



**PENOKSULAM'IN ALLIUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Seçil ÖZKAN

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Recep LİMAN

Uşak

Haziran, 2019

**T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PENOKSULAM' IN ALLİUM CEPAL KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seçil ÖZKAN

HAZİRAN 2019

UŞAK

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

PENOKSULAM' IN ALLİUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seçil ÖZKAN

UŞAK 2019

Kabul ve Onay Sayfası

ÇIKTI ŞEKLİNDE VAR O EKLENİLECEK



TEZ BİLDİRİMİ

Tez çalışmamdaki bilgi ve metinlerin akademik kurallar ile etik davranışlarla hazırlanıldığını ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış olup, çalışmada bana ait olmayan tüm ifade ve bilgilerin kaynaklarına eksiksiz atıf yapılmış olduğunu bildiririm.

Seçil ÖZKAN



PENOKSULAM' IN *Allium cepa* L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Seçil ÖZKAN

UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2019

ÖZET

Penoksulam, pirinç tarlalarında, geniş yapraklı yabancı otların kontrolü için, ekim veya doğrudan kuru ya da tohumlama yöntemleriyle yetiştirilen bitkilerin kontrolünde kullanılan yeni nesil bir herbisittir. Penoksulam, hücre bölünmesinin durdurulmasını ve bitkilerde sonraki büyüme işlemlerinin kontrol edilmesinde rol oynayan Asetolaktat Sentaz (ALS) enzimini inhibe eder. Bu çalışmada, *Allium cepa* ana-telofaz ve Komet testi Penoksulam herbisitinin *Allium cepa* köklerinde sitogenetik ve genotoksik etkilerini araştırmak için kullanılmıştır. *Allium cepa* yumruları Penoksulam'ın $\frac{1}{2}xEC_{50}$, EC_{50} ve $2xEC_{50}$ konsantrasyonlarına, saf su (negatif kontrol) ve Metilmetansülfonat (MMS, 10 ppm, pozitif kontrol) 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Penoksulam kontrol grubuna göre kök büyümesinin azalmasına neden olmuş ve Mitotik İndeks (MI) değerini azaltarak sitotoksik etki, kromozom anormalliklerini (KA'lar, anafaz köprüsü, kalgın kromozom, bozulmuş ana-telofaz, poliploidi ve yapışıklılık) ve DNA hasarını istatistiksel olarak artırarak genotoksik etki göstermiştir. Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) *A. cepa* kök meristem hücrelerindeki Penoksulam'ın miktar tayinini belirlemek için kullanılmıştır. Bu sonuçları doğrulamak için Penoksulam'ın bitkilerdeki sito-genotoksitesinde ortaya çıkan daha ileri moleküler toksikolojik değerlendirmelere ihtiyaç vardır.

Bilim kodu:

Anahtar Kelimeler: Penoksulam, *Allium* testi, Komet testi, Kromozomal Bozukluklar

Sayfa Adedi: 78

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Recep LİMAN

CYTOGENETIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF PENOXSULAM ON *Allium cepa* L. ROOT MERISTEM CELLS

(M. Sc. Thesis)

Seçil ÖZKAN

UNIVERSITY OF UŞAK

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Penoxsulam is a new post-emergence herbicide used on rice crops for annual grasses, broadleaf weeds, and sedges control, either grown through transplanting or direct dry or direct seeding methods of planting. Penoxsulam acts through inhibition of the Acetolactate Synthase (ALS), controlling cell division cessation and subsequent growth processes in plants. In this study, *Allium* ana-telophase and comet assay were used to examine the cytogenotoxic effects of herbicide Penoxsulam on *Allium cepa* roots. *Allium cepa* bulbs were exposed to $\frac{1}{2}xEC_{50}$, EC_{50} and $2xEC_{50}$ concentrations of Penoxsulam, distilled water (negative control) and Methyl methanesulfonate (MMS-10 ppm, positive control) for 24, 48, 72 and 96 h. Penoxsulam showed a cytotoxic effect by reducing root growth and mitotic index (MI), a genotoxic effect because it statistically increased chromosome aberrations (CAs, anaphase bridge, chromosomal laggards, disturbed anaphase-telophase, polyploidy and stickiness) and DNA damage as compared to control. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was also used for quantitative analysis of Penoxsulam in *A. cepa* root meristem cells. Further molecular toxicological evaluations associated in the cyto-genotoxicity of penoxsulam on plants are needed to confirm these results.

Science code:

Keywords: Penoxsulam, *Allium* test, Comet Assay, Chromosome Aberrations

Number of Page: 78

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Recep LİMAN

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda bilgi ve birikimleriyle bana yol gösteren ve destek veren kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Recep LİMAN'a, çalıőmalarım boyunca yanımda bana destek olan çok değerli arkadaőım Gller PİRDAL'a ve tüm bu süreçte yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaőlarım Hande AYTUĞ, Said YILDIZ'a ve emeği geçen tüm arkadaőlarıma çok teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca maddi manevi yanımda olan canım aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Seçil ÖZKAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	viii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Pestisitler.....	3
2.1.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması	3
2.1.1.1. İnsektisitler	6
2.1.1.2. Fungusitler	7
2.1.1.3. Herbisitler	8
2.2. Penoksulam	8
2.3. Dünyada ve Türkiye’ de Pestisit Kullanımı	10
2.4. Pestisit Toksisitesi	12
3. GENEL BİLGİLER.....	15
3.1. Mitoz Bölünme	15
3.2. Kromozom Yapısı.....	19
3.3. Kromozom Mutasyonları	20
3.3.1. Yapısal Kromozom Mutasyonları	20
3.3.2. Sayısal Kromozom Mutasyonları.....	23
3.4. Allium Testi	24
3.5. Komet Testi.....	25
4. MATERYAL VE METOT	29
4.1. Materyal	29
4.2. Metot.....	34
4.2.1. Allium Testi	34
4.2.1.1. Büyüme Engelleme Testi	34

4.2.1.2. Feulgen Tekniği Kullanılarak Preparat Hazırlama.....	35
4.2.2. Komet Testi.....	35
4.2.3. LC-MS/MS Tekniği ile Miktar Tayini Belirlenmesi	37
4.3. Veri Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	38
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
5.1. Büyüme Engelleme Testi.....	39
5.2. Penoksulam'ın Mitotik İndeks Üzerinde Oluşturduğu Etkiler	41
5.3. Penoksulam'ın Neden Olduğu Kromozomal Bozukluklar	42
5.4. Penoksulam'ın DNA Hasarı Üzerine Etkileri.....	46
5.5. LC-MS/MS Tekniği ile Penoksulam miktarının Belirlenmesine Ait Bulgular	46
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
7. KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEŐMİŐ	

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması	4
Çizelge 2.2. Herbisitlerin Sınıflandırılması.....	8
Çizelge 2.3. Penoksulam'ın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	9
Çizelge 4.1. Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar.....	31
Çizelge 4.2. Çalışmamızda kullanılan cihazlar, marka ve modeller	32
Çizelge 4.3. Kütle spektrofotometresi koşulları	39
Çizelge 5.1. Penoksulam'ın büyümeyi engelleme testi sonuçları	40
Çizelge 5.2. Penoksulam'ın <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak ortalama kök uzunlukları.....	41
Çizelge 5.3. Penoksulam'ın <i>A. cepa</i> kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi	43
Çizelge 5.4. Penoksulam'ın neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları.....	45
Çizelge 5.5. Penoksulam'ın <i>A. cepa</i> kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti.....	47
Çizelge 5.6. Penoksulam'ın <i>A. cepa</i> kök hücrelerinde LC-MS/ MS ile kantitatif analizi ...	48

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.2. Lösin, valin ve izolösin amino asitlerinin biyosentez yolu	10
Şekil 2.3. Dünyada pestisit olarak tarım ilacı kullanımı oranları	11
Şekil 2.4. Türkiyedeki pestisit kullanımı dağılımı	12
Şekil 2.5. Pestisit Toksisitesi	14
Şekil 3.5. Komet yönteminin basamakları	28
Şekil 3.6. Komet testiyle farklı hasar derecerleriyle DNA kuyruk görüntüleri.....	29
Şekil 4.1. <i>A. cepa</i> L. Karyotipi	30

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Mitoz bölünme evreleri	18
Resim 3.2. Kromozom yapısı	21
Resim 3.3. Translokasyon	22
Resim 3.4. İnversonlar	23
Resim 3.5. Delesyon ve Duplikasyon	24
Resim 5.3. Penoksulam'ın neden olduğu bazı kromozom anomalikleri	46



SİMGELER VE KISALTMALAR

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla beraber aşağıda sunulmuştur.

Simge	Açıklaması
cm	Santimetre
°C	Derece santigrat
EC₅₀	%50 etkili konsantrasyon (EC=Effective Concentration)
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
N	Normal
ppm	Milyonda bir kısım (Parts Per Million µg/mL) çözelti
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ALS	Asetolaktat Sentetaz
AChE	Asetilkolin Esteraz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
KA	Kromozomal Anormallik
LMPA	Düşük Erime Noktalı Agaroz
MI	Mitotik İndeks
MMS	Metil Metan Sülfonat
MN	Mikronükleus

NMPA
USEPA

Normal Erime Noktalı Agaroz
Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı



1.GİRİŞ

Bitki koruma seçenekleri içerisinde sınıflandırılan pestisit kullanımı tarım mahsüllerinin işletim ve niteliklerini fazlaştırmak adına uygulanan birleştirici etkindir. Pestisitleri kullanmak, tarım ürününü yabancı otların bitkiye zarar verici etkilerinden koruyabilmek, üretimi güvence altında tutabilmek adına tercih edilen tarımsal mücadele yöntemi olup, 1940'dan bu yana üretim için arttırıcı en büyük etken olmuştur. Hızlı sürede etki etmesi ve kullanımının basit olmasıyla, en fazla pestisit kullanımı tercih edilmektedir [1]. Pestisitler çevre ve insan sağlığına olumsuz etkiler gibi sorunları da birlikte getirmektedir. Bilinçsiz ve oranının fazla kullanılmasıyla gıda ürünlerinde, toprakta, suda veya atmosferde pestisit veya transforme yapıları görülebilmektedir. Bütün çevrede tarım uygulamalarının vazgeçilmez durumu olan pestisit kullanımı tarım ürünlerinde iz bırakma hatası ve çevreye kötü bir etki oluşturması özenle dikkate alınması gereken bir konudur. Maddi anlamda düşünüldüğünde ise tüketim oranını, %31 oranında insektisit kullanımı, %26 oranında herbisit, %20 oranında da fungusit kullanımı tamamlamaktadır [2].

Pestisitler, fiziksel görünüm, şekil ve zararlı etkilerinin ve hastalıklar ile ve kendi biyolojik dönemlerine nazaran, barındırdıkları etkenin cinsine göre, zehir etkisi oranına ve uygulama biçimine göre farklı biçimlerde sınıflandırmaya girerler. En fazla tercih edilen sınıflandırma biçimi ise kullanılan zarar grupları ve yapısında bulunan etken çeşidine göre uygulanan sınıflandırma biçimleridir. Hedef olan zararlı etkenlere veya organizmalara göre yapılmış olan ise bilinen 3 pestisit sınıfı, insektisitler, fungusit ve herbisit grubudur [2, 3]. Kimyasallarla mücadele yöntemlerini uygularken kullanılan pestisitlerin yoğunluğuna bağlı olarak da toprak, su ve gıda ürünlerinde kalıntıların kalması, istenilmeyen canlıların da kötü açıdan tesir etmesi, çevre kirliliğinin çoğalması ve insan sağlığı üzerinde birçok sorunu beraberinde getirmektedir. Tüm bunlara ilaveten yabancı ot büyümesi ve hastalıkların pestisitlere karşı direnç göstermesi de yakın zamanlarda karşımıza çıkan sorunlardan biri olmuştur [4].

Yabancı ot popülasyonunun artmasıyla pestisit sınıfından etkili olan herbisitler çoğunlukla bilinçsizce kullanılmakta ve bitki yapısına ve diğer organizmalara da zarar

vermektedir. Herbisit sınıfına ait olan Penoksulam ise bitki dokularına zarar verip, sonucunda da insan sağlığı açısından zararlı bir etken oluşturmaktadır.

Penoksulam, dallı zincirli amino asitlerin (valin, lösin ve izolösin) oluşumundan sorumlu olan bir enzim olan asetolaktat sentetaz (ALS) inhibisyonu ile etki eden triazolopirimidin sülfonamidler grubuna aittir. Bu amino asitler yeni bitki dokularının sentezi için gereklidir [5]. Penoksulam bitkilerde kök büyümesini durdurup, doku sentezine zarar vererek kromozomal bozukluklara ve bitki DNA'sında hasara neden olmaktadır. Sitogenetik bitki test sistemleri sınıfından olan allium test, DNA'sına olası bir zarar vermesini mümkün kılan kimyasalın ve havalı etkenlerin seri olarak taranmasını sağlayan, toksik etkisini ve genotoksisiteyi belirlemede hassas, kolay olması nedeniyle ilgili madde için tercih edilen bir yöntemdir. Allium test Dünya Sağlık rgt ve USEPA aracılığıyla da kabul edilmiştir. Bu testte makroskobik (EC₅₀, büyüme) ve mikroskobik (c-mitoz, adezyonlar, kromozom kırılmaları gibi anomaliler) ok rahat bir şekilde değerlendirilebilmektedir. Allium testi sonuçları farklı biyosistemlerle kazançlı bir korelasyon vermektedir [6]. Genotoksisitenin tespit edilmesi ve analizlerinde tek bir hücrede meydana gelen DNA hasarının belirlenmesi için kullanılan diğer yöntem ise komet testidir. Bitkilerin kök uzunluklarına etki eden Penoksulam'ın DNA üzerinde etkilerini değerlendirebilmek ve genotoksisite oranını hesaplayabilmek için komet testi kullanımı en uygundur. *A. cepa* alışmalarımızda tercih ettiğimiz en iyi sonuç alabileceğimiz bitkilerden biridir. Bu nedenle, komet testi, *A. cepa* kök meristem hücrelerinde DNA hasarını belirlemek için kullanılmaktadır [7, 8].

Çalışmamızda Penoksulam herbisitinin *A. cepa* kök hücrelerinin meristem dokularında oluşturduğu genotoksik ve sitogenetik etkileri Allium test ve Komet testi ile araştırılmış olup *A. cepa* 'ya geçen madde miktarının tayini LC-MS/MS ile yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Pestisitler

Pestisit kelimesi ‘‘pest’’ denilen zararlı canlıları öldürmek için kullanılan madde manasına gelmektedir [9]. Pestisit, tarımsal mücadelede kullanılan çeşitli kimyasal maddeler ve zirai ürünlerdir. Genel olarak bitkilere zarar veren organizmalara mani olmak, sayılarını azaltmak veyahut olumsuz etkilerini en aza indirmek için kullanılmış olup yüksek etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir [10].

Tarımda kimyasallarla mücadele yöntemi %95'ten fazla orana sahiptir. Pestisit tercih edilmeyen zamanlarda ürün kalitesinde %60 gibi azalma gerçekleştiği bilinmektedir. Bu yüzden, mahsül eksilmesine neden olan zarar verici organizmaları kontrol etmek amacıyla birçok ülkede ve ülkemizde bitkileri korumak adına kimyasalların kullanılması olası bir sonuçtur [1]. Fakat pestisit uygulaması insan sağlığını olumsuz etkilemesi gibi çevresel sorunları da yaratmaktadır. Yüksek dozda, bilinçli olmayan bir biçimde kullanılmalarıyla gıda ürünlerinde, su, toprak gibi maddelerde pestisit etkisi kalabilmektedir [3].

2.1.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Fiziki görünüm ve şekil itibarıyla, etkilediği zararlı ve hastalık grubuyla aynı zamanda biyolojik dönem, içeriğindeki aktif maddeye, zehir etkisine ve uygulama tekniğine göre birçok şekilde pestisitler, sınıflandırılırlar. Genelde tercih edilen sınıflandırma şekli ise etki ettiği zararlı grubu ve yapılarında buldukları aktif maddeye göredir, en çok bilinen ve önemli olan pestisitler, insektisitler, fungusitler ve herbisit sınıflarıdır [11].

Çizelge 2.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması [12]

Pestisit Çeşidi	Aktif Oldukları Etkenler
İnsektisit	Böcek öldürücü grubu (karınca, böcek, tırtıl, sivrisinekler gibi)
Herbisit	Ot öldürücü (yabani ot, bitki, yosun)
Fungisit	Mantar öldürücü (bitkisel hastalık mantar grubu, diğer mantar cinsleri)
Akarisitler	Kene vs.
Rodentisit	Fare öldürücüler, kemirici öldürücü grup.
Pisisit	Balıkları öldürücü
Avisit	Kuşları öldürücü
Mollusisit	Yumuşakçaları öldürücü grup
Nematisit	Nematod, topraktaki segmentsiz kurtlar

USEPA [13]' işlev grubuna göre de pestisit sınıflandırması yapmıştır:

1. Yaprak dökücüler
2. Kurutucular
3. Dezenfektanlar
4. Kaçırıcılar
5. Çekiciler
6. Kısırlık yapan kimyasallar
7. Büyüme düzenleyicileri gibi sınıflandırmıştır.

Kimyasal formül ve yapılarına göre sınıflandırma yapmak da mümkündür:

1. N-metil karbamatlar
2. Organofosfatlar
3. Arsenikler
4. Bisdiyokarbamat grubu
5. Fenoksialifatik asitler
6. Botanik yapıda maddeler
7. Klorlu hidrokarbonlar
8. Organotinler

9. Piretrodİler
10. Mikrobiyaller
11. Fenol türevleri [12].

Pestisit grupları tarımsal veya tarımsal olmayan şekilde ikiye ayrılabilir. Ek olarak, insan sağlığı, endüstriyel, yapısal, evsel ve bahçe pestisitleri şeklinde de sınıflandırılabilir [13].

Başka bir kaynağa göre pestisit sınıflandırması şu şekildedir [14]:

1. Akarisitler veya mitisitler, akarları yok edenler,
2. Algisitler, alg türlerinin ölümüne sebebiyet verenler,
3. Çekiciler, ortadan kaldırılmasını neden olan etkiyle kuşlar, böcekler veya diğer hayvanları çekerler,
4. Kemosterilantlar, böceklerin üremesinde değişikliğe neden olurlar,
5. İnektisit, böcek karşıtı,
6. Herbisit sınıfı, yabancı ot uzamasına karşıt,
7. Defoliantlar, bitkilerin yapraklarını dkmelerine sebep olurlar,
8. Fungisitler, mantarları öldürenler,
9. Ovisitler, böcek yumurtalarına karşıt,
10. Molusisitler, yumuşakçalara karşıt,
11. İtici, kaçıncılar, hayvaları kaçıran gruplara,
12. Rodentisitler, kemirici karşıtı şeklinde isimlendirilirler.

Etki süreleri gereğince kalıcı olup olmamasına göre de sınıflandırmak mümkündür:

1. Kalıcı olmayan: 1-2 gün ila 12 hafta gibi etki gösterirler.
2. Eşit seviyede kalan: 1-18 ay gibi etki gösterebilirler.
3. Kalıcı olan grup: Birçok klorlu hidrokarbon bu gruptadır.
4. Sürekli kalıcılar: Kurşun, cıva, arsenik örnek olarak verilebilir.

Gelişim evrelerine göre etki etmesinden dolayı aşağıdaki gibi sınıflandırmak mümkündür:

1. Ovisit: Yumurtalara zarar veren türler,
2. Larvisit: Larvaları zarar veren türler,
3. Adlütisit: Erişkin böcekleri öldürenler olarak da isimlendirmek mümkündür.

Pestisitlerin fiziki yapısı, formülasyonu, uygulama tekniği, yağış, nem, sıcaklık gibi etkenler ve bitki türü, stoma yapısı, yaprak altı ve üst yüzeylerinin tüy ve mumsu yapı gibi faktörler pestisitlerin metabolizmasını ve uygulanma durumunu etkiler [15]. Ayrıca, topraktaki fiziksel ve biyokimyasal reaksiyonlar, pestisitlerin uygulama metodu ve dozu, toprak türü ve toprağın özellikleri, tarımsal işlemler, iklim koşulları, kök gelişimi, gibi faktörler toprakta pestisitlerin parçalanmasını ve bitki kökünün pestisit alımının oranını etkiler [11, 16].

2.1.1.1. İnsektisitler

İnsektisitler böceklerle mücadelede kullanılan bir pestisit çeşididir. Böceklerin larvalarına yumurtalarının oluşumuna karşı kullanılan ovisit ve larvisitleri bulundurlar. Ziraai alanda, tıp, endüstri ve günlük yaşamımızda da kullanılmaktadır. Genel olarak böceklere karşı kullanılan insektisitlerin etki şekli belirli enzimleri inhibe ederek ya da kimyasal nörotransmitterleri etkileyerek böceklerin sinir uçlarında ve sinir sisteminde hasara neden olurlar [17]. En çok tercih edilen 4 temel insektisit grubu mevcuttur. Bunlar Pyrethroidler, Organoklorinler, Organofosfatlar ve Karbamatlar olarak sınıflandırabiliriz. Birçok insektisit türü böceklerin sinir sistemine yönelik toksisitesi önemli insektisidal etkilerinden kaynaklanır.

Gelişmiş canlılarda sinir sistemi en duyarlı sistemlerden biridir [18]. Sinir hücreleri ve yardımcı hücreler sinir dokusunu oluşturur ve nöronlar aşırı derecede farklılaşmış hücrelerden oluşmuş olmasından dolayı bölünme yeteneklerini kaybetmişlerdir. Farklı sebeplerle hasara uğrayan nöron yerine başka bir hücre kabul edemez. Sinir hücrelerinin belirgin yanı canlıların tüm mekânlardan alınabilecek uyarı gruplarını alıp, hepsine yanıtlaması ve en irak konumlara dahi iletebilmesidir.

Nöronlar bunu ince sitoplazmik uzantıları ile yaparlar. Vücutta metabolik parçalanma ve mekanizmalarla birlikte etki eden insektisite karşı ve bu insektisit etkisini azaltan karşı koyma mekanizmaları da mevcuttur. Böceklerdeki sinir sistemi *Musca domestica* L.'da oluşan hemen hemen birleşen fitil gibi olmuş veya *Periplaneta americana* L.'daki gibi segmentlerden oluşabilen ventral ganglion sarmallarından meydana gelmiştir [19].

İnsektisitlerin fosfor gruplarının organik türlerinin etki mekanizmaları fosfor atomuna bağ yapan kimyasal yapısının farklılıklarına oranla değişiyor olsa da asetilkolin esteraz enzimi üzerinde etkilidirler. Böylece böceklerde sinir sisteminde asetilkolin esteraz (AChE) enzimini inhibe ederek etkinliğini susturmaktadır. Bunun sonucunda sinir uçlarında asetilkolin (AChE) birikmesiyle birlikte sinirsel iletimin geri dönüşümsüz şekilde susturulmasına ve ölüme kadar gitmektedir [20]. Calabar fasulyesinden 1865 senesinde izolesi yapılan ve 1935 senesinde de pestisit türü olarak karbamatlı insektisitler tercih edilmiştir [21]. Organik fosfor yapıdaki insektisitler gibi asetilkolin esterazı inhibe ederek sinirsel iletimi durdururlar. Değişik allosterik yapıda eşlenen ve birçok nörotoksinler için bağlanım bölgelerini meydana getiren reseptörler belirli nörotoksinlerin böcek-sodyum kanallarında affinitesine sebebiyet vermiştir. Bunlar böcek-sodyum kanalları, omurgalılarda sodyum kanallarına göre daha çok dirençli olan nörotoksik etkili birtakım insektisitlere oranla bi nebze kadar hassaslaştırmaktadır [22, 23].

2.1.1.2. Fungusitler

Mantar ve mantar sporlarının ve durdurulup kontrol edilmesine ve öldürülmesinde kullanılan kimyasallara fungusit adı verilir. Fungusitler tarımda verim kaybını önlemek için kullanılırlar çünkü mantarlar mahsulün verimini yüksek miktarda azaltabilirler [24]. Bakır oksiklorür, bakır sülfat ve tebuconazole en çok tercih edilen fungusitler arasında bulunmaktadır.

Bunlar bazı tarlalarda *Coryneum beijerinckii*, *Phyophthora infentans*, *Mycosphaerella* sp., *Alternaria solani*, *Erysiphe graminis*, *Tilletia* sp. ve *Ustilago muda* gibi zararlı organizmalar için tercih edilmektedir [25].

2.1.1.3. Herbisitler

Herbisitler bitki, yabancı ot büyümesi, çalı gibi etkenlerin engellenmesinde kullanılan pestisit grubudur. Günümüzde kullanılan herbisitlerin birçoğu organik maddelerden oluşmuştur. İçerisinde C, H₂ ve O₂ atomlarından oluşmaktadır. Karbon sırasına göre de halka ya da zincir şeklinde sıralanırlar [26]. Herbisitler uygulanmaları sırasında oluşan drift ile hedef dışı bitkilere zararlı olmalarıyla beraber toprak içerisine ya da direkt bitki üzerine, farklı şekillerde toprak içerisine karışmalarıyla fazla süreçte bulunarak ekim nöbeti bitkilerinde büyük kayıplara sebep olmaktadır. Uygulama anında değişime uğrama olasılıkları oldukça yüksektir. Herbisit veya herbisit dönüşümlerinin toprakta bulunan miktarını azaltan birçok faktör mevcuttur. Ana sebepler buharlaşma, ışıpta bozunma, parçalanma veya kimyasal değişime uğrama, adsorpsiyon gibi durumlardır. Herbisitler kimyasal yapılarına göre Çizelge 2.2' deki gibi sınıflandırılmıştır [27].

Çizelge 2.2. Herbisitlerin Sınıflandırılması [27]

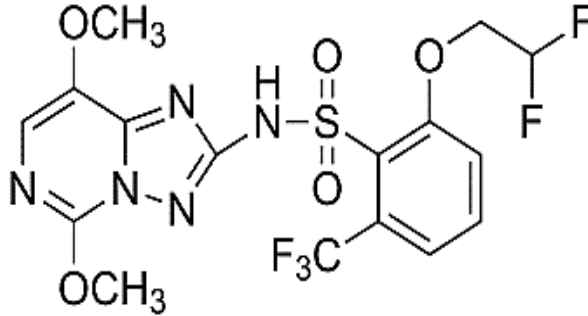
Fenoksi bileşikleri	Anilinler	Diazinler	İmidazolinonlar
Karbomatlar	Amid ve anilidler	Triazinler	Triazoller
Üre bileşikleri	Benzoik asitler	Benzonitriller	Oxadiazoller
Sülfonil üreler	Picolinic asitler	Sikloheksanlar	Aminofosfanotlar

2.2. Penoksulam

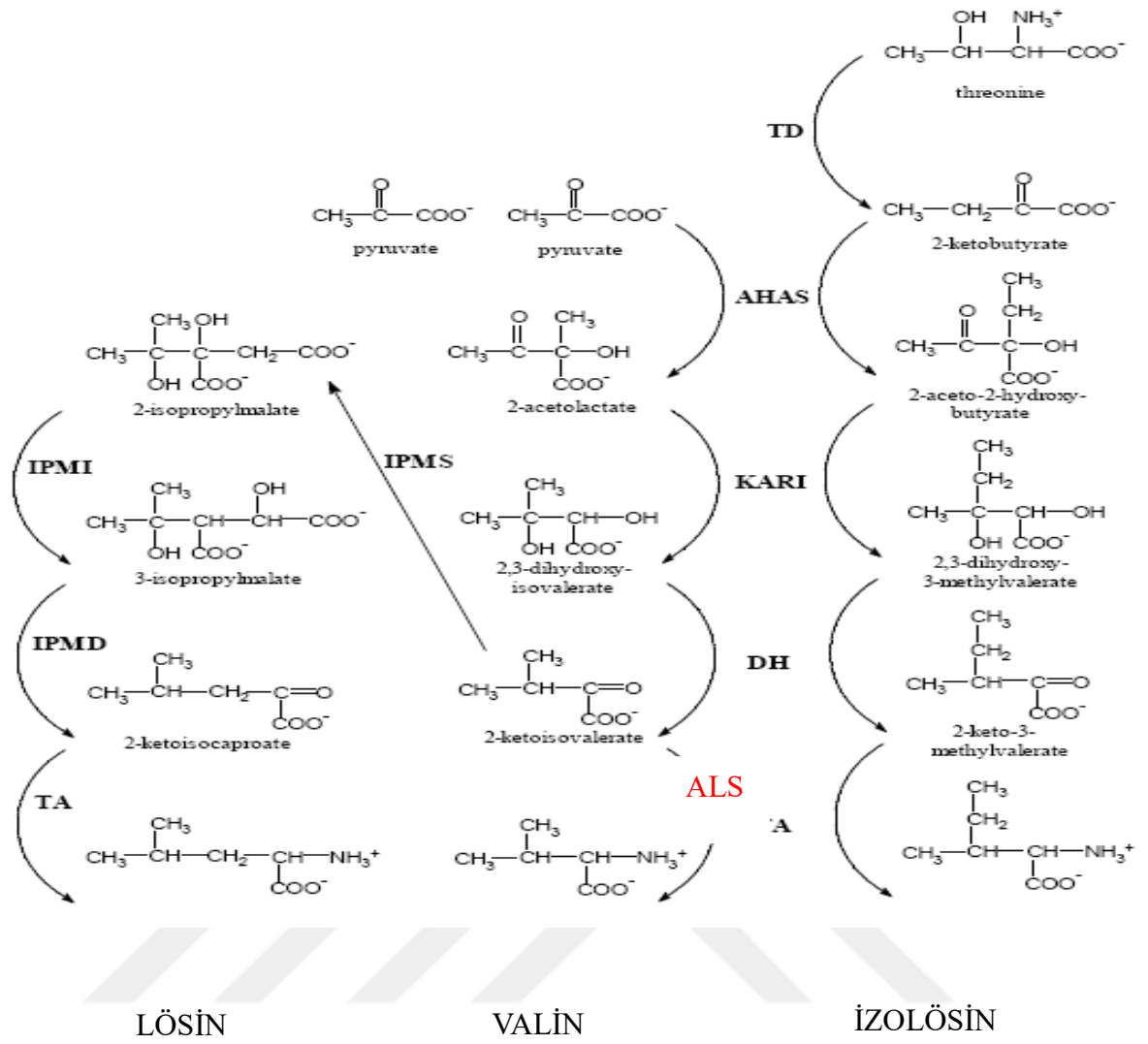
Herbisitlerin kullanımı hastalık oluşumu, yabancı ot büyümesine engel olan birçok zirai mücadele uygulamaları içerisinde kullanılan ve kimyasal mücadele bugün de geçerliliğini koruyan bir yöntemdir [5]. Penoksulam herbisiti, pirinç tarlalarında, yıllık çimlen, geniş yapraklı yabancı otların kontrolü için kullanılan, ekim veya doğrudan kuru ya da tohumlama yöntemleriyle yetiştirilen bitkilerin kontrolünde kullanılan bir herbisittir. Penoksulam, hem karasal hem de sucül uygulama alanları için kullanılan geniş spektrumlu, sistemik herbisit ürünlerindeki aktif bileşendir [5, 28]. Penoksulam'ın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizege 2.2' de belirtilmiştir.

UPAC isimlendirilmesine göre Penoksulam adı aşağıda verilmiş olup, moleküler ağırlığı 483,37 g/mol, suda çözünürlük oranı pH derişimine göre farklılık göstermektedir. Örneğin pH 5'te 5,7 mg/L, pH 7' de 408 mg/L, pH 9' da 1460 mg/L çözünebilmektedir.

Çizelge 2.3. Penoksulam'ın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri [28]

Kimyasal Adı	Penoksulam
UPAC İsimlendirme	-(2,2- difluoroethoxy)-N-(5,8-dimethoxy-[1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-2-yl)-6-(trifluoromethyl) benzenesulfonamide
Kimyasal Yapı	
Moleküler Ağırlık	483,37 g/mol
Suda Çözünürlük	pH5'te 5,7 mg/L, pH7'de 408 mg/L, pH9' da 1460 mg/L

Penoksulam, yapraklar, sürgünler ve kökler yoluyla emilir ve meristematik dokulara aktarılır. Penoksulam hücre bölünmesinin durmasına neden olmakla birlikte yavaş etkili bir herbisit olarak kabul edilir çünkü hedeflenen bitkilerin tamamen öldürülmesi için temas sürelerine ve büyüme koşullarına bağlı olarak etkinliği 60 ila 120 gün sürebilir. Soğuk hava veya bitki büyümesini etkileyen diğer koşullar, eğer bitkilerin büyüme hızını düşürürse, bitkiye etkisi değişebilmektedir [29, 30]. Penoksulam için tanımlanmış 11 ana bozunma ürünü vardır, bunlardan altısı toksik olarak kabul edilir. Bununla birlikte, metabolitlerin veya bozulmaların hiçbiri, ana bileşikten (Penoksulam) daha yüksek bir potansiyel toksisiteye sahip olarak tanımlanmamıştır. Sucul ve karasal bitkilerin kontrolünde Penoksulam uygulamaları letal doza uygun şekilde kullanılmaması sonucunda nesli tükenmekte olan bazı bitkilere zarar verebilme ihtimalini artırır [28, 31].



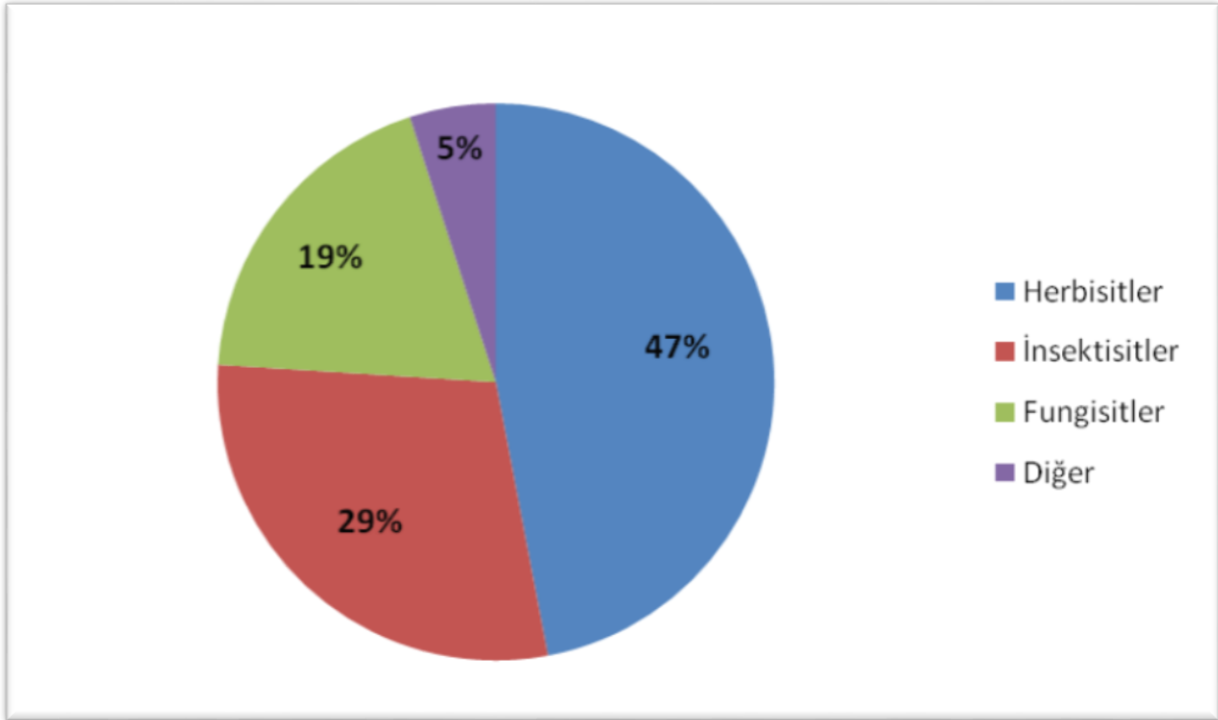
Şekil 2.2. Lösin, valin ve izölösün amino asitlerinin biosentez yolu [26].

Penoksulam, hücre bölünmesinin durdurulmasını ve bitkilerde büyümenin kontrol edilmesinde rol oynayan Asetolaktat Sentaz (ALS) enzimini inhibe eden bir herbisitir. Bu amino asitler ise yeni bitki dokularının sentezi için gereklidir ve Penoksulam DNA sentezini durdurarak bitkiyi öldürebilmektedir [5, 32, 33].

2.3. Dünyada ve Türkiye’ de Pestisit Kullanımı

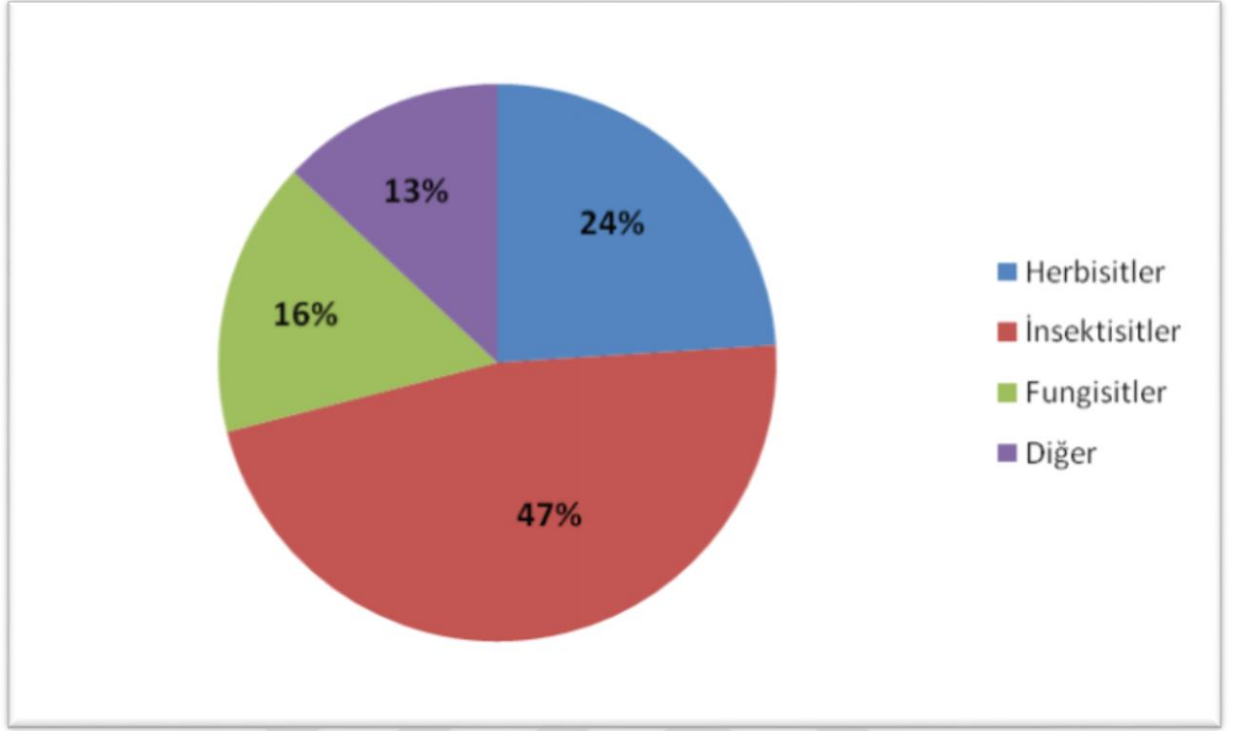
Tarım ürünlerini korumada, pestisitlerin çevreye zarar vermeyecek seviyede ve gerekli miktarda kullanılması gerektiği özümsemiştir. Bununla ilgili ilk etapta Amerika ve diğer gelişen milletlerde “minimal tehlike” veyahut “doğa dostu” pestisitler isimlerinde toplanılmıştır. Örnek olarak Amerika Çevreyi Koruma Ajansı (EPA), bu gibi pestisit

gruplarının ruhsatlandırılmasını yapmış ve uygulamada kullanımını teşvik etmiştir [34]. Öte yandan pestisit kullanılmadan bitki yetiştiriminin çok zor olduğu gelişmiş ülkelere bilinmesiyle pestisit kullanımının artmasının tarımda verim kalitesinde artış olmayacağı anlaşılmıştır. Öte yandan, maliyetleri arttırmamak adına gereksiz ilaçlamalardan kaçınılmaya başlanmıştır. Bu tarz kullanımlarda sivil toplum kuruluşlarının ve tüketici şikâyetleri de görülmüştür. Örnek olarak, Avrupa ülkeleri fungusit uygulamasını patates bitkisinde %30 ve elmada %20 azaltılmasına karşın verim kalitesinde azalma tespit edilmemiştir [35]. Şekil 2.3' de dünyada pestisit olarak tarım ilacı kullanımı oranları gösterilmiştir [36].



Şekil 2.3. Dünyada pestisit olarak tarım ilacı kullanımı oranları [36]

Dünya çapında tarım için ilaç üretimi 3 milyon ton olarak bilinmektedir. Dünyadaki pestisit satışlarında tonaj şeklinde yıl içerisinde %1 oranında bir artış beklenilmektedir [2]. Tarımda kullanılan ilaçlar arasında %47 oranında herbisitler bulunmaktadır. Herbisitleri takiben %29 ile inektisitler, %19 fungusitler kapsamaktadır %70 olarak da herbisit ve inektisit kullanıldığı tespit edilmiş, farklı pestisit gruplarınsa %5 gibi bir orana sahip olduğu belirlenmiştir.



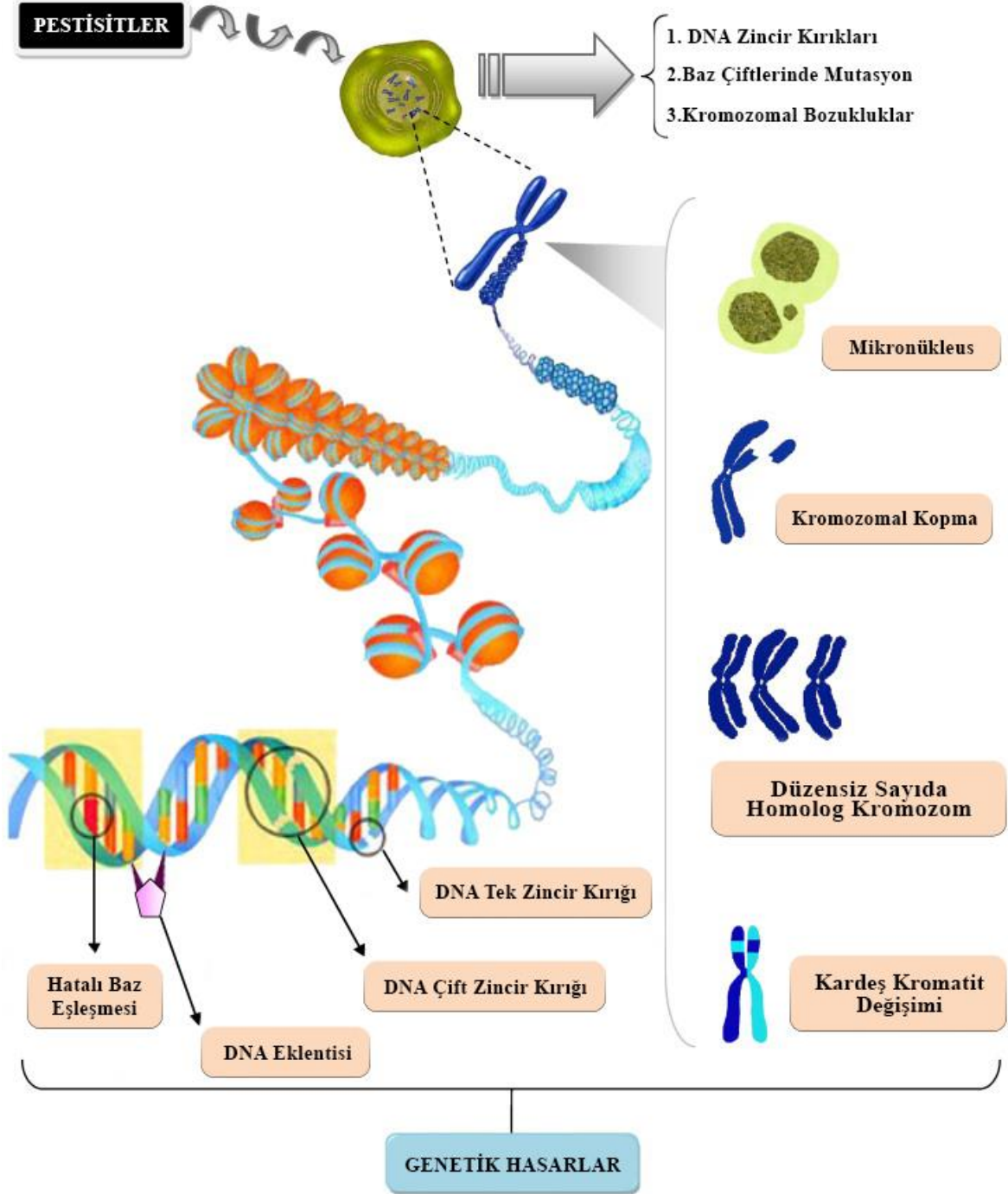
Şekil 2.4. Türkiyedeki pestisit kullanımı dağılımı [36]

Türkiye’de tüketilen tarım ilacı miktarı hemen hemen 33,000 ton kadardır. Şekil 2.4’de gösterildiği gibi %47’liğini insektisit grubu, %24’lüğünü herbisit grubu, %16’lığını fungusit grubu, %13’ ünü de diğer gruplar meydana getirmektedir [36].

2.4. Pestisit Toksisitesi

Toksikoloji kimyasalların kimyasalların biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini ölçen bilim dalıdır. Kimyasal pestisitler birçok farklı toksikolojik teste tabi tutulurlar. Pestisitlerin insanlar üzerindeki toksik etkileri tolere edilemez, uygulamalarda zararsız doz ve toksik dozlar iyi bilinmeli ve uygulamalarda dikkat edilmelidir. Ülkemizde farklı nedenlerde pestisitlerle zehirlenmelerin ve toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Zehirlenme vakalarının pestisit zehirlenmelerinin halk sağlığı açısından dikkat edilmesi, gerekli önlemlerin ve uyarıların yapılması zorunluluğu büyük önem teşkil etmektedir. Ortaya çıkan vakalarda sonuç genellikle tedavi edilebilir boyutlarda olsa da bu vakaların bir

kısmında pestisitler toksik etkilerinden dolayı ölümlere kadar neden olabilmektedir [37, 38]. Şekil 2.5' de pestisit toksisitesi gösterilmiştir [39].



Şekil 2.5. Pestisit Toksisitesi [39]

Toksik etkilerinden dolayı pestisitlerle zehirlenme durumu henüz ülkemiz için önemli bir halk sağlığı problemidir. Ancak zehirlenme şüphesinde, öncelikle ilgililer tarafından klinik bulgular ile epidemiyolojik verilerin iyi değerlendirildikten sonra numunelerin elde edilen bilgilerle birlikte laboratuvarlara yönlendirilmesi daha doğru olacak ve kullanımlarında letal doza uygun hareket edilmesi gerektiği önem arz etmektedir.



3. GENEL BİLGİLER

3.1. Mitoz Bölünme

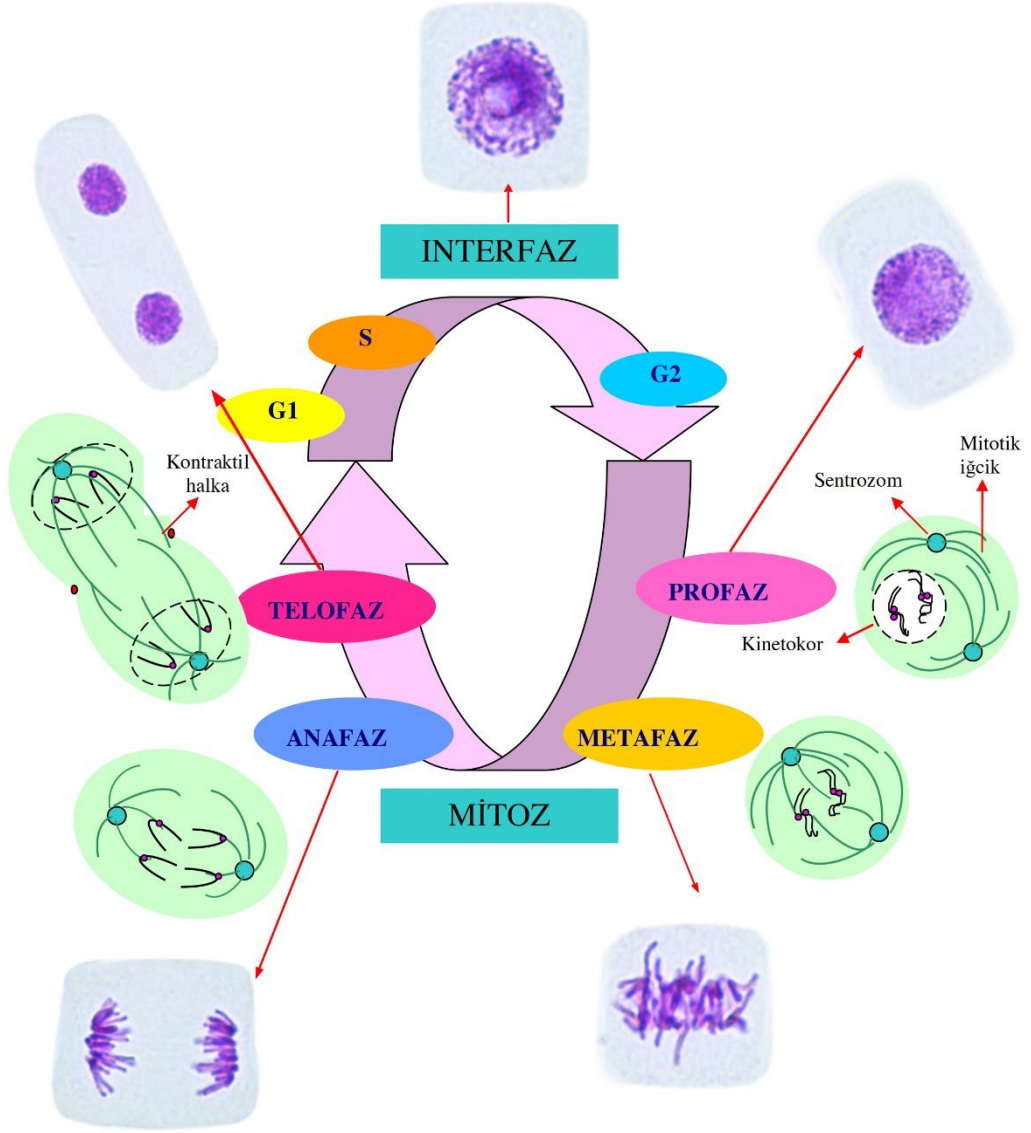
Hücrelerin kendi kopyalarını oluşturması ve çoğaltmasının en temel aşaması hücrenin genetik materyalinin kopyalanmasıdır. Mitoz; çekirdeğin bölünmesidir ve bunu takiben hücrenin bölünmesiyle (sitokinez) yavru hücreler oluşturmasıdır. Mitotik safha ve sitoplazma bölünmesi yaklaşık bir saatik süreci bulmaktadır. Hücre döngüsünün yaklaşık %95'lik kısmı interfazda geçer. Bu fazda kromozomlar gevşek haldedir ve çekirdek içerisinde dağınık bir durumdadırlar. Çekirdeğin yapısı morfolojik anlamda değişiklik oluşturmamasıyla aynı zamanda moleküler anlamda interfazda hücreler büyümeye devam eder ve DNA'sı kopyalanmaya başlar. Bölünen hücrelerin çoğunluğu bu dönemde hücre boyutunu neredeyse 2 katına çıkartır [40]. Mitoz bölünmede kromozom yapısı kondansasyon formunda olurlar. Çekirdeğin zarf yapısı bozulur, hücrenin iskeleti mitotik iğsi cisimcik oluşturmak için düzenli olur ve kromozomlar zıt kutuplara hareket ederler. Kromozomların ayrılmasını, hücre bölünmesi yani sitokinez izler. Mitozda temel olarak kromozomlar kondanse olur, mitotik iğsi iplikcikler oluşur ve bu iplikciklerin mikrotübüllerine kromozomlar tutunurlar [41].

Hücre Siklusu ve İnterfaz

Bölünmeyi sürekli gerçekleştiren hücrelerde mitoz bölünme sonrasında dönem interfaz ve mitoz olarak tamamlanıp tekrara girer. Bu döngünün geçtiği zaman diliminde hücrenin uyarımı ve büyümesi görülmekte ya da bölünmek için sinyal alınmadığı süreçlerde dinlenme fazı G_0 'da beklemektedir [42- 47]. İnterfaz aşamaları döngüyü %90 oranında kapsayarak ve 16 saat ile 24 saat arasında sürebilir [47, 48]. Hücre döngüsünde bir aşama bitirilmeden diğer aşamaya gidilirse genetik materyaller eksiksiz ve doğru kopyalanmadığı için hücrelerde hasar oluşabilmektedir.

Hücre döngüsünde G_1 -S arasında, G_2 -M arasında ve metafazdan geçiş safhası arasında kontrol noktaları bulunmaktadır, bunlar hücre döngüsünün tekrar edilip edilmeyeceği seçilir. Toksik maddeler ya da radyasyon gören hücrelerin DNA'larında görülen hasar hücre döngüsü kontrol noktaları G_1 den S fazına veya G_2 'den mitoz geçişi baskılar. DNA'da oluşan hasarlar DNA sentezinin inhibisyonuna neden olur. Hücrelerin bazılarında DNA ipliği replikasyona uğramamış ise mitoz geçiş kinaz komplekslerinin inaktivasyonu ile baskılanabilir [47, 48]. Resim 3.1' de mitoz bölünme evreleri gösterilmiştir [49].





Resim 3.1. Mitoz Bölünme Evreleri [49]

Profaz

Profaz, nükleer zarın dağılmasıyla başlar. Çok küçük veziküller halini almış zar keseleri parçalanıp dağılırlar. Mitoz evresince içcik çevresinde kalır ve nükleer zarın dağılmasıyla içciği oluşturan mikrotübüller nükleusun bulunduğu bölgeye uzanırlar. Profazda kondansasyon meydana gelir [50]. Profazda her bir sentromer üzerinde her bir kromatidin sentromer bölgesine bir tane denk gelecek şekilde birbirine zıt yönde 2 kinetokor oluşur. Kinetokorlar metafazda kutuplardan kromozomlara uzanan kinetokor fibrillerinin kromozomlara tutundukları yerdir [51]. Profazı takiben hücre prometafaza girer. Profaz ve metafaz arası bir geçiş dönemidir. Bu dönemde içsi iplikciğin mikrotübülleri kinetokorlara temas eder. Kardeş kromatid kinetokorları kromozomun zıt kutuplarına yönlendirilirler, böylece içsi iplikciğin zıt kutuplarından çıkacak şekilde mikrotübüle temas ederler [40].

Metafaz

Metafaz evresinde kromozomlar iki kutuba da eşit uzaklıkta olacak şekilde içsi iplikcikte sıralanırlar. Bu durum kromozomları iten ve çeken güçlerin varlığı sayesinde gerçekleşir. Bu güçlerin nereden kaynaklandığı henüz bilinmemektedir. Bir kromozomu metafazda tutan kinetokor fibrillerden birisi kesilirse kromozom tam olarak yani kromatidler ayrılmadan kinetokor fibrili ile o yöndeki kutuba doğru çekilir. Eğer iki kromatid arasındaki birleşme noktası koparılsa, her 2 kromatid birbirinden ayrılır. Aynı anafazda olduğu gibi bağlı buldukları kutuplara doğru hareket ederler. Eğer bir kromozom bir kutba doğru itilirse, karşıt güç aniden artar ve kromozomu metafaz plağına çeker ve orada kalmasını sağlar [40, 52, 53].

Anafaz

Kardeş kromatidler arasındaki bağın kopmasıyla metafazdan anafaza geçiş olur. Anafazda 2 olay meydana gelir. Anafazda kinetokor mikrotübülleri kısalır, kromozomlar kutuplara doğru gider, polar mikrotübüller uzar, böylelikle iç yapısının 2 kutup noktası birbirlerinden iyice uzaklaşırlar [52, 53].

Telofaz

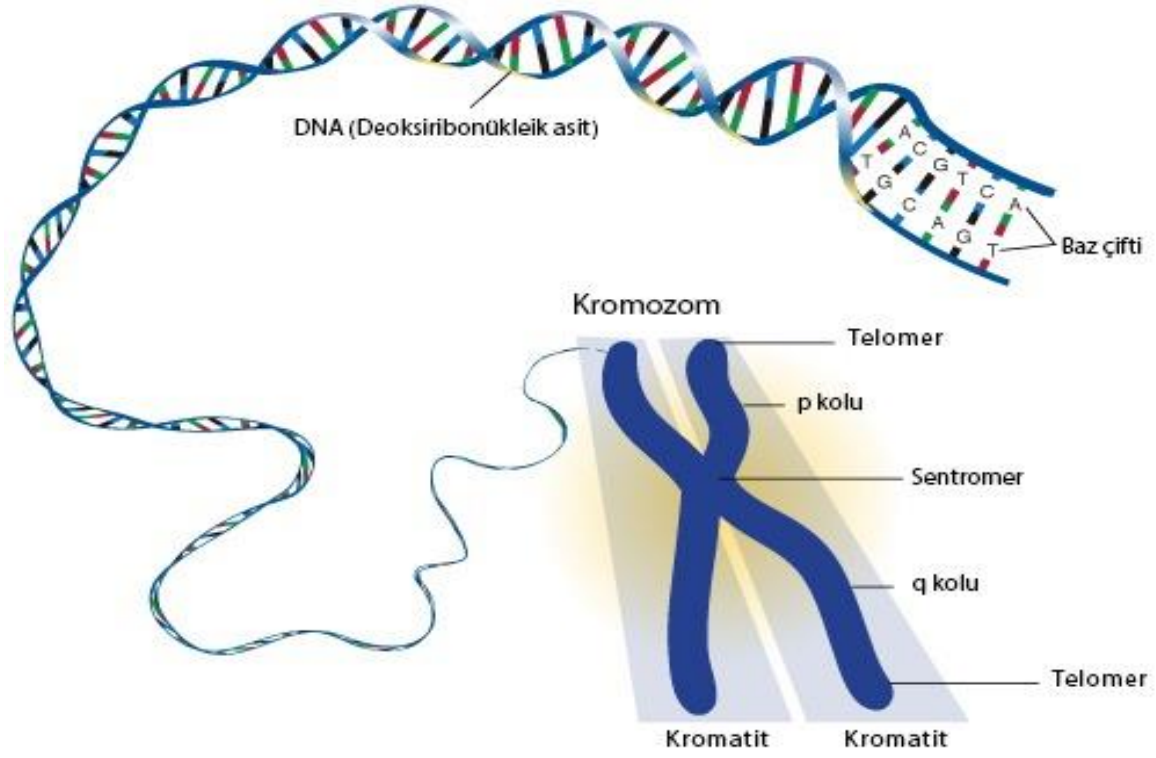
Telofazda kromatid yapıları kutuplara doğru gider ve kinetokor mikrotübülleri görünmez yapıya gelir. Polar mikrotübül yapılar uzamaya devam eder. Yeni çekirdek zarfı oluşur. Çekirdek tekrar şekil alır ve kromozomlar dekondanse olur. Yoğunlaşmış kromatinler yaygınlaşır ve mitoz sonlanır [40].

Sitokinez

Mitozun bitimi, 2 yavru hücre oluşumu olan sitoplazma bölünmesi ile gerçekleşir. Süreci geç ola anafazda başlar ve MPF inaktivasyonu ile tetiklenebilir. Çekirdek ve sitoplazma bölünmesini organize eder. Kontraktıl halka adı verilen ve plazma membranının altında oluşan aktin ve miyozin II filamentlerinin yapısıyla sitoplazmik bölünme gelişir [54].

3.2. Kromozom Yapısı

Vücudumuzda bulunan hücre sayısı trilyonlardadır ve 200 kadar fazla hücre çeşidi bulunmaktadır. Birbirlerine benzeyen hücre grupları birleşerek, kıkırdak, sinir, kan, kas, gibi yapıları oluştururlar. Hücre çekirdeğinde bulunan DNA (deoksiribonükleik asit), organizmaların büyümeleri, gelişmeleri ve işlevlerini yapabilmeleri için gereken bilgilerin depolanmasını sağlar. DNA içerisinde 6,4– 6,6 milyar baz çifti bulunur, fakat bu miktarın %1,5'i kodlanmış dizilerden meydana gelmektedir. DNA içerisindeki hücrelerin işlevleri yerine getirmesi ve düzenlemesi için gerekli genetik bilgileri taşıyan dizilere gen denir. Bu genlerden hemen hemen 20,000' i protein kodlama özelliğine sahiptir [55- 57]. Yaklaşık 2 metre uzunluğunda olan DNA, proteinlerle birlikte paketlenerek kromatin adı verilen yapıyı oluşturmaktadır. Bu kromatinlerin hücre bölünmesi esnasında kısalıp kalınlaşarak yoğunlaştığı halineyse kromozom denir. Kromozomlar, iki kol olarak kısa ve uzun, onları birbirlerine bağlayabilen sentromer yapılarından oluşurlar. Kromozomlardaki bu kolların uç kısımlarındaysa telomer yapıları bulunmaktadır [55- 58]. Resim 3.2' de kromozom yapısı gösterilmiştir.



Resim 3.2. Kromozom yapısı [58]

3.3. Kromozom Mutasyonları

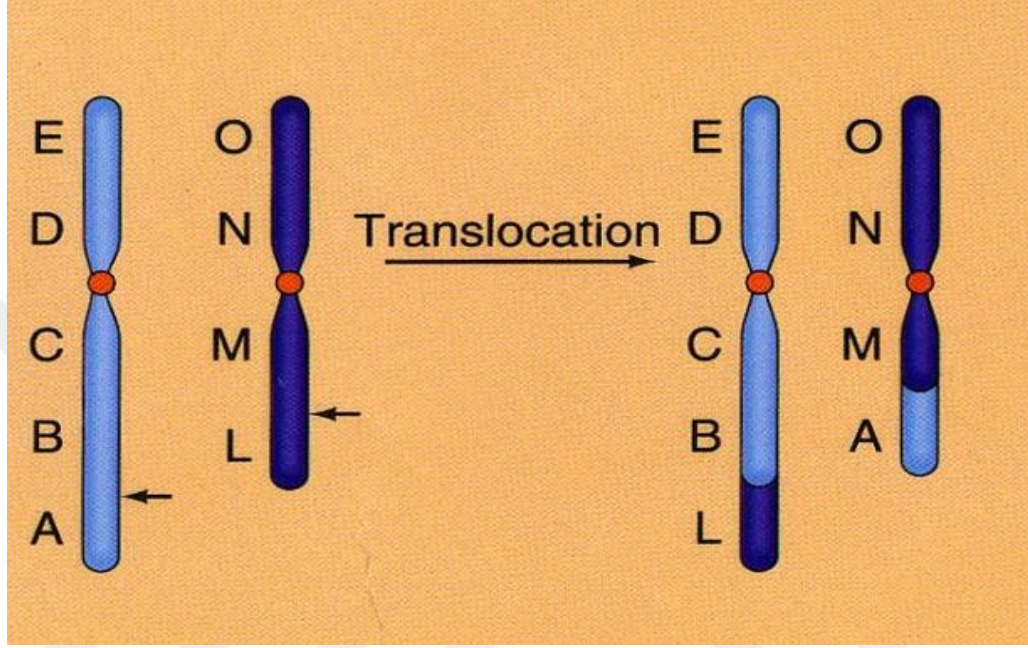
DNA daki nükleotid değişiklikleri veya yeniden düzenlenimler fenotipi etkiliyor ise, mutasyon olarak adlandırılır. Kromozomal bozukluklar, sayısal ve yapısal mutasyonlar ya da belirteç kromozom gibi tüm hepsinin beraber olduğu yapılar bulunmaktadır. Kromozom mutasyonları iki ana grup altında incelenir. Hücredeki kromozom sayılarında meydana gelen değişiklikler genom mutasyonları, kromozom yapısında meydana gelen değişiklikler kromozom mutasyonları, DNA'nın yapısındaki nükleotidlerde meydana gelen değişiklikler gen mutasyonları olarak adlandırılır [59, 60].

3.3.1. Yapısal Kromozom Mutasyonları

Yapısal kromozom mutasyonları, temelde kromozomların kırılıp normal olmayan şekilde birdaha aynı kromozom üzerine gelmelerinden kaynaklanabilmektedir. Yapısal kromozom

mutasyonları, translokasyon, inversiyon, delesyon, duplikasyon, izo kromozom yapısı, insersiyon gibi alt gruplara ayrılmaktadır [55- 57, 60].

Translokasyon



Resim 3.3. Translokasyon [56]

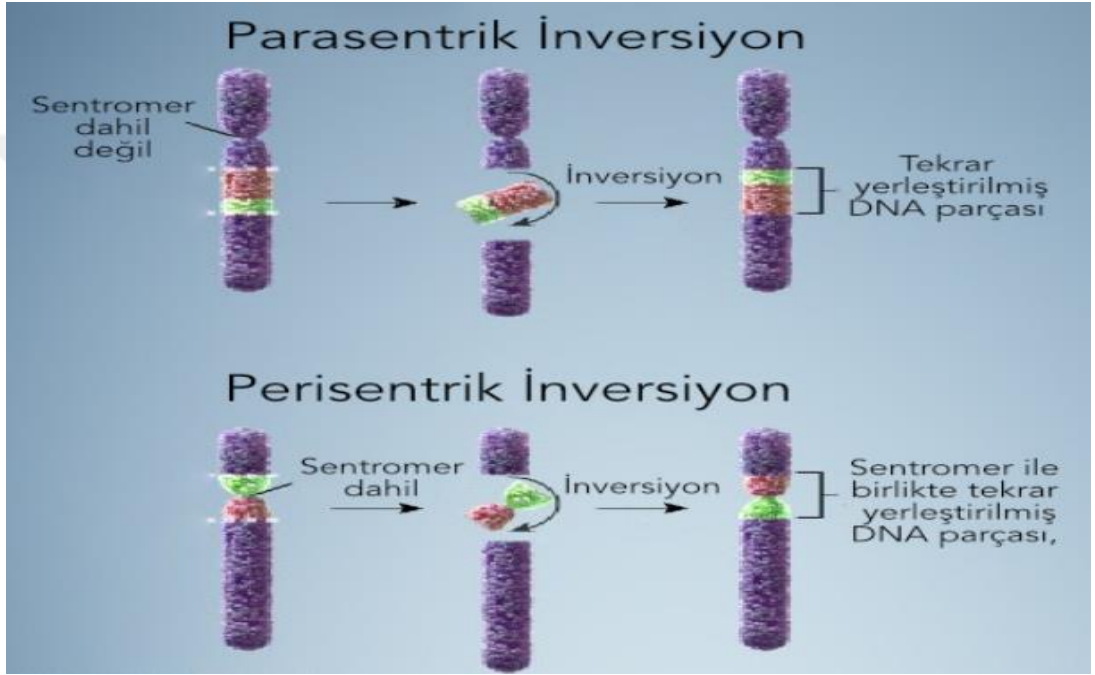
Translokasyonlar, kromozom yapısının diğer kromozomlar arasında değiştirilmesine denir. Resim 3.3' de translokasyon şekilleri gösterilmiştir. İki farklı translokasyon çeşidi bilinmektedir;

1. Resiprokal translokasyon: Kromozomlarda kırılmalar nedeniyle kromozom materyalinin karşılıklı değiş tokuşuna denir. Bu değişimler genel olarak kromozom materyal kaybı olmamasından dolayı dengeli translokasyon olarak kabul edilir.

2. Robertsonian translokasyon: 2 akrosentrik kromozomun (13, 14, 15, 21 ve 22) sentromerlerinden veya sentromerine yakında olan bölgesinden kırıldıktan sonra birbiriyle birleşme durumuna denir.

İnversiyonlar

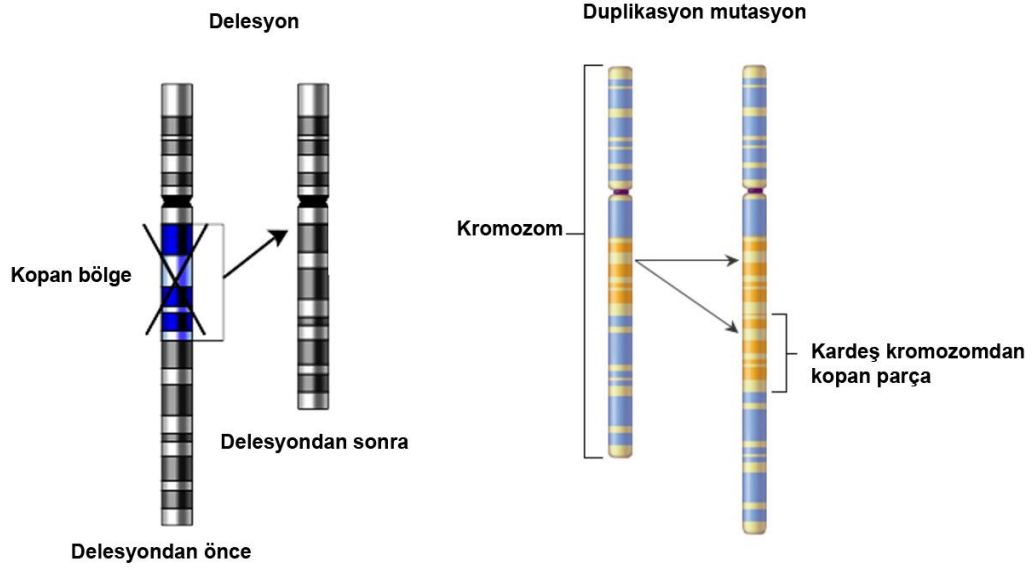
Bir kromozomun iki farklı bölgesinden kırılmasıyla, kırılmış olan parçanın 180 derece dönüp tekrar kromozoma yapışmasıyla oluşan kromozom bozukluğuna inversiyon denir. Ters dönen yapı kromozomda tek bir kolda oluyorsa parasentrik inversiyon, diğer kırılmalar sentromerin iki yan tarafında oluyorsa da perisentrik inversiyon denir. Resim 3.4’ de inversiyonlar gösterilmiştir.



Resim 3.4. İversiyon [56]

Delesyon ve Duplikasyon

Kromozomda belirli olmayan bir kısmın eksilmesine delesyon, fazla bir kopyasının bulunmasınaysa duplikasyon adı verilmektedir. Resim 3.5’ de delesyon ve duplikasyon gösterilmiştir [56].



Resim 3.5. Delesyon ve Duplikasyon [62]

3.3.2. Sayısal Kromozom Mutasyonları

Öploidi

Normalde hücre sayısı diploid ($2n=46$ kromozom) yapısındadırlar. 23 (n) kromozomun katlar şekline bulunması sayısal kromozm bozukl olarak öploidi adı verilir. Kromozomlar, haploid (n), iki katı diploid ($2n$), üç katı triploid ($3n$), dört katı ise tetraploid ($4n$) olarak isimlendirilebilir. İki (n) katından çok fazla n kromozomun katları oluşmasına poliploidi denir. Triploidi ($3n=69$), bir ovumun genel olarak iki farklı spermle fertilize edilmesinden oluşurlar. Tetraploidi ($4n=92$) hücre yapısında artış olmadan nükleer bölünmeyle görülebilmektedir [55, 56]. Tüm bunların sonucu olarak da kromozom sayısı farklı bölünmelerde katı şeklinde artmış olarak bulunur [63].

Anöploidi

Kromozomlarda “n” katı şeklinde olmadan, oran olarak az ya da fazla kromozom bulundurmasına anöploidi denir. Anöploidi yapısının hücre bölünmesi anında homolog

kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) veya ‘anafazda geri kalma’ sebebiyle meydana geldiği düşünülmektedir [56]. Bir kromozom artışına ‘trizomi’, tek bir kromozomun eksikliğine ise ‘monozomi’ adı verilmektedir.

3.4. Allium Testi

Allium testi toksisite testleri içerisinde bitkiler kullanılarak çevresel etkilerin belirlenmesinde kullanılan bir testtir. Toksisite testlerinde bitki tercih edilmesinin en önemli nedenleri, bitkinin transferi, depolanabilmesi ve kullanımının kolaylığı ve genel olarak incelenmesi kolay kromozom yapısında olmasıdır. Buna ek olarak kökleri, toprak ile suyun içerisine girebilen kimyasalların formlardan etkilenen ilk organizmalar olduğundan biyolojik test sistemlerinde birçok açıdan yararlı materyal gruplarıdır [64].

1938’de Levan [65] ilk olarak Allium testi kullanmış ve kimyasal maddelerin oluşturduğu biyolojik sonuçlarını tespit etmiş ve hala günümüzde de uygulamaya devam edilmiştir [6, 8, 66, 67]. Avantajlı bir test sistemi olmasının nedenleri, tekrarlanabilen, hassas, rahat ve seri oluşu gibi birden fazla etken mevcuttur. Aynı zamanda farklı testlerle güçlü bir korelasyon gösterebilmektedir. Makroskobik sonuçlar ve mikroskobik sonuçlar ile ilgili yorum yapılabilir ve iki parametre arasında ilişkiler olduğu saptanılır. Makroskopik sonuçlar (kök uzamasını engellediği) büyümenin durdurulmasıyla sonuçlanacağı düşünülen herhangi bir direkt ve indirekt zararlı etkenin oluşuyla ilgili bilgilendirirken, mikroskopik sonuçlarsa kromozom hasarlarının ve hücre bölünmesi esnasında meydana gelen bozuklukların tespitinde önemli rol oynar. Bu şekilde toksik etkinin varlığı, etkisinin sonucu ve işlevi hakkında bilgi verir. Allium testi geniş bir kullanım alanına sahip olmakla birlikte toksik nedenlerin ve çevresel kimyasal gruplarının analiz edilmesinde önemlidir [68].

En çok tercih edilen test yöntemlerinden *Allium* test, çevreye zarar veren etkenlerin toksik ve genotoksik etkilerini büyümeyi engelleme testiyle kök uçlarında belirleyici dozu bulduktan sonra hücre siklusu rol alınarak farklı uygulamaya süreleriyle beraber mitotik indeks, mitotik faz, bozukluklar, mikronükleus oluşumu ve kromozom hasarlarını tespit etmektedir. Mitotik indeks frekansının kontrol grubuna oranla %22 oranından az olmasına letal etki %50 oranından az olmasınaysa subletal etki şeklinde belirlenmekte ve tüm sonuçlar sitotoksik sınır frekanslarını oluşturmaktadır [69].

3.5. Komet Testi

Yakın geçmişte “Single Cell Gel Electrophoresis” (SCGE) tekniği diğer bir isimle Komet testi DNA zincir kırıkları için, hızlı, dikkat edilmesi gereken ve pahalı olmayan bir test yöntemidir. Bu teknik “Comet Assay” veyahut “Microgel Electrophoretic Technique” şeklinde de isimlendirilmektedir. DNA tek zincir kırıklarının insan hücrelerindeki ilk tespiti Rydenberg ve Johanson ile tespit edilmiştir. DNA'nın ayrılması için düşük alkali ortamda lam üzerine agaroz jel içerisinde gömülen hücreleri “lize” ederek hücreler proteinlerinden ayrılmıştır. Sonrasında nötralize işlemiyle akrinin oranj boyasıyla DNA boyanmış ve kırmızı flörosan ışığa yeşil ışığın oranı hesaplanılmıştır. Kırmızı ışık tek zinciri, yeşil ışık çift zinciri belirtmiştir. Yalnız test sistemi çok fazla kullanılamamıştır [70]. 1984 senesinde Ostling ve Johanson transforme ederek hücre içerisinde DNA hasarının ilk etapta yok edilmesinde “Microgel Electrophoretic Technique” şeklinde bildirilmiştir. Ostling ve Johanson agaroz jel ile süspansiyona bırakılan ve radyasyon altında bulunan hücreleri lamın üstüne yayıp, yoğun tuz ve deterjan çözeltisiyle lizince ve arkasından elektroforeze bıraktığı süreç sonrası akrinin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boya ile boyamışlardır [71].

DNA zincirlerinde kırıklar var ve kırılan DNA parçaları ile elektriksel yük almış olan DNA, çekirdek yönünden anot yönüne göç ederek kuyruklu yıldız görüntüleri oluşturmuş, böylece hasar gören hücreler komet olarak isimlendirilmiştir. DNA'da meydana gelen hasarı tespit etmek adına oluşan kuyruğun uzunluğu hesaplanıp ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun etkisi olduğu belirlenmiştir [72]. Fakat DNA çift zincir kırıklarının tespiti için nötral şartlar, tek zincir kırıklarının belirlenmesinde yeterli olamamıştır.

Fakat DNA'da hasar meydana getiren birçok ajan DNA çift zincirindeki hasara oranla DNA tek zincirinde hasar meydana getirmektedir. Bununla birlikte nötral şartlarda proteinler tamamen ayrılamamıştır [73]. O yüzden Singh ve ark. (1988) [75] alkaline komet metodunu ortaya çıkarmışlardır.

Böylelikle “tek zincir kırıkları” adı verilen ve yalnızca alkali şartlarda tespit edilebilen DNA tek zincir kırıklarını tanımlama şansı olmuştur. Tercih edilen yoğun lizis şartları proteinleri %95 oranından çoğunu ayırabilmekte, böylece SCGE yönteminin yeni oluşumu bireylerde hücrelerinin birçoğunda DNA hasar derecesini direkt olarak tespitini olanak vermektedir [73- 75]. DNA fragmentleri, üzerlerinde oluşan hasar nedeniyle çeşitli

molekül ağırlıklara ve değişik elektrik yükleri bulundurur ve elektriksel alanda değişik süratte hareketlenir ve kuyruk tipinde bir görsel meydana getirirler, sonuçta ortaya çıkan DNA göç görüntüleri değerlendirilerek bir yorum yapılır [73-76]. Şekil 3.6' da Komet testiyle farklı hasar derecelerleriyle DNA kuyruk görüntüleri gösterilmiştir. Komet testinde uygulanan aşamalar laboratuvar ortamlarına göre değişkenlik gösterebilmekle birlikte Tice ve arkadaşları [74].

Komet yöntemi genel olarak basamaklarını aşağıdaki gibi yapmışlardır:

1. Hücrelerin izolasyonu: insan, hayvan ve bitki hücreleri gibi farklı hücreler invitro çalışmalarında kullanılabilir. İnsanlarda en fazla tercih edilen hücreler lökosit ve lenfosit hücreleridir. Birçok doku hücrelerinin de kullanımı belirtilmiştir [70].

2. Slayt hazırlama: PBS içinde normal kaynamalı agaroz jelden (NMP) hazırlanarak %1'lik ve kullanıma göre 50-80 µL lam üstüne damlatılarak, lamın üzeri lamelle kapatılıp 2-4 °C'de 5 dk durduktan sonrasında lamel kaldırılarak ilk agaroz katmanı hazırlanmış olur [71, 75-77].

3. Lizis: lizis hücreyi ve çekirdek zarını eritecek güçte olup DNA zincirlerinin agaroz içerisinde serbest halde olması için uygulanır [71, 75-77].

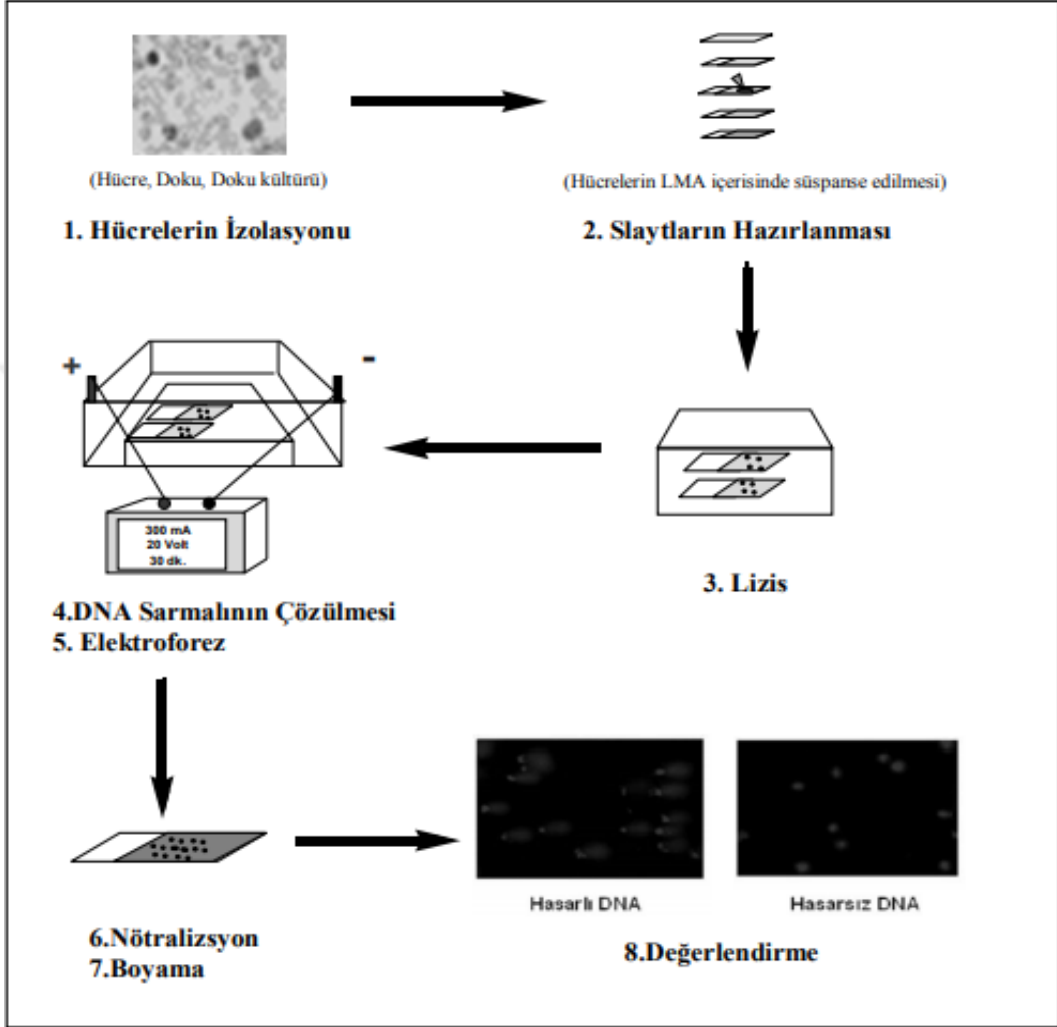
4. DNA zincirinin çözülmesi: elektroforez ile yürütülmeden önce DNA fragmentlerinin ayrılabilmesi için slaytlar elektroforez tampon içerisinde bekletilir.

5. Elektroforez: 300 mA 20 V' luk elektriksel ortamda 5-25 °C'de 30 dk yürütülmeye bırakılır [71, 75-77].

6. Nötralizasyon: Elektroforez içerisinde yürütme aşaması bittikten sonra alkali olan tampon çözeltiyi slaytlardan arındırmak için slaytlar 3'er dk ve 3 kez 5 ml/slayt nötralizasyon tamponu ile yıkanır [71, 75-77].

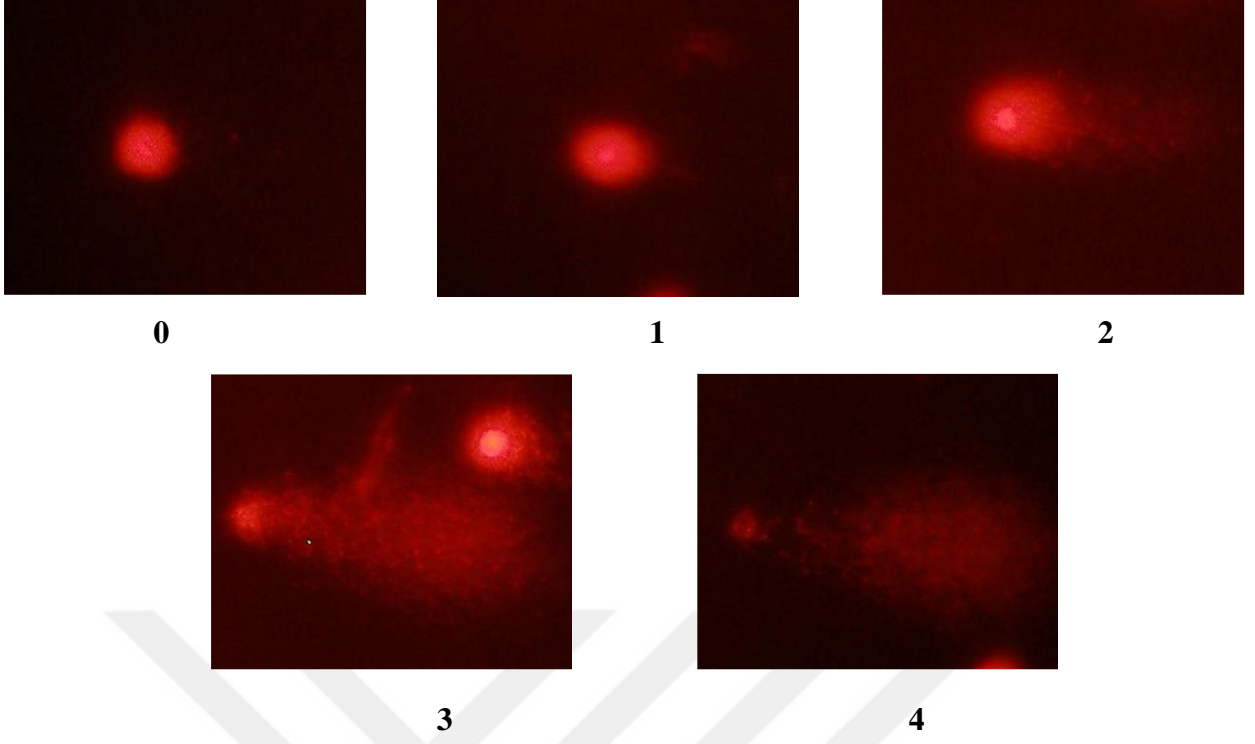
7. Boyama: Nötralizasyon işlemi bittikten sonra, slaytları floresan boya Ethidium bromür (5µg/mL) ile DNA boyanması gerçekleştirilir, belirli süre sonunda değerlendirilir [78].

8. Değerlendirme; yaklaşık 4 saat sonrasında ise değerlendirme aşamasına geçilir [71, 75-77].



Şekil 3.5. Komet yönteminin basamakları [78]

Floresan mikroskobu ile incelenen DNA moleküllerin çekirdeklerinin daire şeklinde uzayarak kuyruklu yıldız benzetilmesiyle oluşan görüntüler oluşturduğunda metota İngilizce “kuyruklu yıldız” anlamında “ Comet Assay” şeklinde adlandırılmıştır [79]. Şekil 3.6’ da Komet testiyle farklı hasar dereceleriyle DNA kuyruk görüntüleri gösterilmiştir [80].

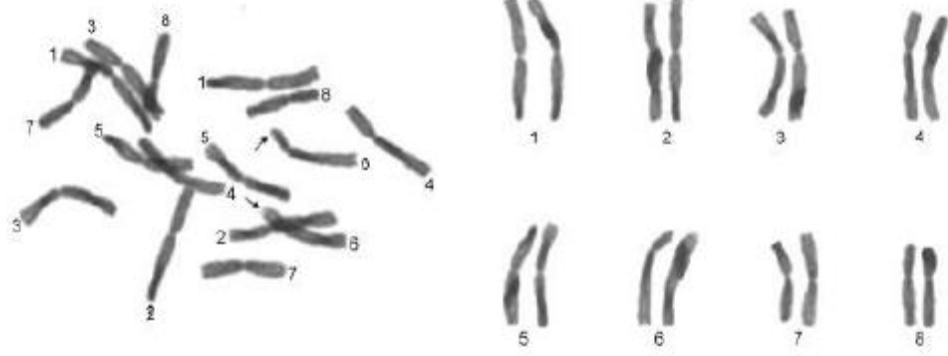


Şekil 3.6. Komet testiyle farklı hasar dereceleriyle DNA kuyruk görüntüleri
0: Hasarsız, 1: Hafif hasar, 2: Orta hasar, 3: Ciddi hasar, 4: Tam hasar [80]

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Materyal

Çalışmamızda tercih ettiğimiz *A. cepa* ($2n=16$), çimlenme süresinin kısa oluşu, kromozom sayısının çok olmayışı ve maliyetinin de ucuz olması sebebiyle kullanıma uygun görülmüştür. Şekil 4.1’ de *A. cepa* L. karyotipi gösterilmiştir [81].



Şekil 4.1. *A. cepa* L. karyotipi [81]

Çalışmalarımızın her bir aşaması için birden farklı kimyasallar kullanılmış ve bu kimyasalların hazırlanış protokolüne uygun davranılmıştır [81].

Kullanılan kimyasallar Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar

Sıra No	Kimyasal Adı	Cas No	Alındığı Yer
1	Penoksulam	219714-96-2	Sigma Aldrich
2	Etanol	64-17-5	Carlo Erba
3	Etidyum Bromüd	1239-45-8	Sigma Aldrich
4	Triton X-100	9002-93-1	Sigma Aldrich
5	Sodyum hidroksit	1310-73-2	Sigma Aldrich
6	Sodyum Fosfat Dibazik H.	7782-85-6	Sigma Aldrich
7	Glasiyal asetik asit	64-19-7	Sigma Aldrich
8	Basık Fuksin	569-61-9	Sigma Aldrich
9	Potasyum Fosfat Monobazik	7778-77-0	Sigma Aldrich
10	Düşük erime noktasına sahip agaroz jel (LMPA)	39346-81-1	Sigma Aldrich
11	Normal erime noktasına sahip agaroz jel (NMPA)	9012-36-6	Sigma Aldrich
12	Potasyum metabisülfid	16731-55-8	Sigma Aldrich
13	Hidroklorikasit	7647-01-0	Fluka
14	Sodyum klorür	7647-14-5	Sigma Aldrich
15	Magnezyum Klorid Hekzahidrat (MgCl ₂ .6H ₂ O)	7791-18-6	Sigma Aldrich
16	Etilendiamintetraasetik asit	6381-92-6	Sigma Aldrich
17	Potasyum klorür	7447-40-7	Sigma Aldrich
18	Trizma hidroklorit (C ₄ H ₁₁ NO ₃ .HCl)	1185-53-1	Sigma Aldrich
19	Trizma baz	77-86-1	Sigma Aldrich
20	Metil metano sülfonat	66-27-3	Sigma Aldrich

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve modelleri Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmamızda kullanılan cihazlar, marka, modeller

Sıra No	Cihaz İsmi	Marka ve Model
1	Lam-Lamel (IsoLab) ve Mikrosantrfüj Tüpleri - P.P- 1,5 mL	Isolab
2	pH Metre	WTW Profiline / pH 3210
3	Pipetler (0,5-2 µL, 0,5-100 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL, 1-5 mL)	Eppendorf
4	Trinoküler Araştırma Mikroskobu	BAB/TAM-F
5	Otoklav	Nüve / NC-90L
6	Su Banyosu	Nüve / NB 20
7	Buz Makinesi	Flake / IMS-50
8	Elektroforez ve Güç kaynağı	Clever / Clever / CS 300V
9	Vorteks	Daihan / VM-10
10	Hotplate	Thermolyne
11	Buzdolabı	Vestel
12	Manyetik Karıştırıcı	Daihan / MSH-20
13	Soğutmalı Santrifüj	Awel / MF 20-R
14	Distile Su Cihazı	Millipore / Direct Q-3 UV
15	Hassas Terazı	Precisa/LS 220 A SCS

Çalışmalarımızda kullanılan kimyasallar ile uygulanan yöntemler için çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler aşağıdaki gibidir;

Feulgen Boyası Hazırlanış Aşamaları:

Feulgen boyasının kullanımı kromozom saymak için kök ucunda ve yaprak veya tomurcuklardaki bitki dokuları gibi bölümlerde en çok tercih edilen bir boyadır. Çalışmamızdaki preparatların hazırlanmasında feulgen boyası kullanılmıştır.

Feulgen boya, hazırlanış protokolüne uygun olacak şekilde aşağıdaki adımlarla ilerlenilmiştir;

1. Bir gram kristal şekilde bazik fuksin (parafuksin) tartılmıştır. Hemen hemen 10 cm çap uzunluğunda büyük olmayacak bir havanda ezilip parçalanmıştır.
2. Hacmi 500 cm³ boyutlarındaki bir erlenin içine toz biçimdeki bazik fuksin, erlenin ağız kısmına değdirilmeden ilave edilmiştir.
3. Başka bir erlen mayerde 200 cm³ damıtık su kaynatıldıktan sonra; yavaşça diğer erlen mayere dökülerek cam çubukla boya sürekli karıştırılmıştır.
4. Sıcaklık 50 °C oluncaya kadar karıştırılmıştır.
5. Boyanın üstüne 20 cm³ 1 N HCl eklenmiştir. Son olarak karışım filtre kâğıdıyla birlikte süzülme işlemine tabi tutulmuştur.
6. Süzdüğümüz boyanın içine 2 g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) eklenip kapağı olan şişe içerisine ilave edilmiştir. Karanlık bir ortamda minimum bir gece 24 saat dolap içerisine bırakılmıştır, sonraki kullanımlar için 4 °C'da saklanılmıştır.

1 N HCl Çözeltisi (25 mL): 22,9 mL dH₂O ekleyip üzerine 2,1 mL %37 saflığında HCl ilave edilmiştir.

%45 Glasiyal Asetik Asiti (100 mL): 55 mL dH₂O üstüne 45 mL %100 saflıkta glasiyal asetik asit ilave edilmiştir.

PBS Çözelti (10X): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g H₂KPO₄, 2,9 g Na₂HPO₄.7H₂O ve 3,2 g C₄H₁₁NO₃.HCl 80 mL distile su içerisinde çözdükten sonra pH 7,4 şeklinde olması kaydıyla son hacim 100 mL şeklinde ayarlanmıştır.

Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMPA) Çözeltisi: 0,03 g LMPA üstüne 2 mL 1X'lik PBS eklenmiştir. %1,5'lik LMPA çözeltisi hazırlanmıştır.

Normal Erime Noktalı Agaroz (NMPA) Çözeltisi: 0,02 g NMPA tartıldıktan sonra üzerine 2 mL 1X'lik PBS eklenmiştir. %1'lik NMPA çözeltisi hazırlanmıştır.

Pozitif Kontrol Çözeltisi (MMS): 0,005 g MMS tartıldıktan sonra son hacim 500 mL olacak şekilde dH₂O ilave edilir.

Etidyum Bromür Çözeltisi: 10 mg Etidyum bromür üzerine, 50 mL dH₂O ile stok çözelti hazırlanmıştır. Stok olarak hazırlanan çözelti buzdolabında muhafaza edilmiştir ve çalışmamız için stokta bulunan Ethidyum bromürden 1 mL ile 9 mL su ile karıştırılarak çözelti hazırlanmıştır.

Nükleus İzolasyon Tamponu: 0,0425 g 4 mM MgCl₂.6H₂O, 250 µL %0,5'lik TritonX ve 10 mL 0,2 M Tris tartıldıktan sonra hacmi su ile tamamlayarak 50 mL, pH 7,5' e ayarlanmıştır

Elektroforez Tamponu: 1 mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit tartıldıktan sonra 500 mL olacak şekilde pH > 13 olarak ayarlanmıştır.

Carnoy Çözeltisi: Absolüt alkolden 75 mL alarak, glasiyal asetik asitten 25 mL eklenerek tamamlanmıştır.

%70 Saflıkta Etil Alkol: %96'lık etil alkol içerisinde 72,9 mL ile dH₂O 100 mL' ye tamamlanmıştır.

Nötralizasyon Çözeltisi: 48,5 mg Trizma Base içerisine 800 mL dH₂O ile çözdürdükten sonra pH 7,5'e ayarlanarak son hacim 1000 mL' ye tamamlanmıştır.

4.2. Metot

4.2.1. Allium Testi

4.2.1.1. Büyüme Engelleme Testi

Penoksulamın *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde sitogenetik etkileri incelemede kullanacağımız dozları belirlemek için, büyüme engelleme testi yapılarak EC₅₀ değeri belirlenmiştir. Hemen hemen aynı çaptaki soğanlardan (2-3 cm çap) kök primordialarına zarar vermeyecek şekilde çimlendirilmiş kökleri ve dış kabukları temizlenir. Aynı zamanda Penoksulam'ın 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/L derişimleri hazırlanmış ve saf su ise negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hazırlanan bu derişimler için 5 adet soğan kullanılmıştır. Soğanlar 96 saat boyunca ışık almayan ortam ve ~21 °C ± 4 °C çimlendirilmeye alınarak aynı soğan yumrusunun 10 tane olması kaydıyla totalde 50 adet kök alınarak ortalama kök uzunlukları hesaplanmıştır. Aşamalar süresince çimlenmeye bırakılan soğanlar için hazırlanan çözeltiler eksildikçe gerekli ilaveler düzenli bir şekilde devam ettirilmiştir.

Kök ucu uzamasını negatif kontrole oranla %50 miktarda azaltan değer EC₅₀'yi vermektedir. İşemler için derişimlerin ayarlanmasında ise 2xEC₅₀, EC₅₀ ve 1/2xEC₅₀ değerleri uygulanmıştır. *A. cepa* bir tam hücre döngü 24 saatlik dilimde gerçekleştirdiği için uygulama süre seçimleri 24, 48, 72 ve 96 saat şeklinde ayarlanmıştır.

Soğan kök uçlarına Penoksulam'ın dozlarını uygulamak için her biri için ayrı olacak şekilde 6 adet soğan seçilmiştir. Soğanlar arasından en iyi çimlenen 5 tanesi seçilmiş, çözeltiler her gün yenilenmiştir. Hücre siklusunu bitiren soğanların uç kısımları 1- 1,5 cm olacak şekilde saat 8⁰⁰ ile 8³⁰ arasında kesilmiştir. Her bir uygulama için 15-20 kök ucu Carnoy fiksativi içerisinde alınarak 24 saat boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonar örnekler %70' lik alkole alınarak buzdolabına koyulmuştur

Çalışmamızda kullanılan bu kök uçları mitoz bölünme esnasında görülen anormallikleri ve Mİ sonuçlarını tespit etmek için kullanılmıştır.

4.2.1.2. Feulgen Tekniği Kullanılarak Preparat Hazırlama

%70 saflıkta alkol içerisinde +4 °C’de depolanmak üzere bıraktığımız kök uçlarını birer tüp içerisine çıkararak, üstüne 1-2 mL 1N HCl çözeltisi eklenip 60 °C’ sıcaklıktaki su banyosu cihazında 8-10 dakika bekletilmiştir. HCl içerisinde çıkarılan kökler beş dk vakitlerle üç defa distile suyla ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. dH₂O ile yıkanan kökler Feulgen boyası içinde 25-30 dk boyamaya bırakılmıştır. Süre tamamlandıktan itibaren kök uçları daha koyu olacak şekilde gelmiş ve 1-2 mm ebatlarında jilet ile lam üstünde kesilmiş, bir damla %45 oranında glasiyal asit ilave edilerek parçalanmıştır. Parçalama işlemi bittikten sonra üstü lamelle kapatılıp, preparatları yarı daimi yapabilmek için lamellerin etrafı tırnak cilasıyla kapatılmıştır. Ayrı ayrı doz uygulama süreçleri için birbirinden farklı kök uçlarıyla beşer tane kök ucu ezme preparat yöntemiyle hazırlanmış ve böylelikle mitotik anormallikler, Mİ ve faz frekansları tespit edilmiştir. Farklı her uygulama için 5 kök içerisinde totalde 5000 hücre sayımı yapılarak mitoz bölünmedeki hücrelerin toplam hücre sayısına bölünmesiyle Mİ değeri belirlenmiştir (Mİ= Mitoza girmiş hücre sayısı- Toplam hücre sayısı ×100) [83]. KA’ları belirlemek için ise ayrı her konsantrasyondaki bir preparattan yüz, totalde beş yüz anafaz-telofaz hücresi sayılıp değerlendirme yapılmıştır.

4.2.2. Komet Testi

Komet testi preparat hazırlanmasındaki hücre sayısının az olması, maliyetinin yüksek olmaması, yöntemin kolay olmasıyla ve aynı zamanda DNA hasarını belirlememizde hızlı olması nedeniyle tercih ettiğimiz bir yöntemdir. Alkali Komet testi, Tice ve arkadaşlarının [74] yapmış olduğu yöntemde birtakım değişikliklere uygulanmıştır [84].

1. Soğanlar 48 saat boyunca ile dH₂O içerisinde köklendirilmeye bırakılmıştır.
2. 48 saat sonra soğanlar önceden hazırlanmış olan kimyasal konsantrasyonlarına alınarak kök uzamaları belirlenen süreler boyunca devam edilmiştir (24, 48, 72 ve 96 saat).
3. İşleme başlanmadan yaklaşık 60 dakika önce cam petri kapları, kesici aletler ve filtreler buzdolabının buzluk kısmında bırakılmıştır.
4. Kullanılacak kadar lam, sıcak tabla üstünde (50-60 °C) ısıtılmak üzere hazırlanılmıştır.
5. %1 oranında NMPA çözeltisi 90-100 µL ısıtılmış lamların üstlerine yayıldıktan sonra oda sıcaklığında dehidre edilmiştir.

6. Süreci tamamlanan soğanlardan ayrı ayrı dozlar için 7 adet kök alınmıştır.
7. Cam petri kabının içerisine bırakılan bu köklere +4 derecede bekletilen soğuk nükleus izolasyon tamponu 600 µL eklenilmiş ve bir jilet ile parçalanıp ependorf tüpe filtrelenerek ilave edilmiştir.
8. Tüm işlemler sırayla her konsantrasyon için ayrı ayrı uygulanmıştır.
9. Örneklerin toplandığı tüm ependorf tüpler 1200 rpm'de 7 dakika +4 °C'de santrifüje edilmiştir. İşlem sonunda ependorflardan süpernatant kısmı miktar tayini için kullanılmış, pelet kısmı ise DNA hasar derecesinin tespiti için ayrılmıştır.
10. Aynı zamanda %1,5' lik LMPA hazırlanılıp ve 55 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.
11. 50 µL örnek, 50 µL LMPA alınarak, %1 NMPA içeren lamlara dökülmüştür.
12. Lamaların üstleri lamel ile kapatılarak buz kasetlerinin üzerinde 4-5 dk bırakılmıştır.
13. 4-5 dk sonrasında jeller donmuş olacaktır ve lameller nazikçe çıkarılmıştır.
14. Örnekler elektroforez tankının içerisine yerleştirilip, tampon çözeltisi içerisinde +4 °C de 25 dk cihaz çalıştırılmadan bırakılmıştır. Daha sonra örnekler 25 V, 20 dk, 300 mA de yürütülmüştür.
15. Elektroforezden sonra preparatlar +4 °C de 5 dk dH₂O içerisinde bekletilip, nötralizasyon tamponu ile +4 °C de 7-8 dk aralılar ile 3 kere nötralize edilmiştir.
16. Preparatlar 70 µL EtBr ile boya uygulanmış ve 5 dk +4 °C' de bırakıldıktan sonra artan boya soğuk dH₂O yardımıyla akıtılmıştır.
17. Lamel ile kapatılıp mikroskopta incelenmiştir. Her preparat için yaklaşık 50 hücre analizi yapılmıştır.

Trinoküler araştırma mikroskobu BAB/TAM-F kullanılarak 50 Komet (50 komet/slayt), beş gruptan bir tanesine (0-hasarsız, 1-hafif hasar, 2-orta hasar, 3-ciddi hasar, 4-tam hasar) ait olarak görsel olarak puanlama yapılmıştır [85]. Bu şekilde, Komet için toplam skor 0 (tüm hasarsız) ve 200 (tüm hasarlı) arasında olabilir.

DNA hasarın ifade etmek şu şekilde bir denklem kullanılmaktadır:

$$\text{Arbitrary unit} = \sum_{i=0}^4 Ni * i$$

Ni = I derecesindeki hücrelerin sayısı; i = hasar derecesi (0, 1, 2, 3, 4)

4.2.3. LC-MS/MS Tekniği ile Miktar Tayini Belirlenmesi

Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi (LC-MS/MS), spektrometri ve kromatografi sistemlerinin birlikte ortaya çıkmasıyla oluşturulmuş bir sistemdir. Eser miktardaki analitlerin hassas miktar tayininde LC-MS/MS sistemi kullanılır. Sebze, meyve et, süt gibi gıdaların içerisindeki pestisitlerin ve bunların ara ürünlerinin, hormon ve türevlerinin, analizlerinde de kullanılabilir. Biyolojik örneklerde ilaç ve türevlerinin ölçülmesi gibi birçok uygulama alanları da vardır. Proteomik araştırma gruplarında da proteinlerin karakterizasyonu için de tercih edilmektedir [86-88].

Ultra performanslı sıvı kromatografi analizleri Agilent 1200 İfinity UPLC sistemi kullanılmıştır. UPLC sisteminde oto örnekleyici, yüksek basınç pompası, degazör, kolon fırını, DAD dedektör ve soğutucu bölümleri bulunmaktadır. Kolon olarak Poroshell 120 EC-C18 (150×4,6 mm, 2,7 µ) kullanılmış, kolon sıcaklığı 40 C' de sabitlenmiştir. UPLC metodu oluşturulup, enjeksiyon hacmi 10 µL, mobil faz akış hızı 1,2 mL olarak ayarlanmıştır. LC-MS/MS analizleri Agilent 6460 triple quadakütle spektrometresiyle yapılmıştır. Bozunurluk ürünleri, elektropray iyonlaştırma tekniği ile pozitif iyon modda belirlenmiştir. Tarama sonuçlarında penosulamın kütle spektrumu 484,1 m/z, tanınma iyonları 195-124-164 g/mol olarak gözlemlenmiştir. Multi Reaction Mode (MRM) kullanılarak kantitatif analiz numunelere uygulanarak tamamlanmıştır. Kütle spektrometresi koşulları ise Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kütle spektrofotometresi koşulları

Ayarlar	Değer Aralıkları	Parametreler (Analiz)	Değer Aralıkları
Gazın Sıcaklık Değer	325 C ⁰	Ana Kütle	484,1 g/mol
Gazın Akış Hızı	11 L/dk	Tanınma Ürün Kütlesi	195-124-164 g/mol
Püskürtme Basınç	45 psi	Kütle İzleme Süreci	45 ms
Taşıyıcı Gaz Sıcaklığı	400 C ⁰	Çapışma Enerjisi	30 eV
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	12 L/dk	Alıkonma Süresi	2,957 dk

4.3. Veri Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Uygulanan yöntemler sonucunda elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Sonuçlar SPSS 23.0 for Windows paket programında, grup ortalamalarının karşılaştırılması Duncan çoklu dağılım testi ile değerlendirilmiştir ($P<0.05$). Doz cevap ilişkisi Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir.

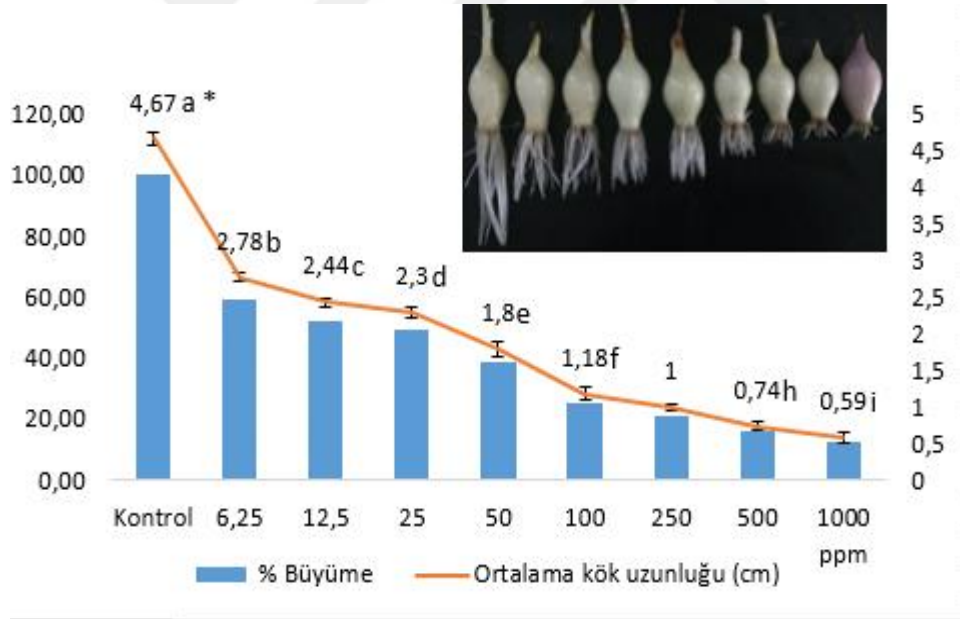


5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Büyüme Engelleme Testi

Bu test Penoksulam'ın EC₅₀ değerinin bulunması için uygulanmıştır. Penoksulam'ın 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/L'lik konsantrasyonları ve saf su (negatif kontrol) 96 saat boyunca çimlenmesi beklenmiştir. Süreç sonrasında her bir uygulama için çimlenen on kök alınarak (toplamda 50 kök) ortalama kök uzunluğu tespit edilmiştir. Çizelge 5.1' de Penoksulam'ın büyüme engelleme testi sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Penoksulam'ın büyüme engelleme testi sonuçları



Çözeltiler her gün yenilenmiştir. Yapılan uygulamada kontrole oranla ortalama kök uzunluğunu %50 oranında düşüren doz EC₅₀ değerini belirlemektedir.

Çalışmamızda, saf su içerisinde çimlendirilen soğanlarda ortalama kök uzunluğu 4,67 cm bulunmuş, EC₅₀ değerinin hesaplanılmasında 4,67 cm'nin yarısı kadar azalmaya neden olan 2,33 cm veya en yakın olan uzama bulunmuştur. Sonuçlarda 25µg/L çözelti

içinde bulunan köklerin ortalama uzunluğu 2,30 cm (Büyüme oranı %49,25) olarak belirlenmiş ve bu değerin negatif kontroldeki soğanların ortalama kök uzunluğunun yarısı olan 2,33 cm'ye en yakın değer olduğu için kabul edilmiştir. Böylece Penoksulam'ın EC₅₀ değeri yaklaşık olarak 25 µg/L olarak tespit edilmiştir. Penoksulam'ın uygulanan tüm dozları ortalama kök uzunluğunu doza bağımlı bir şekilde istatistiksel olarak azalttığı tespit edilmiştir. (r=-0,982 p=0,01). Çizelge 5.2' de Penoksulam'ın *A. cepa* kök ucu hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak ortalama kök uzunlukları verilmiştir.

Çizelge 5.2. Penoksulam'ın *A. cepa* kök ucu hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak ortalama kök uzunlukları

Doz miktarları (µg/L)	Ortalama uzunluk cm±SS*	% Büyüme	% Büyümede azalma
Kontrol	4,67± 0.08a	100,00	0
6,25	2,83±0.07b	59,53	40,47
12,5	2,49±0.06c	52,25	47,75
25	2,35±0.07d	49,25	50,75
50	1,83±0.1e	38,54	61,46
100	1,2±0.09f	25,27	74,73
250	1,02±0.05g	21,41	78,59
500	0,74±0.06h	15,85	84,15
1000	0,58±0.07i	12,63	87,37

* Her bir uygulamadaki aynı sütun içerisindeki farklı harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma

5.2. Penoksulam'ın Mitotik İndeks Üzerinde Oluşturduğu Etkiler

Penoksulam'ın, *A. cepa*'nın kök meristem hücrelerinde Mİ ve mitotik fazlarda değişik şekillerde etkileri Çizelge 5.3' de verilmiştir. Penoksulam Mİ değerlerini kontrol grubuna göre azaltmış ve azalış süre ve doza bağımlı bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($r=-0,982$ $p=0,01$). 24 saatlik uygulama hariç Penoksulam' ın 25 ve 50 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonlarından elde edilen Mİ değerleri pozitif kontrol grubu olan MMS' den düşük bulunmuş olup, bu düşüşler 48 saatlik uygulamanın 25 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonu hariç istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Penoksulam uygulaması metafaz indeksini artış ve azalışlar şeklinde etkilemişken, 24 saatlik uygulamadaki artışlar ve azalışlar 12,5 $\mu\text{g/L}$ hariç istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Penoksulam anafaz indeksini kontrol grubuna göre 24 saatlik uygulamalarda arttırmışken, diğer uygulamalarda azaltmış olup sadece 48 saatlik uygulamanın 50 $\mu\text{g/L}$ dozundaki azalış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Penoksulam telofaz indeksini kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan arttırmıştır.

Çizelge 5.3. Penoksulam'ın *A. cepa* kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi

Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/L}$)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks \pm SS	Mitotik Faz Safhaları (%) \pm SS*			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol-24 saat	5080	71,69 \pm 0,61a	89,35 \pm 0,79a	1,81 \pm 0,19a	2,45 \pm 0,28a	6,39 \pm 0,6a
MMS-10 ppm	5134	56,51 \pm 0,53b	88,03 \pm 0,9b	2,83 \pm 0,34b	2,52 \pm 0,41a	6,62 \pm 0,36a
12,5	5113	61,58 \pm 0,75c	85,68 \pm 0,98c	2,51 \pm 0,31b	2,73 \pm 0,6a	9,08 \pm 0,52c
25	5093	58,53 \pm 0,67d	84,61 \pm 0,37d	2,45 \pm 0,28b	2,61 \pm 0,24a	10,33 \pm 0,35d
50	5032	57,07 \pm 0,25b	87,46 \pm 0,45b	2,51 \pm 0,2b	2,58 \pm 0,45a	7,45 \pm 0,38e
Kontrol-48 saat	5080	70,29 \pm 0,8a	88,88 \pm 0,29ab	2,41 \pm 0,2a	2,8 \pm 0,22a	5,91 \pm 0,33a
MMS-10 ppm	5072	55,45 \pm 0,93b	88,44 \pm 0,62a	2,24 \pm 0,14ab	2,7 \pm 0,32a	6,62 \pm 0,49b
12,5	5040	58 \pm 0,76c	86,15 \pm 0,88c	2,16 \pm 0,3ab	2,74 \pm 0,28a	8,96 \pm 0,67c
25	5090	55,19 \pm 0,6b	87,54 \pm 0,41d	1,99 \pm 0,2b	2,49 \pm 0,18a	7,98 \pm 0,5d
50	5080	51,97 \pm 0,66d	89,71 \pm 0,87b	1,63 \pm 0,19c	1,97 \pm 0,2b	6,7 \pm 0,62b
Kontrol-72 saat	5117	70,32 \pm 0,53a	89,47 \pm 0,63a	2,05 \pm 0,25a	2,59 \pm 0,38a	5,89 \pm 0,46a
MMS-10 ppm	5091	54,18 \pm 0,84b	88,83 \pm 0,54ab	2,1 \pm 0,5a	2,65 \pm 0,42a	6,42 \pm 0,42a
12,5	5153	55,05 \pm 0,99b	88,66 \pm 0,21c	2,19 \pm 0,29a	2,36 \pm 0,28a	7,79 \pm 0,36b
25	5122	51,62 \pm 0,57c	88,13 \pm 0,97bc	2,08 \pm 0,3a	2,35 \pm 0,42a	7,45 \pm 0,54b
50	5117	50,48 \pm 0,46d	88,11 \pm 0,78bc	2,05 \pm 0,35a	2,36 \pm 0,37a	7,47 \pm 0,68b
Kontrol-96 saat	5113	69,88 \pm 0,7a	89,48 \pm 0,46a	2,07 \pm 0,3a	2,71 \pm 0,22ab	5,74 \pm 0,43a
MMS-10 ppm	5151	53,42 \pm 0,23b	88,38 \pm 0,45b	2,07 \pm 0,37a	2,76 \pm 0,24b	6,79 \pm 0,39b
12,5	5128	53,53 \pm 0,86b	88,16 \pm 0,84b	2,19 \pm 0,4a	2,26 \pm 0,41a	7,39 \pm 0,62b
25	5142	50,43 \pm 0,98c	88,01 \pm 0,74b	2,04 \pm 0,28a	2,51 \pm 2,46ab	7,44 \pm 0,62b
50	5190	48,62 \pm 0,95d	88,19 \pm 0,42b	2,02 \pm 0,2a	2,46 \pm 0,29ab	7,33 \pm 0,48b

* Her bir uygulamadaki aynı sütun içerisindeki farklı harfler $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma

5.3. Penoksulam'ın Neden Olduğu Kromozom Bozuklukları

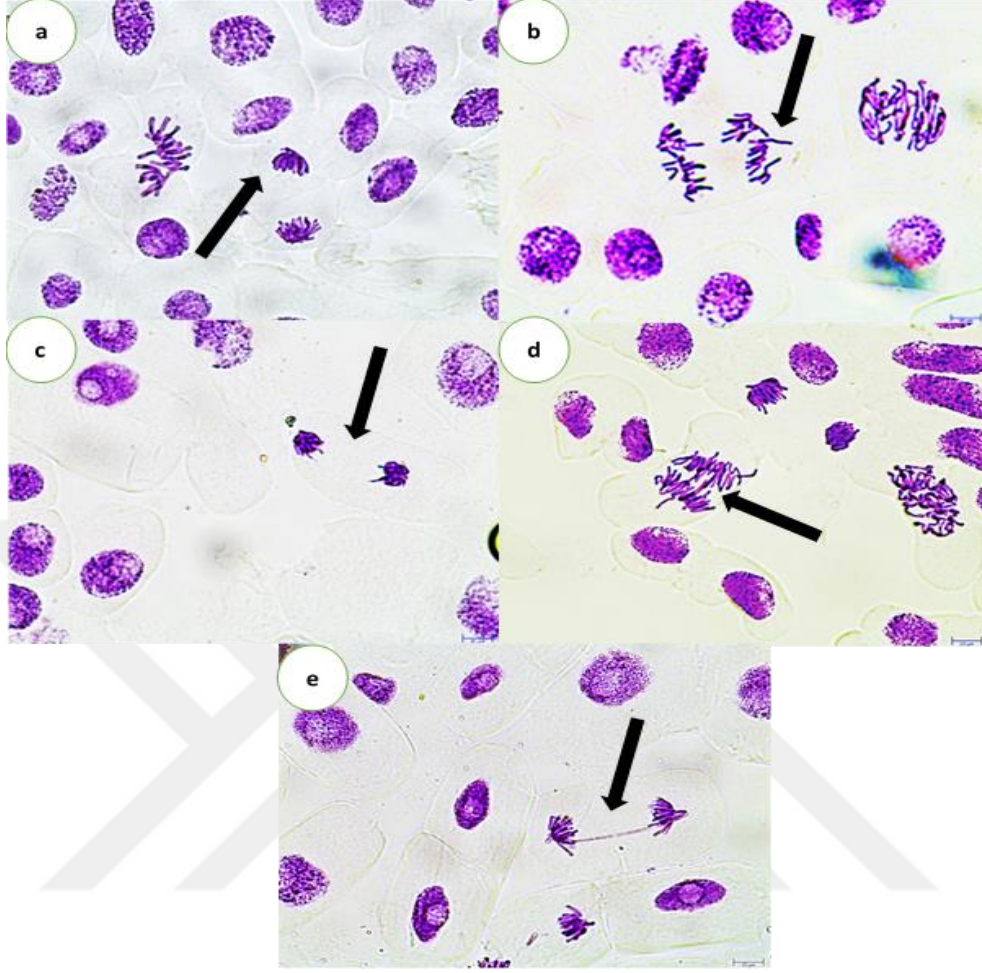
Penoksulam'ın ana-telofaz kromozomlarında meydana getirdiği bozukluklar, bozulmuş ana-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık, poliploidi ve anafaz köprüsüdür. Toplam KA'larda doza ve zamana bağlı bir artış gözlemlenmiştir. (24 saat için $r=0,686$ $p=0,01$, 48 saat için $r=0,641$ $p=0,05$, 72 saat için $r=0,796$ $p=0,01$, 96 saat için $r=0,526$ $p=0,05$) Penoksulam'ın neden olduğu anomalikler Çizelge 5.4' de gösterilmiştir. Penoksulam toplam ana-telofaz bozukluklarını istatistiksel olarak hem doza hem süreye bağlı olarak arttırmıştır. Ancak bu artışlar pozitif kontrol grubu olan MMS' den düşük bulunmuştur. En fazla anormalliğe 96 saatlik uygulamanın 50 µg/L derişiminde (14 ± 1) rastlanılmışken, en az anormalliğe 24 saatlik uygulamanın 12,5 µg/L derişiminde ($10,2\pm0,45$) rastlanılmıştır.

Penoksulam bozulmuş ana-telofaz oranını (Resim 5.3a) kontrol grubuna oranla arttırmış olup en düşük değerine 24 saatlik uygulamanın 50 µg/L konsantrasyonunda (%1,8) rastlanılmışken en yüksek değerine 96 saatlik uygulamanın 50 µg/L konsantrasyonunda (%2,8) rastlanılmıştır. Kalgın kromozom oluşumu (Resim 5.3b) oranı %2,6 ile %3,2 oranında arttırmıştır. Penoksulam'ın neden olduğu en fazla anormallik yapışkanlık (Resim 5.3c) olup 96 saatlik uygulamanın 12,5 µg/L konsantrasyonunda (%1,4) görülmüştür. Penoksulam'ın neden olduğu bir diğer anormallik iste poliploidi (Resim 5.3d) olup bu değerler MMS' den düşük bulunmuştur. Toplam ana-telofaz anormallikleri arasında Penoksulam'ın uyardığı en az anormallik anafaz köprüsüdür (Resim 5.3e).

Çizelge 5.4. Penoksulam'ın neden olduğu anormalliklerin tipleri ve oranları

Konsantrasyon (µg/L)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)						Toplam Anormallikler (%± SS)
		Bozulmuş anafaz-telofaz	Kalgın kromozom	Yapışkanlık	Poliploidi	Anafaz köprüsü		
Kontrol-24 saat	500	1,2	0,8	0,4	0,8	0,2	3,4±0,55a	
MMS-10 ppm	500	2,2	3,2	3,2	3,8	1,6	14±1,00b	
12,5	500	2,4	3,6	3,4	0,8	-	10,2±0,45c	
25	500	2,4	2,8	2,6	1,8	0,8	10,6±0,89c	
50	500	1,8	3,4	3,60	2,4	0,4	11,6±0,55d	
Kontrol-48 saat	500	0,2	1	0,6	0,8	-	2,6±0,55a	
MMS-10 ppm	500	3	3,2	3,2	3,4	2,2	14,8±0,45b	
12,5	500	2,2	2,6	3,2	1,8	0,6	10,4±0,89c	
25	500	2	2,8	2,6	3,	1,40	11,8±0,84d	
50	500	2	3	2,6	3,2	1,2	12±0,71d	
Kontrol-72 saat	500	0,8	1	0,6	0,8	-	3,2±0,84a	
MMS-10 ppm	500	2,6	3,4	3,4	3,2	2,4	15±0,71b	
12,5	500	2,2	3,2	3,2	2,2	0,8	11,8±0,45c	
25	500	2,6	2,8	2,8	3,2	1,2	12,6±0,55cd	
50	500	2,8	3	2,8	3	1,4	13,2±0,45d	
Kontrol-96 saat	500	0,6	1	0,6	1,2	0,2	3,6±0,89a	
MMS-10 ppm	500	2,6	3,2	3,6	3,4	2,4	15,2±0,84b	
12,5	500	2	3,2	4	2	1,4	12,6±1,14c	
25	500	2	3,2	3	3,4	1,2	12,8±0,84cd	
50	500	2,8	3,6	3,4	3,2	1	14±1bd	

* Her bir uygulamadaki aynı sütun içerisindeki farklı harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma



Resim 5.3. Penoksulam'ın neden olduğu ana-telofaz anormallikleri
a: Bozulmuş anafaz-telofaz, b: Kalgın kromozom c:Yapışkanlık d: Poliploidi e: Anafaz köprüsü

5.4. Penoksulam'ın DNA Hasarı Üzerine Etkileri

Penoksulam'ın *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerinde neden olduğu DNA hasarı 24, 48, 72 ve 96 saatlik uygulamalarla Komet testi ile belirlenmiştir (Çizelge 5.5). Penoksulam'ın 50 µg/L konsantrasyonu 24 saatlik uygulama hariç diğer sürelerde DNA hasarını MMS' den daha çok arttırmış olup bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. 12,5 µg/L ($r= 0,919$ $p= 0,01$), 25 µg/L ($r= 0,908$ $p= 0,01$), 50 µg/L ($r= 0,842$ $p= 0,01$).

Çizelge 5.5. Penoksulam'ın *A. cepa* kök hücre meristemlerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti

Uygulama	Konsantrasyon (µg/L)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) Ortalama ± Standart sapma			
		24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Kontrol	-	2±1a	3±1a	3,67±0,58a	5,33±0,58a
MMS	10 ppm	108±4,36b	119,33±3,21b	124,33±1,53b	126,33±1,53b
Penoksulam	12,5	63±2,65c	77,67±2,52c	88,33±2,08c	90,67±2,31c
	25	70,33±2,31d	115,67±2,08b	121,33±2,52b	133±2d
	50	101±3,61e	129,33±3,79d	135±2d	141±2,65e

* Her bir uygulamadaki aynı sütun içerisindeki farklı harfler $p < 0.05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma

5.5. LC-MS/MS Tekniği ile Penoksulam Miktarının Belirlenmesine Ait Bulgular

Penoksulam'ın *Allium cepa*' ya geçen miktar tayini LC-MS/MS tekniği ile belirlenmiş olup sonuçlar Çizelge 5.6' da gösterilmiştir. Kök uçlarına geçen en yüksek madde miktarı 96 saatlik uygulamanın 50 µg/L'inde olup süreye ve zamana bağlı olarak artış göstermiştir. 24, 48, 72 saatlik uygulamalarda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (24 saat($r= 0,714$ $p= 0,01$), 48 saat ($r= 0,693$ $p= 0,01$), 72 saat ($r= 0,753$ $p= 0,01$), 96 saat($r= 0,894$ $p= 0,01$).

Çizelge 5.6. Penoksulam'ın *A. cepa* kök hücrelerinde LC-MS/ MS ile kantitatif analizi

Uygulama	Konsantrasyon (µg/L)	Miktar (ppb ±SD)*			
		24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Negatif kontrol	-	-	-	-	-
MMS	10 ppm	-	-	-	-
Penoksulam	12,5	0,0012±0,0004a	0,0013±0,0005a	0,0015±0,00005a	0,0017±0,0005a
	25	0,0015±0,0005a	0,0017±0,0005a	0,0018±0,0004a	0,0037±0,0008b
	50	0,0023±0,0005b	0,0025±0,0005b	0,0043±0,0015b	0,0057±0,0012c

* Her bir uygulamadaki aynı sütun içerisindeki farklı harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genel olarak tarım ürünlerini yabancı ot büyümesi, hastalık etkenleri gibi etkenlerden korumak, üretim kalitesini arttırmak için kullanılmış olan pestisitler hızlı etki etmeleriyle ve kullanım olarak basit olmasıyla çok tercih edilmesine rağmen dikkatli ve uygun miktarda kullanılması ile birlikte diğer moleküler test sistemleriyle de bakılması gerekmektedir [1]. Pestisitler, zararlı canlıları öldürmek için kullanılan madde manasına gelmektedir [9]. Pestisit, tarımsal mücadelede kullanılan çeşitli kimyasal maddeler ve zirai ürünlerdir. Genel olarak bitkilere zarar veren organizmalara mani olmak, sayılarını azaltmak veyahut olumsuz etkilerini en aza indirmek için kullanılmış olup yüksek etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir [10]. Pestisitlerin sınıflandırılmasında insektisit, fungusit ve herbisit şeklinde sınıflandırma gerçekleştirilir, herbisitlerden Penoksulam, pirinç tarlalarında, yıllık çimlen, geniş yapraklı yabancı otların kontrolü için kullanılan, ekim veya doğrudan kuru ya da tohumlama yöntemleriyle yetiştirilen bitkilerin kontrolünde kullanılan bir herbisittir. Penoksulam, hem karasal hem de sucul uygulama alanları için kullanılan geniş spektrumlu, sistemik herbisit ürünlerindeki aktif bileşendir [5, 28]. Allium teste makroskobik (EC₅₀, büyüme) ve mikroskobik (c-mitoz, adezyonlar, kromozom kırılmaları gibi anomaliler) çok rahat bir şekilde değerlendirilebilmektedir. Toksisitenin takibi için yapılan, Allium test iyi bilinmekle birlikte birçok laboratuarda çoğunlukla tercih edilmektedir [89-91]. Bitkiler iyi birer monitor sistem olmalarından dolayı da mutasyon testleri açısından son yıllarda oldukça popüler duruma gelmişlerdir. DNA hasarları ve onların biyolojik etkilerini belirlemek için DNA'da meydana gelen bozuklukların belirlenmesi de oldukça önemlidir. Bu amaçla bitkisel organizmalar için zaman içerisinde geliştirilmiş olan birçok mutajenite testleri bulunmaktadır. Bunların bir kısmı genlerde meydana gelen mutasyonlar (Klorofil mutasyonları, Polen Mutasyonları, Somatik Mutasyonlar (Tradescantia Stamen Tüyü Mutasyonu)) şeklinde iken bir kısmı da Kromozomlarda meydana gelen mutasyonlar (Kromozom Anomalileri, Mikronükleus Oluşumları) şeklinde ortaya çıkmaktadır [92- 94].

Bitkilerin en çok tercih edilmesinin sebebi meristematik dokuların mitoz bölünmenin incelemesi açısından en uygun olan hücreleri içerdiğinden kaynaklanır. Çünkü

meristematik olan bölgeler sürekli olarak bölünebilme yeteneğine sahip olan hücrelerden oluşmaktadır. Kök ucu hücreler testinin de bir parçası olan mitoz bölünme analizi herhangi bir mutajenik ajanın belirlenmesinde mitoz bölünmenin tüm safhalarının detaylı olarak incelenmesini içermektedir. Profaz, metafaz, anafaz ve telefoz safhaları sırasında kromozomların davranışları ya da yapısal değişiklikleri mutajenik ajanın etkisinin ortaya çıkarmaktadır [92]. Pek çok bitki çeşitleri, (*Crepis capillaris*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum*, *Tradescantia sp.*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Lycopersicum aesculentum*, *Arabidopsis thaliana* ve *Allium cepa*) kimyasalların sitotoksik etkilerini belirlemek için en çok tercih edilen bitkilerdir [95].

Çalışmamızla birlikte Penoksulam'ın *Allium cepa* kök meristematik hücrelerine gösterdiği sitotoksik etkileri *Allium* test ile tespit edilmiştir. *Allium* büyüme engelleme testi uygulanarak Penoksulam'ın EC₅₀ değeri sonuçlarda 25µg/L (Büyüme oranı %49,25) olarak tespit edilmiştir. Penoksulam'ın diğer konsantrasyonları da ortalama kök uzunluğunu istatistiksel olarak azaltmış ve kök büyüme değerlerinde doza bağlı bir azalma görülmüştür (r=-0,982 p=0,01). Genellikle, kök uzamasının engellenmesi meristematik aktivite ve farklılaşma esnasında hücre uzamasıyla alakalıdır [96]. Literatürde bulunan diğer bazı EC₅₀ sonuçları ise *Oreochromis niloticus*'de 96 saat 8,948 mg/L [97], *Eisenia andrei* 80,6 mg a.i. kg⁻¹ [97] *Hoplobatrachus chinensis* (24, 48, 72) ,*Lithobates catesbeianus* (96 saat) 1,74, 1,45, 1,29, and 7,52 mg/L [98- 99] *Mytilus galloprovincialis* (30 günlük uygulama sonrasında) 0,72 µg/L [100] *Scirpus validus Vahl.*, (66 gün) 12 µg/L [5] *Paspalidium geminatum*, *Panicum hemitomom*, *Pontederia cordata* L., *Sagittaria lancifolia* L., 64, 630, 51 ve 23 µg/L [5] şeklinde bulunmuştur.

Penoksulam'ın EC₅₀ değerinin uygulanacak dozlarını tespit etmek için EC₅₀ değerinin, 2xEC₅₀, EC₅₀ ve 1/2xEC₅₀ dozları hesaplanılmıştır. Buna bağlı olarak 12,5 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L'lik konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak safasu, pozitif kontrol grubu olarak ise MMS uygulanmıştır. *A. cepa* hücre siklusunu 24 saat de bir tamamlayabildiği için uygulama süreleri 24-96 saat şeklinde belirlenmiştir [60, 64, 89, 101].

Çizelge 5.3' de Penoksulam'ın mitotik indeks üzerine frekanslarına bakıldığında 24-96 saatlik uygulama ve doza bağımlı bir şekilde mitotik indekste azalma görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Penoksulam'ın, *Allium cepa*'nın kök meristematik hücrelerinde Mİ ve mitotik fazlar üzerinde değişik şekillerde etkilemiştir. Mitotik indeksin

en düşük olduğu doz 96 saatlik uygulamada 50 µg/L olup %48,62±0,95d' dir. Profaz frekansı 24 ve 48 saatlik uygulamalar içerisinde artış ve azalışlar gösterirken, 72 ve 96 saatlik uygulamalarda hemen hemen aynı sonuçları vermektedir, en düşük profaz frekansı 24 saatlik uygulamanın 25 µg/L derişiminde (%84,6±0,37) rastlanılmış ve kontrol grubuna göre azalmıştır. Metafaz frekansında 48 saatlik uygulamanın kontrol grubuna oranla diğer derişimlerinde mitotik indeksinde azalma görülmüş, en düşük metafaz frekansı 48 saatlik uygulamanın 50 µg/L (%1,63±0,19) derişiminde rastlanılmıştır.

Penoksulam'ın anafaz frekansı 24 saatlik kontrol grubuna oranla artış gösterirken, 48, 72, 96 saatlik uygulamalarda kontrol grubuna oranla azalmıştır. Penoksulam'ın enayüksek telofaz frekansına 24 saatlik uygulamanın 25 µg/L derişiminde (%10,33±0,35) rastlanışken en düşük telofaz frekansı ise 48 saatliğin 50 µg/L derişiminde (6,7±0,62) rastlanılmıştır.

İncelenen maddenin hücreler üzerindeki mitotik indeks oranını düşürmesi maddenin mitodepresif etki yarattığını ortaya koymaktadır. Madde, interfaz evresine giren hücre yoğunluğunu azaltıp hücre döngüsünün olağan mekanizmasına zarar vermektedir. Mitotik indeks oranında artma ya da azalma, çevresel biyolojik çalışmalarda sitotoksiste de kullanılmaktadır. İncelenen maddenin hücreler üzerindeki mitotik indeksteki azalmanın nedenleri DNA sentezinin inhibisyonu nedeniyle, G₂ fazından mitoza geçişinin engellenmesiyle [96], kimyasalların mitodepresif etkisiyle [102], enerji üretiminin engellenmesi ve ATP üretiminin azalmasıyla, hücre döngüsünün durdurulmasıyla DNA polimeraz ve çeşitli görev yapan enzim proteinlerin incelenmiş madde için hedefi inhibe edilmiştir. Bu olay antimitotik etki olarak tanımlanır. Mitotik indeks düşüşü, test edilen maddenin mitodepresif bir etkiye sahip olduğunu gösterir. Test maddesi, geçen hücrelerin sayısını azaltarak hücre döngüsünün normal çalışmasını engeller. Mitotik aktivitenin azaltılması, S-faz DNA sentezinin inhibe edilmesiyle de oluşur [103, 104].

Penoksulam'ın neden olduğu anomalikler, kalgın kromozom yapısı, anafaz telofaz bozukluğu, yapışkanlık, anafaz köprüsü, poliploididir. Çizelge 5.4' de baktığımızda Penoksulam'ın neden olduğu toplam anomalilerin en çok olduğu derişim 96 saatlik uygulamanın 50 µg/L'lik derişiminde (14±1) görülmektedir. Anafaz köprüsü oluşumu 48 saatlik uygulamanın 25 µg/L'lik derişiminde ve 96 saatlik süreçte 12,5 µg/L'lik derişiminde en büyük hasar derecesini göstermiştir. Anafaz köprülerinin oluşum nedenleri arasında, uygulanan kimyasalların klastojenik etkisi ile kromozom kırıkları veya füzyonu, kardeş

kromatit değişimi, disentrik kromozom nedeniyle, replikasyon enzim aktivasyonundaki değişikliklerden ya da yapışkanlıktan oluştuğu bilinmektedir [83]. Yapışkanlık frekansı en fazla 96 saatlik süreçte 12,5 µg/L'lik derişiminde görülmüştür.

Yapışkanlık, kromozomların kısalması ve yoğunlaşması ve DNA'nın depolimerizasyonu ve nükleoproteinlerin normalden az çözünmesinden ya da kromatin liflerinin ekstra kromozomal ile iç içe geçmesi nedeniyle olabilir. Yapışkanlık durumu DNA-DNA veya DNA-protein çapraz bağlanmalarına sebep olur. Muhtemel olarak yapışkanlık, teste tabi tutulan maddenin toksik olduğunu göstermesi açısından büyük bir öncül olmasıyla birlikte anormalliğin hücrenin ölümüne neden olduğuda düşündürmektedir [95, 105]. Anafaz telofaz bozukluğu 72 ve 96 saatlik uygulamanın 50 µg/L'lik derişiminde hasar seviyesi en yüksek boyuta ulaşmıştır. Anafaz-telofaz bozukluğu ve kalgın oluşumu nedeni ise kutuplara doğru giden kromozomların başaramamasıyla, iç yapısının deformasyonu nedeniyle veya bozulmuş mikrotübüllerden dolayı oluşuyor olabilir [105, 106]. Kalgın kromozom yapısı 24 saatlik süreçte 12,5 µg/L'lik derişiminde ve 96 saatlik uygulamanın 50 µg/L'lik derişiminde en yüksek hasar frekansını göstermiştir. Kalgın kromozomların, kromozomların kutuplara hareket etmesiyle ya da asentrik parçalar nedeniyle oluşması durumunda MN oluşumu gerçekteşebilmektedir [107]. Poliploidi hücreler fragmoplastın eksikliğinden kaynaklanabilir [108]. Çalışmamızdan farklı olarak Penoksulam, Chinese hamster yumurta hücrelerinde, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, rat lenfositlerinde ve fare kemik iliği hücrelerinde genotoksik etki göstermemiştir [109].

Penoksulam'ın genotoksik etkileri Komet test ile belirlenmiş olup, uygulanan test, kolay, hızlı, çok yönlü, basit, hassas ve maliyeti düşüktür [79], DNA hasarlarından, DNA çapraz bağlantıları ve oksidatif DNA hasarı gibi lezyonlar, özel DNA tamir enzimleri kullanılarak Komet testiyle belirlenebilir. Farklı olarak *Alium cepa* kök hücreleri Komet testinde de kullanılmaktadır [7, 67, 90, 110, 111]. *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde Penoksulam'ın, DNA hasarı Komet testi ile 24-96 saat arasında değerlendirilmiştir (Çizelge 5.5). Hücrelerde hasar değerleri doza ve zamana bağlı olarak artış göstermiş, en büyük hasar değeri 96 saatlik uygulamanın 50 µg/L'lik derişiminde görülmüş olup, en az hasar seviyesi 12,5 µg/L'lik derişimin 24 saat uygulama da tespit edilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Literatürde yapılan diğer bir çalışmada Penoksulam, 15 ve 30 gün sonra *Mytilus galloprovincialis*'in hemositlerinde comet assay ile ROS üretiminin ve

DNA hasarının indüklenmesine neden olduğunu saptamışlardır [111]. Penoksulam ayrıca *Oryza sativa*'da [112] *Oreochromis niloticus* [113] *Rhamdia sp.* ve *Cyprinus carpio*'da oksidatif strese neden olmuştur [114].

Penoksulamın *A. cepa* kök hücrelerinde LC-MS/MS ile kantitatif analizi Çizelge 5.6' da görüldüğü üzere, en çok Penoksulam miktar 96 saatlik uygulamanın 50 µg/L'sinde olup süreye ve zamana bağlı olarak artış göstermiştir. 24, 48, 72 saatlik uygulamalarda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, Penoksulam *A. cepa* kök ucu meristematik hücrelerinde sitotoksik aktivitesi sebebiyle mitotik indekste bir azalmaya neden olmuş ve KA' larda ve DNA hasarında ise artışa neden olarak genotoksik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir. *A. cepa* üzerinde absorpsiyon miktarı tayin edilmiş olup ve birçok tarım ürünlerini, hastalıklardan, yabancı ot popülasyonundan ve zararlarından koruyabilmek, kaliteli ürün kullanımı, kullanılan kimyasalların da dikkat ederek gerekli derişimlerde uygulanması gerekir ve başka moleküler test sistemleri ile de araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- [1] Turabi, M.S., 2007, “Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması”, *Tarım İlaçları Kongre ve Sergisi*, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası ve TMMOB Kimya Mühendisleri Odası Bildiriler Kitabı, Ankara, 50-61.
- [2] Dağ, S., 2000, “Türkiye' de Tarım İlaçları Endüstrisi ve Geleceği”, *V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi Bildirileri 2. Cilt*, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, 933-958.
- [3] Öncüler, C., 1995, “Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları” İzmir, 5-12.
- [4] Uysal, B., 2011, “Yabancı Otların Herbisitlere Dayanıklılığı”, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki koruma Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Semineri*, Tokat, 10-21.
- [5] Koschnick, T. J., Netherland, M. D., Haller, W. T., 2007, “Effects of three ALS-inhibitors on five emergent native plant species in Florida”, *J. Aquat. Plant. Manage.*, 45: 47–51.
- [6] Rahman, M. M., Rahman, M. F. And Nasirujjaman, K., 2017, “A study on genotoxicity of textile dyeing industry effluents from Rajshahi, Bangladesh, by the *Allium cepa* test”, *Chem. Ecol.*, 33 (5): 434-446.
- [7] Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E. D. And Plewa, M. J., 2009, “The use of higher plants in the Comet assay”, A. Dhawan, D. Anderson (Eds.), *The Comet Assay in Toxicology. Roy. Soc. Chem.*, United Kingdom, 98–119.
- [8] Kaygisiz, Ş. Y., Ciğerci, İ. H., 2017, “Genotoxic evaluation of different sizes of iron oxide nanoparticles and ionic form by SMART, *Allium* and comet assay”, *Toxicol. Ind. Health*, 33 (10): 802-809.
- [9] Harte, J., Holdren, C., Schneider, C. and Shirley, C., 1991, “Toxics A to Z, A guide to everyday pollution hazards” *University of California Press*, United States, 2-35.
- [10] Durmuşoğlu, E ., Tiryaki, O., Canhilal, R., 2010, “Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları”, *VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Bildiriler Kitabı, Ankara, 2: 589-607.

- [11] Führ, F., 1982, "Fate of herbicide chemicals in agricultural environment with particular emphasis on the application of nuclear techniques", *Agrochemicals Fate in Food and Environment*, Vienna, IAEA, 99-111.
- [12] Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., 1997, "Pestisitler", *Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi* Ankara, 52: 15-17.
- [13] USEPA, Pesticide Industry Sales and Usage, 1987 Market Estimation, EPA Office, *Washington DC*, 1-34.
- [14] Koren, H., Bisesi, M., 1996, "Handbook of Environmental Health and Safety", Lewis Publishers, *Florida*, United States, 83-95.
- [15] Führ, F., 1991, "Radiotracers in pesticide studies - Advantages and limitations", *Cience e Cultura*, 43:3, 211-216.
- [16] Tunçbilek, A. Ş., Ayvaz, A., Saatçi, E., 1998, "Pestisitlerin Çevreye Etkisi ve Yayılma Yolları", *Kayseri I. Atık Sempozyumu*, Kayseri, 316-325.
- [17] Sevim, R., 2011, "Toksikoloji Pestisitler", *Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü*, Antalya, 7-10.
- [18] Yavuz, O., Şanlı, Y., 1999, "Halk Sağlığı ve Vektör Kontrolünde Kullanılan Pestisidler, Pestisid Formülasyonları ve Uygulama Seçenekleri", *I. Seminer Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri*, Ankara, 10-98.
- [19] O'Brien R. D., 1974, "Insecticides -Action and Metabolism", *Academic Press Inc*, London, 332.
- [20] Sogorb, M. A., 2002, Vilanova, E., 2002, "Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis", *Toxicol. Lett*, 128: 215-8.
- [21] Ünal, G., Gürkan, M. O., 2001, "İnsektisitler kimyasal yapıları, toksikolojileri ve ekotoksikolojileri", Ankara, 159.
- [22] Zlotkin, E., 1999, "The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides", *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 429-55.
- [23] Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., Weiner, M. L., 2002, "Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment", *Toxicol.*, 171: 3-59.

- [24] Finizio, A., Calliera, M., Vighi, M., 2001 “Rating systems for pesticide risk classification on different ecosystems”, *Ecotoxicol. Environ.*, 49:262-74.
- [25] Topbas, M. T., Brohi, A. R., Karaman, M. R., 1998, “Çevre kirliligi, T.C. Çevre Bakanlığı Yayınları”, Ankara.
- [26] Whitcomb, C. E., 1999, “An introduction to ALS-inhibiting herbicides”, *Toxicol. Ind. Health*, 15: 232-240.
- [27] Anonim, 2003, “The e-Pesticide Manual. Ver 3.0, 13. Edition (British Crop Protection Council)”, ISBN 1901396347.
- [28] USEPA 2007, EFED Ecological Risk Assessment for the Proposed New Uses of the Chemical Penoxsulam on Turf and Aquatic Weeds.
- [29] California Environmental Protection Agency, 2005, Department of Pesticide Regulation, Medical Toxicology Branch, Summary of Toxicology Data: Penoxsulam, Document Processing Number 52967.
- [30] True Sarah, L., Richardson, R. J., Hipkins, P. L., & Gardner, A. P., 2010, “Efficacy of selected aquatic herbicides on common reed”, *J. Aquat. Plant Manage.*, 48: 121-123.
- [31] USEPA, 2004, Pesticide Fact Sheet. USEPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7501C).
- [32] Roberts, D. W., Knuteson, J. A., Jackson, R., 2003, “The dissipation of penoxsulam in flooded rice fields”, *Pesticides in Air, Plant, Soil & Water Systems, XII Symposium Pesticide Chemistry*, Piacenza, Italy, 349-357.
- [33] Glomski Leann, M., Netherland, M. D., 2009, “Efficacy of fluridone, penoxsulam, and bispyribac-sodium on variable-leaf milfoil”, *J. Aquat. Plant Manage.*, 46:193-196.
- [34] EPA, 1999, Fiscal year 1999 work plan, USEPA, 4.
- [35] Gullino, M. L., and L. A. M., Kuijpers, 1994, “Social and political implication of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe”, *Annu. Rev. Phytopath.*, 32: 559-579.
- [36] Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S., 2010, "Tarım İlaçları Kullanımı Ve Riskleri", *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Kayseri 26(2): 154-169.

- [37] Vural N., 1984, ‘‘Toksikoloji’’, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:56.
- [38] Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güngör, N., Gürcan, A., Turgut, C., Burçak, A., 2005, ‘‘Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı Ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları’’, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre*, Ankara.
- [39] Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013, ‘‘Pesticides and Human Chronic Diseases; Evidences, Mechanisms, and Perspective’’, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Tehran University of Medical Sciences, *Tehran*, Iran, 268:(2), 157-177.
- [40] Çoğulu, Ö., Alpman, A., Durmaz, B., Özkınay, F., 2007, ‘‘Turkiye Klinikleri, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Genetik ve Teratoloji BD’’, *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi*, İzmir, 2-15.
- [41] Wittmann, T., Hyman, A., Desai, A., 2001, ‘‘The spindle: A dynamic assembly of microtubules and motors’’, *Nat. Cell. Biol.*, 3:28-34.
- [42] Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N., 2003, ‘‘The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer’’, *Cell Prolif*, 36: 131- 49.
- [43] Guimaras, C. A., Linden, R., 2004, ‘‘Apoptosis and alternative deastyles’’, *Eur. J. Biochem.*, 271: 1638-50.
- [44] Zong, W. X., Thompson, C. B., 2006 , ‘‘Necrotic death as a cell fate?’’, *Genes. Dev.*, 20: 1-15.
- [45] Bellamy, C. O. C., 1996, ‘‘p53 and apoptosis’’, *Br. Med. Bull.*, 53(3): 522-38.
- [46] Devita Jr, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 1997, ‘‘Cancer: principles and practice of oncolgy’’, 5th eds., Lippincott-Raven, *Philadelphia*, Pennsylvania, 100.
- [47] Vermeulen, K., Berneman, Z. N., Van Bockstaele, D. R., 2003, ‘‘Cell cycle and apoptosis’’, *Cell. Prolif.*, 36: 165-75.
- [48] Öndağ, H., Cabadak H., 1987, ‘‘İnsan periferel kan ve fibroblast hücre kültürlerinin sinkronizasyonu ve sinkronize hücre kültürlerinden kromozom analizi ve karyotip hazırlanması’’, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı*, Ankara, 51-61.

- [49] Nigg, E. A., 2001, “Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints”, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2:21-32.
- [50] Giménez-Abián, J. F., Clarke, D. J., Mullinger, A.M., Downes, C. S., Johnson, R. T. A., 1995, “Postprophase topoisomerase II- dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes”, *J. Cell. Biol.*, 131:7-17.
- [51] Rieder, C. L., Salmon, E. D., 1998, “The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis”, *Trends Cell Biol.*, 8:310- 8.
- [52] Desai, A., Maddox, P. S., Mitchison, T. J., Salmon, E. D., 1998, “Anaphase A chromosome movement and poleward spindle microtubule flux occur at similar rates in *Xenopus* extract spindles”, *J. Cell. Biol.*, 141:703-13.
- [53] Cande, W. Z., Hogan, C. J., 1989, “The mechanism of anaphase spindle elongation”, *Bioessays*, 11:5-9.
- [54] Glotzer, M., 1997, “The mechanism and control of cytokinesis”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9:815-23.
- [55] Yirmibeş Karaoğuz, M., 2007, “İnsandaki genetik hastalıklar”, *MİSED Türk Eczacılar Birliği Yayını/Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*, 5-20.
- [56] Robert, L., Nussbaum Roderick R., Mc Innes, Huntington, F., Willard, H. F., 2005, “Thompson ve Thompson Tıbbi Genetik”, *Ankara Güneş Kitabevi*, Ankara, 6. Baskı, 17–32, 135–155, 157–178.
- [57] Edward, S., Tobias Connor, M., Ferguson-Smith, M., 2014, “Tıbbi Genetiğin Esasları”, Çeviri editörü: Özbek, U., *İstanbul Tıp Kitabevi*, İstanbul, 1. baskı 14–17, 24–39, 58–71, 90–114.
- [58] <https://www.genome.gov/>
- [59] Dunnen, J. T., Antonarakis, S. E., 2000, “Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations”, *Hum. Mutat.*, 15:7-12.
- [60] Alberts, B., Jonson, A., Lewis, J., 2002, “Molecular Biology of the Cell” 4th edition, *Garland Science*, New York, 50-136.
- [61] Alqallaf, A. K., Alkoot, F. M., Aldabbous, M. S., 2013, “Recent Advances in Autism Spectrum Disorders”, (chapter 16: Discovering the Genetics of Autism), Volume I, Fitzgerald, M., (Ed.), ISBN: 978–953–51-1021–7, In Tech, 341–358.

- [62] Butler, M. G., Bittel, D., Talebizadeh, Z., Prader, W., 2002, “Syndrome and a deletion/duplication within the 15q11-q13 region”, *J. Med. Genet.* 39: 202-204.
- [63] Başaran, A., Başaran, N., Solak, M. and Güneş, H., 1995, “Tıbbi Biyoloji ve Genetik”, *Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları*, Eskişehir, 117-123.
- [64] Yüzbaşıoğlu, D., 2001, “Illoxan ve Racer herbisitlerinin *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitoz bölünmeye ve kromozomlara etkileri”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 25-27.
- [65] Levan, A., 1938, “The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*”, *Hereditas*, 24 (4): 471-486.
- [66] Mauro, M. O., Pesarini, J. R., Marin-Morales, M. A., Monreal, M. T. F. D., Monreal, A. C. D., Mantovani, M. S. And Oliveira, R. J., 2014, “Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture”, *Genet. Mol. Res.*, 13 (3): 4808-4819.
- [67] Liman, R., 2013, “Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay”, *Chemosphere*, 93 (2): 269-273.
- [68] Fiskesjö, G., 1995, “In Vitro Toxicity Testing Protocols: Methods in Molecular Biology”, Volume 43, 2: 119-127.
- [69] Antosiewicz, D., 1990, “Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Ledakrin”, *Folia Histochem. Cyto.*, 28 (1-2): 79-95.
- [70] Fairbain D. W., Olive P. L., O’Neill, K. L., 1995, “The Comet Assay: A Comprehensive Review” *Mutation. Res.*, 339: 37-59.
- [71] Ostling, O., Johanson, K. J., 1984, “Microelectrophoretic Study Of Radiation Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells” *Biochem. Res. Com.*, 123: 291-298.
- [72] Ertürk, Ş., 2001, “Sevofluranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening Ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi”, Uzmanlık Tezi, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı*, Ankara, 50.
- [73] Ünal, Y., 1998, “Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının COMET assay tekniği ile araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Entitüsü*, Ankara, 2-18.

- [74] Tice R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. 2000, "Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing" *Environ. Molecul. Muta.*, 35:206- 221.
- [75] Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells" *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- [76] Horoz, M., Bolukbas, C., Bolukbas, F., Kocyigit, A., Aslan M., Koylu A. O., Gumus M., Celik, H., Koksall M., 2006, "Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection Mutation" *Res. Molecul. Mec. Mut.*, Volume 596, Issues 1-2, 137-142.
- [77] Giovannelli, L., Pitozzi, V., Riolo, S., Dolara, P., 2003, "Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay" *Mut. Res.*, 538 71-80.
- [78] Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H., Erel, O., 2005, "Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis Mutation" *Res. Molecul. Mec. Mut.*, Volume 585, Issues 1-2, 71-78.
- [79] Dhawan, A., Bajpayee, M. And Parmar, D., 2009, "Comet assay: a reliable tool for the assesment of DNA damage in different models", *Cell Biol. Toxicol.*, 25 (1): 5-32.
- [80] Koçyiğit, A., Dikilitaş, M., 2010, "Canlılarda Tek Hücre Jel Elektroferez yöntemi ile DNA hasar analizi", Comet analiz yöntemi, *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, Şanlıurfa, 14 (2): 77-89.
- [81] Topaktaş, M., And Rencüzoğulları, E., 2010, "Sitogenetik", *Nobel Yayın Dağıtım, Tür. Çev. Sor. Vakfı*, Ankara, 87-91.
- [82] Leme, D. M., And Marin-Morales, M. A., 2009, "Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application", *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.*, 682 (1): 71-81.
- [83] Saxena, P. N., Chauhan, L. K. S. And Gupta, S. K., 2005, "Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of Allium sativum: spectroscopic basis of chromosome damage" *Toxicol.*, 216 (2-3): 244-252.
- [84] Liman, R, Ciğerci, İ. H., Gökçe, S., 2018, "Cytogenetic and genotoxic effects of rosmarinic acid on Allium cepa L. root meristem cells", *Food Chem. Toxicol.*, 121: 444-449.

- [85] Farooqi, I. H., Basheer, F. And Ahmad, T., 2008, “Studies on biodegradation of phenols and m-Cresols by Upflow Anaerobik sludge Blanket and Aerobik Sequential Batch Reactor”, *Global NEST J.*, 10 (1): 39-46.
- [86] Raju, B., Ramesh, M., Srinivas, R., Raju, S. S., Venkateswarlu, Y., 2011 “Identification and characterization of stressed degradation products of prulifloxacin using LC-ESI-MS/Q-TOF, MSn experiments: Development of a validated specific stability-indicating LC-MS method”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 56, 560.
- [87] Edgar, C., Nicolas, T., Scholz, H., 1998 “Active Drug Substance Impurity Profiling Part II. LC MS/MS Fingerprinting”, *J. Pharmaceutic. Biomedical Analysis*, 16: 825-836.
- [88] Michelle, W., Marleen, L., Nele, S., Maria, M. R. F., Ernst A. B., Robert A. A. M., Gert D. B., 2006, “Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in forensic science”, *J. Chrom.*, 1130: 3-15.
- [89] Liman, R., Akyıl, D., Eren, Y. And Konuk, M., 2010, “Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* Test”, *Chemosphere*, 80 (9): 1056–1061.
- [90] Liman, R., Ciğerci, İ. H., Akyıl, D., Eren, Y. And Konuk, M., 2011, “Determination of genotoxicity of fenaminosulf by *Allium* and Comet Tests”, *Pestic. Biochem. Phys.*, 99 (1): 61-64.
- [91] Liman, R., Gökçe, U. G., Akyıl, D., Eren, Y. And Konuk, M., 2012, “Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *Genistifolia*”, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22 (3): 541-548.
- [92] İlhan, D., 2008, “*Tradescantia pallida* H., *Allium cepa* L., *Vicia faba* L., bitkilerinde bazı genotoksik bileşiklerin genetiksel etkilerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Çanakkale, 1-25.
- [93] İlhan, D., Aki, C., 2009, “Evaluation of Genetic Effects of Some Genotoxic Compounds in *Tradescantia pallida* H. with Micronucleus and Stamen-Hair Mutation Test”, *Fresenius Environmental Bulletin*, Vol.18, 10: 1828-1831.
- [94] İlhan, D., Aki, C., 2010, “Mutagenicity of Sunset Yellow and Brilliant Black in *Vicia faba* L. and *Allium cepa* L.”, *Fresenius Environmental Bulletin*, Vol.19, 5: 769-772.
- [95] Al-Momani, F., 2003, “Combination of photo-oxidation processes with biological treatment”, Doktora Tezi, *Barselona Üniversitesi Kimya Fakültesi*, İtalya, 45-55.

- [96] Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., Dumas-Gaudot, E. And Berta, G., 2006, "Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings", *Env. Exp. Bot.*, 58 (1-3): 253-260.
- [97] Marques, C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2009, "Using earthworm avoidance behavior to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils", *J. Soil, Sediments*, 9(2): 137-147.
- [98] Wei, L., Shao, W. W., Ding, G. H., Fan, X. L., Yu, M. L., Lin, Z. H., 2014, "Acute and joint toxicity of three agrochemicals to chinese tiger frog (*Hoplobatrachus chinensis*) tadpoles", *Zoo. Res.*, 35(4): 272-279.
- [99] França, F. M., De Paiva, T. C., Marcantônio, A. S., Teixeira, P. C., Ferreira, C. M., 2015, "Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles", *J. Environ. Sci. Heal.*, 50(6): 406-410.
- [100] Patetsini, E., Dimitriadis, V. K., Kaloyianni, M., 2013, "Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and Penoxsulam", *Aquat. Toxicol.*, 126: 338-345.
- [101] Antonopoulou, M., Vlastos, D. And Konstantinou, I., 2015, "Photocatalytic degradation of pentachlorophenol by N-F-TiO₂: identification of intermediates, mechanism involved, genotoxicity and ecotoxicity evaluation", *Photochem. Photobiol. Sci.* 14 (3): 520–527.
- [102] De Araujo, B. S., Dec, J., Bollag, J. M., And Pletsch, M., 2006, "Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*", *Chemosphere*, 63 (4): 642-651.
- [103] Vlastos, D., Antonopoulou, M. And Konstantinou, I., 2016, "Evaluation of toxicity and genotoxicity of 2-chlorophenol on bacteria, fish and human cells", *Sci. Total Environ.*, 551, 649-655.
- [104] Jennings, V. L., Rayner-Brandes, M. H. And Bird, D. J., 2001, "Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems Victor", *Water Res.*, 35 (14): 3448–3456.
- [105] Cernakova, M., Kostalova, D., 2002, "Antimicrobial activity of berberine-A constituent of *Mahonia aquifolium*", *Folia. Microbiol.*, 47: 375-8.
- [106] Ousaa, A., Elidrissi, B., Ghamali, M., Chtita, S., Bouachrine, M. And Lakhlifi, T., 2014, "Acute toxicity of halogenated phenols: Combining DFT and QSAR studies", *J. Comput. Methods Mol. Des.*, 4 (3): 10-18.

- [107] Yang, Y., Liu, Z., Zheng, M., Fang, Z., Wang, L., Sun, W. And Ren, J., 2009, “The joint toxicity in juvenile *Carassius auratus* exposed to 2-chlorophenol and 2, 4-dichlorophenol”, *Fresen. Environ. Bull.*, 18 (1): 21-25.
- [108] Vidakovivé-Cifrek, Z., Pavlica, M., Regula, I. and Papers, D., 2002, “Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry High-Density Brines”, *Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 284-291.
- [109] Billington, R., Gehen, S. C., Hanley, T. R., 2010, “Toxicology of triazolopyrimidine herbicides”, In: Krieger R (ed) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicolog. *Academic Press*, United States, 1865-1885.
- [110] Patnaik, A. R., Achary, V. M. M. And Panda, B. B., 2013, “Chromium (VI)-induced hormesis and genotoxicity are mediated through oxidative stress in root cells of *Allium cepa* L.”, *Plant Growth Regul.*, 71 (2): 157-170.
- [111] Pakrashi, S., Jain, N., Dalai, S., Jayakumar, J., Chandrasekaran, P. T., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N. And Mukherjee, A., 2014, “*In Vivo* Genotoxicity Assessment of Titanium Dioxide Nanoparticles by *Allium cepa* Root Tip Assay at High Exposure Concentrations”, *PloS one* 9 (2): e87789.
- [112] Nohatto, M. A., Agostinetto, D., Langaro, A. C., Oliveira, C. D., Ruchel, Q., 2016, “Antioxidant activity of rice plants sprayed with herbicides”, *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46(1): 28-34.
- [113] Galal, A. A., Reda, R. M., Mohamed, A. A. R., 2018, “Influences of *Chlorella vulgaris* dietary supplementation on growth performance, hematology, immune response and disease resistance in *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of Penoxsulam herbicide”, *Fish Shellfish Immun*, 77: 445-456.
- [114] Murussi, C. R., Thorstenberg, M. L., Leitemperger, J., Costa, M., Clasen, B., Santi, A., Menezes, C., Engers, V. K., Loro, V. L., 2014, “Toxic effects of Penoxsulam herbicide in two fish species reared in southern Brazil”, *Environ. Contam. Toxicol.*, 92(1): 81-84.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Seçil ÖZKAN

Uyruğu: T.C.

Doğum tarihi ve yeri: 14.06.1995/ İZMİR

Medeni hali: Bekar

E-mail: secilozkan52@gmail.com

İş Deneyimi:

Uşak Üniversitesi: Kısmi Zamanlı Öğrenci 2013- 2014

Genosis Biyoteknoloji Ltd.Şti: Satış Sorumlusu 2018- halen

Eğitim:

Yüksek Lisans: Uşak Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik- halen

Lisans: Uşak Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik 2017

Lise: İzmir, Menemen Haldun Koşay Anadolu Lisesi 2013

Yabancı Dil: İngilizce