

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

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**2- KLOROFENOL'ÜN ALLİUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DERYA KÜÇÜK

TEMMUZ 2018

UŞAK

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

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**2- KLOROFENOL'ÜN ALLİUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DERYA KÜÇÜK

UŞAK 2018

Kabul ve Onay Sayfası

Derya KÜÇÜK tarafından hazırlanan “**2-Klorofenol’ün *Allium cepa* L. Kök Meristem Hücreleri Üzerine Sitogenetik ve Genotoksik Etkileri**” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Recep LİMAN

Tez Danışmanı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Doç. Dr. Recep LİMAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Uşak Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Funda KARABAĞ ÇOBAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Tarih: 10/07/2018

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

Prof. Dr. İsa YEŞİLYURT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Derya KÜÇÜK



2-KLOROFENOL'ÜN ALLIUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Derya KÜÇÜK

UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2018

ÖZET

Organik kirleticilerden biri olan 2-Klorofenol (2-KF) yüksek klorlu bileşiklerin sentezinde, bazı boyalarda, koruyucularda, herbisitlerde, fungusitlerde ve plastiklerin sentezinde ara ürün olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, 2-KF'nin sitotoksik ve genotoksik etkileri *Allium cepa* kök meristematik hücrelerinde kök büyümesi, mitotik indeks (MI), kromozomal anormallik (KA)'ler ve DNA hasarı üzerindeki etkileri *Allium* anafaz-telofaz ve Komet testleri kullanılarak araştırılmıştır. 2-KF'nin EC₅₀ değeri *Allium* kök büyümesini engelleme testi ile yaklaşık olarak 25 ppm belirlenmiştir. 2-KF'nin üç konsantrasyonu (12,5, 25 ve 50 ppm), saf su (negatif kontrol) ve metil metan sülfonat (MMS, 10 ppm, pozitif kontrol) soğan kök hücrelerine farklı zamanlarda (24, 48, 72 ve 96 saat) uygulanmıştır. 2-KF'nin tüm konsantrasyonları mitotik indekste (MI) hafif bir şekilde azalmaya neden olmuştur. 2-KF toplam KA'ları (bozulmuş anafaz telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık ve anafaz köprüsü) ve DNA hasarını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttırmıştır. Bu sonuçlar 2-KF'nin *A. cepa* kök meristematik hücreleri üzerinde genotoksik etki oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Bilim Kodu:

Anahtar Kelimeler: 2-Klorofenol, *Allium cepa*, Genotoksisite, Toksisite, Komet Testi

Sayfa Adedi: 84

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Recep LİMAN

**CYTOGENETIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF 2-CHLOROPHENOL ON
ALLIUM CEPA L. ROOT MERISTEM CELLS**

(M.Sc. Thesis)

Derya KÜÇÜK

UNIVERSITY OF USAK

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2018

ABSTRACT

2-Chlorophenol (2-CP), an organic pollutant, is used as intermediate in the synthesis of the higher chlorinated congeners, certain dyes, preservatives, herbicides, fungicides and plastics. In this study, cytotoxic and genotoxic effects of 2-CP were investigated on the root meristem cells of *Allium cepa* for its effects on root growth, mitotic index (MI), mitotic phases, chromosomal abnormalities (CAs) and DNA damage by using Allium anaphase-telophase and Comet assays. EC₅₀ of 2-CP value was determined as approximately 25 ppm by Allium root growth inhibition test. Three concentrations of 2-CP (12,5, 25 and 50 ppm), distilled water (negative control) and methyl methane sulphonate (MMS, 10 ppm, positive control) were applied to onion stem cells under different exposure periods (24, 48, 72 and 96 h). All the applied doses of 2-CP slightly decreased MIs. 2-CP induced total CAs such as disturbed anaphase-telophase, chromosome laggards, stickiness and bridges and also DNA damage at significant levels. These results demonstrate that 2-CP has genotoxic effects in *A. cepa* root meristematic cells.

Science Code:

Keywords: 2-Chlorophenol, *Allium cepa*, Genotoxicity, Toxicity, Comet Assay

Number of Page: 84

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Recep LİMAN

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum araştırma boyunca yardımını esirgemeyen ve tez yazım aşamasındaki büyük katkılarından dolayı, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Recep LİMAN'a, çalışmam boyunca yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince her daim desteklerini gördüğüm Bermal BAŞBUĞ, Güller PİRDAL ve Seçil ÖZKAN'a çok teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ve bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 2017/TP027 numaralı proje ile Uşak Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

Derya KÜÇÜK
UŞAK, 2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	ix
RESİMLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Organik Kirlenmeler	2
2.1.1. Fenol ve Fenol Bileşikleri	3
2.1.1.1. Klorofenoller	5
3. GENEL BİLGİLER.....	8
3.1. Mitoz Bölünme	8
3.2. Kromozom Mutasyonları	13
3.2.1. Kromozom Sayı Değişiklikleri	13
3.2.2. Kromozom Yapı Değişiklikleri.....	16
3.3. DNA Hasarı	18
3.4. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Bazı Yöntemler	18
3.4.1. Salmonella/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi	18
3.4.2. Kromozomal Anormallik (KA) Testi.....	19
3.4.3. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi	21
3.4.4. Mikronükleus (MN) Testi	22
3.4.5. Allium Test.....	24
3.4.6. Tek Hücre Jel Elektroferez Yöntemi (Komet Testi).....	25
4. MATERYAL ve METOT	29
4.1. Materyal	29
4.1.1. Kullanılan Organizmalar	29
4.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	30

4.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	31
4.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	31
4.2. Metot.....	34
4.2.1. Allium Testi	34
4.2.1.1. Büyüme Engelleme Testi	34
4.2.1.2. Feulgen Tekniği İle Preparatların Hazırlanması.....	35
4.2.2. Komet Testi.....	36
4.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	37
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
5.1. Büyüme Engelleme Testi.....	38
5.2. 2-Klorofenol'ün Mitotik İndeks Üzerine Etkisi.....	40
5.3. 2-Klorofenol'ün Neden Olduğu Kromozomal Anormallikler	42
5.4. Allium Komet Testine Ait Bulgular	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Fenol'ün bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri	3
Çizelge 2.2. Endüstriyel atık sularında bulunan fenol miktarları	4
Çizelge 2.3. Bazı KF bileşiklerinin kimyasal yapıları.....	5
Çizelge 2.4. 2-KF'nin fiziksel ve kimyasal bazı özellikleri	7
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar	30
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve teçhizatlar	31
Çizelge 5.1. 2-FK'nin büyümeyi engelleme testi sonuçları	39
Çizelge 5.2. 2-KF'nin A. cepa kök hücrelerindeki mitoz bölünme üzerine etkisi	41
Çizelge 5.3. A. cepa kök meristematik hücrelerinde 2-KF'nin neden olduğu kromozomal anormallikler.....	44
Çizelge 5.4. 2-KF'nin A. cepa kök meristematik hücrelerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti.....	46

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Hücre siklusu.....	9
Şekil 3.2. Yapısal kromozom anomalilerin gösterimi	17
Şekil 3.3. Ames testinin uygulama aşamaları ve mutajeniteyi gösteren koloniler	19
Şekil 3.4. Metafaz hücrelerinden elde edilen kromozomal anormallikler.....	20
Şekil 3.5. Kardeş kromatid değişimi	21
Şekil 3.6. Kardeş kromatit değişiminin BrdU ile saptanması ve KKD içeren metafaz plakları.....	22
Şekil 3.7. Klastojenlerin ve anojenlerin etkisiyle uyarılan hücrelerdeki MN'ler.....	23
Şekil 3.8. Sitokinezin inhibe edilmesiyle MN bulunduran binükleer hücrenin oluşumu....	23
Şekil 3.9. Alkali Komet tekniğinde basamakların şematik gösterimi	26
Şekil 3.10. Farklı derecelerdeki DNA hasarınının mikroskop altındaki görüntüsü	27
Şekil 3.11. Komet testi ile farklı düzeylerde hasarlı DNA görüntüleri	28
Şekil 4.1. Allium cepa L. karyotipi	29

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Mitoz bölünme safhaları.....	12
Resim 4.1. %70'lik alkol içerisinde farklı süre ve dozlarda depolanan kökler.....	35
Resim 5.1. 2-KF'nin büyümeyi engelleme testi.....	38
Resim 5.2. 2-KF'ye maruz bırakılmış A. cepa kök hücrelerinde görülen anafaz-telofaz anormallikleri	45



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
cm	Santimetre
°C	Derece santigrat
EC₅₀	%50 etkili konsantrasyon (EC=Effective Concentration)
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
N	Normal
ppb	Milyarda bir kısım (Parts Per Billion=ng/mL) çözelti
ppm	Milyonda bir kısım (Parts Per Million µg/mL) çözelti
µm	Mikrometre
Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
KA	Kromozomal Anormallik
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
LMPA	Düşük Erime Noktalı Agaroz
MI	Mitotik İndeks
MMS	Metil Metan Sülfonat

MN	Mikronükleus
NMPA	Normal Erime Noktalı Agaroz
OCP	Organoklorlu Pestisit
PCP	Pentaklorofenol
USEPA	Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı
2-KF	2-Klorofenol
2,4-DKF	2,4-Diklorofenol
2,4,6-TKF	2,4,6-Triklorofenol
4-KF	4-Klorofenol



1. GİRİŞ

2-Klorofenol (2-KF), klorlu organik kirleticilerin bir sınıfı olup ahşap koruyucular, fungusitler, pestisitler, plastikler ve bazı boyaların sentezinde ara ürün olarak kullanılır [1-4]. Öncelikli organik kirleticiler listesinde yer alan 2-KF, fenollerin klorlanmasıyla oluşan bir dezenfeksiyon yan ürünü, fenoksi herbisitlerinin degradasyon ürünü ya da fenolik asitlerle hipokloridin reaksiyonunun sonucu olarak içme suyu, endüstriyel atıksular, yüzey ve yeraltı suları ile topraklarda da tespit edilmiştir [5-7]. 2-KF'nin içme suyundaki konsantrasyonu 0,04 ppm'den fazla olmamalıdır [8].

Çeşitli kimyasalların, su örneklerinin ve ekstraktların genotoksik etkileri hayvansal, bakteriyel ve bitkisel test sistemleri ile saptanabilmektedir. Bunlardan elde edilen sonuçlar materyalin genotoksitesine ilişkin bilgiler vermektedir. Sitogenetik bitki test sistemlerinden biri olan *Allium* testi, kimyasalların ve çevresel numunelerin hızlı bir şekilde taranması, toksisite ve genotoksisiteyi değerlendirmede hassas, basit ve ekonomik olmasından dolayı çok tercih edilmektedir. Ayrıca Birleşmiş Milletler Çevre Programı, Dünya Sağlık Örgütü ve Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından da onaylanmıştır. Bu test sisteminde makroskobik (EC_{50} büyüme) ve mikroskobik parametreler (büyük, kararlı kromozom sayısı ve c-mitoz, adezyonlar, kromozomal kırıkları gibi aberasyonlar) kolaylıkla değerlendirilebilir. *Allium* testi sonuçları diğer biyolojik test sistemleri ile de iyi korelasyon göstermektedir [9-15].

Yüksek yapılı bitkilerdeki Komet testi, basit, duyarlı, nispeten düşük maliyetli olması ve az sayıda hücreden güçlü sonuçlar elde edilebilmesinden dolayı kimyasal(lar)ın genotoksitesinin tespiti ve analizinde tek bir hücredeki DNA hasarının belirlenmesi için geliştirilmiş iyi bir tekniktir. *Allium* testindeki mitozdan bağımsız olarak *A. cepa* kök meristem hücreleri Komet testi ile DNA hasarını tespit etmek için kullanılmaktadır [16-22].

Bu çalışmada ile 2-Klorofenol'ün *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerine olan sitogenetik ve genotoksik etkileri *Allium* ana-telofaz ve Komet testi ile araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Organik Kirleticiler

Yirminci yüzyılın en önemli sorunlarından biri olan kirlilik, ekosistemde zararlara ve düzensizliklere sebep olarak canlıların olumsuz etkilenebileceği kirleticilerin, çevreye girişi ve doğal yaşam alanlarında fazla miktarda birikmesiyle tanımlanabilir. Dünya nüfusunun hızla artması, endüstrideki ilerleme ve kentsel yaşamla birlikte artan çevre kirliliği, endüstrideki hızlı değişimle beraber ortama salınan kirleticilerin oranını ve çeşidini de zamanla arttırmakta dolayısıyla bu da doğal yaşamı tehdit etmektedir. Çevre kirliliği canlı organizmalara ve üzerinde yaşadığı çevreye dolaylı ya da doğrudan zarar veren organik veya inorganik durumdaki kirletici maddelerin toprak, su ve havaya karışması şeklinde tanımlanabilir [23].

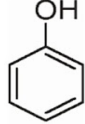
Organik ve inorganik yapıdaki bileşiklerin büyük bir çevresel probleme neden olmasındaki önemli pay ise insan aktivitelerinin sonucuna dayanmaktadır. Karsinojen, mutajen, toksik ve/veya kalıcı özellikteki kirleticiler sadece çevreyi değil beraberinde insan sağlığını ve tarımsal verimliliği de tehdit etmektedir. Bunlara halojenli hidrokarbonlar, toplam petrol hidrokarbonlar (TPH), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), metaller ve solventler örnek olarak gösterilebilir [24]. Bunların yanında poliklorlu bifeniller (PCB), klorlu fenoller (CP) ve organoklorlu pestisitlerde (OCP) suni bir şekilde oluşturulan ve toplumdaki günlük aktiviteler sonucu ortaya çıkan organik bileşiklerdir. Amerika Çevre Koruma Teşkilatı (USEPA) tarafından organik kirleticiler grubuna dâhil edilen PAH, PCB ve CP gibi bileşikler, kanserojen olmaları ve vücutta birikmelerinden dolayı çevre ve insan sağlığı açısından önemli bir tehlike oluşturmaktadır [25]. Kirleticiler bir kez sulu sistemlere girdikten sonra, besin zincirini yukarı kaldırarak daha yüksek besin basamaklarında ve hatta insanlarda beklenmedik etkilere neden olabilmektedir [26-28].

2.1.1. Fenol ve Fenol Bileşikleri

80'li yılların ardından dünya üzerinde endüstrinin değişimi ve ilerlemesinin hızlı bir şekilde olmasının zararlı etkilerine dikkat edilmemiştir. Endüstrideki bu ilerlemeyle beraber birinci sırada yer alan üretimin çevreye yaymış olduğu kirleticilerle, canlılar ve doğal yaşam üzerindeki etkileri düşünülmemiştir. Endüstriyel atıklardaki hızlı yükselişten sonra pek çok atık çeşidinde doyumluğa ulaşılmış ve etkileri görülmeye başlanmıştır. Fenol ve fenol türevleri insan sağlığını tehdit edici potansiyele sahip oldukları için tehlikeli kirletici sınıfında yer alırlar [29].

1867 yılında ilk kez cerrahi uygulama üzerinde dezenfektan olarak kullanılan fenoller, su içerisinde rastlanan çok düşük dozları bile tat ve koku sorunu oluşturduğu, buna karşılık yüksek dozlarda ise toplum sağlığı ve doğal yaşam için ciddi toksik etkileri bulunan organik bileşiklerdir. Diğer organik bileşikler ile karşılaştırıldığında daha polar yapıya sahip olan fenoller sulu ortamda ng-µg/L düzeylerinde belirlenebilmektedir [30,31]. Fenol bileşiğinin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Fenol'ün bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri [32]

Kimyasal adı	Fenol (C ₆ H ₅ OH)
Molekül yapısı	
Molekül ağırlığı, g/mol	94,11
Yoğunluğu, g/cm ³	1,07
Çözünürlük (20 °C)	8,3 g/100 mL
Erime Noktası, °C	40,5
Kaynama Noktası, °C	181,7
Görünüm	Renksiz/Beyaz kristal

Fenol, doğal ya da antropojenik süreçlerle üretilir. Doğal olarak oluşumu, bazı yiyeceklerde, insan ve hayvan atıklarında, organik maddelerin çürümesi sonucu ve aromatik amino asitlerin metabolizmasında midede üretilir. Buna ek olarak fenol aromatik bir bileşik olup, endüstriyel, evsel ve tarımsal atık suların çoğunda bulunur ve geniş bir kullanım alanına sahiptir. Basit moleküler yapıya sahiptir. Sulu çözeltilere kolay karışır ve endüstriyel

atık sularında bulunan organik kirleticilerden birisidir. Fenol ve fenol bileşikleri; petrokimya, boya, boya çözücü, kok, katran, kâğıt hamuru ve kâğıt ağartma (kâğıt üretiminde ligninin ayrışması sonucu), ilaç, kauçuk, plastik, çözücü, herbisit, pestisit, dezenfektan, antioksidan, tekstil ve kimya endüstrileri, seramik tesisleri, yağ rafinerisi, yemek tesisleri, çelik üretimi, fenolik reçineler, gazifikasyon, yalıtıma ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzeme üretimi gibi endüstriyel alanlarda sıkça kullanılmaktadır [33-52]. Fenoller yüksek sıcaklıkta daha çabuk ayrışırlar, sıcaklık arttıkça suda daha az gözüktürler. Örneğin Finlandiya’da yeraltı suyu sıcaklığı 10°C’nin altında olup fenolün bu ortamda biyolojik olarak ayrışması zordur [53].

Çizelge 2.2’de de görüldüğü gibi fenoller pek çok endüstriyel kaynaktan bulunan ve uzaklaştırılması zor olan bir kirleticidir.

Çizelge 2.2. Endüstriyel atık sularında bulunan fenol miktarları [54]

Endüstriyel Kaynak	Fenol Derişimi ppm
Petrol Rafinerisi	40-185
Petrokimya	200-1220
Tekstil	100-150
Deri	4,4-5,5
Kömür Dönüşümü	1700-7000
Pişirme Fırınları (defenolizasyonsuz)	600-3900
Plastik Sanayi	3-10
Çelik Sanayi	5,6-9,1
Odun Sanayi	50-953
Fenolik reçine üretimi	1600
Şeker pancarı ve kâğıt sanayi	22
Boya Sanayi	1,1
Fiberglass imalatı	40-2564

Fenollü bileşikler, içme ve kullanım sularında bulunması halinde kötü tat verir ve içilmesi durumunda ciddi böbrek bozukluklarına ve hatta ölümlere neden olabilmektedir

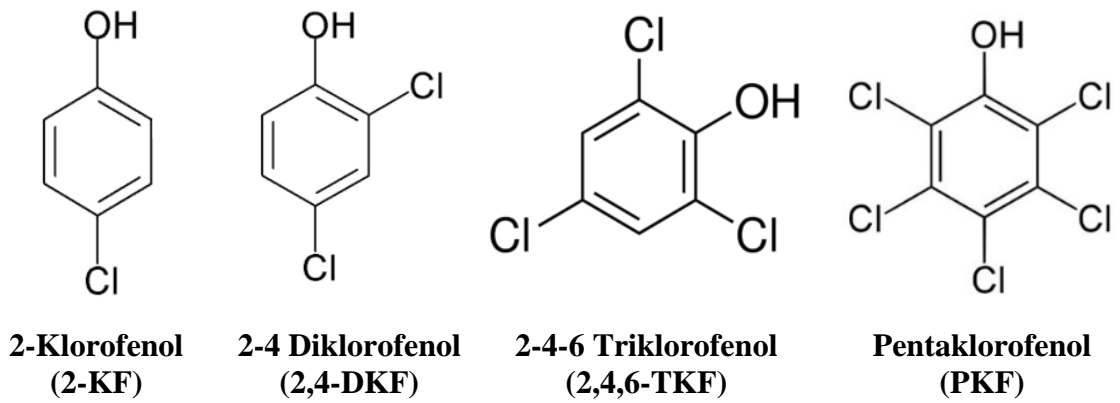
[46,55]. Fenoller yüksek reaktivitesi, zayıf biyolojik ayrışabilirliği ve sudaki iyi çözünürlüğü ile çevre için ciddi bir sorun oluşturmaktadır [45]. Aynı zamanda Avrupa Birliği'nde de fenol öncelikli kirleticiler listesindedir ve içme sularında maksimum toplam fenol konsantrasyonu (80/778/EC) 0,5 µg/l'den, bireysel fenol konsantrasyonu da 0,1 µg/l'den az olmalıdır. Krezol, nitrofenol ve klorofenol gibi çoğu fenol bileşiği doğal sularda 1 ppb'den daha düşük konsantrasyonlarda bulunmalıdır. [33,36,39,46].

2.1.1.1. Klorofenoller

Benzen halkasına bağlı, yapısında bir veya birden fazla klor bulunduran klorofenoller, zayıf asitlik derecesine sahip, renksiz, toksik ve fenol yapısındaki organik bileşiklerdir [55,56]. Başlıca klorofenoller pentaklorofenol (PKF), tetraklorofenol (TeKF), triklorofenol (TKF), diklorofenol (DKF) ve klorofenoldür (KF) [57].

Klor atomunun, fenol köküne bağlanmasıyla 19 ayrı KF bileşiği elde edilebilmektedir. 2-KF dışında diğer tüm KF bileşikleri oda sıcaklığında katı halde bulunurlar. KF'ler oldukça keskin bir kokuya sahiptirler ve ppb gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda dahi sularda (özellikle içme sularında) istenmeyen kokulara sebep olurlar. Bazı KF bileşiklerinin kimyasal yapıları Çizelge 2.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Bazı KF bileşiklerinin kimyasal yapıları [58]



KF'ler genelde pestisit ve antiseptik olarak kullanılmakla birlikte, soğutucu, kâğıt endüstrisi, klorlu ağartıcılar, deri, yangın geciktirici, boya, çözücü, herbisit, fungusit ve tahta koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [42,54,56,57,59-65]. Klorofenollerin

endüstriyel alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaları nedeniyle yeraltı ve yüzeysel sularda değişik konsantrasyonlarda klorofenol kirliliği oluşturmaktadır [44].

2-KF ve 4-KF bileşikleri, evlerde, hastanelerde dezenfektan madde olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanında, monoklorofenoller, daha yüksek klor atomu içeren fenollerin üretiminde başlangıç maddesi olarak da kullanılmaktadır [66]. 2,4-DKF ve 2,4,5-TKF, 2,4-diklorofenoksiasit ve özellikle herbisitlerin ara kimyasal ürünüdür. Klorofenoller hem aerobik hem de anaerobik metabolizmalarda besin olarak kullanılabilir [57].

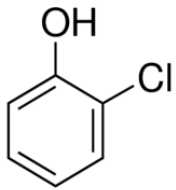
Bu bileşikler doğada yavaş ayrıştıkları için çevredeki miktarları zamanla artmaktadır [63]. Klorlu aromatik bileşikler, önemli düzeylerde oluşturulmaları, ayrışmaya karşı dayanıklı olmaları, toksik olmaları, sediment ve çevre üzerinde birikmeleri gibi sebeplerden ötürü çevresel kirleticilerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Yıl boyunca binlerce tonda üretilen klorlu fenoller ve türevleri tarımda değerlendirildikleri için ekolojik ortama girip birikmektedirler. Aynı zamanda, kaza ile olan dökülmeler, kirlenmiş topraklardan sızan sular, depolama tanklarının elverişli şekillerde temizlenmemesi, pestisitlerin bulunduğu alanlardan sızıntı olması ve üretim bölgelerindeki atıkların boşaltılması da kirlilik sebepleri arasında yer almaktadır [61,63].

Renksiz kristal şeklinde olan saf PKF tutuşmayan katı formdadır ve kolayca buharlaşmaz. Saf olmayan PKF ise, genellikle tehlikeli madde formunda, koyu gri tanecikli toz ya da parçacık halindedir. PKF'nin iki formu mevcuttur: Non polar suda kolayca çözünürken diğer fenoller suda kolayca çözünmez. Polar formu PKF alkolde serbestçe çözülür, benzen ve az miktarda soğuk petrol kökenlilerle de çözünebilir. PKF aynı zamanda insanlarda yüksek ateş, aşırı terleme ve zor nefes almaya neden olmaktadır. Vücut sıcaklığını tehlikeli seviyelere çıkarabilir, doku ve organlarda çeşitli yaralara ve ölümlere sebep olabilmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansına (IARC) göre PKF insanlar için kanserojenik etki göstermektedir. Yüksek dozda PKF balıklarda akciğer ve böbreküstü bezi ve genizde tümör oluşumlarını arttırmakla beraber laboratuvar hayvanlarında tiroit ve üreme sistemi üzerinde zararlı etkiler oluşturmuştur [67].

2-Klorofenol

2-KF fungusit, dezenfektan, antiseptik gibi daha yüksek klorofenollü bazı kimyasalların üretiminde kullanılmak üzere ticari olarak üretilen, aynı zamanda kömürden sülfür ile nitrojen bileşiklerini ayırmada kullanılabilen bir ara üründür. Gıdaların 2-KF ile kirlenmesi, toprak, hayvan, bitki ve su kaynakları yoluyla gerçekleşmektedir ve bu kirliliğin dolaylı olduğu bilinmektedir. Çoğunlukla bu durum phenoksialkanoik herbisit kullanımının sonucu olabilmektedir [68]. İçme sularına kadar girebilen klorofenollerden biri olan 2-KF için güvenli içme suyu standardı aylık ortalama 39 mg/ L'dir [8]. 2-KF'nin birtakım özellikleri Çizelge 2.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. 2-KF'nin fiziksel ve kimyasal bazı özellikleri [69]

Kimyasal adı	2-Klorofenol (C ₆ H ₅ ClO)
Molekül yapısı	
Molekül ağırlığı, g/mol	128,56
Yoğunluğu, g/cm³ (20°C)	1,2634
Erime Sıcaklığı, °C	9,4
Kaynama Sıcaklığı, °C	174,9
Buhar Basıncı	0,308 kPa
Asitlik Derecesi (pK_a)	8,56
Görünüm	Renksiz/Sıvı form
Benzer aromatik hidrokarbonlar	Fenol/Benzen/Klorobenzen

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Mitoz Bölünme

Birbirini izleyen makro moleküler düzeydeki biyokimyasal olaylar hücre bölünmesi olarak tanımlanmaktadır. Hücre bölünmesi ile beraber düzenli olarak büyümekte ve çoğalmakta olan hücreler canlıların gelişmeleri ile birbirlerine bağlıdır [70]. Çok hücrelilerde ve tek hücrelilerde bölünme şekilleri farklılık göstermekte tek hücreli canlılarda genellikle amitoz bölünme gerçekleşirken, çok hücrelilerde ise mitoz ve mayoz bölünme şeklinde gerçekleşmektedir. Tek hücreli canlılar mitoz bölünme ile birlikte birbirine tıpatıp benzeyen bireyler oluştururken, çok hücreli canlılarda ise mitoz bölünme yeni bir organizma oluşumunda, büyüme ve gelişmesinde hasar gören bölümlerin yenilenmesinde ve çeşitli organların meydana gelmesinde rol oynar [71].

Mitoz bölünme de DNA kendini yarı korunumlu eşleyerek kromozom sayısı korunmuş olur. Ökaryotik hücre, bölünme olmadığı zaman nükleus içerisindeki DNA, kromatin adı verilen esnek ve ince DNA-protein yapısını oluşturur. Hücre ne zaman bölünmeye girerse kromatin yapısı kısalıp kalınlaşarak kromozomları meydana getirir. Bir hücre bölünmesinin bitişi ile diğer hücre bölünmesinin başlangıcı arasında dinlenme evresi olarak adlandırılan, metabolik faaliyetlerin yoğun olarak gerçekleştiği interfaz evresi bulunmaktadır.

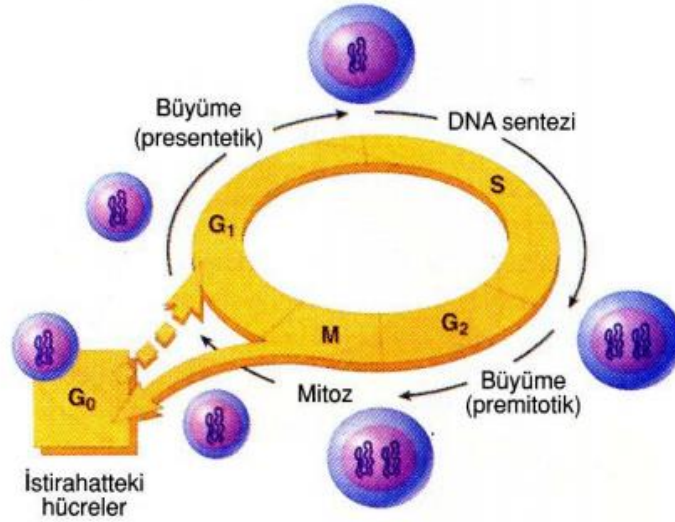
Hücre bölünmesi ve büyümesinde 4 ana safha (Şekil 3.1) vardır:

- i. Hücre bölünmesi ve hücre sel organellerin sayısında artış olan safha (G_1 safhası)
- ii. DNA replikasyonu ile birlikte protein sentezinin olduğu safha (S safhası)
- iii. Mitoz bölünmeye hazırlık için çeşitli metabolik olayların gerçekleştiği (G_2 safhası)
- iv. Mitoz ve sitokinezi kapsayan tüm hücre bölünmesi safhaları (M safhası)

Mitoz hücre siklusunun yalnızca bir kısmını oluşturmaktadır. Mitozu ve sitokinez evresini içine alan bölüm ise mitotik (M) fazdır. Bu hücre siklusunun en kısa bölümüdür. Hücrenin büyüdüğü ve bölünmenin gerçekleşmesi için kromozomların kopyalarını oluşturduğu interfaz safhası ise mitotik hücre bölünmesinden sonraki uzun bir evredir.

İnterfaz (Resim 3.1a), G_1 , S ve G_2 safhalarından oluşmaktadır [71]. Genetik maddenin replikasyonu interfazın hemen başlangıcında meydana gelmez. Bir önceki hücre bölünmesinin sonlanması ile genetik madde replikasyonu başlaması arasında kalan zaman boşluğuna G_1 safhası denir. Bu safhada ribozom ve diğer organeller kendi eşlerini yapmaya başlar, protein ve ATP sentezlenmeye başlanır. Özellikle iğ ipliklerinin oluşumunda rol oynayan proteinler bu safhada hazırlanır. Bu safhada kromozom ve DNA miktarı $2n$ 'dir. G_1 evresinden sonra gelen S safhasında ise, DNA replikasyonu başlar, kromozomların eşleri yapılır ve organellerin ikileşmesi de devam eder. Bu safha sonunda kromozom ve DNA'nın $4n$ olduğu görülür. İnterfaz aşamasındaki son evre olan G_2 'de ise bazı protein sentezleri ile birlikte hücre bölünmeye hazırlanır. Hücre yüzeyinde G_1 aşamasındakinden daha seyrek olmak üzere yine kabarcıklar ve mikrovilluslar görülür. Kromozom ve DNA miktarı $4n$ 'dir [72].

Dokulardaki birçok bölünmeyen hücre (dinlenme durumundaki fibroblastlar gibi), S evresinden hemen önce, yeteri kadar büyümemişlerse, hücre siklusunu durdururlar. Böylece dinlenme durumundaki hücrelere G_0 durumunda (veya G_0 hücresi) denir. G_0 birkaç gün, birkaç hafta sürebilir hatta hücre bölünmekten tamamen vazgeçebilir [73].



Şekil 3.1. Hücre siklusu [74]

M Safhası Olayları

M safhası olayları genel olarak 5 evreden oluşmaktadır. Profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhaları ile başlayan bölünmeyi takip eden son evre ise gerçek zamanlama olarak anafaz safhasında başlayıp bölünmenin sonuna kadar devam eden sitokinez'dir.

Profaz

Profaz evresinde nükleus içerisinde olan kromatinler kromozom halini alırlar. Her kromozom ise bölünmemiş olan sentromerler tarafından bir arada tutunan kromatid adı verilen iki iplikten oluşmaktadır. Kromozomlar safhanın başında nükleus içerisinde eşit dağılım gösterirken profazın bitişine yakın nükleus zarına yaklaşırlar ve bu şekilde nükleus merkezi boş kalır. Kromozomlar profaz evresi boyunca hücre içerisinde belli bir yönelime sahip değillerdir. Bu yönelimler üzerinde etkisi olan durum ise her bir sentromerin her iki tarafında bulunan kinetokorlardır. Profaz safhası ilerledikçe kromozomlar kısalıp kalınlaşarak yoğunlaşırlar. Profazın sonunda ise nükleolus adı verilen ribozomların üretilmesini sağlayan ve her nükleus içinde ez an bir tane bulunan bölgeler git gide küçülür ve kaybolur (Şekil 3.1b) [75].

Metafaz

Metafaz iki aşamada açıklanabilir:

a) **Prometafaz:** Safha nükleus zarının, nükleus lamina proteinlerinin fosforile olması ile birlikte ortadan kalkmasıyla başlamaktadır. Bu aşamada kromozomlar sitoplazma içerisinde rastgele hareket etmektedir. Tübülün protein alt birimlerinden meydana gelen mikrotübüller, kinetokorlara bağlanan (mitotik iğ) mikrotübüller ve kinetokorlara bağlanmayan (polar-kutupsal) mikrotübüller olarak ikiye ayrılmaktadır. Evre boyunca kromozomların hareketini sağlayan ve göçüne yardımcı olan, sentromerler ile bir araya gelen kinetokorlara bağlanan mitotik iğ mikrotübülleridir. Polar mikrotübüllerin ise iki kutup arasına girerek mesafeyi koruduğu düşünülmektedir.

b) Metafaz: Metafaz (Şekil 3.1c) safhasında kromozomlar ekvatoriyal plakta (metafaz plağında) kinetokorlar ve bunları farklı kutuplara bağlayan kinetokor mikrotübülleri yardımıyla dizilirler [76].

Anafaz

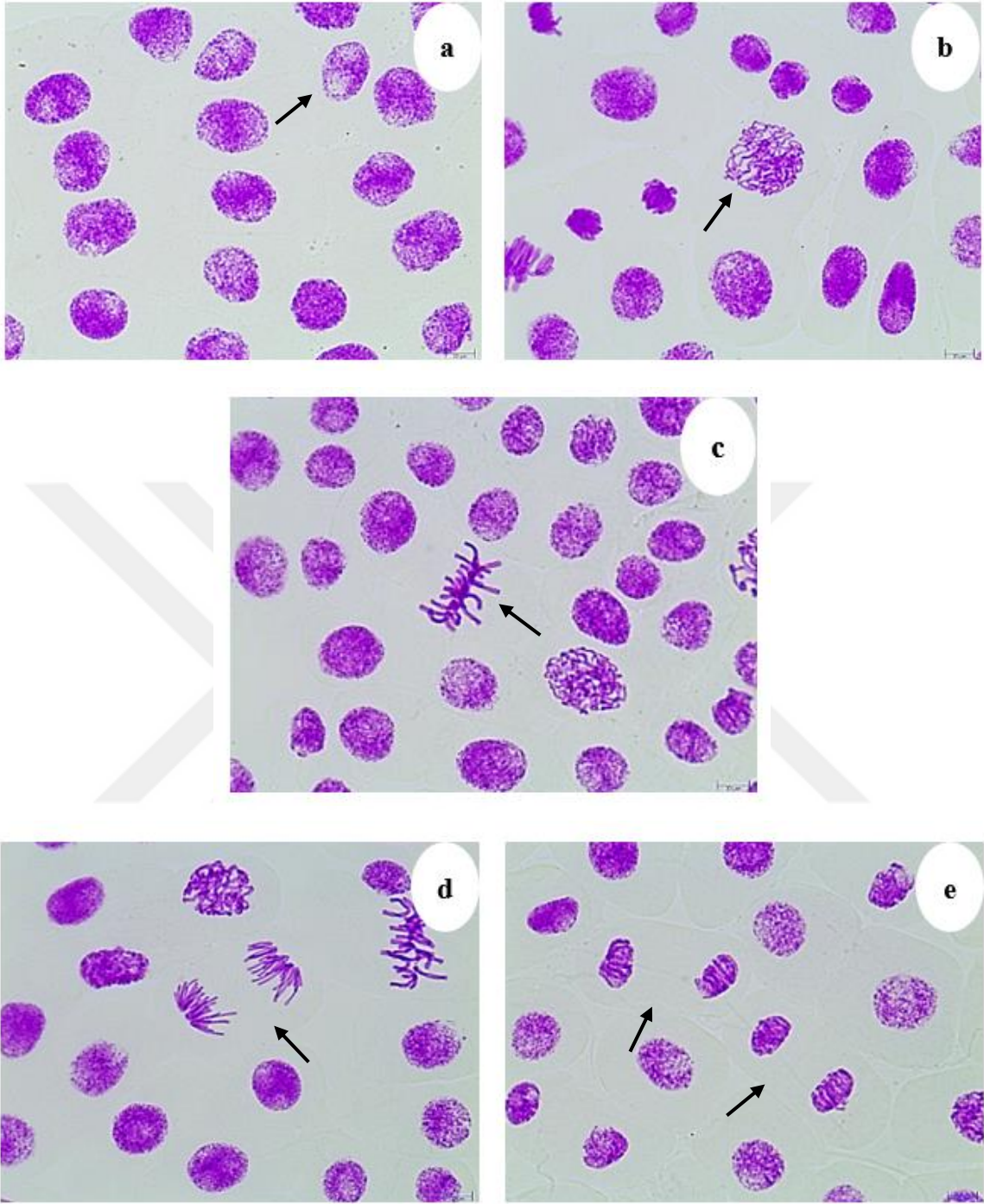
Bu safhada duplike olan ve ayrılmış her bir kromozom, kinetokorlarının tutunduğu mikrotübüller aracılığıyla kendilerine karşılık gelen kutba doğru çekilir. Ayrılan kromozomlardan her bir kardeş kromatid ters yönde kutuplara doğru hareket eder. Kardeş kromatid grupları kutuplara ulaştığında ise anafaz safhası sona ererek telofaz safhasına geçiş başlamış olur (Şekil 3.1d).

Telofaz

Telofaz safhasında kutuplara göç eden kromozomlar çözülür ve interfaz hücrelerde olduğu gibi heterokromatin ve ökromatin biçiminde şekillenir. Anafaz esnasında oluşmaya başlayan nukleus zarının yeniden yapılması için çekirdek laminleri defosforile olmuştur. Yoğunlaşmış biçimde olan kromatinler yayılır, çekirdekçik tekrar belirlemeye başlar ve böylelikle mitozun sonuna gelinmiş olur (Şekil 3.1e).

Sitokinez

Sitokinez evresinde iki yeni hücrenin oluşumu çoğunlukla anafaz evresinde başlayan ayrışma (cleavage) olarak bilinen bir yöntem ile gerçekleşmektedir. Sitokineze uğrayacak olan hücrenin aktivitesi ekvatoriyal düzlem (orta kısım) üzerindeki hücre zarını miyozin ve aktin filamentlerinin oluşturduğu halka ile iç ipliklerinin konumuna dik ve iki yeni çekirdek arasında bir inhilal oluşu oluşturacak şekilde devam eder. İpliğe yaklaşan oluk gitgide daralır ve safhanın sonuna doğru bu dar bölge birleşerek iki yeni hücrenin ortaya çıkmasını sağlar [77,78].



Resim 3.1. Mitoz bölünme safhaları a: İnterfaz, b: Profaz, c: Metafaz d: Anafaz e: Telofaz

3.2. Kromozom Mutasyonları

Kromozomun büyük parçalarını ilgilendiren mutasyonlara kromozom mutasyonları denir. Kromozom mutasyonları, kromozom sayısı değişimleri ve kromozom yapısı değişimleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

3.2.1. Kromozom Sayı Değişiklikleri

Organizmaların hem doğal hem de laboratuvar populasyonlarında kendiliğinden meydana gelen kromozom sayısındaki değişimlerdir. Organizmaların kromozom sayıları cinsten cinse hatta türden türe değişkenlik gösterir fakat her tür için sabittir. Kromozomlar bazen mitoz ve mayoz sırasında düzenli olarak ayrılmayabilir ve farklı kromozom sayısına sahip hücreler oluşabilir. Bu şekilde birçok genin oranı değişeceğinden dolayı kalıtsal açıdan birçok sorun oluşur. Bu olayda kromozomun birparçası değil tümü yok olur ya da sayıca artar. Öploidi ve anöploidi olarak 2 şekli vardır [79].

I. Öploidi

Bir takımdaki kromozomların hepsinin birden sayısının tam katları şeklinde artması veya o kromozom takımının organizmada tek bir defa bulunması olayıdır. Öploidi monoploidi ve poliploidi olarak ikiye ayrılmaktadır [72]. Temel kromozom sayısı kadar kromozom içeren bireyler monoploid (n), üç katı, dört katı veya daha fazla içeren bireyler poliploidi olarak adlandırılır. Bu olay neticesinde triploid ($3n$), tetraploid ($4n$), pentaploid ($5n$) veya daha fazla sayıda kromozom takımına sahip bireyler meydana gelir [80].

Öploidide temel kusur, hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin olmamasıdır (endomitoz). Endomitoz durumunda kromozomlar katı kadar çoğalır fakat mitoz bölünmenin ilk iki evresi (profaz ve metafaz) gerçekleştiği halde anafaz ve telofaz safhası olmaz hücre ve sitoplazma bölünmesi (sitokinez) olmaz. Bunun sonucunda kromozom sayıları her bölünmede katı kadar artmış olur [72,81].

Öploidinin içerisinde olan poliploidinin de üç şekli bulunmaktadır. Bunlar; Otopoliploidi (Otoploidi), Allopoliploidi (Allopoloidi) ve Endopoliploidi (Endoploidi) şeklinde adlandırılmaktadır.

a) Otopoliploidi: Otopoliploidi'de mevcut olan genomların hepsi aynı türden gelir. Örneğin, eğer bir diploid bireyin genomu AA ise, Otopoliploid bireyler 3A (AAA), 4A (AAAA), 5A (AAAAA), 6A (AAAAAA) şeklinde olurlar. Bu bireyler Ototriploid, Ototetraploid, Otoheksaploid şeklinde isimlendirilmektedir. Ototriploid ve Ototetraploid bireyler diploid bireylere göre daha iridirler.

b) Allopoliploidi: Allopoliploidi de ise mevcut olan genomların bir kısmı bir türden, diğer bir kısmında başka bir türden gelmektedir. Eğer AA ve BB genomlarını taşıyan iki birey çaprazlanırsa, AB genomunu taşıyan bir zigot yani diploid bir birey meydana gelmektedir. Bu zigotun kromozom sayısı 2, 3, 4 katına çıkarılırsa 2AB (AABB), 3AB (AAABBB), 4AB (AAAABBBB) gibi allopoliploid bireyler ortaya çıkar.

c) Endopoliploidi: Endopoliploidi, endomitoz olayının bir sonucudur. Bazen farklılaşmış ve bölünme yeteneğini yitirmiş olan hücrelerde çekirdek zarı kalbolmadığı halde, kromozomların mitozda olduğu gibi uzunlamasına bölünerek sayılarının iki veya daha fazla kata yükselttikleri görülür. Bu olayda iğ iplikleri teşekkül etmez. Endomitozda meydana gelen kromatidler birbirinden ayrılarak bağımsız kromozomlar halini alırlarsa bu olaya Endopoliploidi, birbirine yapışık kalarak kromatid paketlerinden ibaret dev kromozomları meydana getirirlerse bu olaya politen adı verilir [72].

II. Anöplöidi

Mutasyon kromozom setinde değil, setin yalnızca bir parçasında görülmektedir. Anöplöid bir birey, anöplöid gametlerin, yani normal haploid sayıdan daha fazla ya da daha eksik kromozom içeren gametlerin, birleşmesiyle meydana gelen bir zigotun ürünüdür [72, 80].

Anöplöidi, kromozomların ayrılmaması (non-disjunction) ya da kromozomların anafazda geri kalması (anaphase lagging) sonucunda oluşabilmektedir. Metafaz evresinde, metafaz plağında dizilen kromozomlar sentromerlerin bölünmeye başlamasıyla birlikte ters yöndeki kutuplara doğru hareket ederler ve bölünmeyi tamamlarlar. Bazı durumlarda kromozomlar bölünemez ve bir kutba iki kromozom birlikte göç eder. Bu olaya non-

disjunction adı verilmektedir. Non-disjunction olayına hem mitoz bölünmede hem de mayoz bölünmede rastlanmaktadır [82].

Aöploidi oluşumunda ikinci bir mekanizma ise kromozomlardan birinin kutuplara çekilme aşamasında geri kalmasından (anaphase lagging) kaynaklanmaktadır. Bu durumdaki kromozom ya özdeş kromozomunun bulunduğu bölgeye katılır ya da bölünme esnasında kaybolur. Özdeş kromozomunun bulunduğu bölgeye katılacak olursa bir hücrede aynı kromozomdan iki tane bulunurken, diğer hücrede hiç bulunmayacaktır. Fakat kromozomun bölünme esnasında kaybolması durumunda bir hücre normal kromozom sayısına sahipken diğer hücre bir kromozom eksik olacaktır [82].

Anöploidi Monosomi, Nullisomi ve Polisomi olmak üzere üç şekilde olabilir.

a) Monosomi: Diploid bir organizmadaki bir çift kromozom sadece birinin kaybolması ile oluşur. $2n-1$ formülü ile gösterilirler. Monosomikler (n) ve (n-1) olmak üzere 2 tipte gamet oluştururlar. Monosomik bireyler genellikle yaşamazlar. İnsanlarda görülen Turner Sendromu, X kromozomunun eksik olduğu bir monosomik durumdur.

b) Nullisomi: Diploid bir organizmada ekstra bir kromozomun homoloğu ile birlikte kaybolması ile oluşurlar. $2n-2$ ile gösterilirler. Nullisomik bireyler, non-disjunction sonunda aynı kromozomunu kaybetmiş olan iki gametin birleşmesi sonucu ortaya çıkmaktadır.

c) Polisomi: Bir takımda bulunan kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısını yükseltmesi olayıdır. Trisomi, tetrasomi, hiperploidi ve hipoploidi polisomi içerisinde yer almaktadır. Diploid bir organizmada ekstra bir kromozomun bulunması olayına trisomi denir ve $2n+1$ formülü ile gösterilirler. (n) ve (n+1) olmak üzere 2 tipte gamet oluştururlar. İnsanlarda Down Sendromu 21. kromozomun trisomik olması durumunda ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında Patau sendromu 13. kromozomun, Edward sendromu ise 18. kromozomun trisomisiyle meydana gelmektedir. Diploid bir organizmada ekstra bir kromozomun homoloğu ile birlikte bulunması durumuna ise tetrasomi adı verilmektedir ve $2n+2$ ile gösterilir. Polisomi olayında yüksek katsayılı poliploidlerde bir takımdaki kromozomlardan yalnızca bir tanesi diğerlerinden fazla ise hiperploidi, az ise hipoploidi adını almaktadır. Hiperploidi $4n+1$, $5n+1$ şekliinden gösterilirken, hipoploidi $4n-1$, $5n-1$ şeklinde formüle edilmektedir [72, 80].

3.2.2. Kromozom Yapı Değişiklikleri

Genetik materyalin kaybı ya da yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkan bir ya da daha fazla kromozom kırıklarından kaynaklanır. Kromozomlar kendiliğinden kırılabilir, ancak bir kromozom kırılmasını, kromozom segmentlerinin tekrar birleşmesi işlemi izleyebileceği gibi bu şekilde tekrar birleşme olayı meydana gelmeyebilir. Kimyasallara ya da radyasyona maruz kalan hücrelerde kromozomların kırılma oranı daha yüksektir [79].

a) Defisiyens ve Delesyon: Tek bir gen ya da gen parçasını içeren kromozom segmentinin kaybolması olayıdır. Eğer kromozom segmenti uç kısımdan kaybolmuşsa defisiyens ya da terminal delesyon, orta kısımdan kaybolmuşsa delesyon ya da interkalar delesyon adını alır (Şekil 3.2a). Defisiyens, kromozom üzerinde tek yerden kopma şeklinde gerçekleşirken, delesyon ise bir kromozomun kendi üzerinde kıvrılıp bir ilmek meydana getirmesiyle oluşmaktadır.

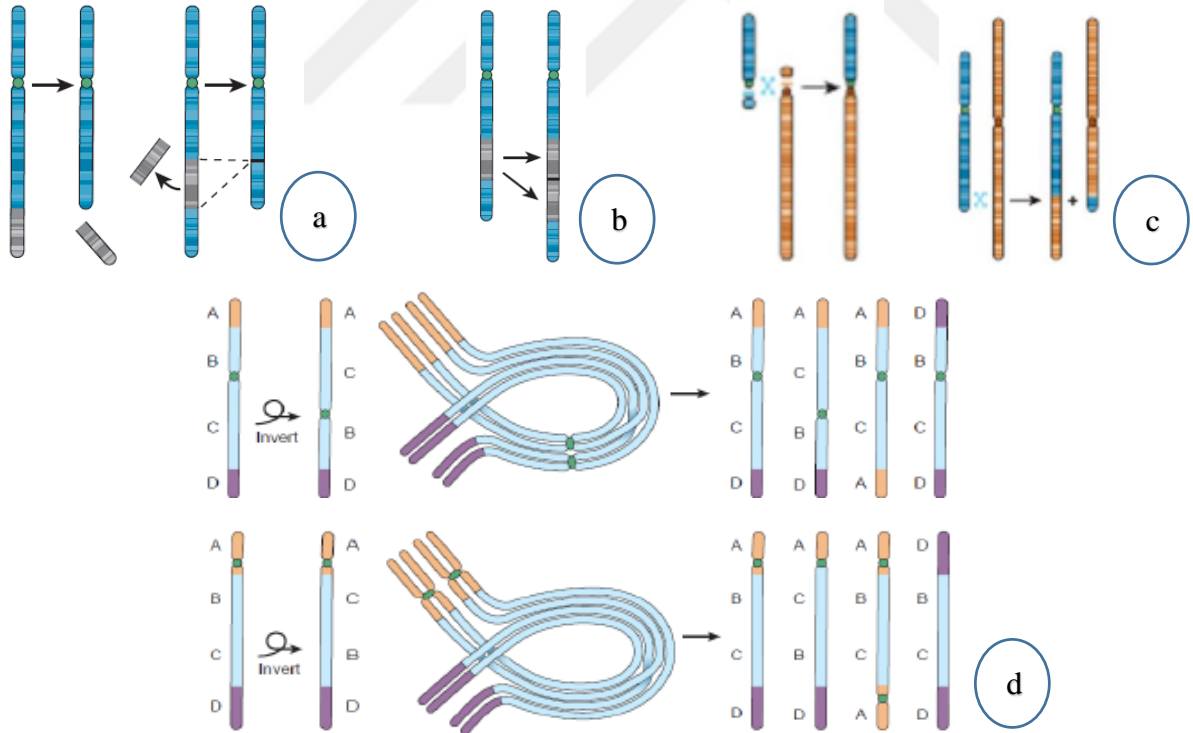
Delesyon sırasında kopan parçaların uç kısımları birbirleri ile tekrar yapışarak öncekinden daha kısa bir kromozom oluşur. Her iki şekilde de sentromeri bulunmayan parçalar hücre içerisinde görev yapamaz ve kaybolur. Sentromerli olan kromozomlara sentrik kromozomlar, sentromeri olmayan kromozomlara ise asentrik kromozomlar denir.

b) Duplikasyon: Bir kromozomda bulunan bir segmentin tekrarlanması olayıdır. Yani bir kromozom, o kromozom segmentini iki veya daha fazla kez bulundurur (Şekil 3.2b). Duplikasyon homolog kromozomlar arasında meydana gelen temas ile o nokta üzerinde oluşan kopma şeklinde meydana gelmektedir. Böylece homolog kromozomlar arasında eşit olmayan bir crossing-over gerçekleşmektedir. Duplikasyon sonunda kromozomlardan biri duplikasyonluyu, diğeri delesyona uğramış bir kromozomu oluşturur. Duplikasyonlu kromozomun normal homologu ile mayoz bölünme geçirmesi sırasında duplikasyonlu kromozomun tekrarlanan kısmı dışı doğru bir lob oluşturur [72,80].

c) Translokasyon: Homolog olmayan iki kromozom arasında segmentlerin birbirleriyle yer değiştirmesi olayıdır (Şekil 3.2c). Bu şekildeki translokasyona Resiprokal translokasyon adı da verilmektedir. Translokasyonların diğeri bir şekli olan Robertsonian translokasyon ise, iki akrosentrik kromozomun kısa kollarını kaybederek sentromer ya da sentromere yakın

bölgeden birleşmesiyle oluşur. Sentrik birleşme ile yeni bir kromozom meydana gelir. Bu birleşmede V şeklinde iki kolu olan metasentrik bir kromozom ile küçük bir parça meydana gelir. Bu küçük parça daha sonra kaybolmaktadır. Robertsonian translokasyonlar, bütün akrosentrik kromozomlarda görülmüştür. Özellikle 13. ve 14. kromozomlarının birbirleriyle olan translokasyon 1300 kişiden birinde görülür [80,83, 84].

c) İnvrsiyon: Bir kromozomdaki segmentlerin normal sıradayken kırılıp 180° dönüp tekrar yapışması olayıdır. Eğer kırılan segment sentromer içeriyorsa perisentrik inversiyon, içermiyorsa parasentrik inversiyon adını alır (Şekil 3.2d). İnvrsiyonda herhangi bir genetik bilgi kaybı yaşanmaz sadece genlerin dizilişi değişmektedir. Eğer inversiyon durumu homolog kromozomların sadece bir tanesinde meydana gelmişse heterozigot inversiyon, her iki kromozomda da aynı anda meydana gelmişse homozigot inversiyon şeklinde adlandırılmaktadır [72,80].



Şekil 3.2. Yapısal kromozom anomalilerinin gösterimi a:Defisiyens – İnterkalar delesyon, b: Duplikasyon, c: Robertsonian Translokasyon – Resiprokal Translokasyon, d: Perisentrik İnvrsiyon - Parasentrik İnvrsiyon [85]

3.3. DNA Hasarı

DNA molekülü bir canlıya ait olan tüm genetik bilgileri taşır. Genom çeşitli faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. Ekzojen veya endojen etkenlerin etkisiyle DNA genomun tümünde meydana gelen tüm değişikliklere “DNA Hasarı” adı verilir [86]. Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidatif hasarlar ve DNA replikasyonu sırasında oluşan hasarlar, deaminasyon, depürinasyon, depirimidinasyon gibi baz hasarları endojen faktörlere örnek olarak verilebilir. Ekzojen faktörler ise, ultraviyole (UV) ışınları, iyonize radyasyon gibi fiziksel ya da aflatoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları ve alkilleyici ajanlar gibi kimyasal olabilir [87].

3.4. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Bazı Yöntemler

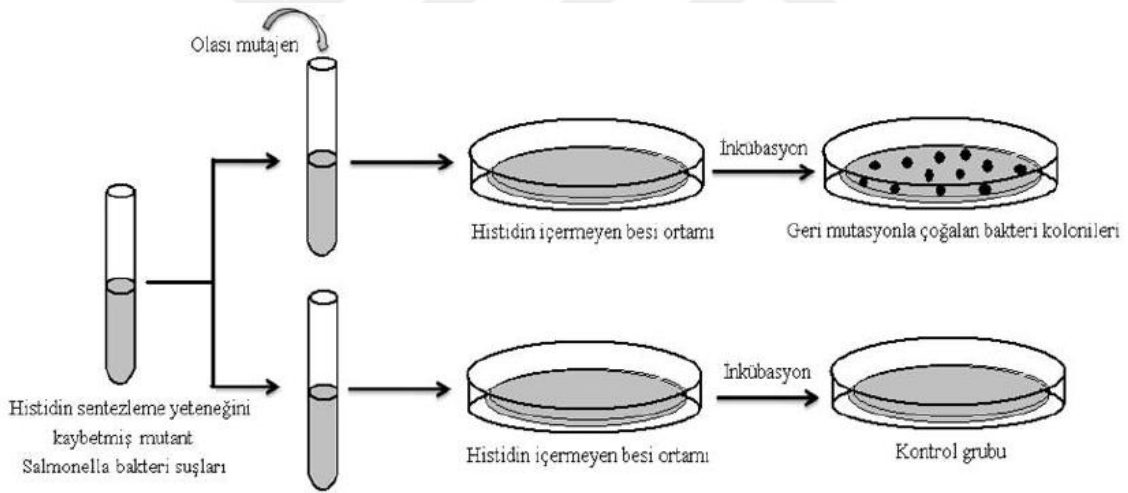
DNA hasarı çeşitli organizmalar üzerinde (maya, bitki, hayvan ve insan) çalışılmaktadır. DNA üzerindeki hasar DNA'nın normal işlevleri esnasında kendiliğinden ya da çevresel faktörlerin etkisi ile meydana gelmektedir. DNA'da oluşan hasarın en önemli sebebi normal işleyen DNA metabolizması esnasında bazların kimyasal yapısında kendiliğinden oluşan değişimlerdir. Fiziksel veya kimyasal ajanlar DNA hasarına neden olan çevresel faktörlerdir [88]. Kimyasal ajanların, DNA hasarına sebep oldukları organizmalar üzerindeki sitogenetik, genotoksik veya mutajenik etkilerini incelemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; tek hücre jel elektroforezi (Komet testi), mikronükleus (MN), salmonella/mikrozom mutajenite (Ames) testi, kromozomal anormallik testi (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), allium testi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), TUNEL, floresans in situ hibridizasyon (FISH), immünokimyasal yöntemler, ELISA, kromatografi gibi yöntemlerdir [89].

3.4.1. Salmonella/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi

Diğer bir adı *Salmonella*/mikrozom mutajenite testi olan Ames testi geçerliliği yüksek olan ve bunun yanında iyi standardize edilmiş bir bakteriyel test sistemidir. Test sisteminin en önemli özelliği ve yaygın kullanılmasının sebebi olarak maliyetinin az olması, çabuk sonuç vermesi ve uygulanabilirliğinin kolay olması olarak gösterilebilir. Ames testi,

deney hayvanlarında ve insanların somatik hücrelerindeki tümör supressor genleri üzerinde oluşan nokta mutasyonlarının belirlenmesinde ve DNA ile kimyasalların etkileşime girerek oluşturduğu mutajenik ve karsinojenik etkileri önlemek için antikarsinojenik ve antimutajenik maddelerin tayini için sıklıkla kullanılmaktadır [90-97].

Ames testinde, test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geni üzerinde meydana getirilen farklı mutasyonlarla mutant suşları kullanılmaktadır. Testin yöntemi, mutasyon yoluyla histidin sentezleme yeteneğini kaybeden *S. typhimurium*'un S9'lu ortamda ya da S9'suz ortamda test edilecek olan bileşene maruz bırakıldıktan sonra tekrar bir mutasyona uğrayıp histidin sentezleyebilen ve histidinden bağımsız ortamda çoğalmasına dayanır. Kendiliğinden geri mutasyona uğrayıp histidinsiz ortamda üreyebilen koloniler sayılarak mutajenite belirlenmiş olur (Şekil 3.3). Eğer ortam şartlarında pozitif mutajen bir madde bulunuyorsa histidinsiz ortamda geri mutasyonla artan koloni miktarı istatistiksel anlamda artmaktadır [90-92,97,98].



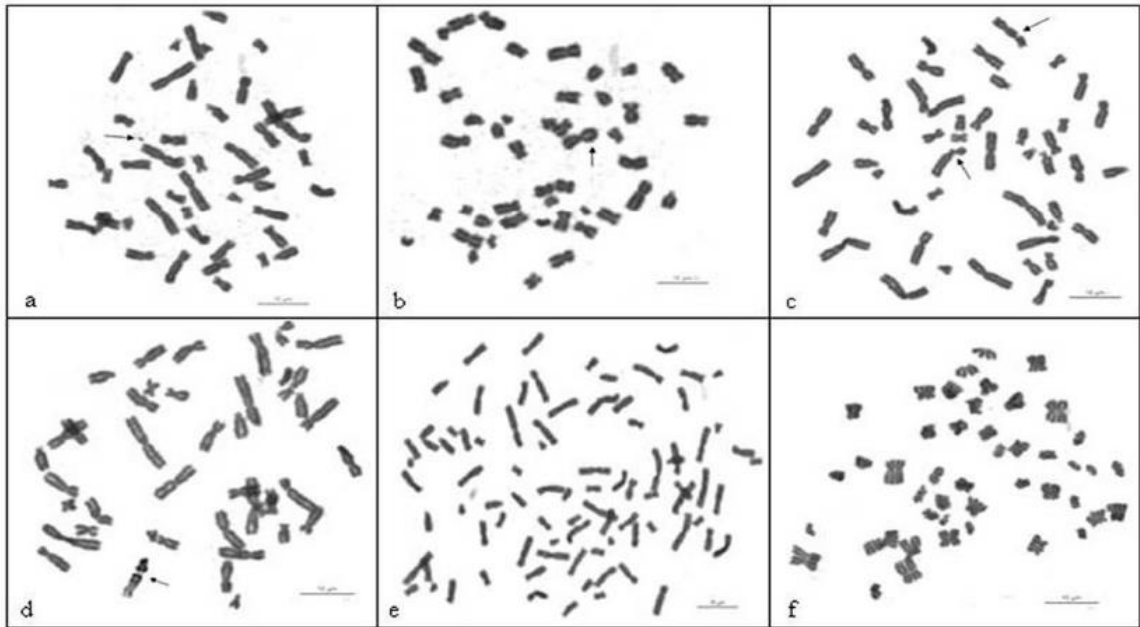
Şekil 3.3. Ames testinin uygulama aşamaları ve mutajeniteyi gösteren koloniler [99]

3.4.2. Kromozomal Anormallik (KA) Testi

DNA seviyesinde hasarın sonucunda ortaya çıkan kromozomal anormalliklerindeki kromozom kırıkları DNA'da çift zincir kırıklarının onarılamayıpından yeni oluşan kromozomlar ise DNA'daki kırıkların yanlış onarılmasından meydana gelmektedir. Tamir edilemeyen bu hasarların sonucu olarak ortaya çıkan KA'nın yüksek frekansı artan kanser riskini işaret etmektedir [100-104].

KA testi, mutajenlerin sebep olduğu kromozomal anormalliklerin belirlenmesinde sıkça tercih edilmektedir. Test *in vitro* ve *in vivo* KA testi olarak ayrılmakta ve *in vitro* KA testi ile memeli hücre kültürlerindeki kromozom anormalliği frekansı değerlendirilirken, *in vivo* KA testi ile çoğunlukla kemik iliği hücrelerindeki kromozomal anormalliğin frekansına bakılır. *In vivo* KA testi, türe ve dokuya göre değişebilen metabolizmada mutajenik hasarın belirlenmesinde ve DNA tamir mekanizmaları gibi etkenlerin analiz edilmesine de imkân sağlamaktadır [90,105-107].

In vitro memeli KA ve *in vivo* KA testini birbirinden ayıran diğer bir noktada, *in vitro* KA'da genelde periferik kan lenfosit hücrelerinin inkübasyonu sağlanırken, *in vivo* KA testinde ise vaskülarizasyonu yüksek ve hızlı dolaşım gerçekleştiren hücreleri kapsayan kemik iliği tercih edilmektedir. *In vitro* KA işleminde oluşturulan kültürlerin hasat işlemi gerçekleştirilmeden çoğunlukla 2 saat öncesinde, *in vivo* KA testinde ise hayvanlar sakrifiye edilmeden 2-4 saat öncesinde kolşisin uygulama işlemi yapılarak hücreler metafaz fazında durdurulmaktadır. Kültürlerden ya da kemik iliği hücrelerinden protokollere uygun bir şekilde alınmış olan metafaz hücreleri üzerinden kromozomlarda oluşan çeşitli sayısal ve yapısal anormallikler (Şekil 3.4) saptanabilmektedir [105-108].



Şekil 3.4. Metafaz hücrelerinden elde edilen kromozomal anormallikler [99]
a: Fragment, b: Kardeş kromatit birleşmesi, c: Kromatit kırıkları, d: Kromozom kırığı,
e: Poliploidi, f: Endoreduplikasyon

3.4.3. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi

KKD, kromozomdaki kardeş kromatidler içerisinde parça değişimi ile meydana gelmektedir. Parça değişimi, kardeş kromatidlerin homolog bölgeleri üzerinde DNA'da kırıklar oluşması ve bu kırıkların yer değiştirip tekrar birleşmesi temeline dayanmaktadır (Şekil 3.5).

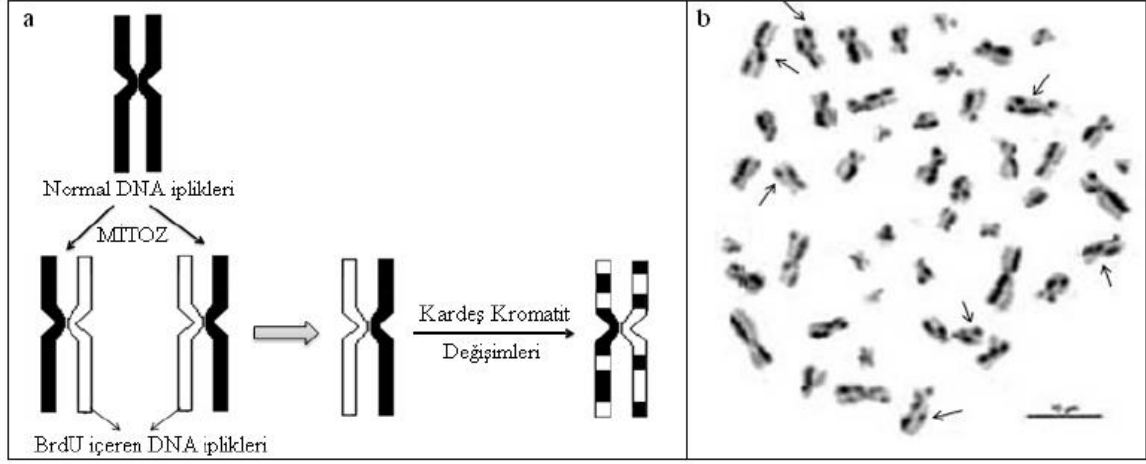


Şekil 3.5. Kardeş kromatit değişimi [99]

Kardeş kromatit değişiminin ilişkili olduğu noktalar sitotoksiste, gen amplifikasyonu ve nokta mutasyonların indüksiyonudur [109-114]. KKD testi, mutasyona sebep olabilecek ajanların kromozomlar üzerinde oluşturduğu yapısal değişimleri araştırmanın yanı sıra bu mutajenlerin sebep olabileceği karsinojenik ve mutajenik etkilerinde ortaya konulmasında önemli bir rol oynamaktadır. Mutajenik ve karsinojenik olduğu bilinen ajanların hücreler üzerindeki etkisi sonucu ya da çeşitli kalıtsal hastalıklarda kardeş kromatit değişim frekansının arttığı ve bu durumun tümör başlangıcı ile doğrusal bir ilişki içerisinde olduğu saptanmıştır [102,109-112,114-118].

KKD testinin öncelikli amacı DNA parçaları oluşturan veya DNA'nın kendini eşlemesi ile etkileşim içinde olan mutasyona sebep olabilecek ajanları belirlemektir. Test aşamasında timin analogu olan Bromodeoksiüridin (BrdU) kullanılmaktadır. BrdU kullanılması amaç hücre döngüsü sırasında timin gibi davranıp oluşan kardeş kromatidler arasına girmesi sağlanarak homolog kromozomlar arasındaki DNA parça değişimi gösterilmekte ve bu sayede DNA kırıkları görünür duruma getirilmektedir. Kültürde çoğalan hücrelerin DNA replikasyonu devam ederken yeni sentezlenen polinükleotid ipliklerinde BrdU içeren bromurasil nükleotidleri yerini almaya devam etmektedir. DNA içerisindeki BrdU yerleşmiş bölgelerin tayini için ultraviyole lambası ile ışınlanmaya maruz bırakılır ve daha açık renkte olan bölgelerin BrdU'li olduğu görülmektedir (Şekil 3.6a). Şekil 3.6b'de görüldüğü gibi BrdU kullanılarak kromatidler

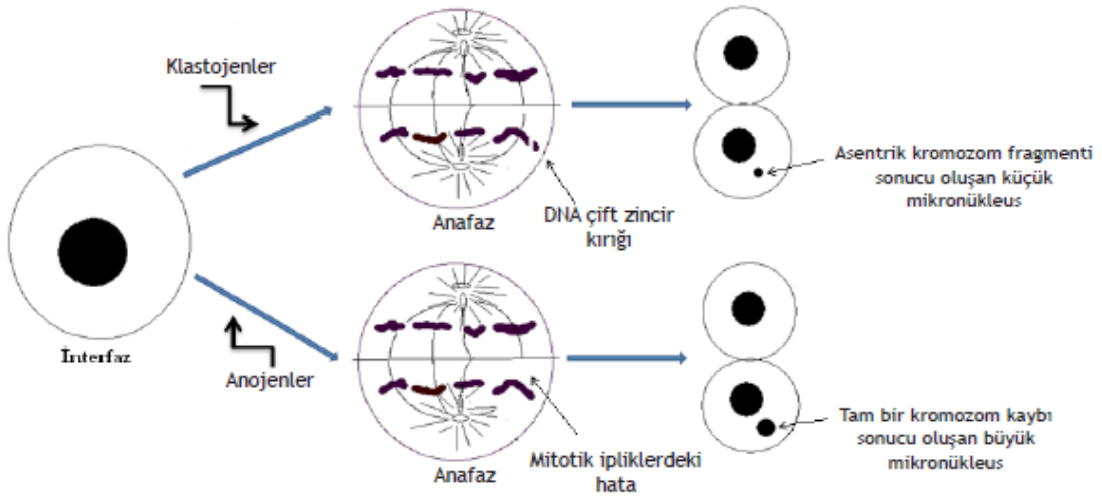
üzerinde boyanma farkı ile kardeş kromatitler arasındaki değişimler gözlenebilmektedir [75,111,114,119,120].



Şekil 3.6. Kardeş kromatit değişiminin BrdU ile saptanması ve KKD içeren metafaz plakları [99]

3.4.4. Mikronükleus (MN) Testi

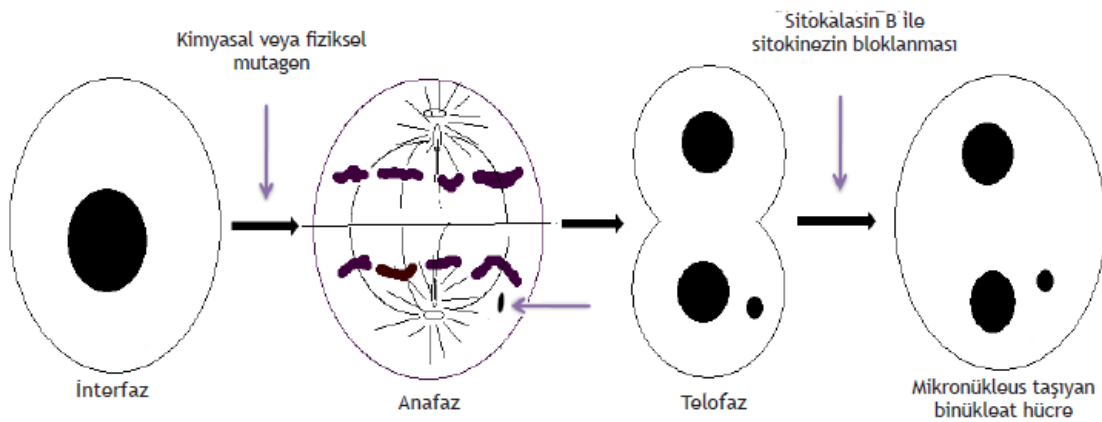
MN'ler mitoz bölünme sırasında varolan çekirdekten bağımsız olarak oluşan, tam ya da asentrik kromozom fragmentlerinden meydana gelen, sentromerde bulunan kinetokor veya mitotik aygıtın diğer parçalarındaki hasarlardan, mitotik iğdeki hatalardan, hücre siklusunda görev alan bazı genlerin eksikliğinde meydana gelmektedir (Şekil 3.7). Çeşitli maddelerin hücreler üzerinde meydana getirdiği yapısal veya sayısal kromozomal anomalilerin dolaylı göstergesi olarak MN miktarındaki yükseliş gösterilmektedir. Bazı araştırmalarda, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların etkisinde olan insanlarda, genomik düzensizliği ve kanser olan hastalarda MN frekansının yüksek olduğu gözlemlenmiştir [90, 115, 121-126].



Şekil 3.7. Klastojenlerin ve anojenlerin etkisiyle uyarılan hücrelerdeki MN'ler [127]

MN testinin genotoksisite çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmasının en önemli sebebi mitoz bölünmeyle meydana gelen bütün hücre tiplerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmesidir [125,126].

In-vitro ortamda yapılan MN testinde, inkübasyona uygun ortamda bırakılan hücre kültürlerine, kültürün yaklaşık 44. saatinde ilk mitozdan önce sitokalsin-B maddesi eklenir. Sitokalsin-B maddesi sitokinezi inhibe ederek hücre döngüsünü tamamlayan binüklear (çift nükleuslu) hücrelerin meydana gelmesini sağlamaktadır (Şekil 3.8). İnkübasyon işlemi biten kültürler uygun kurallara göre hasat edilir ve preparatlarda MN içeren binüklear hücrelerin oranı tespit edilir [90,128,129].



Şekil 3.8. Sitokinezin inhibe edilmesiyle MN bulunduran binüklear hücrenin oluşumu [127]

In vivo MN testi, sitokinezi engellenmemiş olan memeli eritrosit hücrelerindeki MN oranını saptamaktadır. *In vivo* MN testinde, test edilecek bileşimin genetik hasara sebep olup olmayacağını saptamak için genellikle periferik kan hücrelerinde ve/veya kemik iliğindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşumu bakımından analizi yapılarak belirlenmektedir [128,130-132].

3.4.5. Allium Test

Toksisite testleri arasında yer alan Allium testi çevresel etkilerin belirlenmesinde bitki materyalinin kullanıldığı yararlı bir yöntemdir [133]. Bu tür toksisite çalışmalarında bitki kullanımının birçok sebebi olmasına karşın en önemli sebepleri, bitki materyalinin taşınması, depolanması ve kullanılmasının kolay, çoğunlukla rahat incelenebilen kromozomlara sahip olmasıdır. Aynı zamanda kök uçları, toprağa ve suya giren kimyasalların etkilerine uğrayan ilk yapılar olduğu için biyolojik testlerde oldukça faydalı materyallerdir [134].

Allium testi ilk kez 1938 yılında Levan [135] tarafından kimyasalların meydana getirdiği biyolojik etkilerin araştırılmasında kullanılmış ve günümüzde de halen kullanılmaktadır [12-15,17,22]. Testin; hassas, tekrarlanabilirliği yüksek, kolay ve nispeten hızlı olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Bunun yanında diğer test sistemleri ile sonuçlar arasında iyi bir korelasyon göstermektedir. Testte makroskobik parametreler (büyüme, EC₅₀) ve mikroskobik parametreler (c-mitoz, yapışkanlık, kromozom kırıkları) arasında gözlemlenebilir bir ilişki olduğu görülür. Makroskobik parametreler (kök büyümesini engellediği) büyümenin engellenmesi ile sonuçlanması beklenen herhangi bir direkt ve indirekt zararlı etkinin varlığı hakkında bilgi verirken, mikroskobik parametreler ise kromozomal hasarın ve hücre çoğalması sırasında oluşan bozuklukların analiz edilmesinde etkilidir. Böylelikle oluşan bir toksik etki var ise şiddeti veya işlevi ya da gizil mutajenite üzerinde ek bilgi sağlamaktadır. Test sistemi yaygın bir uygulama alanına sahip olmasına ilaveten toksik etki sonuçlarıyla çevresel kimyasalların analiz edilmesi ve sıraya koyulmasında da faydalıdır [136]. Bitki köklerindeki meristematik hücreler çevresel kirlenmelerin “klastojenite”sinin (kromozomlardaki kırıklıklar, düzensizlikler ya da artışlar) saptanması için elverişli bir sitogenetik gereçtir [137].

Sıkça kullanılan test yöntemlerinden biri olan *Allium* testi çevresel kirleticilerin (pestisit, herbisit, atık sular vb.) toksik ve genotoksik etkilerini büyümeyi engelleme testi ile kök üzerinde etkili olan konsantrasyon belirlendikten sonra hücre döngüsü esas alınarak değişik uygulama süreleri ile birlikte mitotik indeks, mitotik faz, anormallikler, mikronükleus oluşumları ve kromozomal bozukluklar saptanabilmektedir. Mitotik indeksin değerinin kontrol grubuna göre %22'nin altında olması letal etki [138], %50'nin altında olması ise subletal etki [139] olarak değerlendirilmekte ve bu değerler sitotoksik sınır değerlerini kapsamaktadır [140].

3.4.6. Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi (Komet Testi)

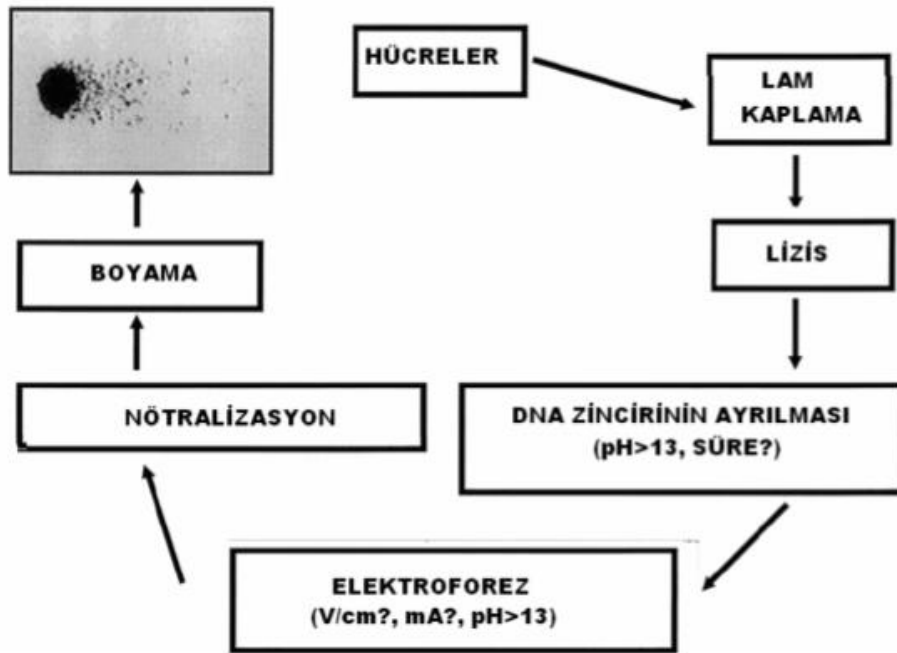
İlk kez 1978 yılında DNA üzerinde tek zincir kırıkları Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir [141]. Lam üzerine yerleştirilen hücrelerin agaroz jel ile birlikte gömülüp sabitlenmesinden sonra DNA'nın sarmal yapısının açılmasını sağlamak için alkali ortamda bekletilip hücre zarının parçalanması ve proteinlerden uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra nötralizasyon işleminden geçen hücreler DNA akrinin turuncusu yardımıyla boyanmıştır. Tek zincir DNA kırıklıklarında kırmızı floresans, çift zincir DNA kırıklıklarında ise yeşil floresansın durumuna göre DNA üzerindeki hasar oranını tespit etmişlerdir [142]. Sonrasında ise Ostling ve Johanson tarafından DNA üzerinde oluşan kırıklıkların hassas bir şekilde tespit edilmesi için 1984 yılında mikro jel elektrophorez yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, hücreler mikroskop lamalarının üzerindeki agaroz jele gömülür, yoğun lizis çözeltisinde bekletilerek hücrelerin membranlarının parçalanması sağlanır sonrasında nötr pH ortamında kısa bir elektrophorez uygulanır ve DNA'lar anoda doğru yürütülür. Anoda doğru yürütülen DNA'lara bakıldığında ise fazla sayıda zincir kırığı olanların az sayıda zincir kırığı bulunan DNA'lara göre daha hızlı göç ettiğini tespit etmişlerdir. Son olarak DNA hasar oranını belirlemek için ise anoda doğru göç eden DNA'ları Etidyum Bromür (EtBr) ile boyayarak hasar oranını floresans yoğunluğuna göre belirlemişlerdir [143].

DNA üzerinde meydana gelen çift sarmal kırıkları nötr ortamda tespit edilip, tek sarmal kırıkları tespit edilemediği için, Singh ve arkadaşları [144] tarafından 1988'de elektrophorez, kuvvetli alkali ortamda (pH>13) uygulanmıştır. Günümüzde birçok çalışmada sıkça kullanılan "Komet testi" Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş yalnızca alkali

şartlarda meydana gelen DNA tek zincir kırıklarının tanımlanmasına olanak sağlamıştır [145]. Son yıllarda FISH tekniği ile belirli DNA dizilerine spesifik olan işaretli probalar kullanılarak Komet testi ile birleştirilerek dizideki veya gendeki spesifik hasar belirlenebilmektedir [146].

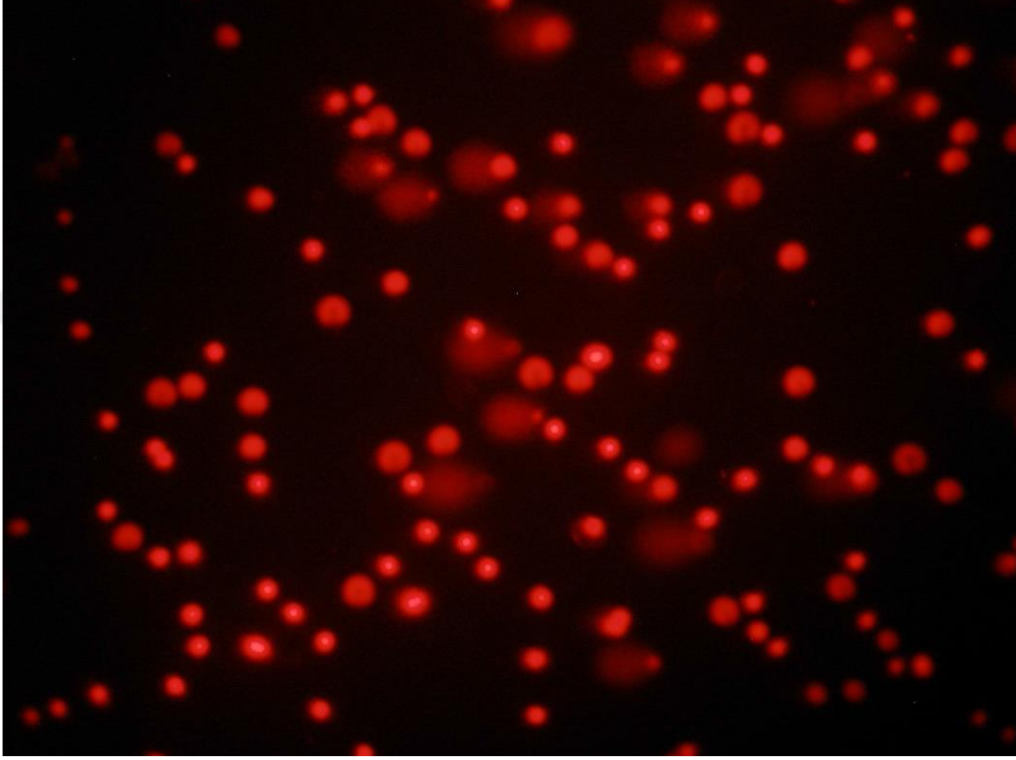
Komet yönteminin en önemli avantajı çeşitli hücre tipleri üzerinde çalışılabilmesidir. Yöntemin DNA hasarı tespitinde tercih edilmesi basit, hızlı, duyarlı olması, radyoaktif işaretleme gerektirmemesinden kaynaklanmaktadır [147]. Komet yönteminin dezavantajlarından bazıları ise tek hücre verisi, küçük hücreli numune, uygulama esnasında dikkat ve el becerisi gerektirmesi ve sonuçların yorumlanmasıdır [148].

Şekil 3.9'da Komet testinin aşamaları gösterilmiştir. Komet yöntemi uygulanırken öncelikle, canlı dokulardan izole edilmiş olan nükleus içerisindeki DNA ince bir agaroz jelin içine gömülür. DNA'nın süperkoil yapısının açılması ve kırıkların ortaya çıkması için alkali ortamda lizis çözeltisine konulur ve sonrasında elektroforetik mekanizma içerisinde yürütme işlemi yapılır. Fiziksel veya kimyasal mutajenlerle hasar görmüş DNA'lar onarım mekanizmaları tarafından onarılmayıp, tek veya çift zincirlerinde kırıklar oluşarak molekül ağırlığı ve elektrik yüklerine bağlı olarak elektriksel alanda farklı hızlarda göç ederler. Sonrasında hasar görmüş DNA, DNA'ya özgü olan EtBr gibi boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelenir [149].



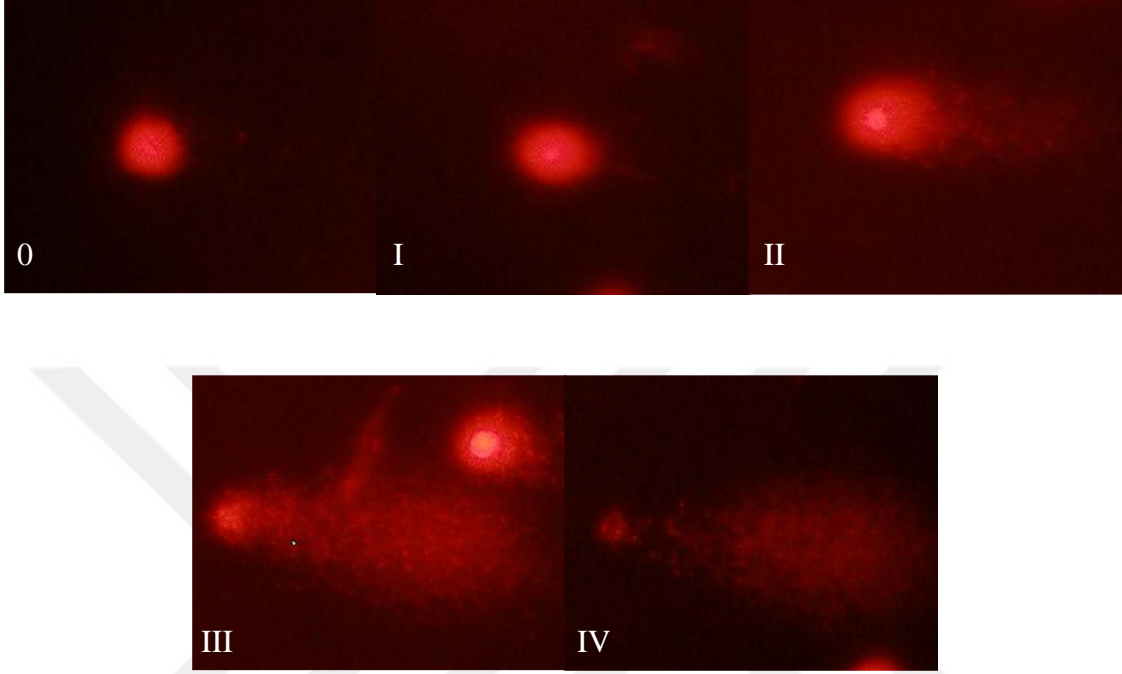
Şekil 3.9. Alkali Komet tekniğinde basamakların şematik gösterimi [147]

Floresan mikroskobu altında incelenen DNA moleküllerinin görüntüleri (Şekil 3.10), dairesel şekilden kuyruklu yıldız benzeyen çeşitli aşamalarda görüntüler meydana getirdiklerinden metotun adı İngilizcede “kuyruklu yıldız” manasında olan “ Comet Assay” olarak adlandırılmıştır [149].



Şekil 3.10. Farklı derecelerdeki DNA hasarınının mikroskop altındaki görüntüsü [149]

Mikroskop altında incelenen DNA'lar (soldan sağa) hasarsız, hafif hasarlı, orta hasarlı, ciddi hasarlı ve tam hasarlı olarak beş grup altında değerlendirilmektedir (Şekil 3.11) [150].



Şekil 3.11. Komet testi ile farklı düzeylerde hasarlı DNA görüntüleri 0: Hasarsız, I: Hafif hasar, II: Orta hasar, III: Ciddi hasar, IV: Tam hasar [149]

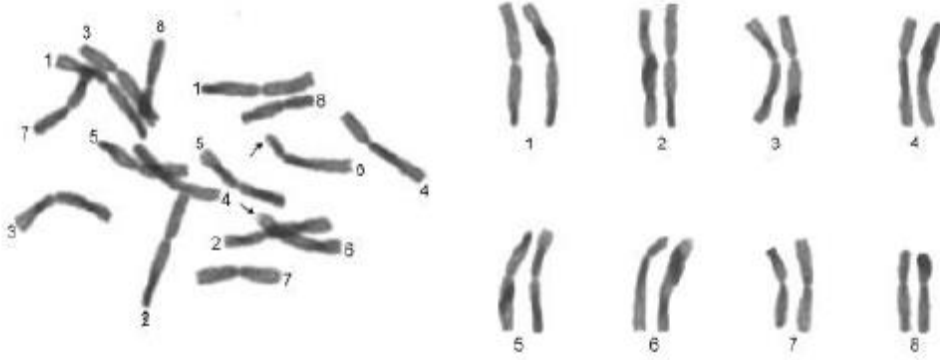
4. MATERYAL ve METOT

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan Organizmalar

A. cepa

A. cepa ($2n=16$, Şekil 4.1); çok iyi çimlenmesi, elde edilmesinin kolay ve ucuz olması, kromozom sayısının azlığı, kromozomlarının büyüklüğü ve sene süresince köklenip çokça kök edilebilmesinden dolayı bu çalışmada tercih edilmiştir [75,151].



Şekil 4.1. *Allium cepa* L. karyotipi [152]

4.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Sıra No	Kimyasal Adı	CAS No	Alındığı Yer
1	2-Klorofenol	95-57-8	Sigma Aldrich
2	Glasiyal asetik asit	64-19-7	Sigma Aldrich
3	Metil metano sülfonat (MMS)	66-27-3	Sigma Aldrich
4	Potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$)	16731-55-8	Sigma Aldrich
5	Hidroklorikasit (HCl)	7647-01-0	Fluka
6	Basik Fuksin	569-61-9	Sigma Aldrich
7	Absolüt alkol (Etanol)	64-17-5	Carlo Erba
8	Normal erime noktasına sahip agaroz jel (NMPA)	9012-36-6	Sigma Aldrich
9	Düşük erime noktasına sahip agaroz jel (LMPA)	39346-81-1	Sigma Aldrich
10	Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	6381-92-6	Sigma Aldrich
11	Trizma base ($NH_2C(CH_2OH)_3$)	77-86-1	Sigma Aldrich
12	Trizma hydrochloride ($C_4H_{11}NO_3.HCl$)	1185-53-1	Sigma Aldrich
13	Sodyum hidroksit (NaOH)	1310-73-2	Sigma Aldrich
14	Sodyum klorür (NaCl)	7647-14-5	Sigma Aldrich
15	Potasyum klorür (KCl)	7447-40-7	Sigma Aldrich
16	Sodyum Fosfat Dibazik-Heptahidrat ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	7782-85-6	Sigma Aldrich
17	Potasyum Fosfat Monobazik (H_2KPO_4)	7778-77-0	Sigma Aldrich
18	Triton X-100	9002-93-1	Sigma Aldrich
19	Magnezyum Klorid Hekzahidrat ($MgCl_2.6H_2O$)	7791-18-6	Sigma Aldrich
20	Ethidium bromide (EtBr)	1239-45-8	Sigma Aldrich

4.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve teçhizatlar

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

4.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

1 N HCl Çözeltisinin Hazırlanması (25 mL): 2,1 mL dH₂O üzerine 22,9 mL %37’lik saf HCl eklenmiştir.

45’lik Glasiyal Asetik Asitin Hazırlanması (100 mL): 55 mL dH₂O üzerine 45 mL %100’lük saf glasiyal asetik asit eklenmiştir.

Feulgen Boyasının Hazırlanması:

Feulgen boyası çalışmalarda (örn; kromozom sayımı için kök uçarında ya da yaprak ve tomurcuklardaki bitki dokularında) sıklıkla kullanılan bir boyadır. Çalışmamızın preparatların hazırlanması aşamasında feulgen boyası tercih edilmiştir.

Feulgen boyası protokole uygun bir şekilde aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

1. 1 g kristal halinde fuksin bazik (parafuksin) alınmıştır. Yaklaşık 10 cm çapında saat camı veya küçük bir havanda ezilmiştir.
2. 500 cm³'lük bir erlenmayerin dip kısmına toz halindeki bazik fuksin, kabın çevresine bulaştırmadan konulmuştur.
3. Farklı bir erlenmayerde ise 200 cm³'lük damıtık su kaynatılıp; kaynamış damıtık su toz halindeki fuksin bazik üzerine yavaşça dökülmüştür.
4. Bir yandan cam çubuk ile boya devamlı olarak karıştırılmıştır.
5. Boyanın sıcaklığı 50 °C oluncaya kadar karıştırmaya devam edilmiştir.
6. Boya üzerine 20 cm³ 1 N HCl ilave edilmiştir. Oluşan karışım filtre kâğıdı yardımıyla süzölmüştür.
7. Süzölen boya içerisine 2 g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) konulup ağzı kapaklı bir şişeye alınmıştır. Işık almayan bir ortamda en az bir gece olmak üzere 24 saat kadar dolapta bekletilmiştir. Vişneçürüğü renginden açık çay rengine dönen boya daha sonraki kullanımlar için 4 °C'da muhafaza edilmiştir [153].

Pozitif Kontrol Çözeltisinin Hazırlanması: 10 ppm MMS çözeltisi hazırlamak için; 0,005 g MMS tartılıp üzeri 500 mL olacak şekilde dH₂O ile tamamlanmıştır.

PBS Çözeltisi (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 suda çözüldükten sonra pH 7,4'e ayarlanarak son hacmi 100 mL'ye ayarlanmıştır.

Normal Erime Noktalı Agaroz (NMPA) Çözeltisi: 0,02 g NMPA tartılıp üzerine 2 mL 1X'lik PBS eklenip ve ısıtılarak % 1'lik NMPA çözeltisi hazırlandı ve ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamaların üzerine yayıldı.

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

Nükleus İzolasyon Tamponu: 4 mM MgCl₂.6H₂O, % 0,5' lik TritonX ve 0,2 M Tris tartılıp son hacim istenilen miktarda dH₂O ile tamamlanarak pH 7,5 olarak ayarlanmıştır.

Elektroforez Tamponu: Alkali elektroforez çözeltisi 1 mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit tartılıp 500 mL'ye tamamlanarak pH > 13 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Etidyum Bromür Çözeltisi: 10 mg EtBr 50 mL dH₂O içerisinde çözülerek stok EtBr çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözelti oda sıcaklığında saklanmış ve çalışma sırasında kullanmak için stok EtBr çözeltisinden 1 mL alınıp 9 mL dH₂O ile tamamlanarak çalışma için kullanılacak EtBr çözeltisi hazırlanmış olur.

Nötralizasyon Çözeltisi: 48,5 mg Trizma Base üzerine 800 mL dH₂O ile çözüldükten sonra pH:7,5 ayarlandıktan sonra 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Carnoy Çözeltisi: Absolüt alkolden 75 mL alınıp üzerine glasiyal asetik asitten 25 mL ilave edilerek hazırlanmıştır.

%70'lik Etil Alkolün Hazırlanması (100 mL): %96'lık etil alkolden 72,9 mL alınıp üzeri dH₂O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

4.2. Metot

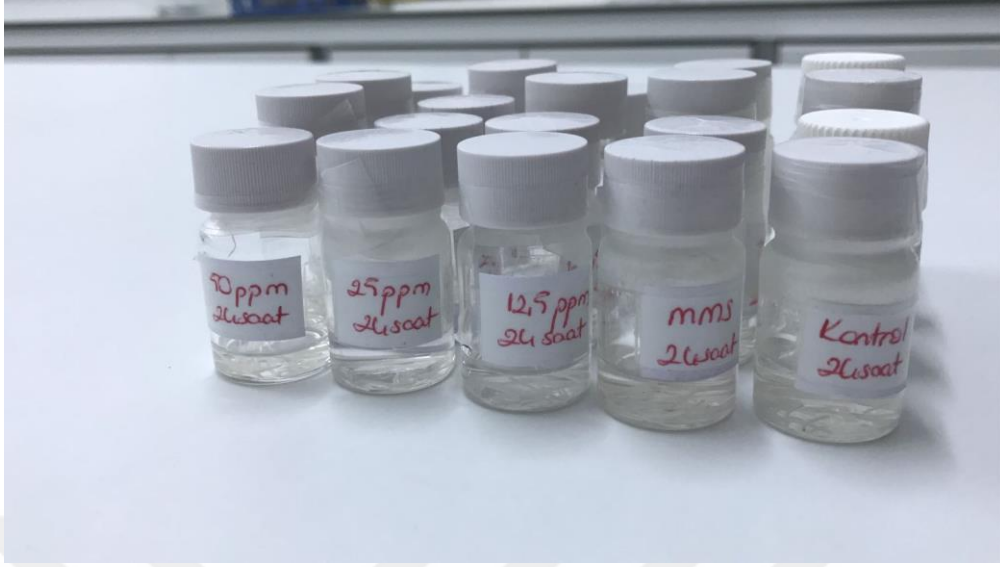
4.2.1. Allium Testi

4.2.1.1. Büyüme Engelleme Testi

Büyüme engelleme testi 2-KF'nin *A. cepa* kök meristem hücreleri üzerindeki sitogenetik etkilerini incelemek amacıyla kullanılacak dozları belirlemek için öncelikli olarak yapılmıştır. Bunun için ilk olarak EC₅₀ değeri belirlenmiştir. Yaklaşık olarak aynı büyüklükte olan soğanların (3-4 cm çapında) kök primordialarının hasar görmeyecek biçimde çimlenmiş olan köklerden ve dış kabuklarından temizlenmiştir. Eş zamanlı olarak 2-KF'nin 12,5, 25, 50 ve 100 ppm'lik derişimleri hazırlanmış, negatif kontrol grubu olarakta saf su uygulanmıştır. Uygulama grupları için beşer tane soğan kullanılmıştır. 96 saat süresince karanlık ortamda oda sıcaklığında ($\sim 21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) çimlendirilen soğanların ortalama kök uzunluklarının belirlenmesinde aynı soğan yumrusundan en iyi çimlenen 10'ar adet olmak üzere toplamda 50'şer kök alınmış ve ortalama kök uzunlukları saptanmıştır. İşlemler boyunca çimlenen soğanların bulunduğu ortamdaki çözeltiler eksildikçe gereken ilaveler yapılmıştır.

Kök uçlarının büyümesini negatif kontrol grubuna göre %50 oranında düşüren derişim miktarı EC₅₀ değerini vermektedir. Uygulanacak dozların belirlenmesinde ise 2xEC₅₀, EC₅₀ ve 1/2xEC₅₀ değerleri kullanılmıştır. *A. cepa* hücre döngüsünü 24 saatte tamamladığı için uygulama süreleri 24-96 saat olarak uygulanmıştır.

Soğan yumrularına 2-KF'nin 2xEC₅₀, EC₅₀ ve 1/2xEC₅₀ konsantrasyonlarını uygulamak için her bir konsantrasyonda kullanmak amacıyla 6'şar soğan 1 gün boyunca çimlendirilmiştir. Bu soğanlardan en iyi çimlenen 5'er soğan seçilerek her biri belirlenen konsantrasyonlar için kullanılmıştır ve azalan çözeltilere her gün ilaveler yapılmıştır. Belirlenen sürelerde hücre döngüsünü tamamlayan bütün soğanların uç kısımları 1-1,5 cm olacak şekilde saat 8¹⁵'de kesilmiştir. Farklı tüplere her bir doz ve süre için 10-12 kök ucu Carnoy fiksatif (3 absöüt alkol: 1 glasiyal asetik asit) içerisine alınarak buzdolabında 24 saat bırakılarak tespit edilmiştir. Örnekler incelenmek için %70'lik alkol içerisine alınmış ve +4°C'de depolanmıştır (Resim 4.1). Kök uçları mitoz bölünme sırasında oluşan anormallikleri ve MI değerlerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.



Resim 4.1. %70'lik alkol içerisinde farklı süre ve dozlarda depolanan kökler

4.2.1.2. Feulgen Tekniği İle Preparatların Hazırlanması

% 70'lik alkolde +4°C'de depolanan kök uçları kullanılmak üzere çıkarılarak bir tüp içerisine konulup üzerine 1-2 mL 1N HCl çözeltisi ilave edilmiş ve 8-10 dakika boyunca 60°C'deki su banyosunda bekletilmiştir. HCl'den çıkarılan kökler 5 dakika ara ile üç kez tekrarlanan distile su ile yıkama işlemiyle HCl'nin etkisini azaltmak amaçlanmıştır. Distile su ile yıkanan kök uçları oda sıcaklığında Feulgen boyası içerisinde 25-30 dakika boyunca boyanması için bırakılmıştır. Süre sonunda kök uçları koyu boyanmış ve 1-2 mm uzunluğunda jilet yardımıyla kesilen bu kök uçları bir lam üzerinde 1 damla %45'lik asetik asit eklenerek parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda üzeri lamelle kapatılan preparatlar ezme preparat şeklinde hazırlanmış ve preparatları yarı daimi hale getirmek için lamellerin etrafı tırnak cilası ile kapatılmıştır. Her bir dozun uygulama süreleri için farklı kök uçları olmak üzere 5'er adet kök ucu ezme preparat yöntemiyle hazırlanmış ve böylece mitotik anormallikler, MI ve faz frekansları belirlenmiştir. Her bir uygulama için beş farklı kökte toplamda 5000-6000 hücre sayılarak mitoz bölünme geçiren hücrelerin toplam hücreye bölünmesiyle MI değeri belirlenmiştir [154]. KA'ları belirlenmek için ise her bir konsantrasyondaki bir preparat üzerinden 100, toplamda 500 anafaz-telofaz hücresi sayılarak değerlendirilmiştir. Mitotik anormalliklerin de belirlenmesinin ardından en fazla görülen anormalliklerin fotoğrafları x40 objektifle çekilmiştir.

4.2.2. Komet Testi

Örnek başına hücre sayısının azlığı, düşük maliyet, uygulama kolaylığı, düşük seviyelerdeki DNA hasarını belirleme ve kısa sürede çalışmanın tamamlanabilmesinden dolayı Allium Komet testi tercih edilmiştir. Alkali Komet testi, Tice ve arkadaşlarının [147] uyguladığı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

1. Gerekli sayıda soğan 48 saat süre ile distile suda köklendirilmiştir.
2. 48. saatin sonunda soğanlar önceden hazırlanan konsantrasyonlara alınarak kök uzamaları belli sürelerle devam ettirilmiştir (24, 48, 72 ve 96 saat).
3. En geç 1 saat önceden cam petri kablari, jiletler ve filtre buzlukta bekletilmiştir.
4. Gerekli sayıda lam, ısıtıcı tabla üzerinde (50-60 °C) ısıtılmıştır.
5. %1 lik NMPA hazırlanarak ısıtılan lamaların üzerlerine 90-100 µl yayılarak oda ısısında dehidre edilmiştir.
6. Süresi dolan soğanlardan her konsantrasyon için her soğandan 10'ar kök kesilmiştir.
7. Cam petri kapının içine alınan kökler üzerine soğuk nükleus izolasyon tamponundan (pH:7,5) 600 µl ilave edilmiş ve bir jilet yada bisturi yardımıyla mekanik olarak parçalanmıştır.
8. Nükleus içeren tampon pipet yardımıyla filtreden geçirilerek ependorf tüpe alınmıştır.
9. Bu işlem sırasıyla tüm konsantrasyonlar için uygulanmıştır.
10. İçerisinde örneklerin bulunduğu ependorflar 1200 rpm de 7 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı dökülerek, pelet kısmı DNA hasarının belirlenmesi için kullanılmıştır.
11. Bu sırada %1,5'lik LMPA hazırlanmış ve 55 °C'de tutulmuştur.
12. 50 µl örnek, 50 µl LMPA ile karıştırılıp önceden hazırlanan lamaların üzerlerine yayılmıştır.
13. Üzerleri lamelle kapatılarak buz kasetlerinin üzerinde 3-5 dakika bekletilmiştir.
14. 3-5. dakikanın sonunda jeller donmuş olacak ve lameller yavaşça çekilerek alınacaktır.
15. Örnekler elektroforez tankına alınmış, elektroforez tampon çözeltisi (PH>13) içinde cihaz çalıştırılmadan +4 °C de 25 dakika bekletilmiştir. Ardından 25V, 20 dk, 300 mA de yürütülmüştür.
16. İşlem sonunda preparatlar +4 °C de 5 dk distile su içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra nötralizasyon tamponuyla +4 °C de 7-8 dk aralar ile 3'er kez nötralize edilmiştir.

17. Her preparat için 70 µl EtBr ile boyama yapılmış ve +4 °C de 5 dk bekletildikten sonra boyanın fazlası soğuk distile su ile akıtılmıştır.

18. Lamelle üzerleri kapatılarak mikroskop aşamasına geçilmiştir. Floresan mikroskopunda her bir preparat için 50 hücre analiz edilip DNA hasar derecesi (0-4) belirlenmiştir.

50 Komet (50 komet/slayt), bir floresan mikroskobu kullanılarak beş sınıftan birine (0-hasarsız, 1-hafif hasar, 2-orta hasar, 3-ciddi hasar, 4- tam hasar) ait olarak görsel olarak puanlanmıştır [144]. Böylece, Komet için toplam skor 0 (tüm hasarsız) ve 200 (tüm hasarlı) arasında olabilir.

DNA hasarının derecesi ifade etmek için aşağıdaki denklem kullanılmıştır:

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

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

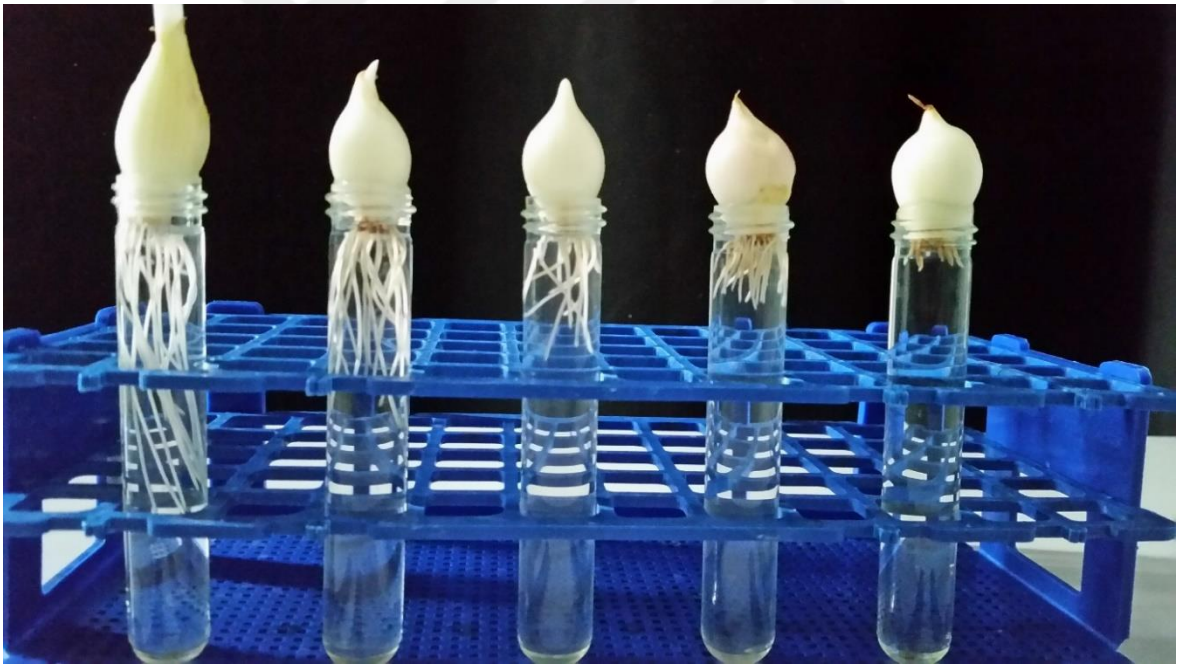
4.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. Sonuçlar SPSS 23.0 for Windows paket programında, grup ortalamalarının karşılaştırılması Duncan çoklu dağılım testi ile saptanmıştır. Anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak belirlenmiştir. Doz cevap ilişkisi Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Büyüme Engelleme Testi

Büyüme engelleme testi 2-KF'nin EC₅₀ değerinin belirlenmesi için yapılmıştır. 2-KF'nin 12,5, 25, 50 ve 100 ppm'lik konsantrasyonları ve saf su (negatif kontrol) 96 saat boyunca çimlenmeye bırakılmıştır (Resim 5.1). Süre sonunda her bir uygulama için en iyi çimlenmiş 10 kök alınarak (toplamda 50 kök) ortalama kök uzunluğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.1). Süre içerisinde azalan çözelti miktarları sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez olacak şekilde eklemeler yapılmıştır.



Kontrol

12,5 ppm

25 ppm

50 ppm

100 ppm

Resim 5.1. 2-KF'nin büyüme engelleme testi

Kontrol grubuna göre ortalama kök uzunluğunu %50 azaltan doz EC₅₀ değerini vermektedir. Çalışmamızda negatif kontrol grubunda çimlenmeye bırakılan soğanların ortalama kök uzunluğu 3,75 cm olarak tespit edilmiş ve EC₅₀ değerinin belirlenmesinde 3,75

cm'nin yarısı olan 1,875 cm ya da bu değere yaklaşık olan büyüme araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında 25 ppm'lik çözelti içerisinde bulunan kök uçlarının ortalama uzunluğu 2,05 cm (Büyüme oranı %54,67) olarak belirlenmiş ve bu değer negatif kontrol grubundaki soğanların ortalama kök uzunluğunun yarısı olan 1,875 cm'ye en yakın değer olduğu görülmüştür. Buna göre 2-KF'nin EC₅₀ değeri yaklaşık olarak 25 ppm olarak belirlenmiştir. 2-KF'nin uygulanan bütün dozları ortalama kök uzunluğunu doza bağımlı bir şekilde istatistiksel olarak azaltmıştır (r=-0,975 p=0,01). 100 ppm'lik uygulamada kontrol grubuna göre %87,47 oranında azalma tespit edilmiştir. 200 ve 400 ppm'lik uygulamalarda ise büyüme gözlemlenmemiştir (veri gösterilmemiştir).

Çizelge 5.1. 2-FK'nin büyümeyi engelleme testi sonuçları

Dozlar (ppm)	Ortalama uzunluk cm±SS*	% Büyüme	% Büyümede azalma
Kontrol	3.75± 0.2a	100,00	0
12,5	2.90±0.34b	77,33	22,67
25	2.05±0.11c	54,67	45,33
50	1.33±0.17d	35,47	64,53
100	0.47±0.08e	12,53	87,47

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)
SS: Standart sapma

5.2. 2-Klorofenol'ün Mitotik İndeks Üzerine Etkisi

2-KF'nin *A. cepa* kök meristematik uçlarına uygulanan farklı dozları ile oluşturduğu değişiklikler Çizelge 5.2 verilmiştir. 2-KF'nin uygulanan kontrol grubuna göre MI değerini azaltmış ancak 96 saatlik uygulamanın 25 ve 50 ppm'lik derişimleri ve 48 saatlik uygulamanın 12,5 ppm ve 50 ppm'lik derişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *A. cepa* kök uçlarına uygulanan 2-KF'nin MI değerlerine bakıldığında en düşük değer 72 saatlik uygulamadaki 12,5 ppm'lik konsantrasyonda ($67,4 \pm 1,1$), en yüksek değer ise 24 saatlik uygulamadaki 25 ppm'lik konsantrasyonda ($71,66 \pm 1,78$) görülmüştür. 24-96 saat boyunca 2-KF'nin tüm konsantrasyonları *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde MI'yı hafif derecede azaltmıştır.

2-KF mitotik faz frekanslarını değişik şekillerde etkilemiştir. 2-KF profaz frekansını 24 saatlik uygulamanın 50 ppm'lik derişimi hariç, 12,5 ppm'lik derişimin 72 saatlik uygulaması ve 96 saatlik uygulamalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaltmıştır. Metafaz frekansını 24 saat ve 48 saatlik uygulamalarda artışlar ve azalışlar şeklinde etkilerken, 72 ve 96 saatlik (25 ppm hariç) uygulamalarda istatistiksel olarak arttırmıştır. 2-KF anafaz frekansını 25 ppm'in 96 saatlik uygulaması ve 50 ppm'in 72 saatlik uygulaması hariç diğer bütün uygulamalarda kontrol grubuna göre arttırmıştır.

2-KF'nin en yüksek telofaz frekansına 96 saatlik uygulamanın 25 ppm'lik derişiminde ($11,61 \pm 1,06$) rastlanılmışken, en düşük telofaz frekansı ise 24 saatlik uygulamanın 50 ppm'lik derişimde ($7,81 \pm 0,38$) rastlanılmıştır.

Çizelge 5.2. 2-KF'nin *A. cepa* kök hücrelerindeki mitoz bölünme üzerine etkisi

Konsantrasyon (ppm)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± SS	Mitotik Faz Safhaları (%) ± SS*			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5159	71,67±0,97a	88,74±1,1a	1,39±0,2a	1,41±0,17a	8,45±0,98a
MMS-10	5172	53,88±2,94b	79,94±0,96b	3,08±0,48b	2,6±0,77b	14,38±1,28b
12,5	5092	71,08±0,97a	86,19±0,49c	1,48±0,14a	1,83±0,24a	10,49±0,39c
25	5232	71,66±1,78a	85,25±0,65c	2,26±0,11c	1,79±0,29a	10,71±0,93c
50	5138	70,55±0,98a	88,91±0,41a	1,41±0,1a	1,87±0,17a	7,81±0,38a
Kontrol- 48 saat	5153	71,94±0,5a	85,91±0,84a	1,72±0,23a	1,96±0,19a	10,40±0,63ab
MMS-10	5192	54,59±1,67c	82,72±0,98b	2,18±0,4b	3,52±0,51b	11,58±1,11c
12,5	5185	69,5±0,44b	85,26±0,35a	1,69±0,2a	2,06±0,24a	10,99±0,31bc
25	5119	71,56±0,42a	85,56±0,77a	2,13±0,32b	2,59±0,2c	9,72±0,65a
50	5171	68,57±0,47b	85,86±0,63a	1,66±0,25a	2,2±0,17a	10,29±0,43ab
Kontrol-72 saat	5253	68,59±0,89a	86,86±0,35a	1,69±0,23a	1,83±0,13a	9,62±0,53a
MMS-10	5305	56,47±1,34b	83,9±0,95b	2,84±0,34b	3,21±0,27b	10,05±0,68ac
12,5	5099	67,4±1,1a	85,45±0,22c	2,39±0,23c	2,47±0,28c	9,7±0,65a
25	5239	67,63±0,66a	86,59±0,25a	2,65±0,09bc	2,4±0,12c	8,35±0,28b
50	5051	68,48±0,53a	84,94±0,87c	2,69±0,27bc	1,76±0,12a	10,61±0,78c
Kontrol- 96 saat	5208	70,04±0,59a	88,09±0,87a	1,7±0,32a	1,92±0,19ac	8,29±0,63a
MMS-10	5121	55,45±1,41b	84,08±0,6b	2,61±0,25b	2,82±0,3b	10,49±0,51b
12,5	5232	69,06±0,75ac	84,92±0,77b	2,46±0,17bc	2,16±0,13c	10,47±0,64b
25	5110	68,34±0,74c	84,54±0,87b	2,07±0,48ac	1,79±0,29a	11,61±1,06c
50	5136	68,45±0,84c	85,11±0,93b	2,42±0,15bc	2,47±0,19d	10±0,69b

* Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

SS: Standart Sapma

5.3. 2-Klorofenol'ün Neden Olduğu Kromozomal Anormallikler

2-KF'nin etkisi ile meydana gelen anafaz-telofaz hücrelerindeki anormalliklerin çeşitleri ve oranları Çizelge 5.3'te belirtilmiştir. 2-KF tarafından oluşturulan toplam anormalliklere bakıldığında en fazla anormallik 96 saatlik uygulamanın 50 ppm'lik dozunda ($17,6 \pm 0,54$), en az anormallik olayına ise 24 saatlik uygulamanın 12,5 ppm'lik dozunda ($12,8 \pm 1,3$) rastlanılmıştır. Uygulanan süre ve artan dozlara göre toplam anormallik kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Toplam KA'larda doza ve zamana bağlı bir artış gözlemlenmiştir (24 saat için $r=0,877$ $p=0,01$; 48 saat için $r=0,876$ $p=0,01$; 72 saat için $r=0,8$ $p=0,01$ ve 96 saat için $r=0,768$ $p=0,01$). Ancak toplam anormallikler pozitif kontrol grubu olan MMS'den düşük bulunmuştur.

Farklı süre ve dozlarda uygulanan 2-KF'nin *A. cepa* kök uçlarında meydana getirdiği ve anafaz-telofaz safhasında görülen anormallikler bozulmuş anafaz-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık ve anafaz köprüsüdür. 2-KF'nin uyardığı en fazla görülen anormallik bozulmuş anafaz-telofaz iken ($6,6$ 50 ppm 96 saat), en az görülen anormallik ise anafaz köprüsüdür ($1,2$ 12,5 ppm 24 saat).

2-KF'nin oluşturduğu anormalliklere bakıldığında 96 saatlik uygulamanın 12,5 ve 25 ppm'lik dozu hariç diğer doz ve sürelerde bozulmuş anafaz-telofaz (Şekil 5.3a) oranının kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür.

Bir diğer anormallik olan kalgın kromozom (Şekil 5.3b) olayına en fazla 96 saatlik sürenin 25 ppm'lik konsantrasyonunda ($5,4$), en az ise 24 saatlik uygulamanın 12,5 ppm'lik dozunda ($2,6$) rastlanılmıştır. 2-KF, 72 saatlik uygulamanın 12,5 ppm'lik dozu dışında kalgın kromozom oranını yükseltmiştir.

Yapışkanlık olayına ise en fazla 48 saatlik uygulama süresinin 50 ppm'lik dozunda ($5,2$) rastlanılmıştır. 24 saat, 72 saat ve 96 saatlik uygulamaların 25 ppm'lik dozları ve 48 saatlik uygulamanın 12,5 ppm'lik dozu hariç diğer dozlarda artış yaşanmıştır. En az yapışkanlık ise 48 saatlik uygulama süresinin 12,5 ppm'lik dozu ile 72 saatlik uygulama süresinin 25 ppm'lik dozunda ($2,6$) görülmüştür (Şekil 5.3c)

2-KF'nin neden olduğu anormalliklerden biri anafaz köprüsüdür (Şekil 5.3d). Anafaz köprüsü anormallikler arasında en az görülen anormallik olup 12,5 ppm'lik dozun 24 saatlik uygulamasında $1,2$ olarak tespit edilmiştir. En fazla olarak da 72 saatlik uygulamanın 25 ppm'lik dozunda ($3,6$) görülmüştür. Diğer anormalliklerle karşılaştırıldığında 12,5 ppm'in

48 saatlik uygulaması ve 25 ppm'in 72 saatlik uygulaması hariç daha düşük oranda rastlanılmıştır.

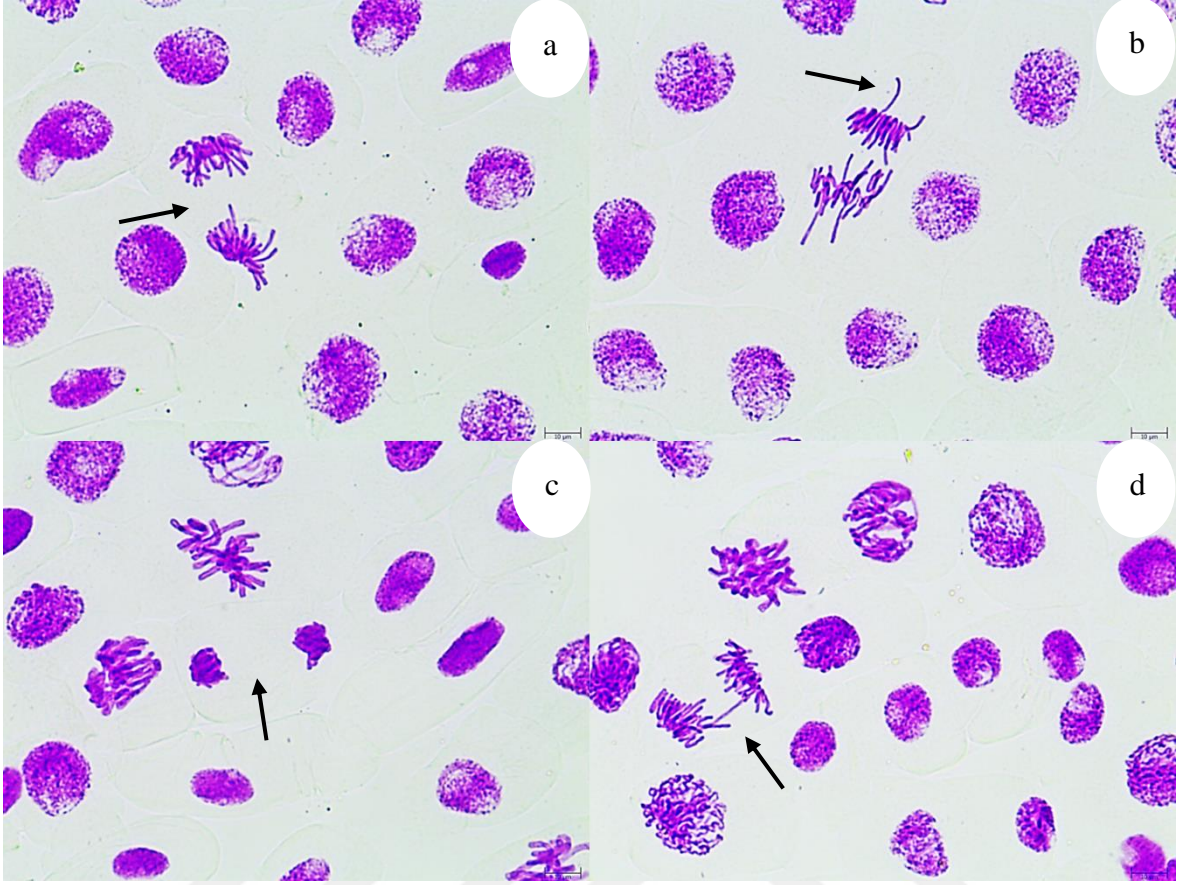


Çizelge 5.3. *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde 2-KF'nin neden olduğu kromozomal anormallikler

Dozlar (ppm)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)*				Toplam Anormallikler (%± SS)
		Bozulmuş anafaz- telofaz	Kalgın kromozom	Yapışkanlık	Anafaz köprüsü	
Kontrol- 24 saat	500	3,6	2,2	4,2	1,4	11,4±0,54a
MMS-10	500	4	4	5,6	4,2	17,8±0,83b
12,5	500	4,6	2,6	4,4	1,2	12,8±1,3c
25	500	5,8	3,4	3,8	1,8	14,8±0,83d
50	500	5,6	3,8	4,2	3	16,6±0,54e
Kontrol- 48 saat	500	3	2,8	3,2	2,6	11,6±0,54a
MMS-10	500	5	4,6	6,8	4,2	20,6±0,89b
12,5	500	4,4	4	2,6	2,8	13,8±0,83c
25	500	5,4	4,2	3,4	2,4	15,4±0,54d
50	500	5,4	4	5,2	2,2	16,8±0,83e
Kontrol-72 saat	500	3,2	3,4	3,2	2	11,8±0,44a
MMS-10	500	5,8	4,2	5,4	4,2	19,6±0,54b
12,5	500	4,4	3,4	5	1,8	14,6±0,89c
25	500	5,6	3,8	2,6	3,6	15,6±0,89d
50	500	6	4,4	4,6	2,2	17,2±0,83e
Kontrol- 96 saat	500	5,6	2,2	3,8	2,4	14±0,7a
MMS-10	500	6,4	5,4	4,2	4,8	20,8±0,83b
12,5	500	4,6	3,8	5	2,4	15,8±0,83c
25	500	5,4	5,4	2,8	2,6	16,2±0,44c
50	500	6,6	4,8	4,2	2	17,6±0,54d

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

SS: Standart Sapma



Resim 5.2. 2-KF'ye maruz bırakılmış *A. cepa* kök hücrelerinde görülen anafaz-telofaz anormallikleri a: Bozulmuş anafaz-telofaz, b: Kalgın kromozom, c: Yapışkanlık, d: Anafaz köprüsü

5.4. Allium Komet Testine Ait Bulgular

2-KF'nin *A. cepa* kök meristematik hücreleri üzerinde oluşturduğu DNA hasarı 24-96 saat arasında Komet testi ile tespit edilmiştir (Çizelge 5.4). 2-KF'nin uygulanan bütün dozları DNA hasarını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttırmıştır ve bu artışlar doza bağımlı bulunmuştur (24 saat için $r=0,957$ $p=0,01$; 48 saat için $r=0,952$ $p=0,01$; 72 saat için $r=0,976$ $p=0,01$ ve 96 saat için $r=0,956$ $p=0,01$). 2-KF'nin oluşturduğu en yüksek hasar değeri 50 ppm'lik dozun 72 saatlik uygulamasında (165 ± 2) ve en düşük hasar değeri 12,5 ppm'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (43 ± 2) rastlanılmıştır. 2-KF'nin 50 ppm'lik uygulaması hariç diğer dozlarda süreye bağlı olarak DNA hasarında artış gözlemlenmiştir.

Çizelge 5.4. 2-KF'nin *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti

Uygulama	Konsantrasyon (ppm)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)*			
		24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Kontrol	-	18,67±1,53a	19,67±1,53a	19±1a	19,33±1,53a
MMS	10	169,67±1,15b	161,33±1,53b	168,33±1,15b	165,67±2,08b
	12,5	43±2c	65,33±2,08c	96,33±2,08c	115,67±2,89c
2-Klorofenol	25	135,67±2,52d	141±1d	143,33±2,52d	152,33±0,58d
	50	164,33±1,53e	162,67±1,15b	165±2b	164±1b

*Sütunlardaki farklı harfler $p < 0,05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pestisit ve boya maddelerinin ara ürünü ya da biyosit olarak kullanılan klorofenoller, endüstriyel atıklar ve yaşadığımız çevrede bulunan kirleticilerden sadece bir grubu temsil etmektedir. Bu toksik bileşiklerin su içerisinde kısmen çözünmelerinden dolayı nehir, göl ve diğer sucul alanlarda sıkça rastlanmaktadır [155]. Suda yaşayan organizmalara ve insanlara karşı potansiyel toksik etkileri nedeniyle, bunların birçoğu USEPA ve Avrupa Çevre Ajansı tarafından öncelikli kirleticiler olarak kabul edilmektedir [27,156,157].

Birçok bitki türü (*Crepis capillaris*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum*, *Tradescantia sp.*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Lycopersicum esculentum*, *Arabidopsis thaliana* ve *Allium cepa*) kimyasalların sitotoksik etkilerini belirlemek için sıkça tercih edilmektedir. Bu test sistemlerinden biri olan *Allium* testi ilk defa 1938 yılında Levan tarafından kolşisin etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır [135]. Daha sonraki yıllarda bu temel test sistemine belirli modifikasyonlar yapılarak kullanım alanı geliştirilmiştir [9]. Bu test sisteminde büyüme, EC₅₀ gibi makroskobik parametreler, büyük ve az olan kromozom sayıları ile c-mitoz, kalgın kromozom, yapışkanlık gibi aberasyonların gözlemlendiği mikroskobik parametreler çok kolay bir şekilde değerlendirilebilmektedir. Ayrıca bu testin sonuçları diğer test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir [9,158-170].

Bu çalışma ile 2-KF'nin *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerine olan sitotoksik etkileri *Allium* testi belirlenmiştir. *Allium* kök büyüme inhibisyon testi kullanılarak 2-KF'nin EC₅₀ değeri yaklaşık 25 ppm (%54,67) olarak bulunmuştur. 2-KF'nin bütün konsantrasyonları ortalama kök uzamasını istatistiksel olarak azaltmış ve bunun yanında kök büyüme değerlerinde doza bağlı bir azalma görülmüştür ($r=-0,975$ $p=0,01$). Genel olarak, kök büyümesinin engellenmesi apikal meristematik aktivite [171] ve farklılaşma esnasında hücre uzamasıyla alakalıdır [172]. 2-KF, *Daucus carota* L., *Ipomoea batatas* L. ve *Solanum aviculare*'nin [173] tüylü kök kültürlerinde büyüme indeksini ve aynı zamanda insan diş eti fibroblastlarında da hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır [174]. Literatürdeki benzer çalışmalarda 2-KF'nin EC₅₀ değerleri Microtox® *Vibrio fischeri* testi ile 16±1,0 µg/mL [175] ve 16,1 µg/mL [176], ToxAlert10® ve LUMISTox® *Vibrio fischeri* testi ile 27,2 ve 18 µg/mL

olarak belirlenmiştir [176]. 2-KF'nin *Cucumis sativus* L., *Lactuca sativa* L., *Panicum miliaceum* için IC₅₀ değerleri sırasıyla 75, 150 ve 60 mg/L olarak bulunmuş [177] ve yapılan başka bir çalışmada *Dunaliella tertiolecta* için IC₅₀ değeri 48, 72 ve 96 saat süre ile sırasıyla 46,5, 58,6 ve 62,4 mg/L olarak tespit edilmiştir [178]. Aruoja ve arkadaşları [179] tarafından *Pseudokirchneriella subcapitata* 72 saatte büyüme inhibisyonu testi sonucunda EC₅₀ değeri 69,5 mg/L, 15 dk *Vibrio fischeri* lüminesans inhibisyon testi ile 51,8 mg/L olarak bulunmuştur. Ousaa ve arkadaşları [180] tarafından *Tetrahymena pyriformis*'de 2-KF'nin pIC₅₀ değeri 0,183 µM olarak bulunmuştur. *E. coli* DH5α ve 2 saat süreyle inkübasyondan sonra izole edilmiş sıçan hepatositleri için 2-KF'nin LD₅₀'si sırasıyla 700 µM ve 1x10⁻³ M olarak [181,182] ve genetik mühendisliği tarafından yapılmış olan DPD2540 *E. coli* suşu üzerinde 2-KF'nin EC₂₀'si 1,5 mM olarak tespit edilmiştir [183].

2-KF'nin yaklaşık olarak bulunan EC₅₀ değerinin sonunda uygulama dozlarını belirlemek için EC₅₀ değerinin, 2xEC₅₀, EC₅₀ ve 1/2xEC₅₀ değerleri kullanılmıştır. Buna bağlı olarak 2-KF'nin 50, 25 ve 12,5 ppm'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Saf su negatif kontrol grubu, MMS'de pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. *A. cepa* hücre siklusunu 24 saat içerisinde tamamladığı için uygulama süresi 24-96 saat olarak seçilmiştir [156,169]. Literatürde çalışmamıza benzer şekilde 24, 48, 72 ve 96 saat [13,166] uygulama süresi ile yapılan çalışmaların bulunmasının yanı sıra 72 saat [184], 24, 48 ve 72 saat [185-187], 4 saat [188,189], 6, 12 ve 24 saat [190], 24 ve 96 saat [191] ve 2 saat [192] gibi farklı uygulama sürelerine göre yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır.

2-KF'nin tüm konsantrasyonları 24-96 saat boyunca *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde MI'yı hafif derecede azaltmıştır. Ancak azalan değerlerden 96 saatlik uygulamanın 25 ve 50 ppm'lik derişimleri ve 48 saatlik uygulamanın 12,5 pmm ve 50 ppm'lik derişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 2-KF, hücre ölümünden ziyade hücre çoğalmasını inhibe etmiş olabilir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 96 saatte telofaz indeksi ve 72 saatte metafaz indeksinin istatistiksel olarak arttırmış ve 96 saatte profaz indeksini önemli derecede azaltmıştır. MI'da artış veya azalma, çevresel biyo-izleme çalışmalarında sitotoksisitenin bir parametresi olarak kullanılmaktadır [193]. DNA onarımının yapılması için gerekli olan sürenin azalmasından dolayı hücre sayısında artma yaşanabilir [161].

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 [151]. Mitotik aktivite üzerindeki azalma S evresinde oluşan DNA sentezinin bloke edilmesiyle de oluşmaktadır [194]. Hücre siklusunun inhibisyonu ile DNA sentezine spesifik olan DNA polimeraz ve çeşitli işlevler için gerekli olan çoğu enzim proteinlerin incelenen maddeye hedef olması ile engellenmektedir. Bu olay antimitotik etki şeklinde yorumlanmaktadır [159, 195]. Mitotik indeksin azalmasındaki diğer bir neden olarakta ATP'nin azalması ve enerji üretiminin engellenmesi gösterilebilmektedir [196].

Sonuçlarımıza benzer bir şekilde, 2-KF'nin 5 ppm'lik dozuna 1 gün boyunca maruz kalan *A. cepa* meristematik hücreler üzerindeki etkiye bakıldığında MI değerinin düştüğü tespit edilmiştir [197]. Aynı zamanda yapılan bir başka çalışma da 2-KF *in vitro* insan lenfositlerinde sitotoksik etki göstermiştir [175]. Profaz indeksinin genel olarak azalması (24 saat 50 ppm hariç), 2-KF'nin interfaz aşamasındaki hücrelerin profaza girmesini önleyerek mitoz başlamasını engellemesinin bir sonucu olabilir [198].

Çizelge 5.3 2-KF etkisi ile *A. cepa* kök meristem hücreleri üzerinde meydana gelen anafaz-telofaz bozukluklarının (bozulmuş anafaz-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık ve anafaz köprüsü) sonuçlarını özetlemektedir. Toplam KA'larda, 24 saat ($r=0,877$ $p=0,01$), 48 saat ($r=0,876$ $p=0,01$), 72 saat ($r=0,8$ $p=0,01$) ve 96 saat ($r=0,768$ $p=0,01$) için doza ve zamana bağlı bir artış gözlemlenmiş ve bu artış 2-KF'nin tüm konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Farklı doz ve saatlerdeki toplam KA'lar, MMS'de oluşan toplam KA'lardan daha düşük seviyede gözlemlenmiştir. 2-KF'nin etkilediği *A. cepa* kök meristem hücrelerinde en fazla görülen anormallik olan bozulmuş anafaz telofaz 50 ppm'lik konsantrasyonun 96 saatlik uygulama süresinde (%6,6), en az görülen anormallik ise anafaz köprüsü olup 12,5 ppm'lik konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasında (% 1,2) tespit edilmiştir.

Bozulmuş anafaz-telofaz ve kalgın kromozom, kutuplara doğru hareket eden kromozomların başarısız olması, iğ yapısının deformasyonundan ya da bozulmuş mikrotübüllerden kaynaklanabilir [199-202]. Ayrıca asentrik parçaların veya kromozomların kutuplara hareket etmesiyle oluşan kalgın kromozomlar MN oluşumuna da sebep olabilmektedir [152].

2-KF'nin meydana getirdiği anormalliklerden biri olan anafaz köprüsü en çok 72 saatlik uygulama süresinin 25 ppm'lik konsantrasyonunda (%3,6) tespit edilmiştir. Anafaz köprüleri, kullanılan kimyasal maddelerin klastojenik etkisi sonucu kromozomların

kırılması ya da füzyonu, eşit olmayan kromatid değişimi, disentrik kromozomdan dolayı, replikasyon enzimlerinin aktivasyonunun değiştirilmesinden veya yapışkanlıktan dolayı oluşabilir [203,204].

Diğer bir anormallik olan yapışkanlık ise en çok 48 saat uygulama süresinin 50 ppm'lik konsantrasyonunda (%5,2) meydana gelmiştir. Genellikle kromozomlar üzerinde geri dönüşümsüz etkiye sebep olan yapışkanlık ise, artan kromozom kısalması ve yoğunlaşması, muhtemelen DNA'nın depolimerizasyonu ve nükleoproteinlerin kısmi çözünmesinden veya kromatin liflerinin ekstra kromozomal ile iç içe geçmesinden kaynaklanabilir [190,205-207]. Kromozomlarda yapışkanlık; DNA-DNA veya DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olur [208]. Aynı zamanda yapışkanlık, test edilen bileşiğin toksik olduğunun göstergesi olmakla beraber bu anormalliğin hücre ölümüne neden olduğu da düşünülmektedir [9,209].

2-KF'nin, insan lenfositleri ve *Carassius auratus* eritrositlerinde yapılan bir araştırmada doza bağlı bir artışın mikronükleus frekansını indüklediği gözlemlenmiştir [175]. Aynı zamanda Önfelt [210] 2-KF'nin Çin hamster V79 hücrelerinde c-mitoz ve anöploidiyi indüklediğini göstermiştir. Morita ve arkadaşlarının [211] *in vitro* Çin hamster akciğer hücrelerinde yapmış olduğu çalışmaya göre 2-KF, karsinojenisiteye neden olmaksızın KA' yı indüklemiştir. 2-KF, S9 karışımı olan ve olmayan ortamda 6 saatlik kısa süreli tedaviden sonra Çin hamster akciğer hücrelerinde yapısal KA'ları indüklemiştir [212]. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, 2-KF testislerdeki ve kemik iliği hücrelerindeki KKD frekansını [213], kemik iliği hücrelerinde ise MN frekansını arttırmamıştır [214].

Bu araştırma kapsamında, 2-KF'nin genotoksik etkileri Komet Testi ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Günümüzde bireysel hücrelerde DNA hasar ve tamirini belirleyebilmek için kullanılan bir yöntem olan Komet testi basit, çok yönlü, hızlı, görsel, maliyeti düşük, hassastır [148,150]. DNA çapraz bağlantıları (örneğin, timidin dimerleri) ve oksidatif DNA hasarı gibi diğer bazı DNA hasar lezyonları, spesifik DNA tamir enzimleri ve lezyon-spesifik antikoları kullanılarak Komet testi ile belirlenebilir. Allium testinden farklı olarak *A. cepa* meristematik kök hücreleri aynı zamanda Komet testinde de kullanılmaktadır [16,17,166,215-219]. Bütün bu avantajlar göz önüne alındığında çalışmamızda Komet testi uygulanmış ve sağlıklı veriler elde edilmiştir.

A. cepa kök meristematik hücreleri üzerinde 2-KF'nin DNA hasarı Komet testi ile 24-96 saat arasında değerlendirilmiştir (Çizelge 5.4). 2-KF ile muamele edilen hücreler,

negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 24 saat ($r=0,957$ $p=0,01$), 48 saat ($r=0,952$ $p=0,01$), 72 saat ($r=0,976$ $p=0,01$) ve 96 saat ($r=0,956$ $p=0,01$) boyunca önemli derecede doz bağımlı bir şekilde DNA hasarı göstermiştir. 2-KF'nin oluşturduğu en yüksek DNA hasar değeri 50 ppm'lik dozun 72 saatlik uygulamasında (165 ± 2) ve en düşük DNA hasar değeri 12,5 ppm'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (43 ± 2) elde edilmiştir. 50 ppm'deki DNA hasarı, pozitif kontrol olan MMS'ye yakın bulunmuştur. 2-KF'nin neden olduğu oksidatif strese bağlı olarak, *Carassius auratus*'ta doza bağımlı reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit dismutaz ve katalaz üretimi 2-KF'ye maruz kaldıktan sonra artmıştır [220-222]. 2-KF ayrıca insan diş eti fibroblastlarında DNA çift iplik zincir kırılmalarını indüklemiştir [174].

Sonuç olarak, 2-KF *A. cepa* kök meristem hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesi nedeniyle mitotik indekste çok az bir azalmaya neden olmakla beraber KA'larda ve DNA hasarında artışa neden olarak genotoksik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir. Birçok endüstriyel alanda direkt üretimde ya da yan ürün olarak kullanılan 2-KF'nin dikkatli bir şekilde uygun dozlarda kullanılması aynı zamanda farklı moleküler test sistemleri ile de araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Czaplicka, M., 2004, "Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment", *Sci. Total Environ.*, 322 (1-3): 21-39.
- [2] Parida, K. M. And Parija, S., 2006, "Photocatalytic degradation of phenol under solar radiation using microwave irradiated zinc oxide", *Sol. Energy*, 80 (8): 1048-1054.
- [3] Michałowicz, J. And Duda, W., 2007, "Phenols-Sources and Toxicity", *Pol. J. Environ. Stud.*, 16 (3): 347-362
- [4] Vallejo, M., Fernández-Castro, P., San Román, M. F. And Ortiz, I., 2015, "Assessment of PCDD/Fs formation in the Fenton oxidation of 2-chlorophenol: Influence of the iron dose applied", *Chemosphere*, 137, 135-141.
- [5] United States Environment Protection Agency, 2002, "National Recommended Water Quality Criteria", *EPA-822-R-02-047*.
- [6] WHO, 2003, "Chlorophenols in drinking-water", Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality World Health Organization, Geneva (WHO/SDE/WSH/03.04/47)
- [7] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2017, Priority List of Hazardous Substances, The ATSDR (2017) Substance Priority List, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/> Assessed 20 April 2018.
- [8] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1999, Public Health Statement for Chlorophenols, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp107-c1-b.pdf>. Assessed 20 April 2018.
- [9] Fiskesjö, G., 1985, "The Allium test as a standard in environmental monitoring", *Hereditas*, 102 (1): 99-112.
- [10] Caritá, R. And Marin-Morales, M. A., 2008, "Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes", *Chemosphere* 72 (5): 722–725.
- [11] Chaparro, T. R., Botta, C. M. And Pires, E. C., 2010, "Biodegradability and toxicity assessment of bleach plant effluents treated anaerobically", *Water Sci. Technol.*, 62 (6): 1312-1319.
- [12] 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.

- [13] Liman, R., Ciğerci, İ. H. And Öztürk, N. S., 2015, “Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration and comet assay”, *Pestic. Biochem. Phys.*, 118: 38-42.
- [14] Palmieri, M. J., Andrade-Vieira, L. F., Trento, M. V. C., de Faria Eleutério, M. W., Luber, J., Davide, L. C. And Marcussi, S., 2016, “Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*”, *Water Air Soil Poll.*, 227 (5): 156-166.
- [15] 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.
- [16] 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.*, UK, (pp. 98–119).
- [17] Liman, R., 2013, “Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay”, *Chemosphere*, 93 (2): 269-273.
- [18] Kaya, N., Çakmak, I., Akarsu, E. And Kaya, B., 2015, “DNA damage induced by silica nanoparticle”, *Fresen. Environ. Bull.*, 24 (12 A): 4478-4484.
- [19] Santos, C. L., Pourrut, B. And Oliveira, J. M. P., 2015, “The use of comet assay in plant toxicology: recent advances”, *Front. Genet.*, 6, 216.
- [20] Dhawan, A., And Anderson, D., (Eds.), 2016, “The comet assay in toxicology” (Vol. 30). *Roy. Soc. Chem.*
- [21] Jana, A., Ghosh, M., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A. And Mukherjee, A., 2017, “Hazard identification of coal fly ash leachate using a battery of cyto-genotoxic and biochemical tests in *Allium cepa*”, *Arch. Agron. Soil Sci.*, 63 (10): 1443-1453.
- [22] Kaygisiz, Ş. Y. And 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.
- [23] Kösesakal, T., 2011, “Tatlı Su Eğreltisi *Azolla filiculoides* Lam. Kullanılarak Petrol Hidrokarbonlarının Fitoremediasyonu”, Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 1-4.
- [24] Greenberg, B. M., Huang, X. D., Gerhardt, K., Glick, B. R., Gurska, J., Wang, W., Lampi, M., Khalid, A., Isherwood, D., Chang, P., Wang, H., Wu, S. S., YU, X.-M., Dixon, D. G. And Gerwing, P., 2007, “Field and laboratory tests of a multi-process phytoremediation system for decontamination of petroleum and salt impacted soils, In: Proceedings of the Ninth International In Situ and On-Site Remediation Symposium”, Gavaskar, AR and Silver CF, eds., Batelle Press, Columbus, OH.

- [25] Aboul-Kassim, T. A. And Simoneit, B. R., 2001, Interaction mechanisms between organic pollutants and solid phase systems, In *Pollutant-Solid Phase Interactions Mechanisms, Chemistry and Modeling*, 107-167, Springer, Berlin, Heidelberg.
- [26] Hickey, J. P., Batterman, S. A. And Chernyak, S. M., 2006, "Trends of chlorinated organic contaminants in Great Lakes trout and walleye from 1970 to 1998", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 50 (1): 97-110.
- [27] Igbinosa, E. O., Odjadjare, E. E., Chigor, V. N., Igbinosa, I. H., Emoghene, A. O., Ekhaise, F. O., Igiehon N. O. And Idemudia O. G., 2013, "Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment:the public health perspective", *Sci. World J.*, 460215.
- [28] Saha, N. C., Bhunia, F. And Kaviraj, A., 1999, "Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems" *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63 (2): 195-202.
- [29] Kolankaya, N. And Ünal, A. T., 2001, "Dechlorination of bleached kraft pulp by laccase enzyme produced from some white-rot fungi", *Turkish Journal of Biology*, 25(1), 67-72.
- [30] Nukatsuka, I., Nakamuna, S., Watanabe, K. And Ohzeki, K., 2000, "Determination of phenol in tap water and river water samples by solid-phase spectrophotometry", *Anal. Sci.*, 16 (3): 269-273.
- [31] Güler, Ç., 1997, "Su kalitesi", Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, No:43, 94s., Ankara.
- [32] Türkoğlu, S., 2010, "Sudaki fenolik kirleticilerin farklı adsorplayıcılara adsorpsiyonu ve katının mikrodalga rejenerasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 44.
- [33] Boyd, S. A., Shelton D. R., Berry, D. And Tiedje, J. M., 1983, "Anaerobic Biodegradation of Phenolic Compounds in Digested Sludge", *Appl. Environ. Microb.*, 46 (1): 50-54.
- [34] Lepine, F., Bisailon, J., Milot, S., Khalid, T. H., Beaudet, R. And Villemur, R., 1996, "Transformation of Phenol into Phenylalanine by a Methanogenic Consortium", *Environ. Microbiol.*, 62 (3): 809-814.
- [35] Boopathy, R., 1997, "Anaerobic Phenol Degradation by Microorganisms of Swine Manure", *Curr. Microbiol.*, 35 (1): 64-67.
- [36] Mahramanhoğlu, M., Gülensoy, H. And Kızılcıklı, İ., 1998, "Aktifleştirilmiş Linyit Kömürleri ile Sulu Çözeltilerinden Fenol'ün Adsorpsiyonu", *Pamukkale Üniversitesi Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 4 (1): 467-470.
- [37] Hajji, K. T., Lépine, F., Bisailon, J. G. And Beaudet, R., 1999, "Simultaneous removal of phenol, ortho- and para-cresol by mixed anaerobic consortia", *Can. J. Microbiol.*, 45(4), 318-325.

- [38] Karlsson, A., Ejlertsson, J., Nezirevic, D. And Svensson, B.H., 1999, "Degradation of Phenol Under Meso- and Thermophilic, Anaerobic Conditions", *Anaerobe*, 5 (1): 25-35.
- [39] Rodriguez, I., Llompart, M. P. And Cela, R., 2000, "Solid Phase Extraction of Phenols" *J. Chromatogr. A*, 885 (1-2): 291-304.
- [40] Pandiyan, T., Rivas, O. M., Martinez, J. O., Amezcua, G. B. And Martinez-Carrillo, M. A., 2002, "Comparison of methods for the photochemical degradation of chlorophenols", *J. Photoch. Photobio. A.*, 146 (3): 149-155.
- [41] Reitzel, L. A. And Ledin, A., 2002, "Determination of phenols in landfill leachatecontaminated groundwaters by solid-phase extraction", *J. Chromatogr. A.*, 972 (2): 175–182.
- [42] Al-Momani, F., 2003, "Combination of photo-oxidation processes with biological treatment", *Doktora Tezi, Barselona Üniversitesi Kimya Fakültesi, İtalya*, 45-55.
- [43] Abd-El-Haleem, D., Beshay, U., Abdelhamid, A. O., Moawad, H. And Zaki, S., 2003, "Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. strain W-17", *Afr. J. Biotechnol.*, 2 (1): 8-12.
- [44] Şahinkaya, E. And Dilek, F. B., 2003, "Aerobik Kesikli Ve Ardışık Kesikli Reaktörler Kullanılarak 2,4-Diklorofenol'ün Arıtımı", *V. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi*, Ankara, 389-399.
- [45] Bielicka-Daszkiwicz, K., Debicka, M. And Voelkel, A., 2004, "Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples", *J. Chromatogr. A.*, 1052 (1-2): 233–236.
- [46] Melo, J. S., Kholi, S., Patwardhan, A. W. And D'Souza, S. F., 2005, "Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation", *Process Biochem.*, 40 (2): 625–628.
- [47] Zhang, T., Ke, S. Z., Liu, Y. And Fang, H. P., 2005, "Microbial characteristics of a methanogenic phenol-degrading sludge", *Water Sci. Technol.*, 52 (1-2): 73-78.
- [48] Çokay, E. And Şengül F., 2006, May, "Treatment of Toxic Pollutants by Advanced Oxidation Processes", *DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8 (2):1-9.
- [49] Özkaya, B., 2006, "Adsorption and desorption of phenol on activated carbon and a comparison of isotherm models", *J. Hazard. Mater.*, 129 (1-3): 158–163.
- [50] Wu, Y., Lerner, D. N., Banwart, S. A., Thornton, S. F. And Pickup, R. W., 2006, "Persistence of Fermentative Process to Phenolic Toxicity in Groundwater", *J. Environ. Qual.*, 35 (6): 2021-2025.

- [51] Gonzalo, M. S., Martinez, M. And Leton, P., 2007, "Anaerobic treatment of phenol in a continuous fluidized-bed bioreactor", *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)*, Copenhagen, 1-7.
- [52] 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.
- [53] Melin, E. S., Jarvinen, K. T. And Puhakka, J. A., 1997, "Effects of temperature on chlorophenol biodegradation kinetics in fluidized-bed reactors with different biomass carrers", *Water Res.*, 32 (1): 81-90.
- [54] Polat, H., Molva, M. And Polat, M., 2006, "Capacity and mechanism of phenol adsorption on lignite", *Int. J. Miner. Process.*, 79 (4): 264-273.
- [55] Aksu, Z. And Yener, J., 1999, "Atıksulardaki fenol ve klorofenollerin aktif karbon ve kurutulmuş aktif çamura adsorpsiyonu", *Turkish J. Eng. Env. Sci.*, 23: 93-104.
- [56] Fava, F., Armenante, P. M. And Kafkewitz, D., 1995, "Aerobic degradation and dechlorination of 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol by a *Pseudomonaspickettii* strain", *Lett. Appl. Microbiol.*, 21 (5): 307-312.
- [57] Field, J. A. And Sierra-Alvarez, R., 2008, "Microbial degradation of chlorinated phenols", *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 7 (3): 211-241.
- [58] HSDB, 1998, "*Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine*", National Toxicology Information Program, USA.
- [59] Ennik-Maarsen, K. A., Louwerse, A., Roelofsen, W. And Stams A. J., 1998, "Influence of monochlorophenols on methanogenic activity in granular sludge", *Water Res.*, 32 (10): 2977-2982.
- [60] Magar, V. S., Stensel, H. D., Puhakka, J. A. And Ferguson, J. F., 1999, "Sequential anaerobic dechlorination of pentachlorophenol: competitive inhibition effects and a kinetic model", *Environ. Sci. Technol.*, 33 (10): 1604-1611.
- [61] Ünal M. Ü., 2001, "Endüstriyel Atıksulardan Klorlu Fenollerin Biyolojik Yöntemlerle Parçalanması", *Ekoloji ve Çevre Dergisi*, 11: 16-19.
- [62] Uğurlu, M., 2003, "Kağıt Endüstrisi Atık Sulardan Lignin ve Fenol'ün Perlit Minerali ile Giderimi", *Ekoloji ve Çevre Dergisi*, 12: 11-16.
- [63] Bolaños, R. M. L., Damianovic, M. H. R. Z., Zaiat M. And Foresti E., 2005, "Assessment of the ability of sludge to degrade PCP under anaerobic conditions", *Braz. J. Chem. Eng.*, 22 (4): 611-617.
- [64] Chen, S. T., Hsu, C. Y. And Berthouex, P. M., 2006, "Fate and modeling of pentachlorophenol degradation in a laboratory-scale anaerobic sludge digester", *J. Environ. Eng.*, 132 (7): 795-802.

- [65] Mun, C. H., He, J. And Ng, W. J., 2008, "Pentachlorophenol dechlorination by an acidogenic sludge", *Water Res.*, 42 (14): 3789-3798.
- [66] Tor, A., 2004, "Atık su ortamında bazı organik kirleticilerin tayini", Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü*, Konya, 15-18.
- [67] Pu, X., 2005, "Effects of Soil Properties and Microbial Source on Pentachlorophenol Bioremediation", *PhD Thesis, University of Akron*, 176.
- [68] EPA, 1980, "Ambient water qualt, criteria for 2,4-dichlorophenol", EPA 440: 5-80-034, <http://www.epa.gov/ost/pc/ambientwqc/2chlophenol80.pdf>.
- [69] Sax, N. I. And Bruce, R. D., 1975, "Dangerous properties of industrial materials", 4th ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1258.
- [70] Berkes, F. And Kışlalıoğlu, M., 1990, *Ekoloji ve Çevre Bilimleri*, İstanbul, 171.
- [71] Akı, C., And Karabay N., 2004, "Genetik Laboratuvar Uygulama Kitabı Yayın No: 38", *Rektörlük Basımevi*, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi.
- [72] Kuru, M. And Ergene, S., 2011, "Genetik (Örnek Problemlerle)", *Palme Yayıncılık*, Ankara, 48-266.
- [73] Bilge, E., 1974, "*Genetik Ders Kitabı*", İstanbul Üniversitesi Yayınları, 1974.
- [74] Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S. L., 2003, *Temel Patoloji. Çev. 7. Baskı, Nobel Yayınları*, İstanbul.
- [75] Topaktaş, M. And Rencüzoğulları, E., 2010, "*Sitogenetik*", Nobel Yayın Dağıtım, Tür. Çev. Sor. Vakfı, 87-91, Ankara.
- [76] Kaçar, B., Katkat V. A. And Öztürk, Ş., 1998, "Bitki Fizyolojisi", *Nobel Yayın Dağıtım*.
- [77] Güneş, H. V., 2006, "Moleküler Hücre Biyolojisi", *Kaan Yayınevi*, Eskişehir, 72-83.
- [78] Öney, S., 2009, "Sıcaklık Stresi Altında Çimlendirilen *Vicia Faba* L. Cv. Eresen-87 Tohumlarında Mitotik İndeks, Hücre Döngüsü Ve Kromozom Davranışları Üzerine Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 1-8.
- [79] Öztürk, N. S., 2013, "İmazethapyr herbisitinin *allium cepa* l. kök meristem hücreleri üzerine sitogenetik etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyonkarahisar, 13-16.
- [80] Akı, C., 2002, "Genel Genetik", *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi*, Çanakkale, 46-48.

- [81] Başaran, A., Başaran, N., Solak, M. And Güneş, H., 1995, “Tıbbi Biyoloji ve Genetik”, *Açıköğretim Fakültesi Yayınları*, Anadolu Üniversitesi, 117-123.
- [82] Gardner, R. M., Sutherland, G. R. And Shaffer, L. G., 2011, “Chromosome abnormalities and genetic counseling” 4th ed., Oxford Monographs on Medical Genetics, *Oxford University Press*, OUP USA, 277-341.
- [83] Page, S. L., Shin, J. C., Han, J. Y., Choo, K. H. A. And Shaffer, L. G., 1996, “Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation”, *Hum. Mol. Genet.*, 5, 1279–1288.
- [84] Shaffer, L. G. And Lupski, J. R., 2000, “Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans”, *Annu. Rev. Genet.*, 34, 297–329.
- [85] Nussbaum R. L, McInnes R. R. And Willard H. F., Principles of Clinical Cytogenetics and Genome Analysis, Thompson & Thompson genetics in medicine. Elsevier Health Sciences, 8 th ed. 2015.
- [86] Kulaksız, G. And Sancar, A., 2007, “Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser”, *Türk Biyokimya Dergisi*, 32 (3): 104-111.
- [87] Onur, E., Tuğrul, B. And Bozyiğit, F., 2009, “DNA hasarı ve onarım mekanizmaları”, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 7 (2): 61-70.
- [88] Dinçer, Y. And Kankaya, S., 2010, “DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay”, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 30 (4): 1365-1373.
- [89] Kumari, S., Rastogi, R. P., Singh, K. L., Singh, S. P. And Sinha, R. P., 2008, “DNA damage: Detection strategies”, *Excl. J.*, 7: 44-62.
- [90] Choy, W. N., 2001, “Genetic toxicology and cancer risk assessment”, *Marcel Dekker*, New York, 29-187.
- [91] McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. And Ames, B. N., 1975, “Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals”, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72 (12): 5135-5139.
- [92] Maron, D. M. And Ames, B. N., 1983 “Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test”, *Mutat. Res.-Envir. Muta.*, 113 (3-4): 173-215.
- [93] Ramel, C., Alekperov, U. K., Ames, B. N., Kada, T. And Wattenberg, L. W., 1986, “Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens”, *Mutat. Res.-Rev. Genet.*, 168 (1): 47-65.
- [94] Victorin, K., Busk, L. And Ahlberg, U. G., 1987, “Retinol (vitamin A) inhibits the mutagenicity of o-aminoazotoluene activated by liver microsomes from several species in the Ames test”, *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 179 (1) : 41-48.

- [95] Jung, R., Engelhart, G., Herbolt, B., Jäckh, R. And Müller, W., 1992, "Collaborative study of mutagenicity with *Salmonella typhimurium* TA 102", *Mutat. Res.-Genet. Tox.*, 278 (4): 265-270.
- [96] Jarvis, A. S., Honeycutt, M. E., McFarland, V. A., Bulich, A. A. And Bounds, H. C., 1996, "A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment", *Ecotox. Environ. Safe.*, 33 (2): 193-200.
- [97] Mortelmans, K. And Zeiger, E., 2000, "The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 455 (1): 29-60.
- [98] Vural, N., 2005, "Toksikoloji, 73", *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 115-129.
- [99] Şekeroğlu, V. And Atlı-Şekeroğlu, Z., 2011, *Tübav Bilim Dergisi*, 4 (3): 221-229.
- [100] Anderson, D., 1988 "Human Biomonitoring", *Mutat. Res.*, 204: 353-541.
- [101] Carrano, A. V. And Natarajan, A. T., 1988, "Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques", *Mutat. Res.-Genet. Tox.*, 204(3): 379-406,
- [102] Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E. G., Tice, R., Waters, M. D. And Aitio, A., 2000, "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans". *Mutat. Res.-Rev. Mutat.*, 463 (2): 111-172.
- [103] Savage, J. R. K., 1993, "Update on target theory as applied to chromosomal aberrations", *Env. Mol. Mutagen.*, 22 (4): 198-207.
- [104] Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R. J., Knudsen, L. E., Barale, R. And Fucic, A., 2006, "Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 600 (1): 37-45.
- [105] Preston, R. J., Au, W., Bender, M. A., Brewen, J. G., Carrano, A. V., Heddle, J. A., McFee, A. F., Wolff, S. And Wassom, J. S., 1981, "Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program", *Mutat. Res.-Rev. Genet.*, 87 (2): 143-188.
- [106] Evans, H. J. And O'Riordan, M. L., 1975, "Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests", *Mutat. Res.*, 31 (3): 135-148.
- [107] Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. And Shelby, M., 1987, "Mammalian *in vivo* cytogenetic assays: Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells", *Mutat. Res.*, 189 (2): 157-165.

- [108] Ford, C. E. And Hamerton, J. L., 1956, "A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes", *Stain Technol.*, 31 (6): 247-251.
- [109] Latt, S. A., Schreck, R. R., Loveday, K. S., Dougherty, C. P. And Shuler, C. F., 1980, "Sister chromatid exchange", *Adv. Hum. Genet.*, 10: 267-331.
- [110] Wolff, S., 1980, "Sister chromatid exchange", *Adv. Hum. Genet.*, 10: 183-201.
- [111] Perry, P. E. And Thompson, E. J., 1984, "The methodology of sister chromatid exchanges", *Handbook of mutagenicity test procedures*, Kilbey B.J., Legator M., Nichols W., Ramel C. eds., *Elsevier Science*, Amsterdam, 495-529.
- [112] Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai Y., Takata, M. And Takeda, S., 1999, "Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells", *Mol. Cell. Biol.*, 19 (7): 5166-5169.
- [113] Helleday, T., 2003, "Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells", *Mutat. Res.-Fund Mol. M.*, 532 (1): 103-115.
- [114] Wilson, D. M. And Thompson, L. H., 2007, "Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 616 (1): 11-23.
- [115] Karaman, A. And Keskinler, F., 2009, "Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda genomik hasar", *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 29 (6): 1392-97.
- [116] Perry, P. And Evans, H. J., 1975, "Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange", *Nature*, 258 (5531): 121-25.
- [117] Carrano, A. V., Thompson, L. H., Lindl, P. A. And Minkler, J. L., 1987, "Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis", *Nature*, 271 (5645): 551-53.
- [118] Cheng, M., Conner, M. K. And Alaria, Y., 1981, "Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchanges in bloom's syndrome lymphocytes", *Cancer Res.*, 71: 4508-12.
- [119] Topaktaş, M. And Speit, G., 1990, "Induction of SCE and CA in human lymphocytes with prometryn", *Tr. J. Biol.*, 14: 69-78.
- [120] Natarajan, A. T., 2002, "Chromosome aberrations: past, present and future", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 504 (1): 3-16.
- [121] Demirel, S., Zamani, A. G., 2002, "Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları", *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3): 123-127.
- [122] Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M. And Temmerman, R., 1990, "The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity", *Mutat. Res. Lett.*, 244 (2): 95-103.

- [123] Cheng, T. J., Christiani, D. C., Xu, X., Wain, J. C., Wiencke, J. K. And Kelsey, K. T., 1996, "Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 349 (1): 43-50.
- [124] Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A. L., Volot, F., Favre, R. And Botta, A., 1997, "Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients", *Mutagenesis*, 12 (4): 227-231.
- [125] Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. And Van Hummelen, P., 1997, "The *in vitro* micronucleus test: A multiendpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and nondisjunction", *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.*, 392 (1): 19-30.
- [126] Stopper, H. And Müller, S. O., 1997, "Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview", *Toxicol. in Vitro*, 11 (5): 661-667.
- [127] Şekeroğlu, V. And Atlı-Şekeroğlu, Z., 2011 (March 7), "Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi", *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (4): 241-252. (Accepted; April 25)
- [128] Krishna, G. And Hayashi, M., 2000, "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 455 (1): 155-166.
- [129] Fenech, M. And Morley, A. A., 1986, "Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 161 (2): 193-198.
- [130] Heddle, J. A., 1973, "A rapid *in vivo* test for chromosomal damage", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 18 (2): 187-190.
- [131] Schmid, W., 1975, "The micronucleus test", *Mutat. Res.*, 31 (1): 9-15.
- [132] Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I. D., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A. And Sutou, S., 2000, "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol desing including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 234-252.
- [133] De serres, F. J., 1978, "Introduction: utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens", *Environ. Health Perspect.*, 27: 3-6.
- [134] 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.
- [135] Levan, A., 1938, "The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*", *Hereditas*, 24 (4): 471-486.

- [136] Fiskesjö, G., 1995, "In Vitro Toxicity Testing Protocols: Methods in Molecular Biology", Volume 43, II, 119-127.
- [137] Ma, T. H., Xu, Z.D., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E. V., Arreola, G. A. And Zhang, H., 1995, "The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants", *Mutat. Res.-Envir. Muta.*, 334 (2): 185-195.
- [138] 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.
- [139] Brahma, B. P., 1985, "Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfothion", *Cytobios*, 42, 147-155.
- [140] Sharma, C. B. S. R., 1983, "Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals", *Curr. Sci.*, 52, 1000-1002.
- [141] Rydberg, B. And Johanson, K. J., 1978, "Estimation of single strand breaks in single mammalian cells", In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, editors. DNA Repair mechanisms. New York, NY: Academic; pp: 465-468.
- [142] Fairbain, D. W., Olive P. L. And O'Neill K. L., 1995, "The Comet Assay, A Comprehensive Review", *Mutat. Res.-Rev. Genet.*, 339 (1): 37-59.
- [143] Ostling, O. And Johanson, K. J., 1984, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123 (1): 291-298.
- [144] Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R And Schneider, E. L., 1988, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Exp. Cell Res.*, 175 (1): 184-191.
- [145] Singh, N. P., Danner, D. E., Tice, R. R., Brant, L. And Schneider, E. L., 1990, "Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in human biology" *Mutat. Res.*, 37, 123.
- [146] Shaposhnikov, S., Frengen, E. And Collins, A. R., 2009, "Increasing of resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization- a review", *Mutagenesis*, 24 (5): 383-389.
- [147] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. And Sasaki, Y. F., 2000, "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing", *Environ. Mol. Mutagen*, 35 (3): 206-221.
- [148] 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.

- [149] Dikilitaş, M. And Koçyiğit, A., 2010, “Canlılarda Tek Hücre Jel Elektrophorez yöntemi ile DNA hasar analizi” (Teknik Not): Comet analiz yöntemi, *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 14 (2): 77-89.
- [150] Collins, A. R., 2004, “The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations”, *Mol. Biotechnol.*, 26 (3): 249-61.
- [151] Badr, A. And İbrahim, A. G., 1987, “Effect of herbicide Glean on mitosis, chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems”, *Cytologia*, 52 (2): 293-302.
- [152] 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.
- [153] Elçi, Ş., 1982, “Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri”, *Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları*, Elazığ, 3, 37-85.
- [154] 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” *Toxicology*, 216 (2-3): 244-252.
- [155] Miyazaki, A., Amano, T., Saito, H. And Nakano, Y., 2002, “Acute Toxicity of Chlorophenols to Earthworms Using a Simple Paper Contact Method and Comparison with Toxicities to Fresh Water Organisms”, *Chemosphere*, 47 (1): 65-69.
- [156] 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.
- [157] EU. European Environment Agency, 2007, “Progress in management of contaminated sites”, *EEA CSI 015* Copenhagen.
- [158] Rank, J., Lopez, L. C., Nielsen, M. H. And Moretton, J., 2002, “Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two laboratories”, *Hereditas*, 136 (1): 13-18.
- [159] Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Sancak C. And Kasab, R., 2003, “Cytological effects of herbicide racer flurochloridone on *Allium cepa*”, *Caryologia*, 56 (1): 97-105.
- [160] Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M. And Toman, M. J., 1996, “The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure”, *Mutat. Res.-Genet. Tox.*, 368 (3-4): 171-179.
- [161] Evseeva, T., Geras'kin, S. A. And Shuktomova, I. I., 2003, “Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test”, *J. Environ. Radioactiv.*, 68 (3): 235-248.

- [162] Kara, M., Sanda, M. A., And Ateş, A., 1994, "Cytogenetics effect of the insecticide cypermethrin on the root meristems of *Allium cepa* L.", *Turk. J. Biol.*, 18 (4): 323-331.
- [163] Grant, W. F., 1992, "Cytogenetics studies of agricultural chemicals in plants" Genetic Toxicology an Agricultural Perspective, R. Fleck and A., Hollaender eds., *Plenum Press*, New York, 335-378.
- [164] Konuk, M., Liman, R., Ciğerci, İ. H., 2007, "Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells", *Pakistan J. Bot.*, 39 (1): 73-79.
- [165] 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.
- [166] 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.
- [167] De Marco, A., Romanelli, M., Stazi, M. A. And Vitagliano, E., 1986, "Introduction of micronucleated cells in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips treated with nitrilotiacetic acid (NTA)", *Mutat. Res.-Genet. Tox.*, 171 (2-3): 145-148.
- [168] Fiskesjö, G., 1988, "The *Allium* Test-an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 197 (2): 243–260.
- [169] Rank, J. And Nielsen M. H., 1994, "Evaluation of *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater", *Mutat. Res.-Envir. Muta.*, 312 (1): 17-24.
- [170] 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.
- [171] Webster, P. L., And Macleod, R. D., 1996, "The root apical meristem and its magrin", In: Waishel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U., (Eds.), *Plant roots. The hidden half* (Second Ed.), Marcel Dekker, New York, 51–76.
- [172] 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.
- [173] 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.
- [174] Shehata, M., Durner, J., Thiessen, D., Shirin, M., Lottner, S., Van Landuyt, K., Furche, S., Hickel, R. And Reichl, F. X., 2012, "Induction of DNA double-strand breaks by monochlorophenol isomers and ChKM in human gingival fibroblasts", *Arch. Toxicol.*, 86 (9): 1423-1429.

- [175] 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.
- [176] 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.
- [177] Wang, W., 1987, "Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants", *Environ. Toxicol. Chem.*, 6 (5): 409-414.
- [178] Ertürk, M. D. And Saçan, M. T., 2012, "First toxicity data of chlorophenols on marine alga *Dunaliella tertiolecta*: correlation of marine algal toxicity with hydrophobicity and interspecies toxicity relationships", *Environ. Toxicol. Chem.*, 31 (5): 1113-1120.
- [179] Aruoja, V., Sihtmäe, M., Dubourguier, H. C. And Kahru, A., 2011, "Toxicity of 58 substituted anilines and phenols to algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and bacteria *Vibrio fischeri*: comparison with published data and QSARs", *Chemosphere*, 84 (10): 1310-1320.
- [180] 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.
- [181] Moridani, M. Y., Siraki, A. And O'Brien, P. J., 2003, "Quantitative structure toxicity relationships for phenols in isolated rat hepatocytes", *Chem-Biol. Interact.*, 145 (2): 213-223.
- [182] Perez-Moya, M., Graells, M., del Valle, L. J., Centelles, E. And Mansilla, H. D., 2007, "Fenton and photo-Fenton degradation of 2-chlorophenol: Multivariate analysis and toxicity monitoring", *Catal. Today*, 124 (3-4): 163-171.
- [183] Choi, S. H. And Gu, M. B., 2001, "Phenolic toxicity—detection and classification through the use of a recombinant bioluminescent *Escherichia coli*", *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(2), 248-255.
- [184] Silveira, M. A. D., Ribeiro, D. L., Vieira, G. M., Demarco, N. R. And d'Arce, L. P. G., 2018, "Direct and indirect anthropogenic contamination in water sources: evaluation of chromosomal stability and cytotoxicity using the *Allium cepa* test", *B. Environ. Contam. Tox.*, 100 (2): 216-220.
- [185] Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y., Erdoğan, S. F., Konuk, M. And Sağlam, E., 2015, "Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of pyracarbolid by *Allium* test and micronucleus assay", *Drug Chem. Toxicol.*, 38 (3): 337-341.
- [186] Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y. And Erdoğan, S. F., 2015, "Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay", *Cytotechnology*, 67 (5): 783-791.

- [187] Eren, Y. And Özata, A., 2014, “Determination of mutagenic and cytotoxic effects of Limonium globuliferum aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests”, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 24 (1): 51-59.
- [188] Kumar, D., Rajeshwari, A., Jadon, P. S., Chaudhuri, G., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. And Mukherjee, A., 2015, “Cytogenetic studies of chromium (III) oxide nanoparticles on Allium cepa root tip cells”, *J. Environ. Sci.*, 38, 150-157.
- [189] Ciğerci, İ. H., Liman, R., Özgül, E. And Konuk, M., 2015, “Genotoxicity of indium tin oxide by Allium and Comet tests”, *Cytotechnology*, 67 (1): 157-163.
- [190] Türkoğlu, Ş., 2015, “Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of Allium cepa”, *Toxicol. Ind. Health.*, 31 (9): 792-801.
- [191] Ciğerci, İ. H., Cenkci, S., Kargıoğlu, M. And Konuk, M., 2016, “Genotoxicity of Thermopsis turcica on Allium cepa L. roots revealed by alkaline comet and random amplified polymorphic DNA assays”, *Cytotechnology*, 68 (4): 829-838.
- [192] Nisha, K. K., 2017, “Cytotoxic Effect of Crotalaria laburnifolia L. Leaf Extract on Allium Cepa Root Tip Cells”, *J. Adv. Biol. Sci.*, 4, 72-75.
- [193] Fernandes, T. C., Mazzeo, D. E. C. And Marin-Morales, M. A., 2007, “Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of Allium cepa exposed to trifluralin herbicide”, *Pestic. Biochem. Phys.*, 88 (3): 252–259.
- [194] Sadia, K. B. And Vahidy, A. A., 1994, “Cytotoxic effect of herbicide ronstar on meristematic cells of Allium cepa, L.”, *Pak. J. Bot.*, 26 (1): 69-74.
- [195] Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J. A., Navas, P. And Garcia-Herdugo, G., 1989, “Abnormal mitosis and growth inhibition in Allium cepa roots induced by prophan and chlorprophan”, *Cytobios*, 57 (228): 7-14.
- [196] Jain, A. K. And Sarbhoy, R. K., 1988, “Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides” III. Concluding Remarks. *Cytologia*, 53 (3): 427-436.
- [197] Čerňáková, M., 1994, “Effect of chlorinated phenol derivatives on various cell models”, *Folia microbiol.*, 39 (4): 315-320.
- [198] Soliman, M. I. And Ghoneam, G. T., 2004, “The mutagenic potentialities of some herbicides using Vicia faba as a biological system”, *Biotechnol.*, 3 (2): 140–154.
- [199] Evseeva, T. I., Geras'kin, S. A., Shuktomova, I. I. And Taskaev, A. I., 2005, “Genotoxicity and cytotoxicity assay of water sampled from the underground nuclear explosion site in the north of the Perm region (Russia)”, *J. Environ. Radioactiv.*, 80 (1): 59–74.
- [200] Kumari, M., Mukherjee, A. And Chandrasekaran, N., 2009, “Genotoxicity of silver nanoparticles in Allium cepa”, *Sci. Total Environ.*, 407 (19): 5243–5246.

- [201] Rajeshwari, A., Roy, B., Chandrasekaran, N. And Mukherjee, A., 2016, “Cytogenetic evaluation of gold nanorods using *Allium cepa* test”, *Plant Physiol. Bioch.*, 109, 209-219.
- [202] Singh, D. And Roy, B. K., 2017, “Evaluation of malathion-induced cytogenetical effects and oxidative stress in plants using *Allium* test”, *Acta Physiol. Plant.*, 39 (4): 92.
- [203] El-Ghamery, A. A., El-Nahas, A. I. And Mansour, M. M., 2000, “The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*”, *Cytologia*, 65 (3): 277–287.
- [204] Luo, L. Z., Werner, K. M., Gollin, S. M. And Saunders, W. S., 2004, “Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells”, *Mutat. Res-Fund. Mol. M.*, 554 (1): 375–385.
- [205] Patil, B. C. And Bhat, G. I., 1992, “A Comparative Study of MH and EMS in The Induction of Chromosomal Aberrations on Lateral Root Meristem in *Clitoria termata* L.”, *Cytologia*, 57 (2): 259-264.
- [206] Fiskesjö G. And Levan A., 1993, “Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium* test”, *Atla*, 21, 139–149.
- [207] El-Ghamery, A. A. And Mousa, M. A., 2017, “Investigation on the effect of benzyladenine on the germination, radicle growth and meristematic cells of *Nigella sativa* L. and *Allium cepa* L.”, *Ann. Agric. Sci.*, 62 (1): 11-21.
- [208] Amin, A. W., 2002, “Cytotoxicity Testing of Sewage Water Treatment Using *Allium cepa* Chromosome Aberration Assay”, *Pak. J. Biol. Sci.*, 5 (2): 184-188.
- [209] Barbério A, Voltolini J. C. And Mello M. L. S., 2011, “Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test”, *Ecotoxicology*, 20 (4): 927–935.
- [210] Önfelt, A., 1987, “Spindle disturbances in mammalian cells III. Toxicity, c-mitosis and aneuploidy with 22 different compounds. Specific and unspecific mechanisms”, *Mutat. Res.-Envir Muta.*, 182 (3): 135-154.
- [211] Morita, T., Honma, M. And Morikawa, K., 2012, “Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity”, *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.*, 741 (1): 32–56.
- [212] Ministry of Health Labor and Welfare of Japan (MHLW), 2001, “2,4-Dinitrophenol, Toxicity testing reports of environmental chemicals”, 8 (1): 7-36.
- [213] Borzelleca, J. F., Condie, L. W. And Hayes, J. R., 1984 (June), “Toxicological evaluation of selected chlorinated phenols. In Proceedings of the Fifth Conference on Water Chlorination”, *Environ. Impact and Health Eff.*, Williamsburg, VA, 331-343.

- [214] European Chemical Bureau (ECB) IUCLID Dataset, 2000, “2-Chlorophenol”, Available on line at:<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/iuclid-datasheet/95578.pdf>. Accessed 16 March 2011.
- [215] Türkoğlu Ş., 2012, “Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity chromosome aberration DNA content and comet assay”, *Pestic. Biochem. Phys.*, 103 (3): 224–230.
- [216] Chakraborty, R., Mukherjee, A. K. And Mukherjee, A., 2009, “Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the Allium test”, *Environ. Monit. Assess.*, 153 (1-4): 351-357.
- [217] Ghosh, M., Paul, J., Sinha, S. And Mukherjee, A., 2010, “Comparative evaluation of promutagens *o*-PDA *m*-PDA and MH for genotoxic response in root cells of *Allium cepa* L.”, *Nucleus*, 53 (1-2): 45–50.
- [218] 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.
- [219] 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.
- [220] 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.
- [221] Luo, Y., Sui, Y. X., Wang, X. R. And Tian, Y., 2008, “2-Chlorophenol induced hydroxyl radical production in mitochondria in *Carassius auratus* and oxidative stress—An electron paramagnetic resonance study”, *Chemosphere*, 71 (7): 1260-1268.
- [222] Luo, Y., Su, Y., Lin, R. Z., Shi, H. H. And Wang, X. R., 2006, “2-Chlorophenol induced ROS generation in fish *Carassius auratus* based on the EPR method”, *Chemosphere*, 65 (6): 1064-1073.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : KÜÇÜK, Derya
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 03.04.1993/İSTANBUL
Medeni hali : Bekar
E-mail : derya.kucuk93@gmail.com

Eğitim

Derece	Bölüm/Program	Bitirdiği Okul	Yıl
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Uşak Üniversitesi	2018
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Uşak Üniversitesi	2016
Lise	Fen Bilimleri	Alibeyköy Anadolu Lisesi	2011

Yabancı Dil

İngilizce

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Derya Küçük, Recep Liman “Cytogenetic and genotoxic effects of 2-Chlorophenol on *Allium Cepa* L. root meristem cells” 6th International Molecular Biology And Biotechnology Congress, Afyonkarahisar, Turkey, P-46, 22-25 December 2017

Projeler

“2- Klorofenol’ün *Allium cepa* L. kök meristem hücreleri üzerine sitogenetik ve genotoksik etkileri”, Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (UBAP), Proje No: 2017/TP027

Sertifikalar

1. Bioform II, Yıldız Teknik Üniversitesi, 28-29 April 2015
2. Bioform III, Yıldız Teknik Üniversitesi, 25-26 November 2015
3. VI. International Congress Molecular Biology and Biotechnology, Nobel Science Research Center and NEU, 22-25 December 2017

