyodu sırasında 697,443 stamen tüyü ortalama 25,36'lık bir hücre sayısı ile gözlemlenmiştir ve 2642 pembe mutasyon durumu belirlenmiştir. Spontan mutasyon frekansı $1,56 \pm 0,03$ pembe mutasyon frekansı şeklindeydi ve frekans Mayıs, Temmuz, Ağustos aylarında önemli derecede düşüş gösterirken Kasım, Aralık aylarında artış göstermekteydi. Elde edilen veriler sonucunda somatik rekombinasyonların stamen tüylerinde tek pembe mutasyon durumlarını oluşturmada da önemli bir rol üstlenebildiğini düşündürmüştür (Ichikawa ve Wushur, 2000).

Alg kökenli biyolojik iyileştirme teknolojisinin toksisite ve etkisi kontamine olmuş endüstriyel atık maddelerin riski için biyoanalizlerden yararlanılarak değerlendirilmiştir. Ağır metallerin algel biyotaşınımı in vitro bir yaklaşım kullanılarak araştırılmıştır. Bitki genotoksisite testleri algel biyofiltrelerin farklı çeşitlerinin kullanımından önce ve sonra endüstriyel atıkların genotoksitesini değerlendirmek amacıyla *Allium cepa* ve *Vicia faba* bitkileri ile yürütülmüştür. Kök hücreleri bir kimyasal gübre fabrikasının hem işlem görmemiş hem de işlem görmüş atıklarının farklı seyreltmelerine 24 saatlik sürede maruz bırakılmıştır. 3 sitogenetik sınır noktası; endüstriyel atığın mutajenik potansiyellerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır; mitotik engelleme, mitotik kromozom anomalileri ve interfaz hücrelerinde çekirdek düzensizlikleri. Algel uygulamadan önce endüstriyel atık madde meristematik hücrelerin mitotik aktivitelerindeki bazı engellemelerle ve hem kromozom hem de nükleus anormalliklerinin yüksek frekansları ile gösterilen güçlü genotoksik etkilere neden olmuştur. Algel uygulamadan sonra ise uygulama yapılmış atık maddelerin %30 ve %60'luk konsantrasyonlarındaki sitotoksik etkileri ile uygulamadan önce %50 ile belirtilen hem kromozom hem de nükleus anomalilerinin frekansı bunların %5 ve %10'luk konsantrasyonları ile karşılaştırılabilir durumdadır. Veri istatistiksel analizi; algel biyofiltreler ile yeniden düzenleme işlemlerinden sonra ağır metal konsantrasyonlarında dikkat çekici boyutta bir azalma ve ilgili genotoksisite durumunda da önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. *Allium* ve *Vicia* genotoksisite yaklaşımı toksisite için yeniden düzenlenmiş atık maddenin görüntülenmesinde etkileyici olmuştur (Migid ve diğ., 2005).

Varanasi şehrinin hava kirleticilerinin genotoksitesini değerlendirmek için Trad-MCN biyoanalizi yapılmıştır. Çalışma Ekim 2006'dan Nisan 2007'ye kadar sürdürülmüştür. Trad-MCN analizi için 4 farklı bölge seçilmiştir. Bunlardan 3'ü trafik aktivitesine sahip ve diğeri de trafik aktivitesine sahip olmayan kontrol bölgesidir. Çalışma periyodu döneminde her bir örnekleme bölgesinden 20 genç *Tradescantia pallida* çiçeği toplanmıştır ve polen ana hücrelerinin erken tetradlarında mikronükleus frekansları belirlenerek ve MCN/100 tetrad şeklinde ifade edilmiştir. Aynı periyot döneminde farklı hava kirleticilerinin konsantrasyonu da ölçülmüştür.

Trad-MCN biyoanalizi daha yüksek trafik emisyonlarına sahip alanlarda tutulan bitkilerin kontrol bölgesinde tutulan örneklerden daha yüksek mikronükleus frekansına sahip olduğunu göstermiştir. Çalışma; genotoksik hava kirleticilerinin bulunduğu alanların karakterizasyonu için ve hatta herhangi bir alete ihtiyaç duyulmaksızın yüksek bitkiler kullanılarak in situ biyo görüntülemenin kullanışlı olabildiğini göstermektedir (Prajapati ve Tripathi., 2008).

Brezilya'nın Sao Paulo şehrinde bulunan Ibirapuera parkında atmosferik kontaminasyonun mutajenik potansiyelini kontrol etmek için Trad-SHM analizi kullanılmıştır. Bu amaçla *Tradescantia* BNL 4430 klon ve KU-20 klonu kullanılmıştır. Her iki klonun 30 saksısı 1 yıllık periyot süresince maruz bırakılmıştır. (Eylül- 2002, Ağustos- 2003). Stamen tüylerindeki mutasyonların frekanslarını belirlemek amacıyla 1 ayda iki kez sabahları her bir klondan çiçekler alınmıştır. Sonuçlar maruziyet bölgesinin yakınında ölçülmüş hava kirliliği ve iklimatik veriler için karşılaştırılmıştır. KU-20 klonu BNL 4430 klonundan daha yüksek stamen tüyü mutasyonları göstermiştir. KU-20 de en yüksek mutasyon oranları aylık ortalama yüksek NO₂ ve günlük ortalama zayıf NO konsantrasyonlarının olduğu durumlarda gözlenmiştir. Taşıtsal kirlilikten kaynaklanan mutajenik etkilerin olduğu ve klon KU-20'nin parkta biyo görüntüleme amaçları için daha uygun olabildiği ortaya çıkarılmıştır (Ferreira ve diğ., 2007).

Allium cepa'nın meristematik mitotik hücrelerinin çevresel kirlenmede kromozom aberasyon denemelerinde elverişli sitogenetik materyal olduğu bilinmektedir. Ateeq ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, Pentaklorofenol (PCP), 2,4-diklorofenoksiasetikasit (2,4-D) ve 2-kloro-2,6-dietil-N-(bütoksimetil) asetanilide (butaklor), %50 EC₅₀ ile c-mitoz, yapışkanlık, kromozom kırılmaları ve mitotik indeksin genotoksik miktarını tayin etmişlerdir.

Vicia faba L. bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada, bir büyüme düzenleyicisi olan Tonifruitin *Vicia faba* L.'de mitotik bölünme, kromozomlar ve DNA miktarı üzerine etkileri araştırılmıştır (Akpınar ve diğ., 2001).

Aybeke ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, zeytinyağı fabrikası atık suyunun *T. aestivum* (buğday) kök uçlarındaki mitotik bölünme anormalliklerini ve total protein miktarlarını incelemişlerdir (Aybeke, 2000).

Polietilen terephtalate, terephtalic asitile etilen glikolden oluşan ve endüstride yiyecek ve içeceklerin paketlenmesinde yaygın olarak kullanılan oldukça yeni bir materyaldir. (Mc Guinness, 1986). Plastik türevi olan bu madde, endüstriyel kaynaklardan çevreye bırakılan önemli bir kirleticidir. Yapılan bir çalışmada bu materyal ve cam ile şişelenen iki ticari maden suyunun karşılaştırmalı olarak farklı çevre koşullarında depolanmaları sonucunda *Allium cepa* bitkisinin kökleri üzerinde yarattıkları sitolojik etkiler araştırılmıştır (Evandri, 2000).

Vicia faba ile yapılan başka bir araştırmada; bitkileri hasta ve zararlılardan koruyan pestisitler ile besleyici nitelik taşıyan kimyasalların (Captan, hezudin, tetrafin, bolikel) bu bitki üzerinde oluşturabileceği etkiler karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur. (Acar, 2000). Desis olarak adlandırılan bir insektisidin *Allium cepa* kök boyu uzunluğunu düşürdüğü saptanmıştır (Coşkun ve diğ., 1994).

Allium cepa L. (soğan)'ya farklı konsantrasyonlarda uygulanan Manisa Organize Sanayi Bölgesi atıksu arıtma tesisine giren ve çıkan atık suyun %100'lük ve giren atık suyun %10, %25, %50 ve %100'lük konsantrasyonlarının kök ucu meristem hücrelerinde, konsantrasyona bağlı olarak çeşitli kromozom anomalileri yarattıkları gözlemlenmiştir (Acar ve diğ., 2006).

Son dönemde yapılan çeşitli araştırmalara genel olarak bakıldığında genotoksik potansiyelleri olan pek çok farklı maddenin ve bunun yanısıra radyoaktivitenin, çevresel stres faktörlerinin canlı dokularda rahatlıkla test edilebildiğini ve sonuçların canlı yaşamı ile direk olarak bağlantılı olduğunu görmekteyiz.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Bitkisel materyaller

Araştırmamızda; bitkisel materyal olarak Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik araştırma laboratuvarından elde edilen *Tradescantia pallida* H., bitkisine ait çelikler ve Oba Tarım firmasından elde edilen *Allium cepa* L., ile *Vicia faba* L. bitkilerinin sertifikalı tohumları kullanılmıştır.

3.1.1.1. *Allium cepa* L. (Soğan)

Soğan bitkilerinin depolanması ve kontrol altına alınması kolaydır, ayrıca bol ve ucuz olarak bulunmaktadır. Genel olarak, bitki hücrelerinin kromozom durumu iyidir, böylece kontrol şartlarında yüksek bir standart sağlanmaktadır. *Allium* testi, oldukça hızlıdır, yüksek duyarlılık ve tekrarlanabilme özelliğinin her ikisinin olmasından dolayı yapılması kolay bir testtir. Bu da, diğer test sistemlerinin sonuçlarıyla karşılaştırmayı mümkün kılar. Makroskopik ve mikroskopik etkilerin her ikisi, ikisinin arasında iyi bir korelasyonu ortaya çıkarmış ve fikir vermiştir. Soğan'ın kromozomları sayıca az fakat yapı bakımından büyüktür. $2n= 14$ kromozomu bulunmaktadır (Akı ve Güneysu, 2004).



Şekil 3.1. *Allium cepa* L.

Soğan; iklim isteği yönünden seçicidir. Gün uzunluğu ve sıcaklık, soğan yetiştirmeyi sınırlayan iki önemli unsurdur. Bitkinin erken gelişme devresinde serin havaya ihtiyaç vardır. Fakat baş bağlama ve başın büyümesi için sıcaklığın fazla olması gerekir. Erken gelişme devresinde ortalama sıcaklık 13 °C olmalıdır. Baş bağlamaya başladığı zaman sıcaklığı 21°C ve başın olgunlaşması için de 24-27 °C olması gerekir. Erken çeşitlerde gün uzunluğu 10-12 saat olunca baş bağlama başlar. Çeşitlerin 13-15 saat gün uzunluğuna ihtiyaçları vardır. Erkenci çeşitler soğuk bölgelerde iyi ürün vermez.

(<http://www.gap.gov.tr/Turkish/Tarim/Tarlayt/sogan.html>).

Soğan, besin değeri yeterli, hafif bünyeli topraklarda başlayarak tınlı ve nihayet pek ağır olmamak şartı ile hafif killi topraklarda da yetiştirilebilir. Soğan tarımına en uygun topraklar; gevşek yapıda, yeterli miktarda su tutabilen, kök sisteminin yayıldığı sahalar, serin, humuslu ve kolayca işlenebilen verimli topraklardır. Soğan, toprak pH'sına karşı çok hassastır. En uygun toprak pH'sı 6.0- 6.5 arasında olmalıdır (<http://www.gap.gov.tr/Turkish/Tarim/Tarlayt/sogan.html>).

3.1.1.2 *Tradescantia pallida* H. (Telgraf çiçeği)

Tradescantia (Telgraf çiçeği) bitkisi genetiksel açıdan oldukça büyük bir öneme sahiptir. Çünkü kromozom yapısı ilk kez Hoffmeister tarafından *Tradescantia* (Telgraf çiçeği) bitkisinin polen ana hücrelerinde görülmüştür (Akı, 2002). *Tradescantia pallida* H. bitkisi $2n=24$ kromozoma sahiptir. Bitkinin çiçek yapısı incelendiğinde dıştan içe doğru; 3 sepal, 3 petal, 6 stamen ve 1 karpelden oluşan halkasal çiçek yapısına sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 3.2. *Tradescantia pallida* H.

Sucul gövde ve yapraklar ile bulunduğu zeminde oldukça fazla yayılım gösterebilme özelliğine sahip bir bitkidir. Yapraklar yaklaşık 1 cm (2,5 cm) genişliğinde ve 3-5 cm (7,6-12,7 cm) uzunluğundadır. Gövde ve yaprakların üst yüzeyleri yapraklar yeterli olgunluğa ulaştığında donuk cansız turkuaz rengini andıran eflatundur. Yaprakların alt kısımları ise gövdeyi kuşatan ve petiyollerin tutulmasını sağlayan bölgelerde pembeye dönüşen parlak menekşe rengindedirler. Gövde uçlarında kıvrılan çift braktelerden oluşan solgun orkide pembesi renğinde 0,5- 0,75 cm (1,3-1,9 cm) uzunluğunda 3 tane petal çiçeği ortaya çıkmaktadır. Bu bitki, ılık aylar boyunca devamlı olarak çiçek açmaktadır fakat çiçekler sadece sabah açılmaktadır. *Tradescantia pallida* yabanıl formuna daha çok Meksika'da

rastlanmaktadır(http://www.floridata.com/ref/T/trad_pal.cfm).

Sıcaklığı 18-24⁰ C olan yerlerde bulundurulabilir. Fakat en iyi gelişmeyi 10-15⁰ C arasındaki sıcaklıklarda gösterir. Sıcaklık 8⁰ C altına düşmemelidir. Bitki, en sağlıklı olarak ışıktaki gelişim göstermektedir. Fakat yarı gölge veya hafif güneşli ortamlarda da gelişimini sürdürebilir.

En uygun gelişimi için zengin kumlu toprakları tercih etmektedir fakat mercan kayalıklarında da iyi gelişim gösterdiği bilinmektedir. Yüksek düzeyde besin maddesi içeren kalsiyum fosfat ve potasyum sülfatlı topraklar da gelişim için uygundur.

Tradescantia pallida; iyi bir kurakçıl bitkidir. Fazla miktarda nemi (%70) tercih etmesine rağmen kuru toprakta da iyi gelişim gösterebilir ve bu gelişim yağmur ya da nemin olmadığı durumda uzun bir zamanı kapsayabilir. Bazen aşırı sulama ile de gelişim hızlandırılabilir.

Bitki, kırağı ya da buz temasını tolere edebilme özelliğine sahiptir fakat soğuk kış gecelerinde onu dıştan koruyacak bir yapıya gereksinim gösterir. Orta derecedeki bir donma olayından sonra bitki tekrar eski haline gelebilmektedir.

Diğer *Tradescantia* üyeleri gibi bu türler kumlu topraklarda gövde nodları uygun bir şekilde toprağa gömüldüğünde çelik olarak adlandırılan bu bitki parçalarından kolaylıkla köklendirilebilir. Transplantasyona oldukça elverişli bitkilerdir. Üretimi çelikleme yöntemi ile Nisan-Eylül ayları arasında yapılır. Sürgün uçlarından alınan 5-7,5 cm uzunluğundaki çelikler saksılara dikilirler. Gölge bir yerde ve 16 C' de 2-3 hafta içerisinde köklenirler.

Gübreleme Her yıl Nisan ayında yapılır. Mayıs-Eylül ayları arası 2 haftada bir kez 2 g/l kompoze gübre verilir. Bitkilerin ideal gelişimleri için yazın büyüme döneminde bolca sulanmalı ve sıcak havalarda sık sık su püskürtmelidir. Kışın ise

orta derecede nemli tutulmalıdır. En önemli hastalığı Kurşuni Küf; zararlıları ise Nematodlar, Sümüklü Böcekler, Kırmızı Örümcekler ve Yaprak Bitleri' dir.

Bu bitkiler; mercan bahçeleri ve tropikal bölgelerdeki temel zeminlerin oluşturulması için ayrıca şehrsel ve evsel dekoratifler için oldukça yaygın olarak kullanılan süs bitkileri olarak da bilinmektedir (http://www.floridata.com/ref/T/trad_pal.cfm).

3.1.1.3. *Vicia faba* L. (Bakla)

İnsanların beslenmesinde önemli bir yeri olan bakla, içerdiği bitkisel proteinin zenginliği nedeniyle birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de değişik şekillerde tüketilmektedir.

Baklada kuvvetli bir kazık kök mevcuttur. Baklanın otsu bir gövdesi vardır. Baklada yapraklar gövde nodyumlarından akasya yaprağına benzeyen bileşik yapraklar şeklinde çıkarlar. Baklada çiçekler yaprak koltuklarında meydana gelir ve salkım şeklindedir. Bitki üzerindeki çiçekler döllendikten sonra baklalar (meyve) olgunlaşmaya başlar.

Bakla tohumları şekil, renk ve büyüklükleri bakımından çeşitlere göre büyük farklılık gösterir. Çok küçük daneli olanların yanında çok iri olanlara da rastlanır.

Tohumların çimlenebilmesi için optimum sıcaklık 20-25⁰ C'dir. En düşük çimlenme sıcaklığı 3⁰ C, en yüksek 30⁰ C'dir. Bakla tohumları toprak sıcaklığı 8⁰ C' yi bulduğunda çimlenmeye başlar. Tohumların çimlenebilmesi için 10-12 gün yeterlidir.



Şekil 3.3. *Vicia faba* L.

Vejetasyon süresi 120-200 gün gibi uzun olmasına karşın fazla sıcaklık istemez. Ilık iklim bitkisi olup börülce, fasulye ve bezelyeye nazaran soğuklara biraz daha fazla dayanabilmektedir. Vejetasyon dönemi boyunca düzenli ve yeterli miktarda yağış alan ya da sulanabilen yerlerde iyi yetişir.

Bakla derin, geçirgen, organik maddece zengin, su tutma kapasitesi yüksek tınlı killi topraklarda en iyi sonucu verir. Toprak nötr veya hafif alkali olduğu zaman en iyi verim elde edilir. pH 7-7,5 arasında olmalıdır. Asitli topraklarda baklanın büyümesi yavaşlar ve verimi çok düşük olur.

Vicia faba L. sadece sitolojik değil, aynı zamanda fizyolojik ve radyobiyojik çalışmalarda da yaygın olarak kullanılan bir materyaldir. *Vicia faba*'nın bir kök ucu hücresi $2n=12$ diploid kromozom sayısına sahiptir. Materyal bütün yıl içerisinde kolaylıkla elde edilebilir, gelişimi ve saklanması kolay ve ucuzdur. Metotta, pahalı materyal, gereçler ve steril şartlar gerekli değildir. Kromozom sayısı düşüktür ($2n=12$) ve kromozomlar çok kalındır, doğru ve tam sayım yapılabilir (Kihlman, 1975).

3.1.2. Kimyasal maddeler

Sunset Yellow (E110) ve Brilliant Black (E151), Glasiyel Asetik Asit (Merck 1.00056.2500) %100, Hidroklorik Asit (Merck 1.00317.2500) %37, 8-hydroxiqunolin (Sigma H6878), Karmin Sigma (C1022), %96'lık Etil Alkol, Torf, Perlit.

3.1.3. Sarf malzemeler

Erlen, beher, dereceli silindir, deney tüpü, piset, otomatik mikropipet, otomatik mikropipet ucu, lam, lamel, sivri uçlu pens, bistüri, piset, lam kutusu, eldiven, üç yollu puar, renkli şişe, saksı, filtre kağıdı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki yetiştirme

Bitkiler, sertifikalı tohum ve yumrulardan kontrollü laboratuvar koşullarında saksı ve su ortamlarında yetiştirilmiştir. Saksı denemelerinde perlit ve toprak karışımı (1:3), su denemelerinde ise beherlerde ve deney tüplerinde bitkilerin yetiştirilmesi sağlanmıştır. *Tradescantia pallida* H. bitkisinin çelikleri ve *Vicia faba* L. bitkisinin tohumları saksılara ekilmiştir. *Allium cepa* L. bitkisi için ise küçük arpacık soğanları, içerisinde saf su bulunan beherlerde ve küçük deney tüplerinde köklendirilmiştir. Tohum ekiminden sonra saksılar 16 saat ışık, 8 saat karanlık uzun gün koşullarındaki bitki yetiştirme dolabına aktarılarak dolabın sıcaklığı $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit olarak ayarlanmıştır. Bitkilerin gelişmeleri için gerekli olan periyotlar belirlenmiştir. Buna göre *Tradescantia pallida*'nın 8 haftalık bir süreçte gelişmesi ve köklenmesi sağlanmıştır daha sonra ana bitkilerden çelikleme yolu ile çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. *Vicia faba* için gerekli olan büyüme ve köklenme süreci 2 hafta olarak *Allium cepa* için ise 1 hafta olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Kimyasalların uygulanması

Çalışma kapsamında, genotoksisitenin bitkilerdeki genetiksel etkilerinin belirlenmesi amacı ile genotoksik potansiyele sahip olan ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan üç farklı gıda renklendirici maddesi, Sunset Yellow (E110), Brilliant Black (151) ve Quinoline Yellow (E104) kullanılması düşünülmüştür. Fakat Quinoline Yellow maddesinde çözünme problemi yaşandığından ve buna bağlı olarak zaman kaybı yaşanmaması için bu madde denemeler için kullanılamamıştır. Maddelerden sadece Sunset Yellow ve Brilliant Black'in stok çözeltileri hazırlanmış ve saksı denemeleri için *Tradescantia pallida* ve *Vicia faba* bitkileri üzerine püskürtme, su denemelerinde ise *Allium cepa* için suya uygulama yapılmıştır.

Bitkilerde en uygun dozun potansiyel aralığının belirlenmesi için 4 farklı konsantrasyonda uygulamaya gidilmiştir. Bu konsantrasyonlar; 10ppm, 200ppm, 1000ppm ve 2000ppm olarak her iki boya maddesinin stok çözeltilerinden hazırlanmıştır. Ayrıca her deneme için bu 4 konsantrasyona ilaveten 2'şer tane de kontrol grubu hazırlanmıştır. Bitkisel materyallerden *Allium cepa* L. ve *Vicia faba* L. bitkileri için 24 saatlik bir uygulama süresi kullanılmış ve kök uçları fiksatife alınmıştır. *Tradescantia pallida* H. bitkisi için ise 10 günlük bir uygulama süresi kullanılmıştır. Bu uygulamalar dörder tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Stok çözeltilerin hazırlanması

Her iki boya maddesi için belirlenen 4 farklı konsantrasyonda (10ppm, 200ppm, 1000ppm ve 2000ppm) uygulama yapılmıştır. Bu konsantrasyonların hazırlanmasında başlangıçta her iki boya maddesi için 2000ppm'lik stok çözeltisi hazırlanmış daha sonra bu stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak 10ppm, 200ppm ve 1000ppm şeklinde olan diğer konsantrasyonlar da elde edilmiştir.

Başlangıçta boya maddelerinin 2000ppm'lik stok çözeltilerini hazırlamak için 2'şer g boya maddeleri 1L (1000ml)'lik distile su ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu stok çözeltilerden aşağıda verilen formül kullanılarak diğer konsantrasyonlar elde edilmiştir.

Stok çözeltinin hazırlanmasında; $C_1V_1 = C_2V_2$ formülünden yararlanılmıştır.

Burada; C_1 : Stok çözeltinin konsantrasyonu (ppm)

V_1 : Stok çözeltiden alınması gereken hacim(lt-ml)

C_2 : İstenilen çözelti konsantrasyonu (ppm)

V_2 : İstenilen çözelti hacmi (lt-ml)

3.2.4. Genotoksisite testleri

Daha sonra kontrol grupları ile uygulama yapılan gruplar arasındaki genetiksel farklılıklar *Vicia faba*, *Allium cepa* bitkilerinde kök ucu hücreleri testi ve mikronükleus testi ile *Tradescantia pallida* bitkisinde ise mikronükleus testi ve stamen tüyü mutasyon testi ile belirlenmiştir. Tüm bunların belirlenmesinin yanı sıra *Allium cepa* L., ve *Vicia faba* L., bitkilerinde mitoz için önemli bir kriter olan mitotik aktivitelerin belirlenmesi de kök ucu hücrelerinden hazırlanan preparatlar yolu ile gerçekleştirilmiştir.

Allium cepa L. ve *Vicia faba* L. bitkilerinde mitotik kromozomların incelenmesi amacıyla Tijo ve Levan'ın (1950) yöntemi, mikronükleus analizi için Ma ve diğ.'nin (1995) yöntemi kullanılmıştır. *Tradescantia pallida* H. bitkisinde stamen tüyü analizi için Ma ve diğ.'nin (1994a) yöntemi, mikronükleus analizi için ise Ma ve diğ.'nin (1994b) yöntemi kullanılmıştır.

3.2.4.1. *Allium cepa* L. ve *Vicia faba* L. bitkilerinde kök ucu hücreleri testi

Boy 15cm, çapı 1.5 cm olan cam deney tüpleri içerisine saf su doldurulup uygun boydaki soğan yumrularının alt kısmı suya degecek şekilde deney tüplerinin

üzerine yerleştirilmiştir. Soğanların kök kısımları su içinde kalacak şekilde 2-3 gün suda bırakılır (Gönüz ve diğ., 2004). Bu şekilde genç ve hızlı gelişen kökler aynı zamanda temizdir.

Allium cepa L. bitkisine ait 20 adet örnek saf su ile doldurulmuş deney tüplerine yerleştirilmiştir. Su, köklerin çıkış bölgesinde bir film oluşturacak şekildedir. İlk 2 gün tüplerdeki sular 24 saatte bir değiştirilmiştir. Köklendirme 20-22⁰C'de gerçekleştirilmiştir. Kökler; 1,0-1,5 cm boyuna ulaştıktan sonra iki farklı boya maddesinin (Brilliant Black ve Sunset Yellow) farklı konsantrasyonlarını içeren (10ppm, 200ppm, 1000ppm ve 2000ppm) ve ayrıca kontrol grubu olarak saf suyu içeren ikişer tekrarlı olarak hazırlanmış deney tüplerine daldırılmışlardır. *Allium cepa* bitkileri uygulama için alındıkları deney tüplerinde 24 saat süre ile bekletilmiştir ve sürenin tamamlanması ile birlikte yaklaşık 2 cm uzunluğunda olan kök uçları kesilerek ön işlem sıvısına alınmıştır.

Vicia faba L. bitkisine ait sertifikalı tohumlar ise ilk önce oda sıcaklığında 6-12 saat saf suda bekletilmiştir. Tohumlar daha önceden otoklavda sterilizasyonu yapılarak 3'e 1 oranında hazırlanan torf-perlit karışımını içeren 60 cm uzunluğunda ve 20 cm çapında olan saksılara ekilmiştir. Tohum ekiminden sonra saksılar 16 saat ışık, 8 saat karanlık uzun gün koşullarındaki bitki yetiştirme dolabına aktarılarak dolabın sıcaklığı 25±2⁰C'de sabit olarak ayarlanmıştır. 2 haftalık gelişme periyodunun sonunda her iki boya maddesinin 4 farklı konsantrasyonunun uygulaması yapılmıştır. Bu uygulamaların yanısıra kontrol grupları da hazırlanmıştır. 24 saatlik uygulama süresi sonunda 2-3 cm uzunluğuna ulaşan kök uçları kesilerek ön işlem sıvısına alınmıştır.

Allium cepa L. ve *Vicia faba* L.' ya ait kök uçları ön işlem amacıyla 0.002 M 8- hidroksikinolin içinde 3-4 saat oda sıcaklığında ağzı açık bir şekilde bekletilmiştir.

Ön işlem sonrasında kök uçları fiksasyon için 3:1 oranında alkol: glacial asetik asit içerisine konur ve preparat hazırlanincaya kadar buzdolabında (+4⁰ C'de) bekletilmiştir.

Fikse edilmiş kök uçları 60⁰ C'deki 1 N HCl içerisinde 10 dakika masere edilip (hidroliz yapılp) işlem sonunda saf su içerisinde alınmıştır.

Bitkilerden alınan kök uçları lam üzerine konularak daha koyu beyaz gözlenen uç kısımdan yaklaşık olarak 2 mm kadar kesilmiştir. Üzerine asetocarmin damlatılıp lamel kapatılmıştır. Kök ucu ezilerek hücrelerin tek bir tabaka halinde dağılması sağlanır. Daha sonra hazırlanan preparat mikroskopta incelenmiştir.

1 N HCl içerisinde 10 dakika hidroliz yöntemi uygulanmayacaksa, fiksatiften alınan kök uçları porselen bir kroze aktarılıp üzerine örtecek miktarda asetocarmin dökülür. Bir bek üzerinde 3 kez buhar çıkıncaya kadar ısıtılıp ve daha sonra ezme işlemine geçilerek de preparat hazırlanabilir.

Vicia faba L., bitkisinde mitotik hücrelerin incelenmesinin yanı sıra aynı yöntem (kök ucu hücreleri testi) izlenerek hazırlanan kök uçlarından da mitotik hücrelerde mikronükleus oluşumlarının mikroskop altında belirlenmesi gerçekleştirilmektedir.

3.2.4.1.1. Çözeltilerin hazırlanması

8-hidroksikinolin: 200 ml sıcak saf su içerisinde 0.058 g 8-hidroksikinolin eritilir. Daha sonra renkli bir şişe içerisinde serin bir yerde saklanarak uzun süre kullanılabilir.

Farmer Fiksatifi: 3 kısım % 96'lık etil alkol: 1 kısım glacial asetik asit

1 N HCl: 9 ml distile su: 1 ml HCl

Asetocarmin: 55 ml saf su ile 45 ml glacial asetik asit karıştırılarak % 45'lik asetik asit hazırlanır.

100 ml % 45' lik asetik asit bir cam balona konur ve bu cam balon bir su banyosuna yerleştirilir. 10 dakika ısıtılır ve % 45' lik asetik asit sıcaklığının kaynayan suyun derecesine gelmesi sağlanır. Kabarıp taşmayı önlemek için asit büyük bir balonda ısıtılmalıdır.

1 g toz carmin alınır ve kaynayan asit içerisine yavaşça konur. Bir taraftan da bir cam çubuk yardımı ile karıştırılır. 10 dakika ısıtmaya devam edilir ve karıştırılır. Boya soğutulur ve başka bir kaba yavaşça aktarılır. Dibe çöken tortunun boyaya karışmamasına dikkat edilir.

İstenirse 2 damla ferric asetat damlatılabilir.

12 saat bekletilir ve boya süzülür. Boya koyu renkli bir şişe içerisinde buzdolabında saklanır.

Araştırma mikroskobu ile yapılan gözlemlerde mitoz geçiren hücreler ile anomali gösteren hücreler ve çeşitleri sayılmıştır. Bu amaçla kontrol ve deney gruplarından preparatlar hazırlanmıştır.

3.2.4.2. *Tradescantia pallida* H., bitkisinde stamen tüyü analizi:

Tradescantia pallida H., - stamen tüyü mutasyon biyoanalizinde her iki boya maddesi (Brilliant Black ve Sunset Yellow) için 4 farklı uygulama grubu ile (10ppm, 200ppm, 1000ppm ve 2000ppm) kontrol gruplarını da içeren tüm denemelerde her bir deneme grubu için 20 adet bitki parçası seçilir.

Her bir bitki parçasında bulunan 5-12 adet çiçeğin stamen tüyleri gliserol ve su karışımına (1:1) ya da bitkisel yağ'a daldırılarak diseksiyon iğnesi yardımıyla tüyler düzenli olarak sıralanır. Böylelikle tüylerin hesaplanması ve mutasyonlarının belirlenmesi kolaylaşacaktır.

Gliserol-su karışımından alınan stamen tüyleri bir lamın üzerine konularak binoküler mikroskop altında incelenmiştir.

Seçilen 20'şer adet bitki parçalarında yer alan 5 ile 12 arasında değişen çiçekler maksimum 3-5 günde her bir deneysel grup için incelenmiştir (Ma ve diğ., 1994a).

3.2.4.3. *Tradescantia pallida* H., bitkisinde mikronükleus analizi:

Tradescantia pallida H., bitkisinin özellikle çiçeklenme periyodunun başlamasıyla birlikte mikronükleus analizi gerçekleştirilmektedir.

Tradescantia'nın tipik bir çiçeği her iki boya maddesinin (Brilliant Black ve Sunset Yellow) 4 farklı konsantrasyonda (10ppm, 200ppm, 1000ppm ve 2000ppm) uygulanmasını takiben 24 saatlik bir iyileşme periyodundan sonra uygun tetradları elde etmek için denemelere hazır duruma gelmişlerdir.

Kontrol grubu da dahil olmak üzere her bir çiçekteki (inflorescence) çiçek tomurcuklarının birisi mayoz'un pakiten safhasında olabilmektedir. Pakiten safhasında kromozom kırıklarından mikronükleusların oluşumu teşvik edildiğinde mayozun erken tetrad safhasına ulaşılmıştır. Mikronükleusların oluşumlarını belirlemek amacıyla *Tradescantia pallida* H., bitkisinin çiçek tomurcuklarındaki mayoz bölünmenin erken tetrad safhaları incelenir. Bu amaçla;

Tradescantia mikronükleus biyoanalizinde her bir deneysel grup için 15 bitki parçası kullanılır.

15 bitki parçasının çiçeklerinden alınan tomurcuklar asetik asit: alkol (3:1) karışımında fikse edilir ve 24 saat sonra %70'lik etanol'e kaldırılarak preparat hazırlanmak üzere +4⁰C' de saklanır.

Her bir deneysel grubun 5 adet slayt'ı (preparat) hazırlanır ve her bir slayt için 300 tetrad ta mikronükleuslar belirlenir (Ma ve diğ., 1994b).

3.2.4.3.1. *Tradescantia* mikronükleus slayt hazırlama prosedürü

Preparat hazırlanırken izlenen basamaklar şu şekilde sıralanabilir;

Tetradlar için uygun çiçek tomurcukları seçilerek fiksatifte alınır ve bu tomurcuklar bir lamın üzerine aktarılır.

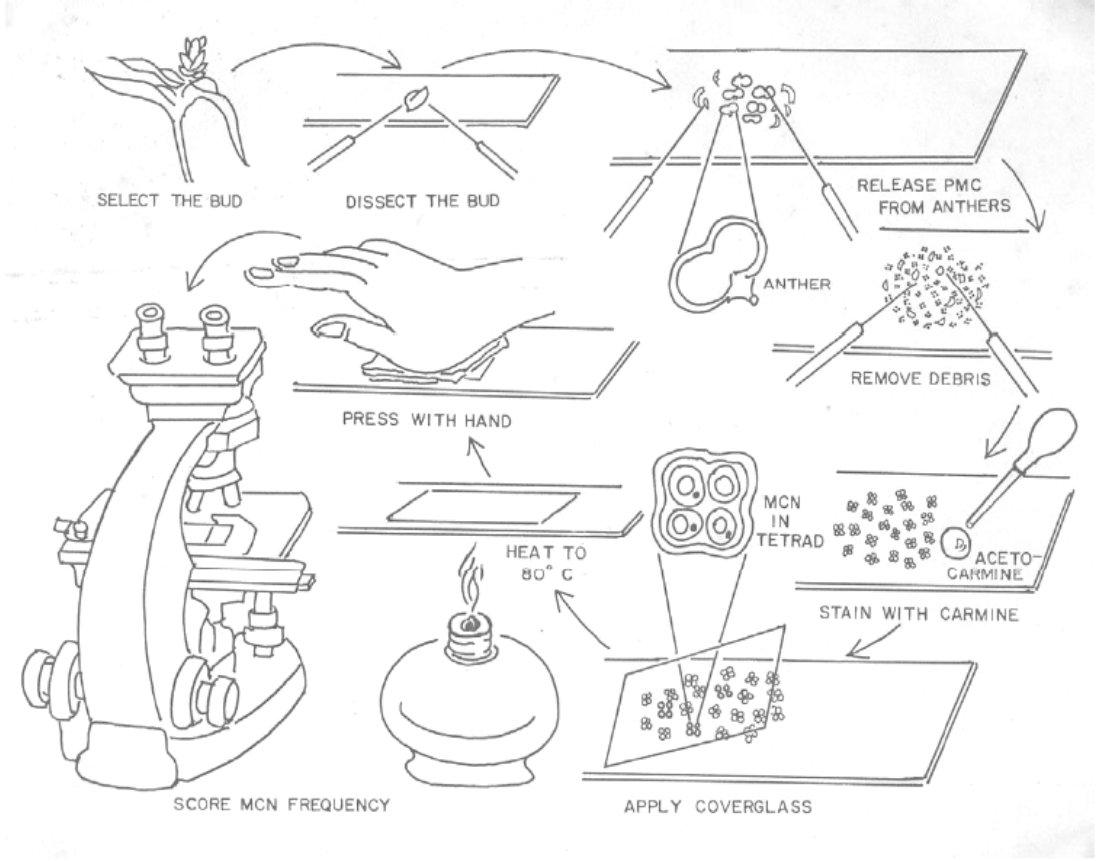
Tomurcukların açılması ve anterlerden hücrelerin serbest kalması sağlanır.

Tomurcukların dış kısmını saran hücreleri koruyucu kabuksu yapılar ortadan kaldırılır.

Asetokarmin uygulaması gerçekleştirilir.

Preparat'ın üzeri lamelle kapatılarak ısı uygulaması yapılır ve hücrelerin iyi dağılmasını sağlamak amacıyla preparat'ın üzerinden baskı uygulanır.

Hazırlanan preparat mikroskopta incelenerek oluşan tetradlarda oluşan mikronükleuslar belirlenir (Ma ve diğ., 1994b).



Şekil 3.4. *Tradescantia* mikronükleus slayt hazırlama prosedürü (Ma ve diğ., 1994b).

BÖLÜM 4

SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Sonuçlar

4.1.1. Mitotik sonuçlar

Çalışmamız kapsamında Brilliant Black ve Sunset Yellow maddelerinin dört farklı konsantrasyonunun uygulandığı ve kontrol gruplarını içeren *Allium cepa* L., *Vicia faba* L. bitkilerinin kök uçlarına ve *Vicia faba* L. mikronükleus testine ait mitotik fotoğraflar bilgisayar ortamında OLYMPUS CX31 marka araştırma mikroskobu ile çekilerek aşağıda sunulmuştur. Ayrıca mitoz bölünme için önemli bir kriter olan mitotik indeksler de her iki bitki için hesaplanarak tablo halinde grafikleri ile birlikte verilmiştir.

Yapılan gözlemler sonucunda araştırma bitkilerimizde normal mitoz bölünmelerin yanı sıra uygulamaların konsantrasyonlarına bağlı olarak çeşitli mitotik anomaliler de gözlemlenmiştir.

Araştırmamızda uygulama sonuçlarının belirlenmesi ve değerlendirilmesi için; elde edilen kök uçlarından hazırlanan mitoz preparatları incelenerek uygulanan konsantrasyonların etkileri belirlenmiştir. Bitkisel materyallerin 4 farklı dozda farklı düzeylerde genetiksel yanıtlar verdikleri mikroskobik incelemeler yolu ile saptanmıştır. Kullanılan dozun artması ile birlikte görülen genetiksel hasarın kromozomal anomallik düzeyinde artışlar meydana getirdiği belirlenmiştir. Uygulanan her iki boya maddesi hücre bölünmesi sırasında kromozomların birbirlerinden ayrılmasını sağlayan temel yapılar olan iğ ipliklerini etkilediklerinden dolayı görülen mitotik anomaliler daha çok iğ ipliklerinin görev aldığı anafaz safhasında etkili biçimde kendisini göstermiştir. Ayrıca telofaz, metafaz ve profaz safhalarında da çeşitli anomali durumlarına rastlanmıştır. Bu kromozomal anomaliler arasında en fazla dikkati çekenler; anafaz safhasında; kutup kayması, kalgın

kromozomlar, kromozom kırılmaları, köprü oluşumu, ayrılmama ve tripolar kutup oluşumu, Metafaz safhasında; düzensiz metafaz, metafaz plağı deformasyonu, kromozom kırıkları, telofazda; kutup kayması, kalgın kromozomlar, köprü oluşumu, enine bölünme ve profazda; düzensiz kromozom dağılımı olarak belirlenmiştir.

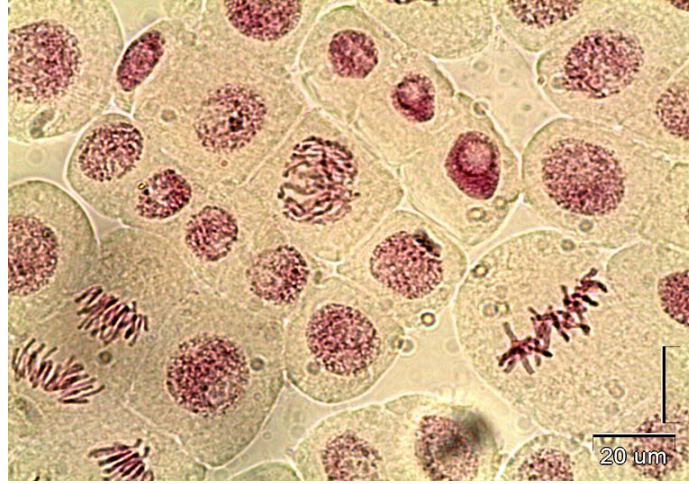
Oluşan genetiksel düzensizlikler boya maddeleri bakımından değerlendirildiğinde; hem *Allium cepa* hem de *Vicia faba* bitkileri için her iki boya maddesinin de oldukça etkili oldukları ve kök ucu hücrelerinde mutasyonların bir göstergesi olarak mitotik düzensizliklerin ortaya çıkmasında önemli rol oynadıkları saptanmıştır. Ayrıca *Vicia faba* bitkisinde mikronükleus oluşumları da gözlemlenmiş olup kromozom kırıklarından kökenlenen bu yapıların artan konsantrasyon miktarına bağlı olarak artış gösterme eğiliminde bulunduğu belirlenmiştir. Kullanılan boya maddelerinden Brilliant Black adlı boya maddesinin mikronükleus oluşturma özelliği bakımından daha yüksek potansiyele sahip olduğu sonucuna da varılmıştır.

Ayrıca elde edilen bu sonuçların yanısıra her iki bitki için mitotik hücrelerin sayımı yapılarak mitotik indekslerin ve standart sapmaların belirlenmesi de sağlanmıştır. Mitotik indeks bulgularına bakıldığında her iki boya maddesinin artan konsantrasyon miktarı ile birlikte kontrol grubuna göre daha düşük mitotik aktivite gösterdiği doğrulanmıştır. Elde edilen verilere göre mitotik indekslerdeki düşümlere paralel olarak *Allium cepa* bitkisi için Sunset yellow boyasının, *Vicia faba* bitkisi için ise Brilliant Black boya maddesinin daha etkili olduğu bulunmuştur. Sonuçta kullanılan bu boya maddelerinin her ikisinin de uygulandıkları bitkilerde genotoksik aktivite gösterme özelliklerinin olduğu kanıtlanmıştır.

Allium cepa L. mitotik kontrol fotoğrafları



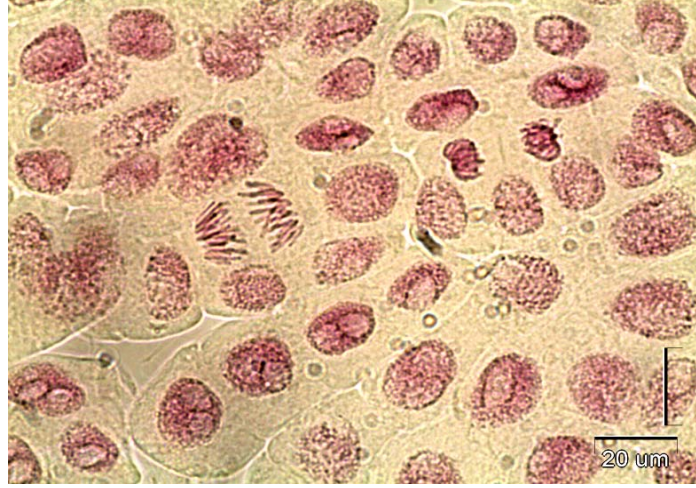
Şekil 4.1. *Allium cepa* L. mitotik anafaz ve telofaz (kontrol grubu)



Şekil 4.2. *Allium cepa* L. mitotik anafaz, profaz ve metafaz (kontrol grubu)



Şekil 4.3. *Allium cepa* L. mitotik profaz (kontrol grubu)

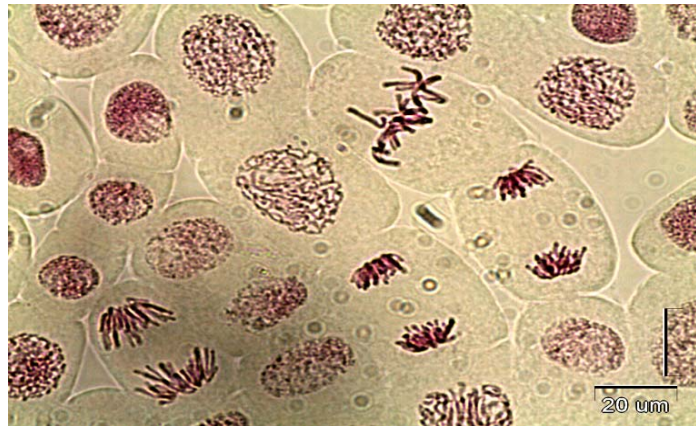


Şekil 4.4. *Allium cepa* L. mitotik anafaz ve telofaz (kontrol grubu)

***Allium cepa* L. mitotik Brilliant Black uygulama fotoğrafları**



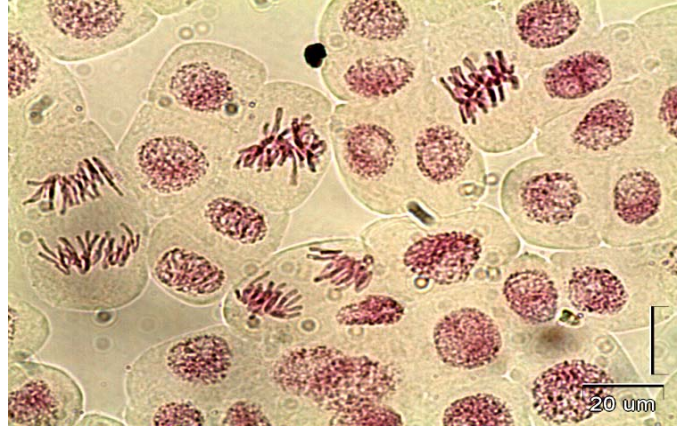
Şekil 4.5. *Allium cepa* L. mitotik telofazda kalın kromozom, kutup kayması, düzensiz metafaz ve kromozom kırılması (10 ppm'lik uygulama)



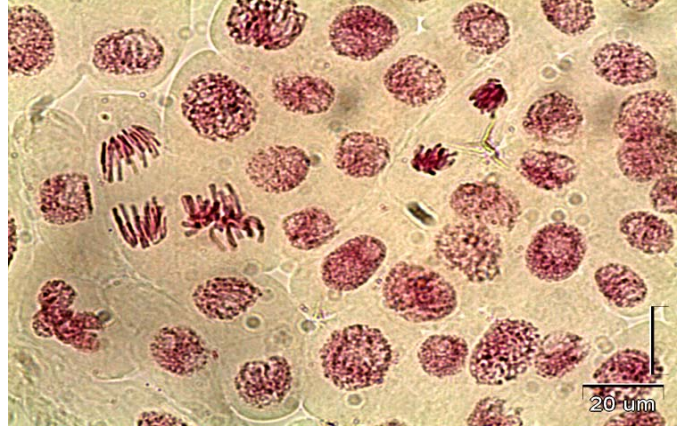
Şekil 4.6. *Allium cepa* L. mitotik anafaz ve telofazda kalın kromozomlar, kutup kayması, düzensiz metafaz (10 ppm'lik uygulama)



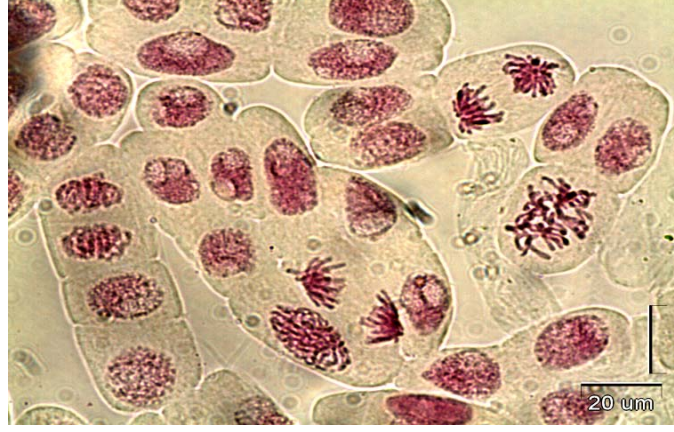
Şekil 4.7. *Allium cepa* L. mitotik anafazda köprü oluşumu (10 ppm'lik uygulama).



Şekil 4.8. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kutup kayması, kalın kromozom ve düzensiz metafaz (200 ppm'lik uygulama)



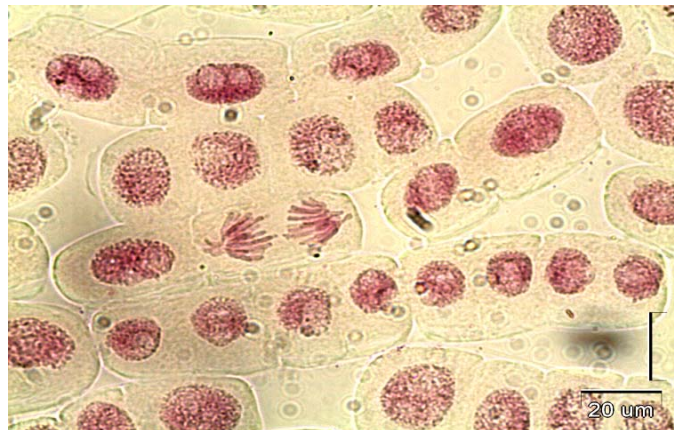
Şekil 4.9. *Allium cepa* L. mitotik anafaz ve telofazda kalın kromozomlar ve kutup kaymaları, düzensiz metafaz, (200 ppm'lik uygulama)



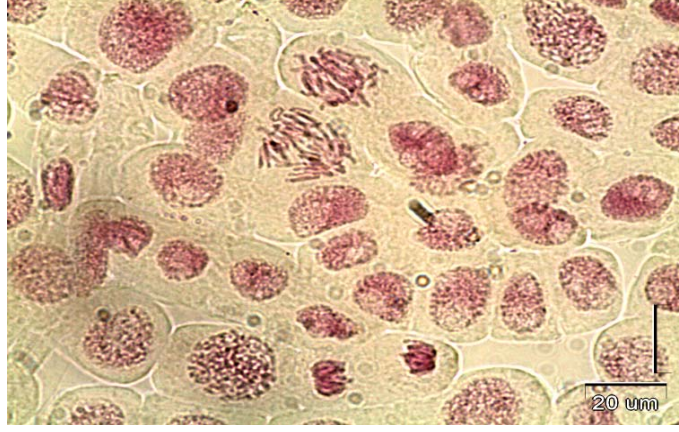
Şekil 4.10. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kalgın kromozomlar ve kutup kaymaları, düzensiz metafaz, (1000 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.11. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kalgın kromozomlar, kutup kayması ve köprü oluşumu (1000 ppm'lik uygulama)

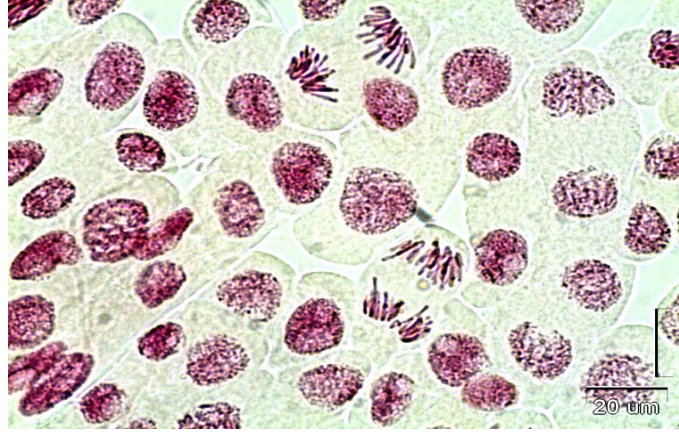


Şekil 4.12. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kalgın kromozom (2000 ppm'lik uygulama)

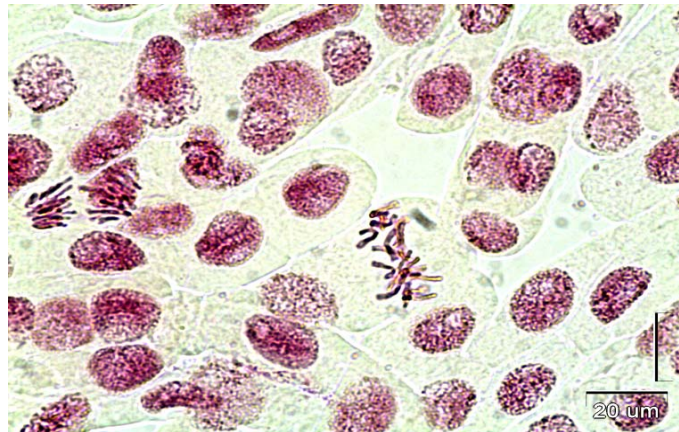


Şekil 4.13. *Allium cepa* L. mitotik anafazda ayrılmama, telofazda kutup kayması ve kalgın kromozom (2000 ppm'lik uygulama)

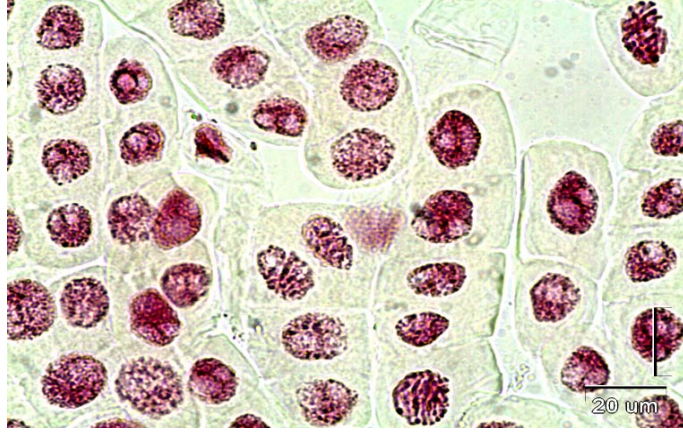
***Allium cepa* L. mitotik Sunset Yellow uygulama fotoğrafları**



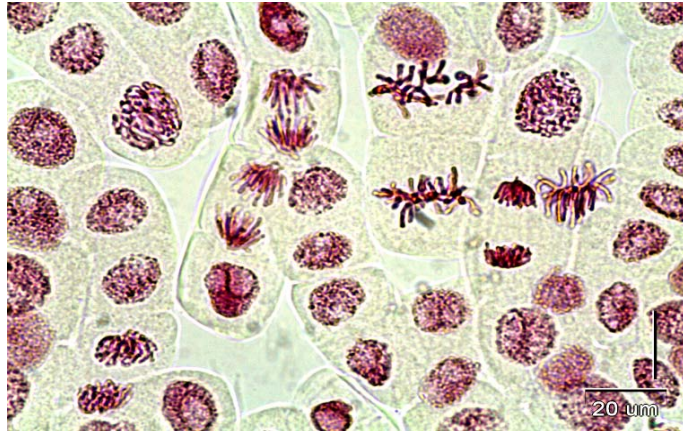
Şekil 4.14. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kalgın kromozomlar ve tripolar kutup oluşumu (10 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.15. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kutup kayması, kalgın kromozomlar ve metafaz plağı deformasyonu (10 ppm'lik uygulama)



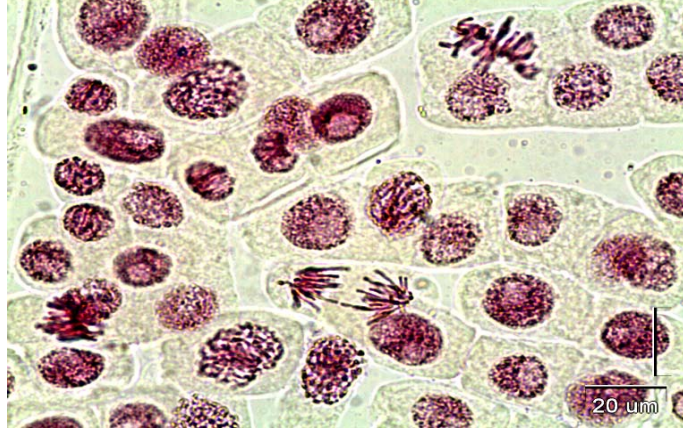
Şekil 4. 16. *Allium cepa* L. mitotik telofazda kutup kayması (200 ppm'lik uygulama)



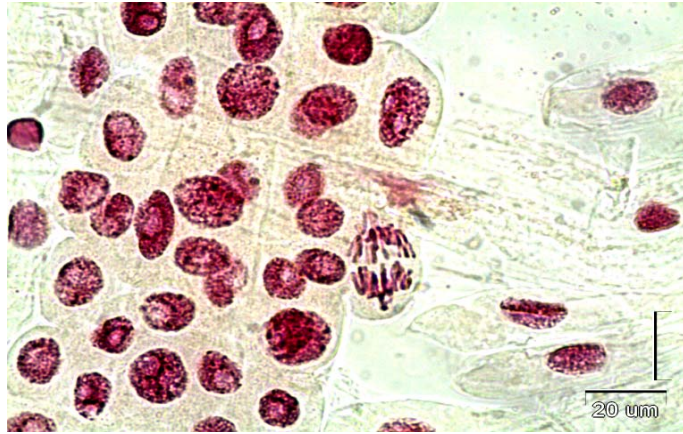
Şekil 4.17. *Allium cepa* L. mitotik anafazda ve telofazda kutup kaymaları, kalın kromozomlar ve düzensiz metafaz (200 ppm'lik uygulama)



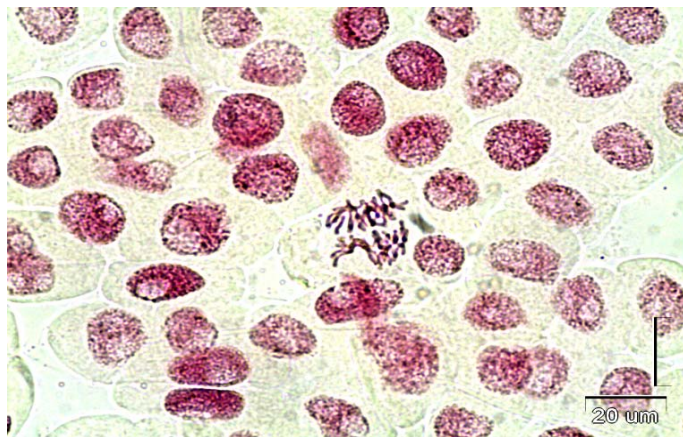
Şekil 4.18. *Allium cepa* L. mitotik anafazda köprü oluşumu, kalın kromozom telofazda kutup kayması (1000 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.19. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kalgın kromozom ve metafaz plağı deformasyonu (1000 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.20. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kalgın kromozom (2000 ppm'lik uygulama)

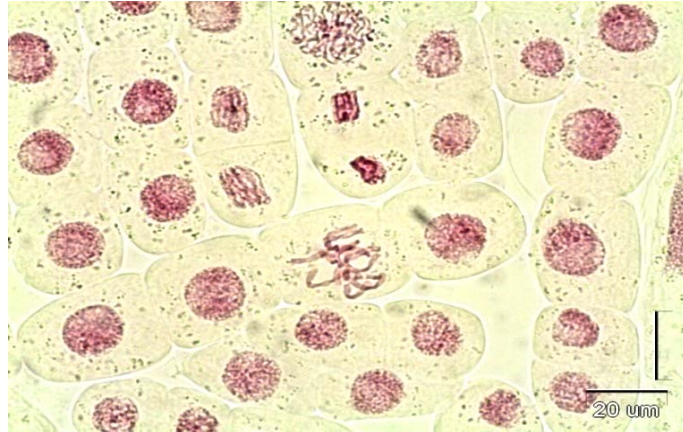


Şekil 4.21. *Allium cepa* L. mitotik anafazda kalgın kromozom ve düzensiz kromozomlar (2000 ppm'lik uygulama)

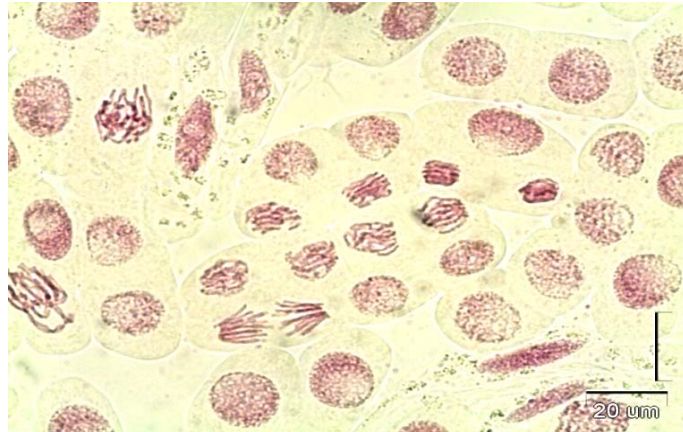
***Vicia faba* L. mitotik kontrol fotoğrafları**



Şekil 4.22. *Vicia faba* L. mitotik profaz, anafaz, telofaz ve metafaz (kontrol grubu)

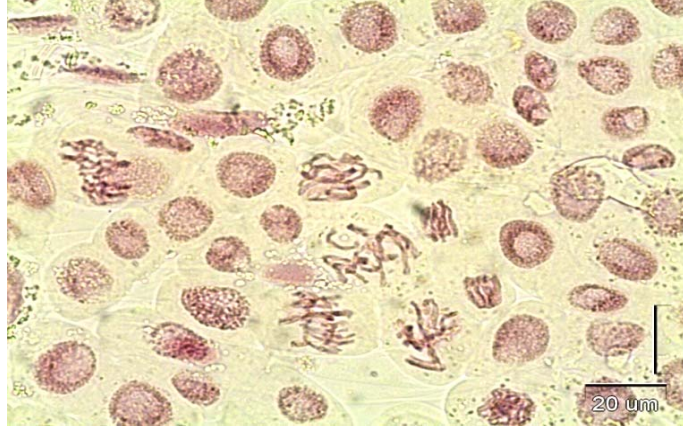


Şekil 4.23. *Vicia faba* L. mitotik profaz, telofaz ve metafaz (kontrol grubu)

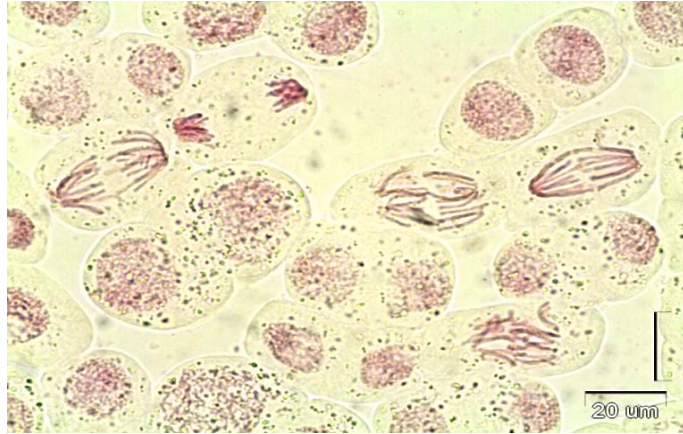


Şekil 4.24. *Vicia faba* L. mitotik profaz, telofaz ve anafaz (kontrol grubu)

Vicia faba L. mitotik Brilliant Black uygulama fotoğrafları



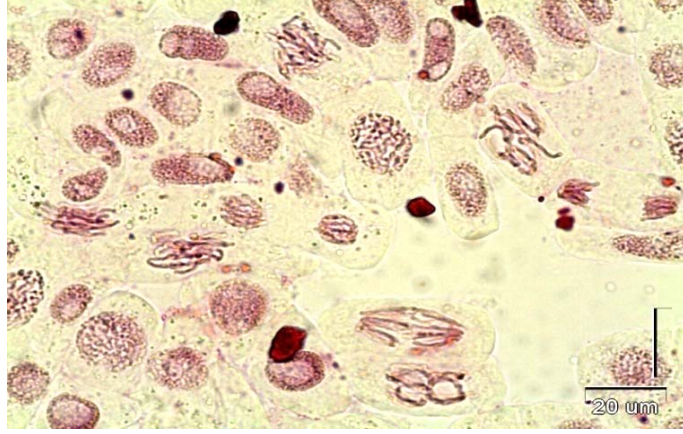
Şekil 4.25. *Vicia faba* L. mitotik telofazda kutup kayması ve düzensiz metafazlar (10 ppm'lik uygulama)



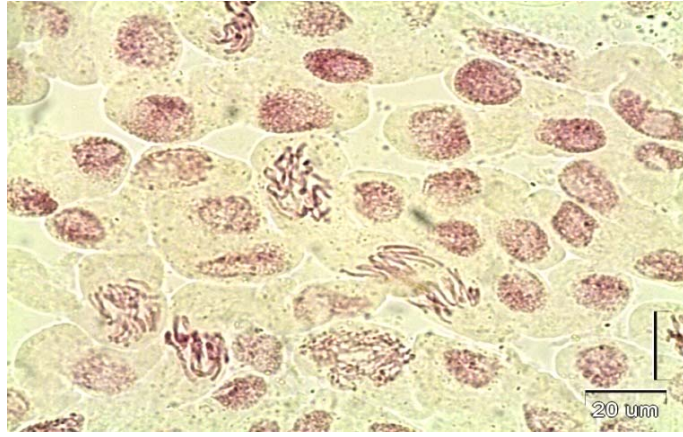
Şekil 4.26. *Vicia faba* L. mitotik anafaz ve telofazda kutup kayması, anafazda köprü oluşumu ve kalgın kromozom (10 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.27. *Vicia faba* L. mitotik profazda düzensiz kromozom dağılımı, anafazda kalgın kromozom ve düzensiz metafaz (200 ppm'lik uygulama)



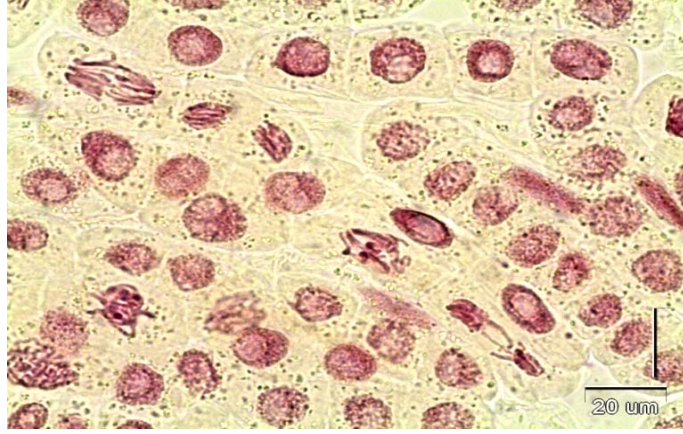
Şekil 4.28. *Vicia faba* L. mitotik telofazda kutup kayması, düzensiz metafazlar ve halka kromozom (200 ppm'lik uygulama)



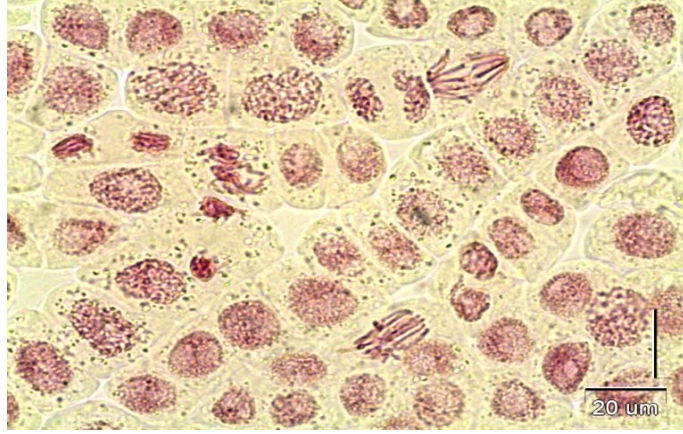
Şekil 4.29. *Vicia faba* L. mitotik profazda düzensiz kromozom dağılımı, anafazda kutup kayması ve kalgın kromozomlar, düzensiz metafaz (1000 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.30. *Vicia faba* L. mitotik anafaz ve telofazda kalgın kromozom, metafaz plağı deformasyonu (1000 ppm'lik uygulama)

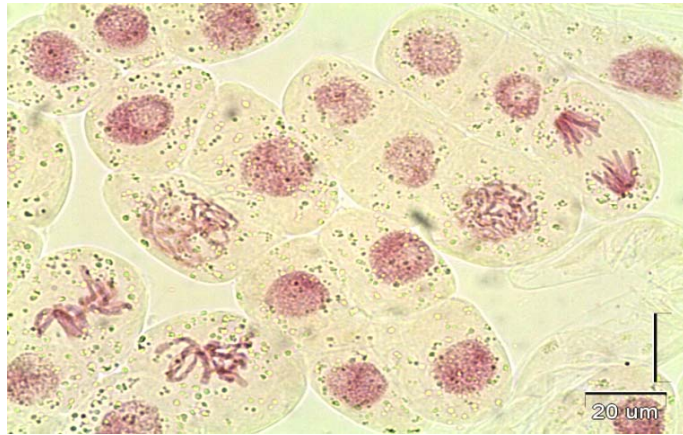


Şekil 4.31. *Vicia faba* L. mitotik telofazda köprü oluşumu ve kutup kayması, anafazda kalgın kromozom ve ayrılmama (2000 ppm'lik uygulama)

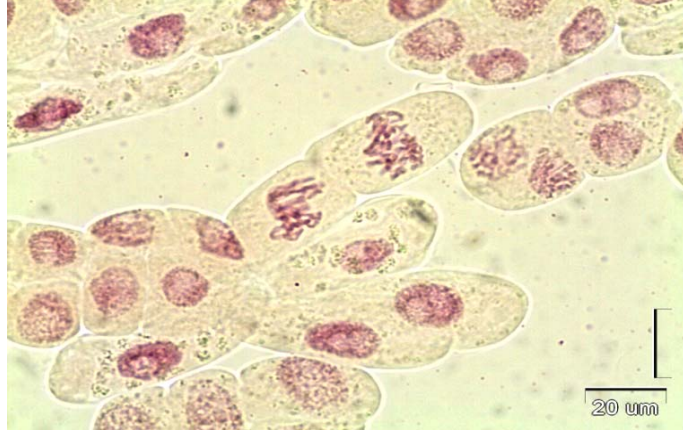


Şekil 4.32. *Vicia faba* L. mitotik telofazda kutup kayması, anafazda kalgın kromozom ve düzensiz metafaz (2000 ppm'lik uygulama)

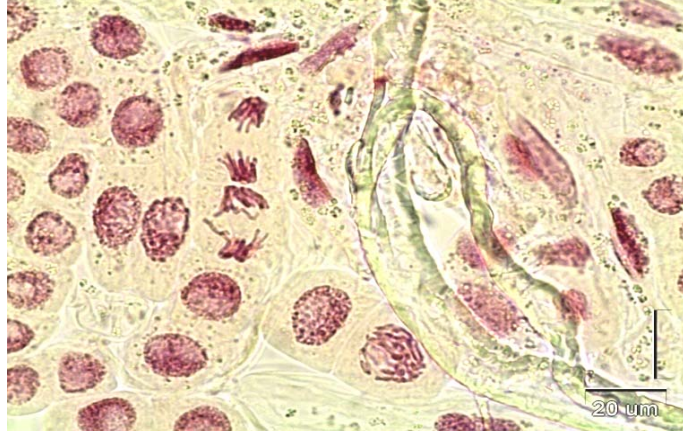
***Vicia faba* L. mitotik Sunset Yellow uygulama fotoğrafları**



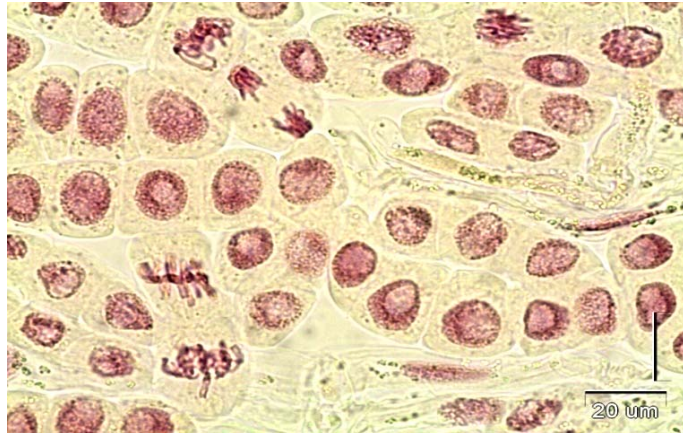
Şekil 4.33. *Vicia faba* L. mitotik anafazda kalgın kromozom ve düzensiz metafaz ve metafaz plağı deformasyonu (10 ppm'lik uygulama)



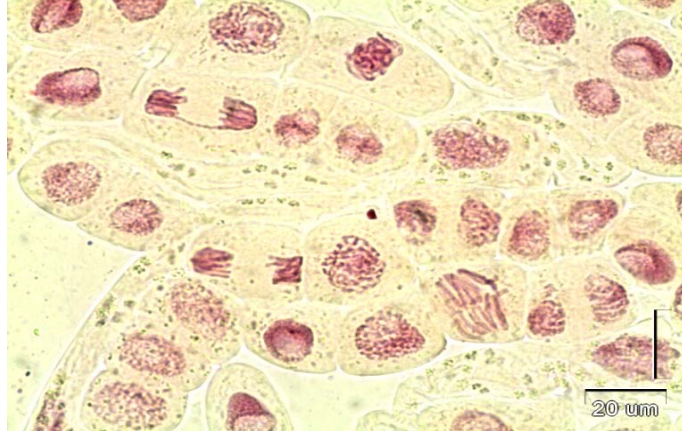
Şekil 4.34. *Vicia faba* L. mitotik düzensiz metafaz (10 ppm'lik uygulama)



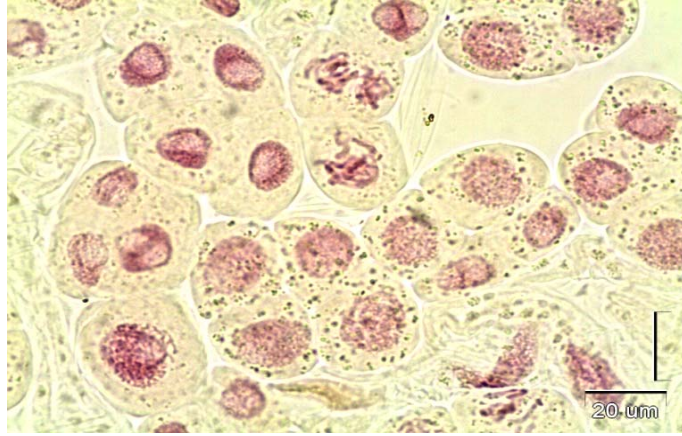
Şekil 4.35. *Vicia faba* L. mitotik telofazda kalgın kromozom (200 ppm'lik uygulama)



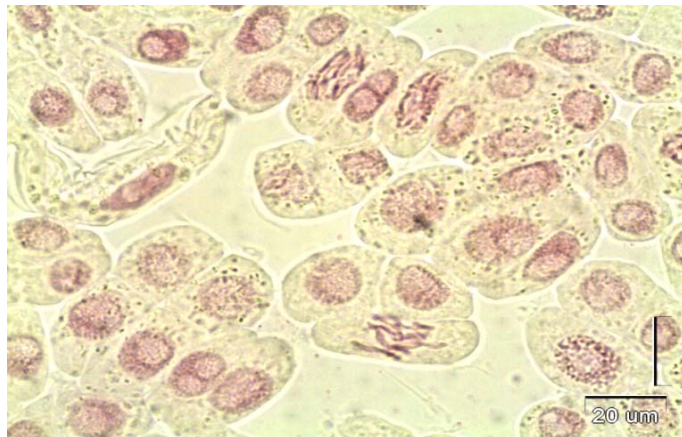
Şekil 4.36. *Vicia faba* L. telofazda kalgın kromozom, kutup kayması ve düzensiz metafaz (200 ppm'lik uygulama)



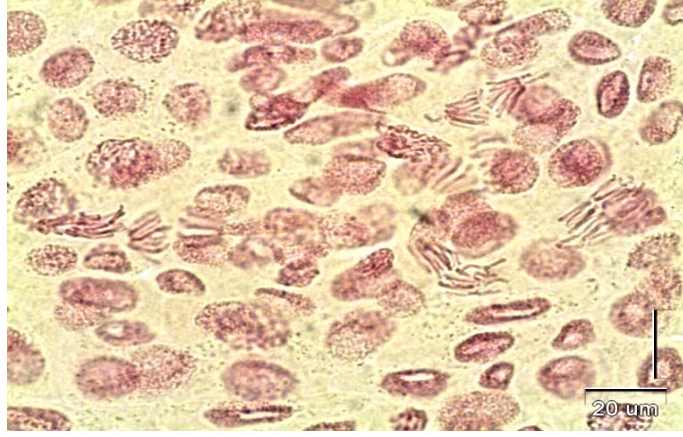
Şekil 4.37. *Vicia faba* L. telofazda köprü oluşumu, anafazda ayrılmama ve kutup kayması (1000 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.38. *Vicia faba* L. Telofazda enine bölünme (1000 ppm'lik uygulama)

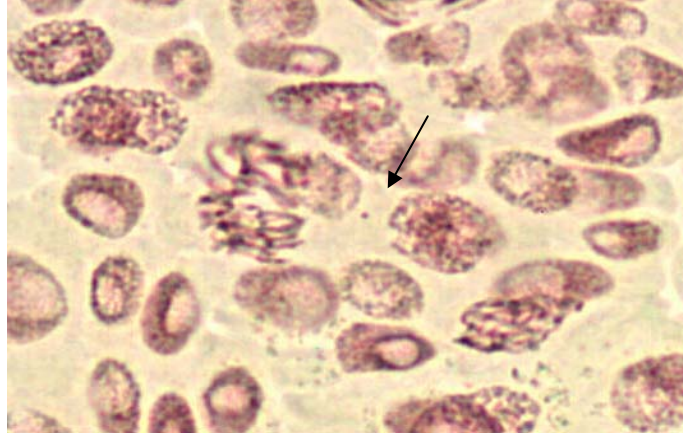


Şekil 4.39. *Vicia faba* L. mitotik anafazda ayrılmama, düzensiz metafaz (2000 ppm'lik uygulama)

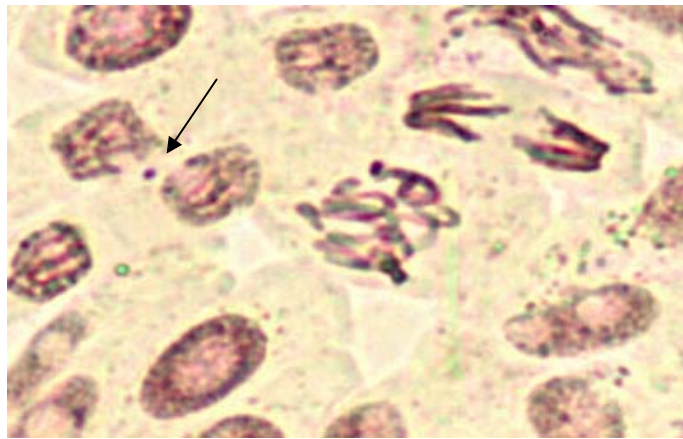


Şekil 4.40. *Vicia faba* L. mitotik anafazda kalgın kromozomlar (2000 ppm'lik uygulama)

***Vicia faba* L. mikronükleus fotoğrafları**



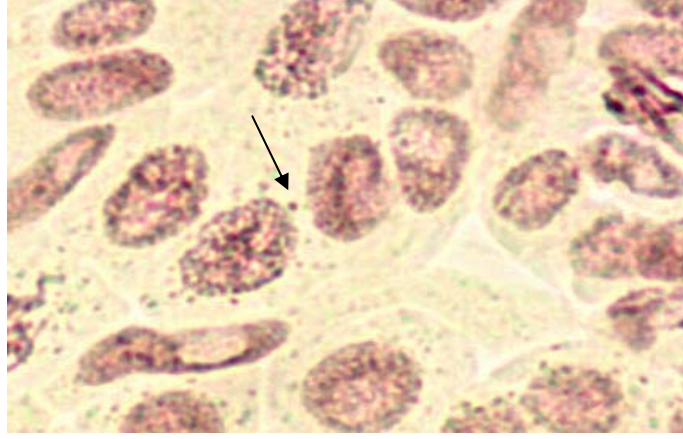
Şekil 4.41. *Vicia faba* L. mikronükleus (10 ppm'lik Brilliant Black uygulaması)



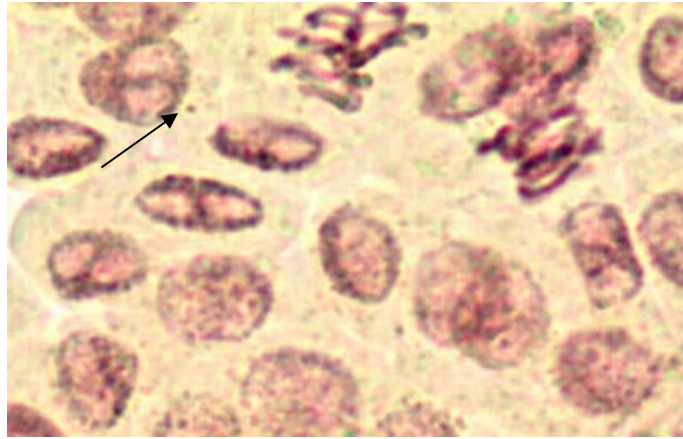
Şekil 4.42. *Vicia faba* L. mikronükleus (200 ppm'lik Brilliant Black uygulaması)



Şekil 4.43. *Vicia faba* L. mikronükleus (1000 ppm'lik Brilliant Black uygulaması)



Şekil 4.44. *Vicia faba* L. mikronükleus (2000 ppm'lik Brilliant Black uygulaması)



Şekil 4.45. *Vicia faba* L. mikronükleus (1000 ppm'lik Sunset Yellow uygulaması)

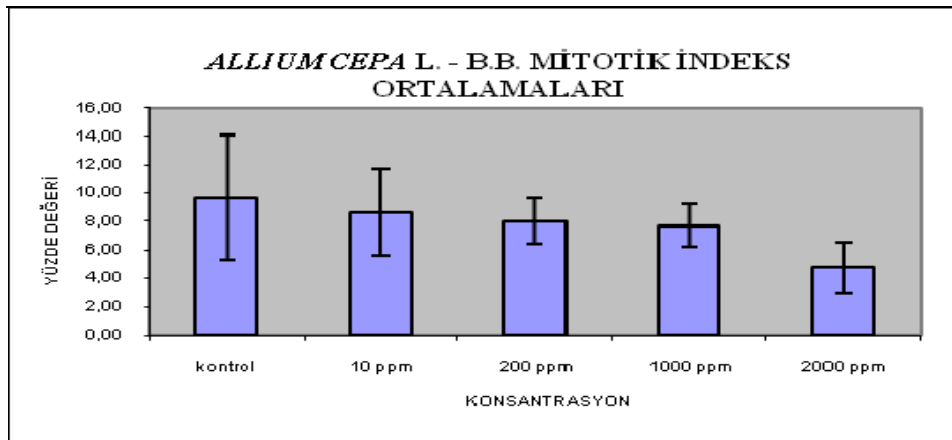


Şekil 4.46. *Vicia faba* L. mikronükleus (2000 ppm'lik Sunset Yellow uygulaması)

4.1.1.1. Mitotik indeks ile ilgili sonuçlar

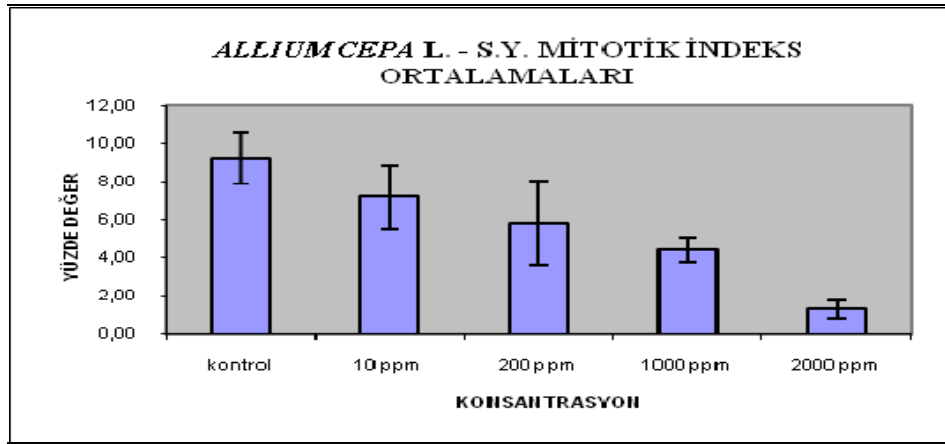
Tablo 4.1. *Allium cepa* L. Brilliant Black uygulaması mitotik indeks ortalamaları

<i>ALLIUM CEPA</i> -B.B.	
Konsantrasyon	Mitotik indeks ortalamaları ve Standart sapmalar
Kontrol	9,68 ± 4,43
10 ppm	8,64 ± 3,02
200 ppm	8,03 ± 3,34
1000 ppm	7,69 ± 1,51
2000 ppm	4,74 ± 1,80



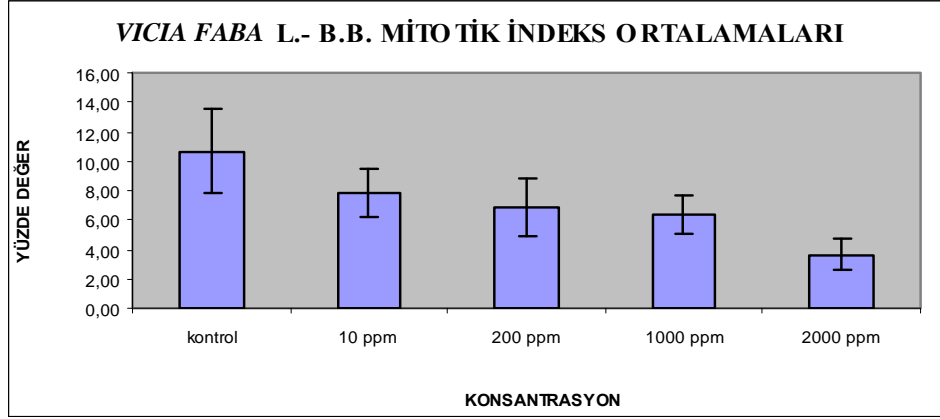
Tablo 4.2. *Allium cepa* L. Sunset Yellow uygulaması mitotik indeks ortalamaları

<i>ALLIUM CEPA-S.Y.</i>	
Konsantrasyon	Mitotik indeks ortalamaları ve Standart sapmalar
Kontrol	9,21 ± 1,33
10 ppm	7,20 ± 1,64
200 ppm	5,82 ± 2,19
1000 ppm	4,41 ± 0,67
2000 ppm	1,30 ± 0,47



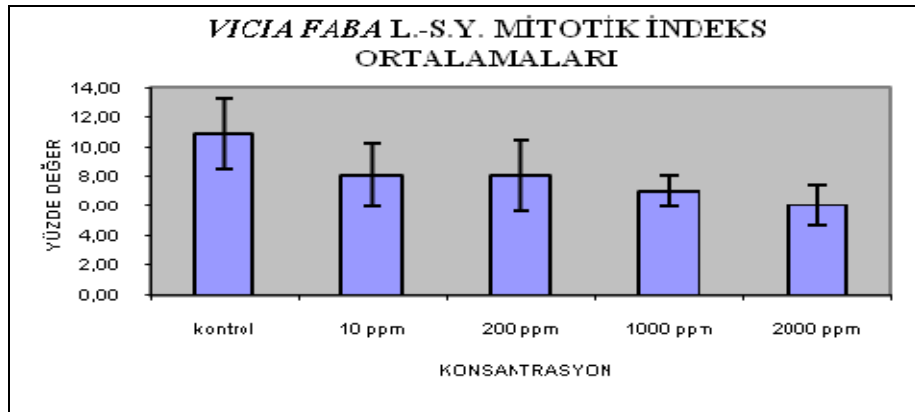
Tablo 4.3. *Vicia faba* L. Brilliant Black uygulaması mitotik indeks ortalamaları

<i>VICIA FABA-B.B.</i>	
Konsantrasyon	Mitotik indeks ortalamaları ve Standart sapmalar
Kontrol	10,64 ± 2,84
10 ppm	7,81 ± 1,66
200 ppm	6,82 ± 1,97
1000 ppm	6,31 ± 1,29
2000 ppm	3,66 ± 1,00



Tablo 4.4. *Vicia faba* L. Sunset Yellow uygulaması mitotik indeks ortalamaları

<i>VICIA FABA-S.Y</i>	
Konsantrasyon	Mitotik indeks ortalamaları ve Standart sapmalar
Kontrol	10,86 ± 2,43
10 ppm	8,06 ± 2,17
200 ppm	8,05 ± 2,40
1000 ppm	7,00 ± 1,07
2000 ppm	6,06 ± 1,35



4.1.2. *Tradescantia pallida* H. stamen tüyü analizi sonuçları

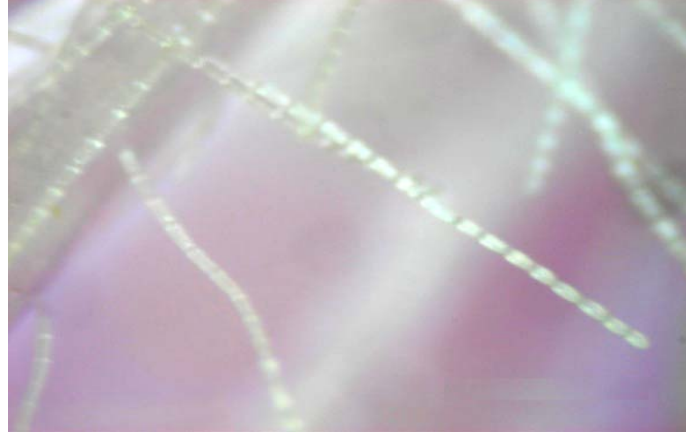
Brilliant Black ve Sunset Yellow maddelerinin dört farklı konsantrasyonunun uygulandığı ve kontrol gruplarını içeren *Tradescantia pallida* H. bitkisinin stamen tüyü analizine ait fotoğraflar OLYMPUS CX31 marka binoküler araştırma mikroskobu ile çekilerek aşağıda sunulmuştur. Somatik mutasyonlar stamen tüylerinde pembe renkli olarak gözlenmiştir.

Brilliant Black ve Sunset Yellow boya maddelerinin dört farklı konsantrasyonunun uygulandığı ve kontrol gruplarını içeren *Tradescantia pallida* H. bitkisinin stamen tüyü analizi sonuçlarına bakıldığında stamen tüyü hücrelerinde pembe renkli somatik mutasyonların olduğu gözlenmiştir. Mutasyonların oluşma frekansı uygulanan boya maddelerinin konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir. Brilliant Black ve Sunset Yellow maddelerinin uygulanması sonucunda mutasyonlar 200 ppm, 1000 ppm ve 2000 ppm'lik konsantrasyonlarda gözlenirken 10 ppm'lik konsantrasyonlarda herhangi bir mutasyon oluşumuna rastlanılmamıştır. Genotoksisitenin belirlenmesinde uygulanan bu analiz için Sunset Yellow adlı boya maddesinin daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Tradescantia pallida H. stamen tüyü kontrol fotoğrafları



Şekil 4.47. Kontrol grubu

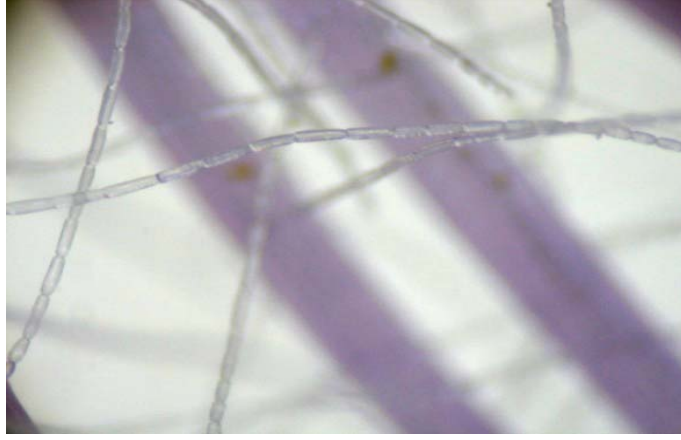


Şekil 4.48. Kontrol grubu

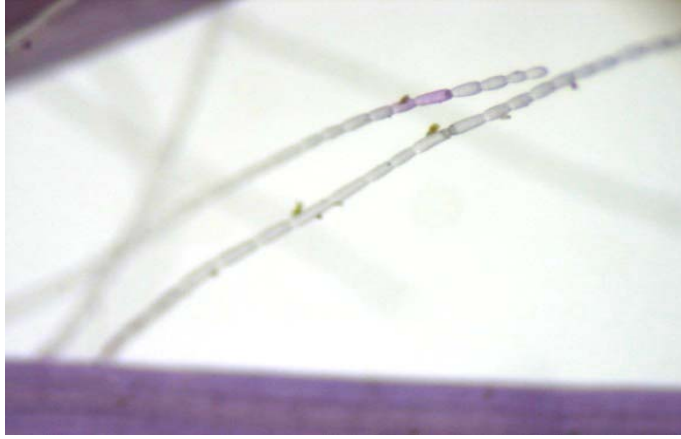


Şekil 4.49. Kontrol grubu

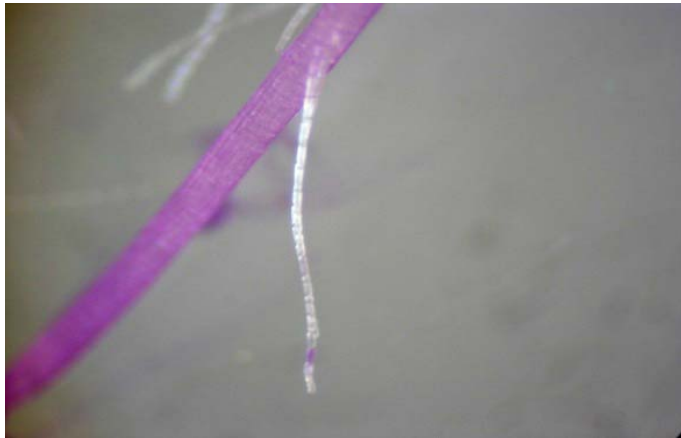
Tradescantia pallida H. stamen tüyü Brilliant Black uygulama fotoğrafları



Şekil 4.50. (10 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.51. (200 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.52. (1000 ppm'lik uygulama)

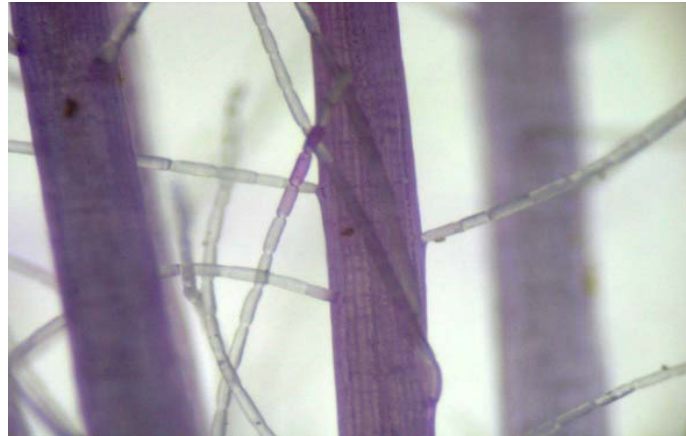


Şekil 4.53. (2000 ppm'lik uygulama)

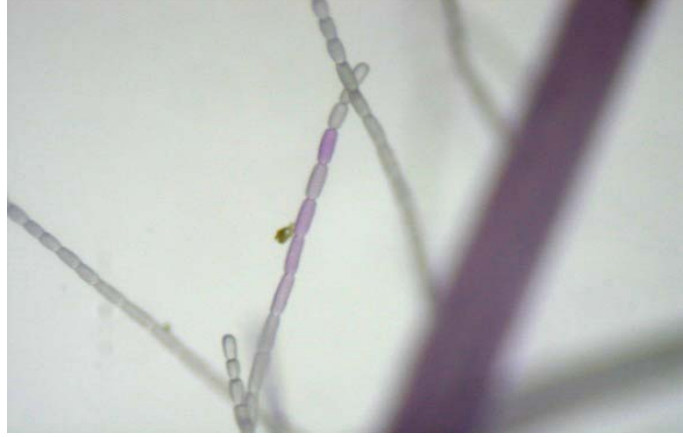
***Tradescantia pallida* H. stamen tüyü Sunset Yellow uygulama fotoğrafları**



Şekil 4.54. (10 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.55. (200 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.56. (1000 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.57. (2000 ppm'lik uygulama)

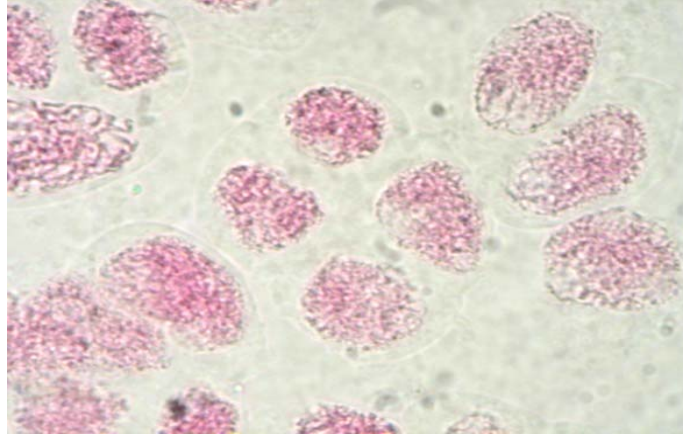
4.1.3. *Tradescantia pallida* H. mikronükleus analizi sonuçları

Brilliant Black ve Sunset Yellow maddelerinin dört farklı konsantrasyonunun uygulandığı ve kontrol gruplarını içeren *Tradescantia pallida* H. bitkisinin mikronükleus analizine ait fotoğraflar bilgisayar ortamında OLYMPUS CX31 marka araştırma mikroskobu ile çekilerek aşağıda sunulmuştur. Oluşan mikronükleuslar mayoz bölünmenin erken tetrad safhasında belirlenmiştir.

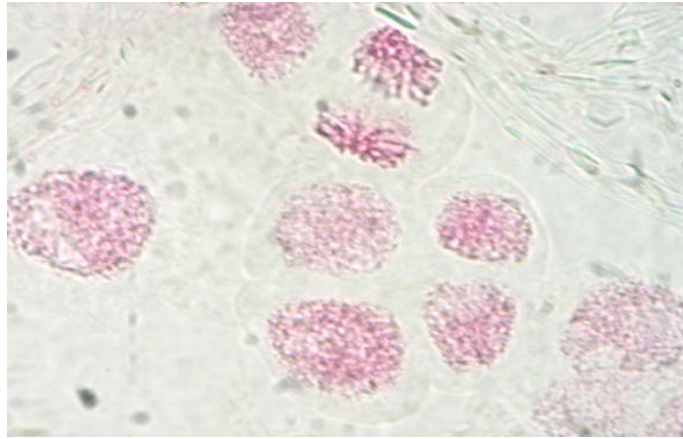
Tradescantia pallida H. bitkisinde gerçekleştirilen mikronükleus analizinin Brilliant Black ve Sunset Yellow maddelerinin dört farklı konsantrasyonunun uygulandığı ve kontrol gruplarını içeren uygulamaların sonuçları

değerlendirildiğinde mayoz bölünmenin erken tetrad safhasında oluşan mikronükleusların uygulanan maddelerin konsantrasyon artışlarına bağlı olarak artış gösterme eğilimine sahip olduğu ve özellikle de Brilliant Black adlı boya maddesinin uygulanması ile mikronükleus oluşumlarının teşvik edildiği ortaya çıkarılmıştır. Her iki boya maddesi için mikronükleuslar sadece 1000 ppm ve 2000 ppm'lik konsantrasyonlarda oluşmuşlardır.

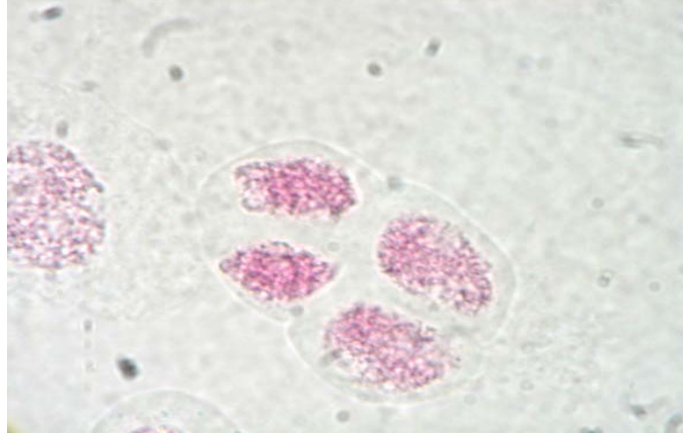
***Tradescantia pallida* H. mikronükleus kontrol fotoğrafları**



Şekil 4.58. Kontrol grubu



Şekil 4.59. Kontrol grubu



Şekil 4.60. Kontrol grubu

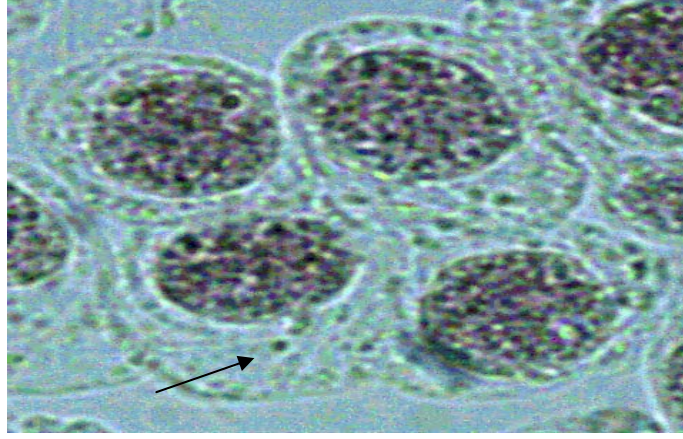
***Tradescantia pallida* H. mikronükleus Brilliant Black uygulama fotoğrafları**



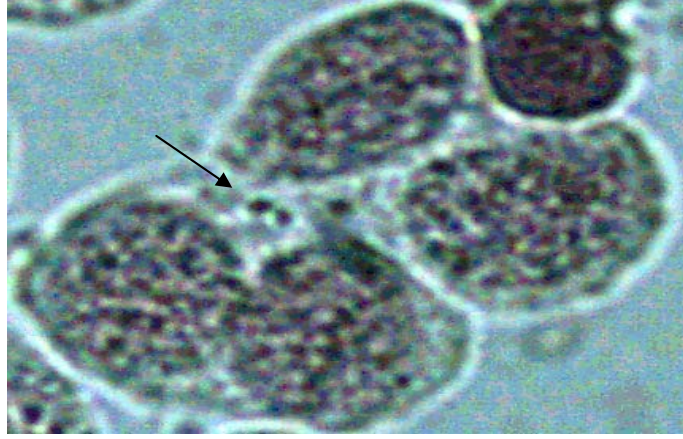
Şekil 4.61. (10 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.62. (200 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.63. (1000 ppm'lik uygulama)

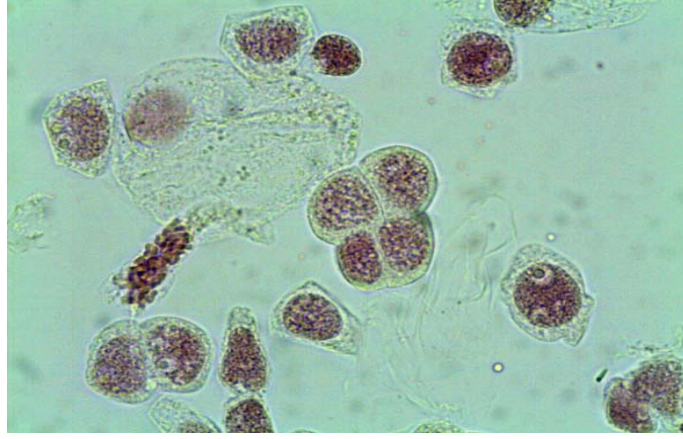


Şekil 4.64. (2000 ppm'lik uygulama)

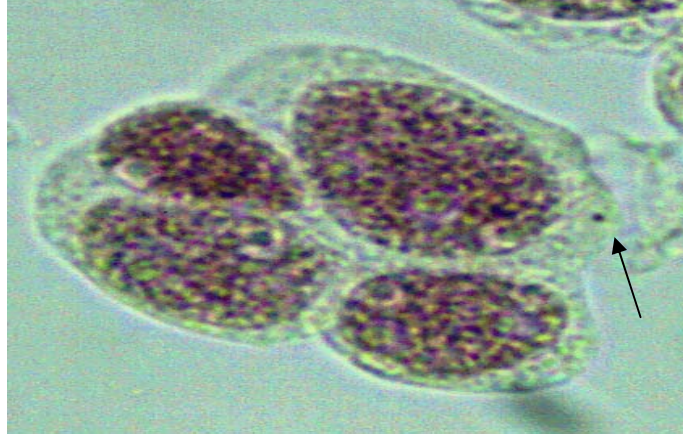
***Tradescantia pallida* H. mikronükleus Sunset Yellow uygulama fotoğrafları**



Şekil 4.65. (10 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.66. (200 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.67. (1000 ppm'lik uygulama)



Şekil 4.68. (2000 ppm'lik uygulama)

4.2. Tartışma

Gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan ve canlının yaşamı üzerinde potansiyel bir tehlike unsuru olabilen gıda renklendirici maddelerinin de genotoksik potansiyellere sahip oldukları bilinmektedir. Bu maddelerin organizmalara uygulanması sonucunda konsantrasyonlarına bağlı olarak canlı hücrelerin fenotipik ve genotipik yapılarında değişiklikler gözlenmektedir. Genotoksik potansiyellere sahip maddelerin organizmalarda oluşturduğu genetiksel hasarların belirlenmesinde ise birtakım testler kullanılmaktadır.

Yapılan bu çalışmada genotoksik aktiviteye sahip olan gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan Sunset Yellow ve Brilliant Black adlı boyar maddelerin *Tradescantia pallida* H., *Allium cepa* L. ve *Vicia faba* L. bitkileri üzerinde oluşturduğu genetiksel hasarların Kök ucu hücreleri testi, *Tradescantia* Stamen Tüyü analizi ve Mikronükleus Testi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda laboratuvar koşullarında yetiştirilen bitkisel organizmalara her iki boya maddesinin 4 farklı konsantrasyonu (10 ppm, 200ppm, 1000 ppm ve 2000 ppm) uygulanmıştır. Ayrıca her iki boya maddesi için kontrol grupları da oluşturulmuştur.

Allium cepa L. ve *Vicia faba* L. bitkileri için gerçekleştirilen Kök ucu hücreleri testinin sonuçları iki boya maddesi için de konsantrasyon artışlarına bağlı olarak mutajenik etkinin artmasıyla birlikte bölünen hücrelerin oranında azalmaya ve bunun sonucunda ise mitotik indekste düşüşe neden olmuştur. Meydana gelen mutasyonlar kendisini çeşitli anomaliler şeklinde ortaya çıkarmıştır. Ayrıca *Vicia faba* L. bitkisinde oluşan mikronükleuslar incelendiğinde en yüksek mikronükleus frekansının 1000 ppm ve 2000 ppm'lik konsantrasyonlarda olduğu sonucuna da varılmıştır.

Tradescantia pallida H. bitkisine uygulanan iki genotoksisite testinin sonucunda elde edilen veriler artan doz miktarına bağlı olarak genetiksel hasarın seviyesinde de artışın olduğunu göstermektedir. Fakat bu testlerin kullanılan farklı boya maddeler için farklı duyarlılık gösterebilme özelliklerine de sahip oldukları

fikri ortaya çıkarılmıştır. Trad-MCN testi Brilliant Black boya maddesi için Trad-SHM analizi ise Sunset Yellow boya maddesi için daha tutarlı sonuçlar vermiştir. Konsantrasyonlara bakıldığında 1000 ppm ve 2000 ppm'lik uygulamalarda hem stamen tüyü analizi hem de mikronükleus testi için en yüksek mutasyon frekansları gözlenmiştir. Bu durumun her iki boya maddesi için geçerli olduğu bulunmuştur.

Literatüre baktığımızda bu konu ile ilgili pek çok çalışmanın yapıldığını görmekteyiz. Özellikle canlı organizmaların yaşamsal faaliyetlerinin değerlendirilmesinde çevresel mutajenlerin test edilebilirliği için gerçekleştirilen bu testler son yıllarda oldukça ön plana çıkmıştır.

Çalışmamızla benzerlik gösteren daha önceden gerçekleştirilmiş olan bazı çalışmalarda gıda boyalarının genotoksisitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarına baktığımız zaman elde etmiş olduğumuz verilerle paralellik gösterdiklerini görmekteyiz (Şekil 4.1- Şekil 4.68).

Besin endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılan iki farklı boya maddesi ile genotoksisite değerlendirilmesinin yapıldığı araştırmada Quinoline Yellow (E104) ve Brilliant Black BN (E151) boya maddelerinin genotoksik etkileri ve potansiyel sitolojik etkileri in vitro insan lenfositleri ve in vivo *Vicia faba* kök ucu meristemleri kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmada oldukça duyarlı ve hızlı testler olan mikronükleus ve comet analizi testleri yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bilgiler göstermiştir ki; analiz edilen boya maddelerinin genotoksik etkileri, potansiyel olarak genotoksik tarama için mikronükleus ve comet analizi testleri ile belirlenebilmiştir ve in vitro insan lenfositleri ile in vivo *Vicia faba* kök ucu meristemlerinde kardeş kromatid değişiklikleri, kromozomal aberasyonlar ve mikronükleus oluşumları gözlenmiştir (Macioszek ve Kononowicz, 2004).

Gıdalarda besin renklendirici olarak kullanılan maddelerin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada; farelerin kemik iliğindeki kromozom yapıları incelenmiştir. Renklendirici kimyasal madde olarak carmoisin iki farklı dozda uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre carmoisinin kemik iliği

hücrelerinde kromozomal aberasyonları çeşitli şekillerde teşvik ettiği bulunmuştur. Ayrıca uygulamanın çeşitli periyotları sırasında nükleik asit ve total protein seviyelerinde de artış saptanmıştır (Ali ve diğ., 1998).

Çevremizde bulunan pek çok kimyasal maddenin mutajenik ve karsinojenik özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Kullanılan bu maddelerin canlı organizmalara uygulanması sonucunda ya da canlıların bu maddelere maruz kalması durumunda genotoksik etkilerin ortaya çıktığı görülmektedir. Bu konuyla ilgili olarak yapılmış olan çalışmaların sonuçları da araştırmamızda kullanmış olduğumuz kimyasal boya maddelerinin genotoksik niteliğini vurgulamaktadır.

Fungusitlerin bitki hücreleri ve memeliler üzerindeki etkileri çevresel kirlenmelerin in vivo ve in vitro için genotoksik potansiyelinin belirlenmesinde hızlı yanıt veren tek hücre jel elektroforezi (SCGE) kullanılarak genotoksisite teşviki yolu ile araştırılmıştır. Fenarimol'un DNA üzerinde zarar verici nitelikte olduğu bilinmektedir. Çalışmanın birçok hedefi bulunmaktadır. Bunlar; DNA ile fenarimol'un etkileşimlerinin olasılığını belirlemek, farklı iki memeli türünde lökositlerde fungusit'e karşı özel duyarlılığını belirlemek, fenarimol'un toksik ya da genotoksik potansiyelini belirlemek ve en son olarak da tropikal bölgelerde fenarimol'a duyarlı yabancı bitki türlerinin bulunup bulunmadığını belirlemektir. Sonuç olarak, zarar görmüş hücrelerin frekanslarındaki artış, artan fungusit dozlarının kanıtı olmuştur. Fenarimol'un teşviki ile hem sitotoksisite hem de genotoksisite artmıştır (Poli ve diğ., 2003).

Allium sativum ve *Vicia faba*'da sülfür dioksit kök ucu hücreleri üzerinde genotoksisitesinin belirlenmesi amacı ile yapılan araştırmada, sodyum bisülfid ve sodyum sülfid (1:3) karışımı $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ile $2 \times 10^{-3} \text{M}$ aralığında değişen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Genotoksisitenin belirlenmesinde *Vicia faba*'da anafaz aberasyon (AA) frekansları ve mikronükleus (MCN) testleri, *Allium sativum*'da ise sadece mikronükleus testleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak negatif kontrol ile karşılaştırıldığında *Vicia faba* kök ucunda anafaz aberasyon (AA)

frekansları 1.7-3.9 ve mikronükleus frekansları ise 3.5-4.5 kat artmıştır. Benzer sonuçlara *Allium* MCN testlerinde de rastlanmıştır (Yi H ve Meng Z, 2003).

Hayvanlar üzerinde yapılan bir araştırmada, in vivo sitogenetik testler ile 8-Cl-Cyclic adenozin monofosfat'ın genotoksik potansiyeli değerlendirilmiştir. Kullanılan bu kimyasal madde in vitro ve in vivo kanser hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda büyümeyi baskılayıcı bir etki göstermiştir. Uygulama için farenin BALB/c straini ve mikronükleus testi kullanılmıştır. İn vivo mikronükleus test sonuçları mikronükleus frekansında ve polikromatik eritrositlerde artışın olduğunu göstermiştir. Ayrıca sayısal ve yapısal kromozom varyasyonları da gözlenmiştir (Bajic ve diğ., 2004).

Genotoksisitenin değerlendirilmesi için kullanılan pek çok test bulunmaktadır. Bu testler arasında yer alan *Tradescantia* stamen tüyü analizi ve *Tradescantia* mikronükleus analizi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Önemli bir çevresel mutajen olan radyasyonun genotoksik etkilerinin belirlenmesinde de bu testlerin kullanıldığı bilinmektedir. Araştırmamızda da kullanılan her iki test pek çok çalışmada gerek maliyeti gerekse uygulanabilirliği açısından göze çarpmaktadır.

Radyasyonun bitkiler üzerindeki etkileri ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada, *Vicia* mikronükleus, *Tradescantia* mikronükleus ve *Tradescantia* stamen tüyü mutasyon biyoanaliz testleri kullanılarak ¹³⁷Cs radyasyonunun genotoksisitesi indelenmiştir. Bu çalışma; ¹³⁷Cs'nin düşük dozlarıyla teşvik edilen DNA zararı için üç bitki biyoanalizinin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. Deneysel radyoaktivitenin çeşitli seviyeleri ile katı ya da sıvı ¹³⁷Cs kaynakları kullanılarak toprakta ya da bir solüsyonda yürütülmüştür. Yürütülen üç biyoanaliz göstermiştir ki; muamelelerde farklı duyarlılıklar ortaya çıkmıştır. Bunun ötesinde karşılaştırılabilir dozlarda, iç kontaminasyonlar üç biyoanaliz için büyük etkilere izin vermiştir. Sonuçta bu biyoanalizlerin radyoaktif ¹³⁷Cs zararının genotoksik etkileri için etkileyici testler olduğu belirlenmiştir (Minouflet ve diğ., 2005).

1999 yılında yapılan bir çalışmada; UV-B radyasyonun artan seviyesi çevre için potansiyel bir tehlike olarak görülmüş, bu durum ise araştırmaları UV-B radyasyonun sitogenetik etkilerinin belirlenmesi yönüne teşvik etmiştir. Bu amaçla *Tradescantia* bitkisinin polen ana hücreleri üzerinde oluşan hasar mikronükleus testi ile incelenmiştir (Wang ve Wang, 1999). *Tradescantia*'nın üç klonu için yapay UV-B radyasyonu 10 saatlik sürenin yanı sıra artan dozlarda (2, 4, 6, 8 saatlik sürelerde) bitkilere uygulanmıştır. Muamele edilmiş bitkiler ve kontrol bitkilerinin çiçeklenmeleri saptanmıştır. Daha sonra bunlar preparatların hazırlanmasında kullanılmıştır. Mikronükleusların frekansları ve genotoksisitenin derecesi erken tetradların oluşum evresi ile gözlenmiştir. Tekrarlanan bu iki deneyin sonuçları normal gün ışığı altında mikronükleus frekanslarındaki artışın kullanılan UV ışığın dozuna bağlı olarak arttığını göstermiştir. Yağmurlu ve bulutlu bir gün altında yapılan oldukça yüksek bir üçüncü UV-B uygulaması sonucunda ise mikronükleus frekanslarının önceki iki denemeye nazaran daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuçta artan radyasyon oranına bağlı olarak mikronükleus sayısında artış gözlemlenmiş ve mikronükleus testlerinin UV-B radyasyonun etkisinin belirlenmesinde önemli bir yere sahip olduğu saptanmıştır (Wang ve Wang, 1999).

Hava, toprak ve su kirliliğinin, ayrıca çeşitli çevresel atık maddelerin in situ olarak görüntülenmesinde *Allium* sp.-*Vicia* sp. kök ucu hücreleri testlerinin yanısıra *Tradescantia* testlerinin de ağırlık kazandığı görülmektedir. Maden bölgeleri ve ağır metallerin de genotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesinde *Tradescantia* testleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu testlerin tıpkı çalışmamızda olduğu gibi görevini en iyi şekilde yerine getiren, oldukça duyarlı ve verimli testler olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da doğrulanmıştır.

Atık suların etkisi üzerine yapılan bir araştırmada ise Güneybatı Bulgaristan'daki maden bölgesinde ağır metal ve siyanid ile kirlenmiş nehir suyunun *Allium cepa* üzerindeki sitogenetik etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma mikronükleus ve anafaz analizleri kullanılarak, mitotik ve faz indekslerinin hesaplanması ile Güneybatı Bulgaristan'ın Panagjurishte bölgesinde yürütülmüştür. İn vivo deney materyali olarak *Allium cepa* kullanılmıştır. Elde edilen veriler hücre çoğalmasında bir azalma ve normal mitoz-mikronükleus, anafaz ve telofaz köprüleri ile

fragmentler, geç kalan kromozomlar ve bir C-mitotik etkisinin meydana geldiğini göstermiştir. Sitogenetik analizler ağır metal ve siyanid ile kirlenmiş suların biyolojik görüntülenmesinin etkili ve uygun olduğunu kanıtlamak için yapılmıştır (Ivanova ve diğ., 2005).

Çin'in Guilin bölgesindeki doğal Lijang ırmağından su örnekleri genotoksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada Trad-MCN ve Trad-SHM biyoanalizleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmada 60 farklı bölgeden toplanmış su örneklerinin genotoksisitesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar; ırmağın kollarındaki su örneklerinin çoğunun yüksek derecede mutajenik olduğunu ve endüstriyel etki ile şehir lağımının bulunduğu Guilin şehir bölgesinde ana ırmaaktaki kirleticilerin biriktiğini göstermiştir. Hem Trad-MCN hem de Trad- SHM analizleri su örneklerinde mutajenlerin belirlenmesi için oldukça etkileyici analizlerdir (Jiang ve diğ., 1998).

Yapılan farklı bir çalışmada Çin'in Kunming şehrinden geçen Panlong ırmağında su genotoksisitesini belirlemek amacıyla 20 farklı bölgeden toplanan su rnekleri Trad-MCN ve Trad-SHM analizleri ile değerlendirilmiştir. Trad-MCN analizinde en düşük frekans 3,19 MCN/100 tetrad olarak, Trad-SHM analizinde ise 1,32 Mutasyon/1000 stamen tüyü olarak belirlenmiştir. En yüksek frekans; Trad-MCN analizi için 8,73 MCN/100 tetrad, Trad-SHM analizi için ise 4,30 Mutasyon/1000 stamen tüyü olarak belirlenmiştir. Trad-MCN analizi için zayıf frekanslar atık olarak ırmağa karışan endüstriyel ve kentsel atık su bölgesi yakınındaki bölgelerden elde edilen su örneklerinde gözlenmiştir. Genelde mikronükleus ve stamen tüyü mutasyonlarının frekansı ırmağın Kunming şehri boyunca akan bölgesinde artmaktadır. Elde edilen verilerden Trad-MCN analizinin ırmaak suyu kirliliğinin genotoksisitesinin belirlenmesinde Trad-SHM analizinden daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (Duan ve diğ., 1998).

Arjantin'de yapılan bir in situ görüntüleme çalışmasında *Tradescantia* mikronükleus biyoanalizi kullanılarak hava kirliliğinin çevresel düzeylerinin genotoksisitesi araştırılmıştır. Çalışmada *Tradescantia pallida* bitkisi 3 farklı bölgede

konumlandırılmıştır. Bu bölgelerden birisi yüksek trafik aktivitesine sahip şehir merkezi, diğeri benzin ve dizel yakıtlı ağır araç trafiğinin yoğun olduğu kampüs alanı, üçüncüsü ise hava kirliliğinin bölgesel kaynaklarının önemli olmadığı konutsal alandır. Her bir örnekleme bölgesinden Kasım, Şubat ve Nisan aylarında 20 genç *Tradescantia pallida* çiçeği toplanmıştır. Polen ana hücrelerinin erken tetradlarında mikronükleus frekansları belirlenmiştir. Aynı zamanda her bir bölge için havada bulunan toplam partiküllerin çevresel düzeyleri belirlenmiştir. Bölgeler arasında mikronükleus frekansında önemli bir fark gözlenmiştir. Konutsal alanın, kampüs bölgesi ve şehir merkezi alanlarına göre daha düşük mikronükleus frekansına sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuçta; çevresel hava kirlilik değişim derecesinin *Tradescantia* polen ana hücrelerinin spontan mikronükleus frekansındaki değişiklikler ile ilgili olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar yüksek bitkiler ile biyogörüntülemenin aletsel görüntüleme teknikleri olmaksızın ya da küçük bir ölçekte hava kirleticilerinin araştırıldığı alanlarda tanımlanan hava kirliliği çalışmaları için kullanışlı olabildiğini göstermektedir (Carreas ve diğ., 2006).

İnsanların da içerisinde olduğu canlılığın sınırları içerisinde doğal ya da insan kaynaklı olarak bulunan ve ekolojik dengeler üzerinde potansiyel tehlike niteliğindeki tüm genotoksik maddeler üzerinde gerçekleştirilen ve gerçekleştirilecek olan araştırmalar ile bu maddelerin genotoksik potansiyelleri ve canlı sistemlerde meydana getirmiş olduğu genetik hasarların bazıları saptanmış bazılarının etkileri ise halen saptanmayı beklemektedir.

Bilimsel araştırmalarda model organizma olarak genellikle bitkisel ya da hayvansal organizmalar kullanılmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda bitkisel ve hayvansal organizmalardan elde edilen veriler göz önüne alınarak insan sağlığı ile ilgili bağlantılı çalışmaların yapılması konuyu daha anlamlı hale getirecektir. Bu doğrultuda kullanılan genotoksik potansiyele sahip olan maddelerin diğerkülkelerde olduğu gibi insanları doğrudan etkileyen gıda ve bağlantılı sektörlerde kontrollerinin daha iyi şekilde yapılması, insan sağlığını tehdit etmeyecek düzeyde uygun miktarlarda kullanılabilmesi ya da canlı sistemleri üzerinde genotoksik ve kanserojenik etkileri ispatlanmış olanların tamamen yasaklanması yönünde girişimlerde bulunulması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar A., Durakbaşı H.G. ve Paydak F., 1995. Alüminyum sülfatın insan periferel kan lenfosit kültürlerinde mikronükleus uyarımı üzerine etkileri. *S Ü Tıp Fak Derg*, 11: 139-44.
- Acar T., 2000. *Vicia faba* L.'nin Meristematik Hücreleri Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkileri, İzmir Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi).
- Acar O., Şık L., Akı C. 2006. Manisa Organize Sanayii Bölgesi Atıksu Arıtma Tesisine Giren ve Çıkan Suyun *Allium cepa* L. (Soğan) Kök Ucu Hücrelerinde Mitoz Bölünme Üzerine Etkileri. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran, Kuşadası, Türkiye.
- Akbaş E., Çelik A., Derici E. ve Söylemez F., 2001. The Investigation of Cigarette Smoking on The Lymphocyte Life Time and Genotoxic Effects. *Turkish Journal of Geriatrics*, Geriatri 4 (1): 15-18.
- Akı C., 2002. Genel Genetik, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Çanakkale, 001.
- Akı C. ve Karabay Ü., 2004. Genetik Laboratuvarı Uygulama Kitabı. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yayınları, No.38, Çanakkale.
- Akı C. ve Güneysu E., 2004. Çanakkale İlindeki Sanayii Kuruluşu Atık Sularının Ekonomik Öneme Sahip Bitki Türleri Üzerinde Enzimatik ve Genetiksel Değişimlerinin İzlenmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek lisans tezi).
- Akpınar N., Türkoglu S. ve Koca S., 2001. An Investigation on Cytological Effects of Tonifruit on *Vicia faba* L. *Journal of Qafqaz University*, 8: 191-198.
- Ali M.O., Ghor A.A., Sharaf A.K., Mekkawy H. ve Montaser M.M., 1998. Genotoxic Effects of the Food Color (Carmoisine) on the Chromosome of Bone Marrow Cells of Rat. *Toxicology Letters*, 95 (1): 44.
- Altuğ T., 2001. Gıda Katkı Maddeleri. *Meta Basım, Bornova, İzmir*, 281.
- Andres C., 1987. Natural Color System, Systems Overcome Potential Deficiencies of Natural Products. *Food Processing*, 2: 46-50.

- Anonim., 2002. Türk Gıda Kodeksi Gıdalarda Kullanılan Renklendiriciler Tebliği (Tebliğ No:2002/ 55), *Resmi Gazete*: 25.8.2002-24857.
- Arutyunyan R.M., Pogosyan V.S., Simonyan E.H., Atoyants A.L. ve Djigardjian E.M., 1998. In situ monitoring of the ambient air around the chloroprene rubber industrial plant using the *Tradescantia*-stamen-hair mutation assay. *Mutation Research*, 426: 117-120.
- Ateeq B., Farah M.A., Niamat A.M. ve Waseem A., 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*, 514: 105-113.
- Aybeke M., Olgun G., Sıdal U. ve Kolankaya D., 2000. Zeytinyağı Fabrikası Atık Suyunun Buğday (*Triticum aestivum* L.) Kök Ucu Hücrelerindeki Mitoz Bölünme ve Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi. *Turk J Biol.*, 24: 127-140.
- Bağdatlıoğlu N. ve Demirbükler B., 1999. Gıda İşlemede Karotenoidlerde Meydana Gelen Gelişmeler. *Gıda*, 9: 48-51.
- Bajic V., Stanimirovic Z. ve Stevanovic J., 2004. Genotoxicity Potential of 8-Cl-Cyclic Adenosine Monophosphate Assessed with Cytogenetic Tests In Vivo. *Archives of Medical Research*, 35: 209-214.
- Başaran A.A., 2004. Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları. *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırimer*, ISBN 975-94077-2-8.
- Carreas H.A., Pignata M.L. ve Saldiva P.H.N., 2006. In situ monitoring of urban air in Cordoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Atmospheric Environment*, 40: 7824-7830.
- Cohen N., Weiss G. ve Minde K., 1972. Cognitive styles in adolescents previously diagnosed as hyperactive. *J Child Psychol Psychiatry*, 13: 203-9.
- Coşkun E, Özgörgücü B, Gönüz A, Tort N. 1994. The effects of Decis (insecticide) on onion (*Allium cepa*) root tip meristematic cells. XII. National Biology Congress 6-8, Jan. Edirne. 266-269.
- Cotelle S., Masfaraud J.F. ve Ferard J.F., 1998. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/ Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research*, 426: 167-171.

- Cruz A.D., McArthur A.G., Silva C.C., Curado M.P. ve Glickman B.W., 1994. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutat Res*, 313: 57-68.
- Çora T., Demirel S., Acar A. ve Erkul İ., 1992. Yenidoğan periferel kan lenfosit kültürlerinde fototerapinin uyardığı mikronükleuslar. *S Ü Tıp Fak Derg*, 8: 345-51.
- Demirel S. ve Zamani A.G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg.*, 12 (3): 123-127.
- Demirer A., 1974. Şekerdeki Boyaların İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanımlanmaları Üzerine Araştırmalar. *A.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*. 21: 145.
- Dovgalyuk A.I., Kalinyak T.B. ve Blum Y.B., 2001. Cytogenetic Effects of Toxic Metal Salts on Apical Meristem Cells of *Allium cepa* L. Seeding Root. *Cytology and Genetics*, 35 (2): 3-10.
- Duan C.Q., Hu B., Wang Z.H., Wen C.H., Yan S.Q., Jiang X.H., Wang D.K., Li Q. ve Liang X.F., 1998. *Tradescantia* bioassays for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People's Republic of China. *Mutation Research*, 426: 127-131.
- Eastmond D.A. ve Tucker J.D., 1989. Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*, 13: 34-43.
- Evandri M.G., Tucci P. ve Bolle P., 2000. Toxicological Evaluation of Commercial Mineral Water Bottled in Polyethylene Terephthalate: A Cytogenetic Approach with *Allium cepa*. *Food Additives and Contaminants*, 1712: 1037-1045.
- Fenech M. ve Morley A.A., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, 43: 233-46.
- Fenech M. ve Morley A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res*, 161: 193-8.

- Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S. ve Zeiger E., 2003. Human Micronucleus Project. "HUMN Project: Detailed Description of The Scoring Criteria for The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures.", *Mutat Re.*, 534 (1-2): 65-75.
- Ferreira M.I., Rodrigues G.S., Domingos M. ve Saldiva P.H.N., 2003. *In situ* monitoring of mutagenicity of air pollutants in Sao Paulo City using *Tradescantia*-SHM bioassay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46 (2): 253-258.
- Ferreira M.I., Domingos M., Gomes H.A., Saldiva P.H.N. ve Assunção J.V., 2007. Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, Sao Paulo- SP, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *Environmental Pollution*, 145: 219-224.
- Fomin A., Paschke A. ve Arndt., 1998. Assessment of the genotoxicity of mine-dump material using the *Tradescantia*-stamen hair (Trad-SHM) and the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassays. *Mutation Research*, 426: 173-181.
- Ford J.H., Schultz C.J. ve Correll A.T., 1988. Chromosome elimination in micronuclei: A common of hypoploidy. *Am J Hum Genet*, 43: 733-40.
- Fucic A., Garaj-Vrhovac V., Skara M. ve Dimitrovic B., 1992. X-Rays, microwaves and vinyl chloride monomer: Their clastogenic and aneugenic activity, using the micronucleus assay on human lymphocytes. *Mutat Res*, 282: 265-71.
- Garewal H.S., Ramsey L., Kaugars G. ve Boyle J., 1993. Clinical experience with the micronucleus assay. *Cellular Biochem*, 17: 206-12.
- Genç M., 1999. Gıdalarda Doğal Renklendiricilerin Avantajları. *Gıda*, 10: 26-27.
- Gomes H.A., Nouailhetas Y., Silva N.C., Mezrahi A., Almeida C.E.B. ve Rodrigues G.S., 2002. Biological Response of *Tradescantia* Stamen-hairs to High Levels of Natural Radiation in the Poços de Caldas Plateau. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45 (3): 301-307.
- Gönüz A., Dülger B. Ve Kesici O., 2004. Sitoloji Laboratuvar klavuzu. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yayınları, No: 12, Çanakkale.

- Heddle J.A. ve Countryman R.I., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 41: 321-32.
- Henry B.S., 1980. Colours- Alternatives to Synthetics. *Food Processing Industry*, 11, 46-47.
- Hessel H., Radon K., Pethran A., Maisch B., Grobmair S. ve Sautter I., 2001. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugsevaluation by the micronucleus assay. *Mutat Res*, 497: 101-9.
- Högstedt B. ve Karlsson A., 1985. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat Res*, 156: 229-32.
- Ichikawa S. ve Wushur S., 2000. Analyses of spontaneous pink mutant events in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430 cultivated in a nutrient solution circulating growth chamber. *Mutation Research*, 472: 37-49.
- Ivanova E., Staikova T.A. ve Velcheva I., 2005. Cytogenetic Testing of Heavy Metal and Cyanide Contaminated River Waters in a Mining Region of Southwest Bulgaria. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4: 99-106.
- Jagetia G.C. ve Jacob P.S., 1994. The influence of vinblastine treatment on the formation of radiation-induced micronuclei in Mouse bone marrow. *Hereditas*, 120: 51-9.
- Jagetia G.C., Jayakrishnan A., Fernandes D. ve Vidyasagar M.S., 2001. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res*, 491: 9-16.
- Jiang Y.G., Yu Z.D., Liu G.Z., Chen R.Z. ve Peng G.Y., 1998. Genotoxicity of water samples from the scenic Lijang river in the Guilin area, China, evaluated by *Tradescantia* bioassays. *Mutation Research*, 426: 137-141.
- Juchimiuk J., Gnys A., Maluszynska J., 2006. DNA Damage Induced by Mutagens in Plant and Human Cell Nuclei in Acellular Comet Assay. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 44 (1): 127-131.
- Kalyoncu A. ve Yurttagül M., 1995. Ankara Piyasasında Satılan Çeşitli Dondurma, Şekerleme ve Pasta Süslerine Katılan Sentetik Gıda Boyalarının Kantitatif Olarak Araştırılması. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 24 (2): 279.

- Karaali A. ve Özçelik B., 1993. Gıda Katkısı Olarak Doğal ve Sentetik Boyalar. *Gıda*, 18 (6): 389-396.
- Kihlman B.A., 1975. Root tips of *Vicia faba* for the study of induction of chromosomal aberrations. *Mutation Res.*, 31: 401-412.
- Kirsch-Volders M. ve Fenech M., 2001. Inclusion of Micronuclei in Non-Divided Mononuclear Lymphocytes and Necrosis/Apoptosis May Provide a More Comprehensive Cytokinesis Block Micronucleus Assay for Biomonitoring, Purposes, *Mutagenesis*, 16 (1): 51-58.
- Klumpp A., Ansel W., Fomin A., Schnirring S. ve Pickl C., 2004. Influence of Climatic Conditions on The Mutations in Pollen Mother Cells of *Tradescantia* Clon 4430 and Implications for The Trad-MCN Bioassay Protocol. *Hereditas*, 141: 142-148.
- Kristen U., 1997. Use of Higher Plants as Screens for Toxicity Assessment. *Toxicology in Vitro*, 11: 181-191.
- Labay K., Ould-Elhkim M., Kles V., Guffroy M., Poul J.M. ve Sanders P., 2001. Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat. *Teratog Carcinog Mutagen*, 21: 441-51.
- Lau K., Mclean W.G., Williams, D.P. ve Howard C.V., 2006. Synergistik Interactions between Commonly Used Food Additives in a Developmental Neurotoxicity Test. *Toxicological Sciences*, 90 (1): 178-187.
- Lehucker-Michel M.P., DiGiorgio C., Amara Lehucke –Michel M.P., DiGiorgio C., Amara Y.A., Laget M. ve et al., 1995. The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: Effects of smoking. *Mutagenesis*, 10: 329-32.
- Ma T.H., Cabrera G.L., Cebulska-Wasilewska A., Chen R., Loarca F., Vandererg A.L. ve Salamone M.F., 1994a. *Tradescantia*-Stamen-Hair-Mutation Bioassay – A Collaborative Study on Plant Genotoxicity Bioassays for the International Program on Chemical Safety, WHO, The United Nations, *Mut. Res.*, 310: 211-220.
- Ma T.H., Cabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vanderberg A.L. ve Slamone M.F., 1994b. *Tradescantia*-Micronucleus Bioassay – A Collaborative Study on Plant Genotoxicity Bioassays for the International

- Program on Chemical Safety, WHO, The United Nations, *Mut. Res.*, 310: 221-230.
- Macioszek V.K. ve Kononowicz A.K., 2004. The Evaluation of The Genotoxicity of Two Commonly Used Food Colors: Quinoline Yellow (E 104) and Brilliant Black BN (E 151). *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9: 107-122.
- Majer B.J., Laky B., Knasmuller S. ve Kassie F., 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res*, 489: 147-72.
- Maluf S.W. ve Erdtmann B., 2001. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet*, 124-5.
- Maluszynska J. ve Juchimiuk J., 2004. Plant Genotoxicity: A Molecular Cytogenetic Approach in Plant Bioassays. *Plant Genotoxicity, Arh Hig Rada Toksikol.*, 56: 177-184.
- Mavournin K.H., Blakey D.H., Cimino M.C., Salamone M.F. ve Heddle J.A., 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*, 239: 29-80.
- Meyne J., Littlefield L.G. ve Moyzis R.K., 1989. Labelling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: Application to the scoring of chromosome aberrations. *Mutat Res*, 226: 75-9.
- Migid H.M.A., Azab Y.A. ve Ibrahim W.M., 2005. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 57-64.
- Miller M., 1985. Danger! Additives at Work, *London Food Commission*.
- Minouflet M., Ayrault S., Badot P.M., Cotellet S. ve Ferard J.F., 2005. Assessment of The Genotoxicity of ¹³⁷Cs Radiation Using *Vicia*-Micronucleus, *Tradescantia*-Micronucleus and *Tradescantia*-Stamen-Hair Mutation Bioassays. *Journal of Environmental Radioactivity*, 81: 143-153.

- Misik M., Solenska M., Micieta K., Misikova K. ve Knasmüller S., 2005. In situ monitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays. *Mutation Research*, 605: 1-6.
- Moore L.E., Warner M.L., Smith A.H., Kalman D. ve Smith M.T., 1996. Use of fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Envir Mol Mutagen*, 27: 176-84.
- Moore L.E., Smith A.H., Hopenhayn-Rich C., Biggs M.L., Kalman D. ve Smith M.T., 1997. Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6: 31-6.
- Naccarati A., Molinu S., Mancuso M., Siciliano G. ve Migliore L., 2000. Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients. *Neurol Sci*, 21: 963-5.
- Norppa H., Renzi L. ve Lindholm C., 1993. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis- blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis*, 8: 519-25.
- Oliveira N.G., Castro M., Rodrigues A.S., Goncalves I.C., Cassapo R., Fernandes A.P. ve et al., 2001. Evaluation of the genotoxic effects of the boron neutron capture reaction in human melanoma cells using the cytokinesis block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 16: 369-75.
- Özkul Y., Dönmez H., Erenmemişoğlu A., Demirtaş H. ve İmamoğlu N., 1997. Introduction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal smears of habitual users. *Mutagen*, 12: 470-9.
- Pastor S., Gutierrez S., Creus A., Xamena N., Piperakis S. ve Marcos R., 2001. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*, 16: 539-45.
- Poli P., Mello M.A., Buschini A., Castro V.L.S.S., Restivo F.M., Rossi C. ve Zucchi T.M.A.D., 2003. Evaluation of The Genotoxicity Induced by The Fungicide Fenarimol in Mammalian and Plant Cells by Use of The Single- Cell Gel Electrophoresis Assay. *Mutation Research*, 540: 57-66.

- Prajapati S.K. ve Tripathi B.D., 2008. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Environment International*.
- Rank J., Lopez L.C., Nielsen M.H. ve Moretton J., 2002. Genotoxicity of Maleic Hydrazide, Acridine and DEHP in *Allium cepa* Root Cells Performed by Two Different Laboratories. *Hereditas*, 136: 13-18.
- Rencüzoğulları E., Kayraldız A., İla H.B., Çakmak T. ve Topaktaş M., 2001. The Cytogenetic Effects of Sodium Metabisulfite, a Food Preservative in Root Tip Cells of *Allium cepa* L. *Turk J Biol.*, 25: 361-370.
- Richard F., Muleris M. ve Dutrillaux B., 1994. The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. *Mutat Res*, 316: 1-7.
- Rodrigues G.S., 1999a. Bioensaios de Toxicidade Genetica com Plantas Superiores: *Tradescantia* (MCN, SHM), Milho e Soja. *Embrapa Meio Ambiente, Circular Tecnica 02*. Jaguariuna, 30.
- Rosin M.P. ve Gilbert A.M., 1990. Modulation of genotoxic effects in humans: Mutation and the environment. *Part E. NewYork: Wiley-Liss*, 51-9.
- Rosin M.P. ve Anwar W., 1992. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma Haematobium* infections. *Int J Cancer*, 50: 539-43.
- Rozgaj R. ve Kasuba V., 2000. Chromosome aberrations and micronucleus frequency in anaesthesiology personnel. *Arh Hig Rada Toksikol*, 51: 361-8.
- Sarikaya R. ve Solak K., 2003. Benzoik Asit'in *Drosophila melanogaster*de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksisitesinin Araştırılması. *GÜ. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23 (3): 19-32.
- Saygı Ş., 2003. Deneysel Toksikolojide Toksikite Testleri ve Test Sonuçlarının Önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3) : 291-298.
- Schmid W., 1975. The micronucleus test. *Mutat Res*, 31: 9-15.
- Schmid W., 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A, ed. Chemical Mutagens, principles and methods for their detection. *New York: Plenum*, 4: 31-53.
- Schneider M., Diemer K., Engelhart K., Zankl H., Trommer W.E. ve Biesalski H.K., 2001. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei

- in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radic Res*, 34: 209-19.
- Schweickl H., Schmalz G. ve Spruss T., 2001. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res*, 80: 1615-20.
- Stich H.F., Stich W. ve Parida B.B., 1982. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Lett*, 17: 125-34.
- Stich H.F. ve Rosin M.P., 1984. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and intervention. *Cancer Lett*, 22: 241-53.
- Sökmen A. ve Gürel E., 2002. Besin katkı maddeleri olarak kullanılan sekonder metabolitler. *Bitki Biyoteknolojisi-1, Doku Kültürü ve Uygulamaları* (2. Baskı), 213-214.
- Tijo J.H. ve Levan A., 1950. The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Anal. Estac. Exh. Aula. Dei*. 2 (1): 21-64.
- Topsoy H., Demirer A. ve Bozkurt M., 1991. Bazı Şekerli Gıdalara Katılan Sentetik Organik Gıda Boyalarının Miktar Tayini. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 48 (1): 21.
- Vanderkerken K., Vanparys P., Verschaeve M. ve Volders K., 1989. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4: 6-11.
- Vanparys P., Vermeiren F., Sysmans M. ve Temmerman R., 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res*, 244: 95-103.
- Von Ledebur M.M. ve Schmid W., 1973. The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutat Res*, 19: 109-17.
- Wang S. ve Wang X., 1999. The *Tradescantia*-Micronucleus Test on The Genotoxicity of UV-B Radiation. *Mutation Research*, 426: 151-153.
- Watanabe T. ve Hirayama T., 2001. Genotoxicity of Soil. *Journal of Health Science*, 47 (5): 433-438.
- Widel M., Kolosza Z., Jedrus S., Lukaszczyk B., Raczek-Zwierzycka K. ve Swierniak A., 2001. Micronucleus assay in vivo provides significant

- prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol*, 77: 631-6.
- Xiao-wei Q., 2004. Mutagenic effects of chromium trioxide on root tip cells of *Vicia faba*. *Journal of Zhejiang University Science*, 5 (12): 1570-1576.
- Yalçın S., 2006. İyonize Edici Radyasyonun Bitkiler Üzerindeki Biyolojik Etkileri. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Radyasyon ve Çevre Sempozyumu. Ayvacık/Çanakkale.29-30 Haziran 2006.
- Yentür G. ve Karakaya A.E., 1985. Kullanımı Yasaklanan Aromatik Azo Yapısındaki Gıda Boyalarının Bazı Gıda Maddelerinde Araştırılması. *Gıda*, 10 (6): 371.
- Yentür G., Yaman M. ve Bayhan A., 1998. Bazı Gıda Maddelerine Katılan Sentetik Boyaların Miktarlarının Araştırılması. *Gıda*, 23 (3): 195-199.
- Yi H. ve Meng Z., 2003. Genotoxicity of Hydrated Sulfur Dioxide on Root Tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutat. Res.*, 537 (1): 109-14.
- Yoshida K., Yamazaki H., Ozeki S., Inoue T., Yoshioka Y., Yoneda M. ve et al., 2001. Mitochondrial genotype and radiationinduced mikronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro. *Oncol Rep*, 3: 615-9.
- Zamani A.G. ve Durakbaşı H.G., 2002. Sigaranın bukkal mukoza hücrelerinde, ürotelyal hücrelerde ve periferik kan lenfositlerindeki genotoksik etkileri. *Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Proje Çalışması*. Konya.
- Zijno A., Marcon F., Leopardi P., Salvatore G., Carere A. ve Crebelli R., 1994. An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. *Fd Chem Toxic* 32: 159-63.
- <http://www.nadidem.net/bmk/Genotok04.pdf>
- <http://www.guncelpediatri.com/yazilar.asp?yaziid=420>
- <http://www.bursakalder.org/bulten1/icerik.php?bulten=haber1&id=39>
- <http://www.saglikvakfi.org.tr/>
- http://www.gidaraporu.com/gida-maddelerinde-kullanilan-renklendiriciler_g.htm
- http://en.wikipedia.org/wiki/Sunset_yellow
- http://en.wikipedia.org/wiki/Brilliant_Black_BN
- http://botit.botany.wisc.edu/courses/botany_130/Eukaryotic_Cell/Cell.html

<http://www.gap.gov.tr/Turkish/Tarim/Tarlayt/sogan.html>

http://www.floridata.com/ref/T/trad_pal.c

TABLULAR

	Sayfa
Tablo 1.1. Kullanımı Yasaklanan Yapay Renk Maddeleri	6
Tablo 1.2. Türk Gıda Kodeksinde Gıdalarda Kullanımına İzin Verilen Doğal Renk maddeleri (Anonim, 2002a)	9
Tablo 1.3. Türk Gıda Kodeksinde Gıdalarda Kullanımına İzin Verilen Suda Çözünen Yapay Renk maddeleri (Anon, 2002a).....	10
Tablo 1.4. Genetik Toksikolojide Kullanılan Temel Testler (Akı ve Karabay, 2004)	14
Tablo 1.5. Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi İçin kullanılan Testler (Akı ve Karabay, 2004)	15
Tablo 4.1. <i>Allium cepa</i> L. Brilliant Black uygulaması mitotik indeks ortalamaları...75	75
Tablo 4.2. <i>Allium cepa</i> L. Sunset Yellow uygulaması mitotik indeks ortalamaları... 76	76
Tablo 4.3. <i>Vicia faba</i> L. Brilliant Black uygulaması mitotik indeks ortalamaları..... 76	76
Tablo 4.4. <i>Vicia faba</i> L. Sunset Yellow uygulaması mitotik indeks ortalamaları 77	77

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. Sunset Yellow kimyasal yapısı	11
Şekil 1.2. Brilliant Black kimyasal yapısı	11
Şekil 1.3. Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus bulunan hücre	23
Şekil 1.4. Sitokinezi bloke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre.....	23
Şekil 1.5. Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre	23
Şekil 1.6. <i>Tradescantia</i> da mayoz bölünmenin tetrad safhasındaki mikronükleuslar	26
Şekil 1.7. Stamen tüyü hücrelerinde mutasyon.....	27
Şekil 1.8. Stamen tüyü hücre yapısı	28
Şekil 3.1. <i>Allium cepa</i> L.....	44
Şekil 3.2. <i>Tradescantia pallida</i> H.....	45
Şekil 3.3. <i>Vicia faba</i> L.....	48
Şekil 3.4. <i>Tradescantia</i> mikronükleus slayt hazırlama prosedürü	57
Şekil 4.1. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafaz ve telofaz (kontrol grubu).....	60
Şekil 4.2. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafaz, profaz ve metafaz (kontrol grubu).....	60
Şekil 4.3. <i>Allium cepa</i> L. mitotik profaz (kontrol grubu).....	60
Şekil 4.4. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafaz ve telofaz (kontrol grubu).....	61
Şekil 4.5. <i>Allium cepa</i> L. mitotik telofazda kalgın kromozom, kutup kayması, düzensiz metafaz ve kromozom kırılması (10 ppm'lik uygulama)	61
Şekil 4.6. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafaz ve telofazda kalgın kromozomlar, kutup kayması, düzensiz metafaz (10 ppm'lik uygulama)	61
Şekil 4.7. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda köprü oluşumu (10 ppm'lik uygulama). 62	
Şekil 4.8. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kutup kayması, kalgın kromozom ve düzensiz metafaz (200 ppm'lik uygulama)	62
Şekil 4.9. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafaz ve telofazda kalgın kromozomlar ve kutup kaymaları, düzensiz metafaz, (200 ppm'lik uygulama)	62
Şekil 4.10. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozomlar ve kutup kaymaları, düzensiz metafaz, (1000 ppm'lik uygulama)	63

Şekil 4.11. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozomlar, kutup kayması ve köprü oluşumu (1000 ppm'lik uygulama).....	63
Şekil 4.12. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozom (2000 ppm'lik uygulama).....	63
Şekil 4.13. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda ayrılmama, telofazda kutup kayması ve kalgın kromozom (2000 ppm'lik uygulama)	64
Şekil 4.14. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozomlar ve tripolar kutup oluşumu (10 ppm'lik uygulama).....	64
Şekil 4.15. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kutup kayması, kalgın kromozomlar ve metafaz plağı deformasyonu (10 ppm'lik uygulama).....	64
Şekil 4.16. <i>Allium cepa</i> L. mitotik telofazda kutup kayması (200 ppm'lik uygulama)	65
Şekil 4.17. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda ve telofazda kutup kaymaları, kalgın kromozomlar ve düzensiz metafaz (200 ppm'lik uygulama).....	65
Şekil 4.18. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda köprü oluşumu, kalgın kromozom telofazda kutup kayması (1000 ppm'lik uygulama).....	65
Şekil 4.19. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozom ve metafaz plağı deformasyonu (1000 ppm'lik uygulama).....	66
Şekil 4.20. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozom (2000 ppm'lik uygulama).....	66
Şekil 4.21. <i>Allium cepa</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozom ve düzensiz kromozomlar (2000 ppm'lik uygulama)	66
Şekil 4.22. <i>Vicia faba</i> L. mitotik profaz, anafaz, telofaz ve metafaz (kontrol grubu).....	67
Şekil 4.23. <i>Vicia faba</i> L. mitotik profaz, telofaz ve metafaz (kontrol grubu).....	67
Şekil 4.24. <i>Vicia faba</i> L. mitotik profaz, telofaz ve anafaz (kontrol grubu)	67
Şekil 4.25. <i>Vicia faba</i> L. mitotik telofazda kutup kayması ve düzensiz metafazlar (10 ppm'lik uygulama)	68
Şekil 4.26. <i>Vicia faba</i> L. mitotik anafaz ve telofazda kutup kayması, anafazda köprü oluşumu ve kalgın kromozom (10 ppm'lik uygulama).....	68
Şekil 4.27. <i>Vicia faba</i> L. mitotik profazda düzensiz kromozom dağılımı, anafazda kalgın kromozom ve düzensiz metafaz (200 ppm'lik uygulama).....	68

Şekil 4.28. <i>Vicia faba</i> L. mitotik telofazda kutup kayması, düzensiz metafazlar ve halka kromozom (200 ppm'lik uygulama).....	69
Şekil 4.29. <i>Vicia faba</i> L. mitotik profazda düzensiz kromozom dağılımı, anafazda kutup kayması ve kalgın kromozomlar, düzensiz metafaz (1000 ppm'lik uygulama).....	69
Şekil 4.30. <i>Vicia faba</i> L. mitotik anafaz ve telofazda kalgın kromozom, metafaz plağı deformasyonu (1000 ppm'lik uygulama).....	69
Şekil 4.31. <i>Vicia faba</i> L. mitotik telofazda köprü oluşumu ve kutup kayması, anafazda kalgın kromozom ve ayrılmama (2000 ppm'lik uygulama)	70
Şekil 4.32. <i>Vicia faba</i> L. mitotik telofazda kutup kayması, anafazda kalgın kromozom ve düzensiz metafaz (2000 ppm'lik uygulama)	70
Şekil 4.33. <i>Vicia faba</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozom ve düzensiz metafaz ve metafaz plağı deformasyonu (10 ppm'lik uygulama)	70
Şekil 4.34. <i>Vicia faba</i> L. mitotik düzensiz metafaz (10 ppm'lik uygulama)	71
Şekil 4.35. <i>Vicia faba</i> L. mitotik telofazda kalgın kromozom (200 ppm'lik uygulama)	71
Şekil 4.36. <i>Vicia faba</i> L. telofazda kalgın kromozom, kutup kayması ve düzensiz metafaz (200 ppm'lik uygulama)	71
Şekil 4.37. <i>Vicia faba</i> L. telofazda köprü oluşumu, anafazda ayrılmama ve kutup kayması (1000 ppm'lik uygulama)	72
Şekil 4.38. <i>Vicia faba</i> L. Telofazda enine bölünme (1000 ppm'lik uygulama).....	72
Şekil 4.39. <i>Vicia faba</i> L. mitotik anafazda ayrılmama, düzensiz metafaz (2000 ppm'lik uygulama)	72
Şekil 4.40. <i>Vicia faba</i> L. mitotik anafazda kalgın kromozomlar (2000 ppm'lik uygulama).....	73
Şekil 4.41. <i>Vicia faba</i> L. mikronükleus (10 ppm'lik Brilliant Black uygulaması)	73
Şekil 4.42. <i>Vicia faba</i> L. mikronükleus (200 ppm'lik Brilliant Black uygulaması) ..	73
Şekil 4.43. <i>Vicia faba</i> L. mikronükleus (1000 ppm'lik Brilliant Black uygulaması)	74
Şekil 4.44. <i>Vicia faba</i> L. mikronükleus (2000 ppm'lik Brilliant Black uygulaması)	74
Şekil 4.45. <i>Vicia faba</i> L. mikronükleus (1000 ppm'lik Sunset Yellow uygulaması)	74
Şekil 4.46. <i>Vicia faba</i> L. mikronükleus (2000 ppm'lik Sunset Yellow uygulaması)	75

Şekil 4.47. Kontrol grubu.....	79
Şekil 4.48. Kontrol grubu.....	79
Şekil 4.49. Kontrol grubu.....	79
Şekil 4.50. (10 ppm'lik uygulama)	80
Şekil 4.51. (200 ppm'lik uygulama)	80
Şekil 4.52. (1000 ppm'lik uygulama)	80
Şekil 4.53. (2000 ppm'lik uygulama)	81
Şekil 4.54. (10 ppm'lik uygulama)	81
Şekil 4.55. (200 ppm'lik uygulama)	81
Şekil 4.56. (1000 ppm'lik uygulama)	82
Şekil 4.57. (2000 ppm'lik uygulama)	82
Şekil 4.58. Kontrol grubu.....	83
Şekil 4.59. Kontrol grubu.....	83
Şekil 4.60. Kontrol grubu.....	84
Şekil 4.61. (10 ppm'lik uygulama)	84
Şekil 4.62. (200 ppm'lik uygulama)	84
Şekil 4.63. (1000 ppm'lik uygulama)	85
Şekil 4.64. (2000 ppm'lik uygulama)	85
Şekil 4.65. (10 ppm'lik uygulama)	85
Şekil 4.66. (200 ppm'lik uygulama)	86
Şekil 4.67. (1000 ppm'lik uygulama)	86
Şekil 4.68. (2000 ppm'lik uygulama)	86

YAŞAM ÖYKÜSÜ

1983 yılında Kırşehir’de doğdu. İlköğretimini Kırşehir Cumhuriyet İlköğretim okulunda tamamladı. Lise eğitimini Kırşehir Lisesinde tamamladıktan sonra 2001 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2005 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2005 Eylül’de aynı bölümde yüksek lisans eğitimine başladı ve halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.