KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI PESTİSİTLERİN SOYA (*Glycine max* (L.) Merrill cv. May 5312) ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

ASUMAN DEVECİ

KOCAELİ 2012

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI PESTİSİTLERİN SOYA (*Glycine max* (L.) Merrill cv. May 5312) ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

ASUMAN DEVECİ

Yrd.Doç.Dr. Özlem AKSOY
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

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

Doç.Dr. Emine Selcen DARÇIN
Jüri Üyesi, Sakarya Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 28.12.2012

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Pestisit, gıda, insan ilişkisi insanoğlunun geleceğini de etkilemektedir. Pestisitlerin içerdikleri kimyasal maddeler ve bunların yıkım ürünleri toprakta ve suda uzun süre kalarak hem çevre kirliliğine neden olmakta, hem de besin zinciri yolu ile hayvanlarda ve insanlarda önemli sağlık sorunları yaratabilmektedir. Bitkiler bir dereceye kadar etkili ve özel fizyo-biyokimyasal mekanizmalarla çevresel stresin üstesinden gelebilmektedir. Diğer yandan zehirli kimyasallar birçok hücresel stres yanıtına ve hücre zarı, protein ve DNA gibi farklı hücresel bileşenlerde hasara sebep olabilmektedir. Stres koşullarında ve farklı zehirli kimyasallarla muamele sonucunda bitki genotipinde polimorfizm meydana gelmektedir. *Glycine max* L. Merrill (soya), çevresel kirleticilerin genetik toksisitesinin bir biyolojik indikatörü olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma ile elde edilen sonuçların; biyolojik bir indikatör bitki olan soya bitkisi kullanılarak farklı pestisitlerin meydana getirebileceği genotoksik etkilerin tespit edilmesini ve böylece çevreye ve dolaylı olarak besin zinciri yolu ile insana verilen zararın ortaya çıkarılmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

Yüksek lisans ögrenimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğiyle daima yanımda olup karşılaştığım tüm zorlukları aşmamda sonsuz yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem AKSOY'a, tezimin birçok aşamasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım Biyoloji Bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e, çalışmalarımın deneysel aşamasında bilimsel tecrübeleri ile bana katkıda bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN'a, bu çalışmayı gerçekleştirirken deneyimlerinden yararlandığım ve yardımını hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Tuba ERBULUCU ve Gonca AL'a, Biyoloji Bölümü son sınıf öğrencilerinden Burçak TÜTÜNOĞLU, Melis ZENGİN, Sibel KIZILIRMAK, Billur AKDENİZ'e, Biyoloji Bölümündeki tüm arkadaşlarıma ve desteklerini her zaman hissettiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Kocaeli Üniversitesi-BAP 2011/043 No'lu proje ile maddi olarak desteklenmiştir.

Aralık - 2012 Asuman DEVECİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iii
TABLOLAR DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 5
1.1. Soya (*Glycine max* (L.) Merrill) 10
1.2. Pestisitler 12
1.3. Genetik Belirleyiciler 18
1.3.1. Morfolojik belirleyiciler 18
1.3.2. Protein belirleyicileri 19
1.3.3. DNA belirleyicileri 20
1.3.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) 20
1.3.3.2. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) 21
2. MALZEME VE YÖNTEM 23
2.1. Deney Materyali ve Büyüme Koşulları 23
2.2. Kullanılan Pestisit Etken Maddeleri 23
2.3. Pestisitler İçin EC50 Değerlerinin Belirlenmesi 25
2.4. Fotosentetik Pigment Analizi 25
2.5. Sitolojik İncelemeler 26
2.6. Moleküler İncelemeler 26
2.6.1. Genomik DNA izolasyonu miktar ve saflık tayini 26
2.6.2. RAPD ve verilerinin değerlendirilmesi 28
2.7. Biyokimyasal İncelemeler 30
2.7.1. Protein izolasyonu, miktar tayini ve standart eğrinin hazırlanması 30
2.7.2. SDS-PAGE 31
2.8. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Çözeltiler 32
2.9. İstatistiksel analizler 34
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 35
3.1. Fizyolojik Bulgular 35
3.1.1. Pestisitler İçin Belirlenen EC50 Değerleri 35
3.1.2. Çimlenme yüzdesi değerleri 36
3.1.3. Fotosentetik pigment miktarı 38
3.2. Sitolojik Bulgular 39
3.3. Moleküler Bulgular 44
3.3.1. gDNA miktar ve saflık dereceleri 44
3.3.2. RAPD profillerinin analizi ve değerlendirilmesi 46
3.4. Biyokimyasal Bulgular 57
3.4.1. Toplam çözünür protein miktarı 57
3.4.2. SDS-PAGE verilerinin analizi ve değerlendirilmesi 58
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 69
KAYNAKLAR 75
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 87
ÖZGEÇMİŞ 88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. *Glycine max* L. Merrill (soya) bitkisi 11
Şekil 1.2. Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı 13
Şekil 1.3. Pestisit gruplarına göre Türkiye'de tarım ilacı kullanım 13
Şekil 1.4. İçerdikleri etken maddelerin özelliklerine göre pestisit türleri 14
Şekil 1.5. Pestisitlerin doğadaki dönüşümleri 15
Şekil 1.6. PZR yöntemindeki aşamaların şematik olarak gösterimi 21
Şekil 2.1. Kullanılan pestisitlerin etken maddelerinin yapısal formülleri 24
Şekil 2.2. DNA izolasyonunda izlenen aşamalar 27
Şekil 2.3. Protein standart eğri grafiği 31
Şekil 3.1. Pomarsol Forte 80 WP için belirlenen EC50 değeri 35
Şekil 3.2. Arrivo 25 EC için belirlenen EC50 değeri 36
Şekil 3.3. The End EC için belirlenen EC50 değeri 36
Şekil 3.4. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitotik frekans yüzdesi üzerine etkisi 40
Şekil 3.5. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi 42
Şekil 3.6. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitotik anormallik üzerine etkisi 43
Şekil 3.7. İzole edilen gDNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü 45
Şekil 3.8. AD-2, AD-6, AD-9, AD-12, AD-14, AD-18 ve AD-19 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen monomorfik bant profilleri 47
Şekil 3.9. AD-1, AD-3, AD-4, AD-5, AD-7, AD-8, AD-10, AD-13, AD-15, AD-17 ve AD-20 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri 48
Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan monomorfik ve polimorfik primer sayıları 49
Şekil 3.11. Pomarsol Forte 80 WP uygulaması sonrası polimorfik bant profili gösteren primerler 50
Şekil 3.12. Arrivo 25 EC uygulaması sonrası polimorfik bant profili gösteren primerler 51
Şekil 3.13. The End EC uygulaması sonrası polimorfik bant profili gösteren primerler 52
Şekil 3.14. Çalışmada kullanılan primerlerle uygulama gruplarına ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları 53
Şekil 3.15. Çalışmada kullanılan RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri 54
Şekil 3.16. Uygulama grupları arasındaki genetik mesafeyi gösteren dendrogram 56
Şekil 3.17. Soya yapraklarına uygulanan farklı pestisit dozlarının tohumdaki toplam protein miktarı üzerine etkisi 58
Şekil 3.18. SDS-PAGE sonrası oluşan toplam proteinlere ait bant profilleri 59
Şekil 3.19. Kontrol grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği 60
Şekil 3.20. 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP (PX) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği 61
Şekil 3.21. 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP (P2X) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği 62
Şekil 3.22. 9,6 M Arrivo 25 EC (AX) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği 63

Şekil 3.23. 19,2 M Arrivo 25 EC (A2X) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği.....64
Şekil 3.24. 0,4 M The End EC (TX) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği.....65
Şekil 3.25. 0,8 M The End EC (T2X) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği.....66
Şekil 3.26. SDS-PAGE sonrası elde edilen protein bant profillerinin uygulama grupları için ayrı değerlendirilmesi ile elde edilen dendogram.....67
Şekil 3.27. SDS-PAGE sonrası elde edilen tüm protein bant profillerinin birlikte değerlendirilmesiyle elde edilen dendogram 68

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Soyanın Melchior (1964)'a göre taksonomik olarak sınıflandırılması 11
Tablo 2.1. Kullanılan pestisitler ve özellikleri 24
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan AD serisi RAPD primerlerinin dizileri ve T_m değerleri 29
Tablo 2.3. RAPD-PZR tekniğinde kullanılan bileşenler 29
Tablo 2.4. Optimize edilen RAPD-PZR döngüsü 29
Tablo 2.5. Protein standart çözelti konsantrasyonları 30
Tablo 2.6. Protein konsantrasyon ve absorbans değerleri 31
Tablo 2.7. Deneylerde kullanılan cihazlar 33
Tablo 2.8. Toplam protein izolasyon tamponunun içeriği 33
Tablo 2.9. SDS-PAGE için kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı 34
Tablo 3.1. Farklı pestisitlerin belirlenen konsantrasyonlarıyla 24,48 ve 72 saat muamelesi sonrası tohum çimlenme yüzdesindeki değişim 37
Tablo 3.2. Soya yapraklarına uygulanan farklı pestisit dozlarının klorofil içeriğine etkisi 38
Tablo 3.3. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitotik frekans yüzdesine etkisi 40
Tablo 3.4. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitotik anormallik yüzdesi üzerine etkisi 42
Tablo 3.5. İzole edilen gDNA örneklerinin konsantrasyon değerleri 45
Tablo 3.6. Uygulama gruplarına göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi 53
Tablo 3.7. RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü 55
Tablo 3.8. Genomik kalıp stabilitesi değerleri 56
Tablo 3.9. SDS-PAGE yöntemi sonrası kontrol (K) grubundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları 59
Tablo 3.10. SDS-PAGE yöntemi sonrası 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP (PX) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları 60
Tablo 3.11. SDS-PAGE yöntemi sonrası 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP (P2X) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları 61
Tablo 3.12. SDS-PAGE yöntemi sonrası 9,6 M Arrivo 25 EC (AX) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları 62
Tablo 3.13. SDS-PAGE yöntemi sonrası 19,2 M Arrivo 25 EC (A2X) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları 63
Tablo 3.14. SDS-PAGE yöntemi sonrası 0,4 M The End EC (TX) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları 64
Tablo 3.15. SDS-PAGE yöntemi sonrası 0,8 M The End EC (T2X) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları 65

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

g	: Gram
Kg	: Kilogram
L	: Litre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
M	: Molar
nm	: Nanometre
N	: Normal
^oC	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
V	: Volt
g	: Yer çekimi ivmesi, (m/s2)

Kısaltmalar

APS	: Amonyum Persülfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
CO_2	: Karbondioksit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EC	: Emulsion Concentration
gDNA	: Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
GKS	: Genomik Kalıp Stabilitesi
HCl	: Hidroklorikasit
$MgCl_2$	: Magnezyum Klorür
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
PBS	: Phosphate buffer solution (Fosfat Tampon Solüsyonu)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Random Aplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
Rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
RNA	: Ribo Nükleik Asit
TBE	: Tris Borat Etilendiamintetraasetikasit buffer (Tris-Borat Etilendiamintetraasetikasit tamponu
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
UV	: Ultra viyole
vb	: Ve benzeri
WP	: Water Powder (Suda Çözünebilir)

BAZI PESTİSİTLERİN SOYA (*Glycine max* (L.) Merrill cv. May 5312) ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Ekosistemlerde, kirleticilerin verdiği zararı ortaya koymak amacıyla canlılar üzerinde pek çok araştırma yapılmaktadır. Bitkilerin bazı pestisitleri dokularında biriktirmektedir ve bu pestisitler çeşitli bitki türlerinde genotoksik etki meydana getirmektedir. Çalışmada soya tarlalarında hastalık, zararlı ve yabancı otlarla mücadele amacıyla kullanılan Pomarsol Forte WP 80 (fungisit), Arrivo 25 EC (insektisit) ve The End EC (herbisit) kullanıldı. Uygulanan pestisitlerin soyada kök uzunluğunu yarıya indiren değer olan EC50 değerleri; Pomarsol Forte 80 WP için 0,08 M, Arrivo 25 EC için 9,6 M ve The End EC için 0,4 M olarak tespit edildi. Tohum çimlenme yüzdesi 0,8 M The End EC muamelesi ile kontrol grubuna göre %90'dan % 70'e, %5,90 olan mitotik indeks 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP muamelesi ile %2,21'e düştü. RAPD analizleri için kullanılan 10 bazlık 18 primerden 308 adet bant elde edildi. Bu bantlardan (146 ile 1077 baz çifti büyüklüğü arasında değişen) 62'sinin polimorfik olduğu tespit edildi. Elde edilen bantların %20'sinin polimorfik olduğu belirlendi. Genomik kalıp stabilitesi değeri 9,6 M Arrivo 25 EC uygulamasıyla %76,9'a düştü. 0,8 M The End EC uygulaması ile toplam klorofil miktarı %64 ve karotenoid miktarı %45 azaldı. SDS-PAGE analizi ile tespit edilen toplam protein profili bakımından uygulama grupları arasında farklılıklar tespit edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ONE-WAY ANOVA) ve TUKEY HSD testi kullanılarak karşılaştırıldı ($P<0.05$). Soya tarlalarında kullanılan bazı pestisitlerin bitkide genotoksik etkiler oluşturduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Genotoksik etki, Pestisit, RAPD, SDS-PAGE, Soya.

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF SOME PECTICIDES ON SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill cv. May 5312)

ABSTRACT

In ecosystems, many studies were made to attempt the damage caused by the pesticides. Plants can accumulate pesticides, and also pesticides can cause genotoxic effects on plants. Pomarsol Forte WP 80 (fungicide), Arrivo 25 EC (insecticide) and The end EC (herbicide) which are used to struggle with disease, pest and weed in soybean fields were used. The EC50 values of the pesticides which were reduced the root length by half were detected as 0,08 M for Pomarsol Forte 80 WP, 9,6 M for Arrivo 25 EC and 0,4 M The End EC. Percentage of seed germination reduced from 90% to 70% with 0,8 M The End EC treatment, mitotic index reduced from 5,90% to 2,21% with 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP treatment compared to control group. Total of 62 polymorphic bands were detected ranging between 146 and 1077 bp from total of 308 bands obtained from 18 decamer primers used for RAPD and the percentage of polymorphism was detected as 20%. Genomic template stability reduced to 76,9% with 9,6 M Arrivo 25 EC treatment. Total chlorophyll and carotenoid content decreased 64% and 45% respectively. SDS-PAGE analysis for total protein profile showed that there were differences between the treatment groups. Statistical differences between the groups were compared with one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD test ($P < 0.05$). It was concluded that some of the pesticides used in soybean fields have genotoxic effects on the plant.

Keywords: Genotoxic effect, Pesticide, RAPD, SDS-PAGE, Soybean.

GİRİŞ

Kirlilik stresi altında kökler kirleticilerle temasın ilk noktasıdır. Bu nedenle son yıllarda *Allium cepa, Hordeum vulgare, Arabidopsis thaliana, Glycine max, Vicia faba* ve *Zea mays* gibi birçok bitki çevresel kirleticilerin genetik toksisitenin biyolojik indikatörü olarak kullanılmaktadır (Angelis ve diğ., 2000; Steinkellner ve diğ., 1999).

Bitkilerde stres faktörleri biyotik veya abiyotik kökenli olabilir. Biyotik stres faktörleri patojen saldırıları; virüs, böcek, bakteri ve fungus gibi başka canlılardan kaynaklanır. Abiyotik stres faktörleri ise fiziksel veya kimyasal kökenli olabilir. Bunlar, kuraklık, tuz, soğuk, sıcaklık, ağır metaller, UV radyasyonu, hava kirliliği, mekanik stres, yüksek ve düşük ışık şiddetini içerir (Linchtenthaler, 1998). Bitkilerde stres faktörlerine karşı iki farklı tepki gözlenir. Bunlar stres faktörlerinden kaçınma veya bu faktörlere toleranstır (Pastori ve Foyer, 2002).

Organizmaların strese verdikleri yanıtlar genetik yapılarına bağlı olarak değişmektedir. Bitkiler stresin algılanmasıyla başlayan ve hedef genlerin ifadesiyle sonlanan olaylar ağı ve tetikleyiciler tarafından strese uyum sağlamaya çalışırlar. Bunlar stres uyartıları, taşıyıcılar, transkripsiyon düzenleyicileri, hedef genler ve stres tepkileridir. Bunların etkisiyle bitkide fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik değişimler olur. Bitkiler strese benzer yollarla yanıt verebilirler. Çapraz tolerans olarak bilinen bu olay spesifik bir strese maruz bırakıldıktan sonra bitkilerin farklı streslere alışmasına ya da toleransa yol açar (Pastori ve Foyer, 2002). Bitkilerin belirli bir stres faktörüne olan tepkileri; yaşa, yaşama ortamına adaptasyon derecesine, mevsime ve günlük aktiviteye bağlı olarak değişiklik gösterir (Özcan ve diğ., 2001).

Stres koşullarında ve farklı zehirli kimyasallarla muamele sonucunda bitki genotipinde polimorfizm meydana gelmektedir. Polimorfizm, bir popülasyonda farklı allellere bağlı olarak iki veya daha çok alternatif yapının görülmesidir. Genetik polimorfizm, bir populasyonda, farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir. Populasyon genetikçileri, bir gen lokusu için, nadir alleller en az %1 frekansına sahip ve bu alleller için heterozigotlar en az %2 oranında görülürlerse polimorfik olarak tanımlarlar. Populasyon genetiği

açısından belli bir frekansa gereksinim olmasına karşın, moleküler biyoloji açısından, frekansın önemi olmayıp, bir ailede dahi görülen farklılık, polimorfik olarak adlandırılmaktadır. Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerininfarklı formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) ya da DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde gelebilir. 1960'lardan itibaren yaygın olarak kullanılmaya başlayan protein polimorfizmi çalışmaları, rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ve PZR (polimeraz zincir reaksiyonu)'nin keşfiyle yerini moleküler tekniklere bırakmış durumdadır. Moleküler teknikler ile daha hızlı ve daha kesin sonuçlar alınmaktadır. Bu tekniklerden Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) moleküler tekniği, dünyada olduğu gibi ülkemizde de genotipik farklılıkların belirlenmesinde ve bazı tarımsal özelliklerin seçiminde kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır (Fafona ve diğ., 1997; Köksal ve diğ., 2006; Mayers ve diğ., 2004). RAPD tekniği, Williams (1990), Welsh ve McClelland (1990) tarafından geliştirilmiştir. RAPD; kısa oligonükleotidler (10 bp) tasarlanarak polimeraz zincir reaksiyonu ile rastgele çoğaltılmış DNA parçaları meydana gelen bir genetik analiz yöntemidir (Williams ve diğ., 1990). Bir primerin bağlanma bölgesi bir bireyde vardır, diğer bireyde yoktur (dominant-resesif) esasına dayalı olarak polimorfizm taranır. Çok sayıda üretilen DNA parçalarıyla genetik varyasyon hızlı ve kolay şekilde belirlenebilir. Bu teknik türlerin sınıflandırılması, genetik haritalama ve filogeni gibi çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna ek olarak zehirli kimyasallar tarafından teşvik edilmiş DNA hasarını göstermedeki kullanımı da yaygındır. Bu nedenle kullanılan farklı pestisitlerin bitkide DNA düzeyinde meydana getirdiği toksik etkiler RAPD yöntemi kullanılarak ortaya çıkarılabilir (Savva, 1996; Savva, 1998; Ateinzar ve diğ., 2000). Biyokimyasal teknikler arasında yer alan Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) bitkilerin genetik yapısını tanımlamadaki kolaylığı ve geçerliliği nedeniyle oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tohum depo proteinleri tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin analizinde, genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmalarında, genom ilişkilerinin belirlenmesinde, mahsüllerin geliştirilmesinde genetik işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Elektroforezle elde edilen tohum depo protein profilleri pek çok türün taksonomik ve evrimsel problemlerini çözmekte kullanılmaktadır. Çünkü elde edilen bant profilleri her tür için özel ve doğrudan doğruya genotipe bağlıdır (Ghafoor ve diğ., 2000).

Genotoksik kimyasalların etkilerinin direk olarak DNA'dan ölçülmesinin avantajı; yüksek duyarlılık ve zehirli kimyasallara yanıtın kısa sürede olmasıdır. Son zamanlarda moleküler biyolojide görülen ilerlemeler genotoksikoloji alanındaki DNA analizleri için çok sayıda duyarlı ve seçici deneylerin gelişmesini sağlamıştır (Angelis ve diğ., 2000; Steinkellner ve diğ., 1999; Yıldız ve Arıkan, 2008; Yıldız ve Ciğerci, 2009).

Son yıllarda sağlık açısından önemi daha iyi ortaya çıkan soya fasulyesi, Asya halkının beslenme alışkanlığında vazgeçilmez bir besin olarak yer almaktadır. Yaklaşık 5 bin yıl önce Doğu Asya ovalarında keşfedilen soya, bugün sadece vejetaryen beslenme düzeninde değil, dünya mutfaklarında da önemli bir yere sahiptir. Soya fasulyesini bu derece önemli kılan, zengin bir protein kaynağı olması, insan vücudunun ihtiyaç duyduğu amino asitler açısından mükemmel bir denge oluşturmasıdır. Soya proteini hem çocuklar hem de yetişkinler için önemli bir kaynaktır. Aynı zamanda inek sütüne karşı alerjisi olanlar için de vazgeçilmez bir protein kaynağıdır. Kolayca sindirilebilen, kolesterol içermeyen soya ürünleri bu özellikleri nedeniyle diyet yapanlara da önerilmektedir. İçerdiği B1 vitamini oranının ete nazaran daha yüksek olması; kalsiyum, demir, çinko, fosfor, magnezyum içermesi gibi nedenlerle uzmanlar sağlıklı bir yaşam ve dengeli beslenme için soya ürünlerinin kullanılmasını önermektedir (Öner, 2006).

Pestisitlerin dezavantajları ve yan etkileri artık herkes tarafından bilinmektedir. Her şeyden önce pestisit uygulamaları üretim maliyetini artırmaktadır. Kimyasal savaş çerçevesinde kullanılan birçok kimyasalın hedef olmayan diğer canlılar üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Özellikle zararlı türleri baskı altında tutan doğal düşmanlar üzerinde yan etkilere sahiptirler (Karaca ve diğ., 2003) . Pestisitler insanlarda; akut ve kronik zehirlenmelere, kansere, alerjik reaksiyonlara, sinir sisteminin tahribatına, öğrenme güçlüğü ve hafıza kaybına, insan organizması için hayati fonksiyonları olan enzim dengelerinin bozulmasına, hücre içi DNA moleküllerinde bozulmalara ve mutasyona neden olurlar (Wakabayashi ve Boger, 2004).

Pestisitler uygulandıklarında doğrudan veya dolaylı olarak bitkiye, toprağa ulaşmakta ve oradan yağmur suları ile yıkanarak yeraltı sularına, akarsulara, göl ve deniz sularına taşınmakta, buralardan da besin zinciri yoluyla insana ulaşmaktadır. Ekosistemde ürün kaybına neden olan zararlı, hastalık ve yabancı otlara karşı yapılan mücadelede kullanılan pestisitin % 0,015-% 6,0'sı hedef alınan canlı üzerine ulaşmakta ve yeterli etki alınmakta, geri kalan kısmı ise hedef olmayan

organizmalara ve toprağa ya da doğal ekosisteme sürüklenmektedir (Yıldız ve diğ., 2005). Pestisitlerin tarımsal üretimde yaygın olarak kullanılması, doğada ve çeşitli ürünlerdeki kalıntı seviyelerinin artmasına neden olmaktadır. Pestisit, gıda, insan ilişkisi insanoğlunun geleceğini de etkilemektedir (Yücel, 2007).

Bu çalışma kapsamında soya tohumları Pomarsol Forte 80 WP (%80 Thiram) fungisiti, Arrivo 25 EC (250g/L Cypermethrin) insektisiti ve The end EC (50g/L Quizalofop-p-ethyl) herbisiti ile muamele edildi ve bu pestisitlerin farklı konsantrasyonlarındaki kök uzunluğunu yarıya indiren değer olan EC50 değerleri saptandı. Kullanılacak pestisit konsantrasyonları bu değerler temel alınarak belirlendi.

Uygulma grupları arasındaki tohum çimlenme yüzdesindeki, genomik DNA miktarındaki, RAPD tekniği kullanılarak DNA düzeyindeki, SDS-PAGE tekniği kullanılarak protein profilindeki, toplam çözünür protein miktarındaki, klorofil ve karotenoid miktarındaki değişimler ve mitoz bölünmedeki anormallikler kontrol grubu ile karşılaştırılarak tespit edildi.

Bu çalışma ile soya bitkisi kullanılarak soya tarımında yaygın olarak kullanılan pestisitlerin seçilen organizma üzerinde meydana getireceği genotoksik etkilerin tespit edilmesi ve böylece çevreye ve dolaylı olarak besin zinciri yolu ile insana verilen zararın ortaya çıkarılmasının sağlanacağı düşünülmektedir.

1. GENEL BİLGİLER

Biyoindikatör organizma; bitki ya da hayvansal organizmaların, çevrelerindeki yararlı ya da zararlı madde karışımlarından birine karşı en duyarlı olanı şeklinde tanımlanır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Örgütü (Environmental Protection Agency, US EPA)'ne göre *Glycine max* (soya) biyoindikatör organizma olarak kullanılan bitkiler arasındadır.

Pestisitler etki ettikleri canlılara göre fungisitler, herbisitler ve insektisitler olarak sınıflandırılmaktadır. Fungisitler, mantarlarla; herbisitler, zararlı otlarla; insektisitler, zararlı böceklerle mücadelede kullanılan pestisitlerdir. Pestisitlerle ilgili fizyolojik ve biyokimyasal bilgiler genellikle *in vivo* ve *in vitro* deneylerle elde edilir (Fedtke, 1982).

Bilinçsizce yapılan ve tekniğine uygun olmayan pestisit uygulamaları sonucunda insan, hayvan ve çevre sağlığı tehdit edilmekte, hava, su ve toprak olumsuz etkilenmekte, gıda maddelerinde ilaç kalıntıları bulunmakta, hedef alınan zararlılarda direnç oluşmakta, önemli olmayan bazı zararlılar ana zararlı konumuna geçmekte, yararlıların ve doğal hayatın öldürülmesiyle doğal denge bozulmakta ve bitkilerde fitotoksisite görülmektedir.

Çevreye bırakılan kimyasallar, ekosistemin normal fonksiyonlarını kısa veya uzun sureli olarak ve geçici ya da kalıcı şekilde değiştirebilirler. Sonuçta ekonomik, sosyal ve çevresel kayıplara neden olurlar. Burada en önemli olan pestisitlerin kolaylıkla biyolojik ayrışmaya uğramayıp, uygulandıkları ve taşındıkları çevrede dirençli olarak kalmalarıdır. Bu özellik bazı hastalıkları kontrol etmede avantaj olabilirse de, kimyasal maddelerin çevreye yayılmaları yönünden de bir dezavantajdır. Bu durum kimyasal maddelerin hedef olarak seçilen zararlı ve hastalık etkeni organizmaların dışındaki diğer canlıların ve çevrenin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Pestisitlerin insanlar üzerindeki etkilerinin yanı sıra, bitki ve hayvanlar üzerindeki etkileri de son yıllarda önemli araştırma konuları oluşturmuştur.

Pestisitlerin insanlar üzerindeki etkileri fetal yaşamdan itibaren başlamaktadır. Bu zehirler plasentadan fetüse geçmekte, bunun sonucunda düşükler, sorunlu çocuk

doğumları görülmektedir (Ami ve Haim, 1992). Atamanalp ve Cengiz (2002) bir sentetik piretroit insektisit olan Cypermethrin'in *Capoeta capoeta*'nın bazı kan parametreleri (hemoglobin, hematokrit ve sediment) üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada; hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde azalmaya sediment değerinde ise yükselmeye neden olduğu gözlenmiştir.

Türkiye'de gelişmiş ülkelere göre genel olarak daha az pestisit tüketilmesine karşın, yoğun olarak tüketilen pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde her yılda on bin kişi tarım ilacından zehirlenerek ölmekte ve 400.000 kişi de hastalanmaktadır (Bora ve Özaktan, 1988). Pestisitler ağız, deri ve solunum yoluyla vücuda girmekte ve doğrudan ya da dolaylı olarak etkiler oluşturabilmektedir. Birçok araştırıcı, pestisitlerin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduklarını göstermiştir (Smaka-Kincl ve diğ., 1996; Rank ve Nielsen, 1998; Steinkellner ve diğ., 1998; Kong ve Ma, 1999; Pavlica ve diğ., 2000; El-Shabhaby ve diğ., 2003; Evseeva ve diğ., 2003; Chandra ve diğ., 2005).

Atienzar ve arkadaşları (1999), genotoksik hidrokarbon olan Benzo[a]piren ile *Daphnia manga*'yı (su piresi) farklı konsantrasyonlarda muamele etmiş ve toksik olan bu maddenin DNA üzerinde ortaya çıkardığı değişiklikleri RAPD tekniğini kullanarak araştırmışlardır. Yapılan deneylerde ortaya çıkan sonuçlar RAPD tekniğinin sadece hızlı ve tekrarlanabilir değil aynı zamanda da diğer ekolojik parametrelerle de karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile RAPD metodunun toksik etkileri tespit etmede etkili bir teknik olduğunu ve hassas sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

Cenkci ve arkadaşları (2009), civa, bor, krom ve demirin fasülye (*Phaseolus vulgaris*) fidelerinde meydana getirdiği DNA hasarını RAPD tekniği ile araştırdıkları çalışmalarında, 20 RAPD primeri kullandıklarını, 12 RAPD primerinin polimorfik bant verdiğini, toplam 120 bant amplifikasyonundan %50.4'ünün polimorfik olduğunu bildirerek RAPD analizinin toksik kimyasallar gibi çevresel kirleticiler tarafından meydana getirilen DNA hasarının tespit edilmesinde yüksek duyarlılıkta bir metot olduğunu rapor etmişlerdir.

Diğer yapılan çalışmalar RAPD (ve diğer ilgili markörler) bant görünümünde meydana gelen değişimlerin kalıtsal mutasyonlar, kromozomal değişimler ve diğer DNA hasarlarıyla ilgili olabileceğini göstermişlerdir (Savva, 1998; Ateinzar ve diğ., 2000; Conte ve diğ., 1998; Theodorakis, 2001).

Buğdayda tohum çimlenmesi, kök uzaması, mitotik indeks ve kromozom davranışları üzerine Spermidin, Spermin ve Sikloheksilamin'in etkileri incelenerek kök uzamasını engellediği, kromozomlarda anomali yarattığı bildirilmiştir (Işıl ve diğ., 2004).

Aksoy ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada; mercimek tarımında uygulanan farklı Fusilade (Fuliazifop-P-butyl) dozlarının, mercimek *(Lens culinaris* Medik.) bitkisinde mitotik bölünme, hücre ince yapısı ve yaprakta klorofil miktarı üzerinde negatif etkisinin olduğu ifade edilmiştir.

Fethiye'de serada yetiştirilen domates *(Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisine, Megasil (%35 Metalaxyl) fungisiti uygulamalarının stoma indeksi değerlerinde kontrole göre azalmaya neden olduğu, anormal ve kapalı stoma sayılarında doz artışına paralel olarak bir artış olduğunu bildirmiştir (Öztürk, 2007).

Öztürk ve Tort (2006), Switch 62.5 WP (% 37.5 Cyprodinil+% 25 Fludioxonil) fungisitinin üç dozunun (60, 120 ve 180 g/ 100 L su) uygulandığı domates bitkilerinden alınan gerek alt ve gerek üst yüze ait yaprak yüzeysel kesitlerinde anormal yapılı stoma ile kapalı stoma sayısı yüzde değerlerinin kontrole göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Öztürk ve Tort (2006)'un yaptıkları diğer bir çalışmada serada yetiştirilen domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisine Mythos SC 300 (300 g/L Pyrimethanil) fungisiti uygulaması sonrası protein değerlerinin kontrole göre doz artışına paralel olarak arttığını, IAA (İndol-3-asetik asit) ile kapalı stoma değerlerinin yine tüm fungisit gruplarında kontrole göre artış gösterdiğini ve elde edilen ürün miktarı üzerinde olumsuz bir etki meydana getirdiğini göstermişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada, yüksek dozlardaki fungisit uygulamalarının total serbest amino asitler ile protein konsantrasyonlarını azalttığı bildirilmiştir (Pinheiro ve diğ., 2001).

Tridemorph fungisitinin *Allium cepa* meristem hücrelerinde mitozu baskıladığı ve bu etkinin konsantrasyon ve süreye bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Bu fungisitin güçlü bir c-mitoz (colchicine mitoz) ajanı olduğu ve buna ilaveten, multipolar anafaz,

kromozom kontraksiyonu, anormal kromozom dağılımı ve mikronükleus oluşumlarına da neden olduğu bildirilmiştir (Cortes ve diğ., 1982).

İlloksan herbisitinin (284 g/L diclofop-methyl) genotoksik potansiyeli, *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde kromozomal anormallikler kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada İlloksanın *A. cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik indeksi düşürdüğü, belirlenmiştir. Bu çalışmanın verileri, kimyasal maddelerin muhtemel genotiksik etkilerinin belirlenmesinde bitki deneme sistemlerinin kullanılabileceğini göstermektedir (Yüzbaşıoğlu ve diğ., 2009).

İnsektisitlerin etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda; Methyl-parathionun *Hordeum vulgare*'nin kök meristem hücrelerinde toksik etki meydana getirdiği ve klorofil mutasyonuna neden olduğu (Grover ve Tyagi, 1979), Decis'in *A. cepa*'da, c-mitoz ve mikronukleus oluşumu gibi mitotik anormallikler oluşturduğu saptanmıştır (Coşkun ve diğ., 1994). Endosülfanın *Lens esculenta*'da (Aktaç ve diğ., 1994), maya hücrelerinde ve farelerde (L'vova, 1984), Cypermethrinin *A. cepa*'da (Kara ve diğ., 1994), malathion ve tamaron uygulamasının *Vicia faba*'da (Adam ve diğ., 1990) mitotik indeksi azalttığı, kromozom yapışması, anafaz köprüleri ve mikronukleuslu hücreler oluşturduğu raporlanmıştır. Carbosulfanın insan periferal kan lenfositlerinde c-mitoza sebep olduğu belirtilmiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1994).

Alfa-siyano piretroid insektisitlerinden Cypermethrin (CYP) ve Fenvarelate (FEN)'in ticari formülasyonlarının sitogenetik etkileri *A. cepa* kök meristem hücrelerinde değerlendirilmiştir. Her iki bileşikle teşvik edilen aberasyonların tipleri, CYP uygulamasında gözlenen kromozomların eşit olmayan dağılımı ve mikronükleuslu hücrelerin oluşumu dışında hemen hemen benzer bulunmuştur. CYP'ye maruz bırakılan hücrelerdeki aberant hücrelerin sıklığı FEN'e maruz bırakılan hücrelerdekinden fazla olduğundan daha toksik bulunmuştur. Önceki çalışmalarla uyumlu olan bu incelemeler alfa-siyano pyrethroid insektisitlerin genotoksik etkilerinin birincil mekanizmasının iğ ipliği hasarı olduğuna işaret etmektedir (Chauhan ve diğ., 1999).

Fungisitlerin etkileri araştırıldığında, Benomylin *A. cepa*'da fitotoksik ve sitotoksik olduğu (Dane ve Dalgıç, 2005), sıçan karaciğer hücrelerinde histolojik ve biyokimyasal değişiklikler oluşturduğu gösterilmiştir. Tütünde mavi küf hastalığına karşı uygulanan Antrakol'ün bitkilerde gövde uzamasını inhibe ettiği, bunun yanı sıra doz artışına paralel olarak klorofil içeriğinin indirgendiği (Steward, 1971) ve yaprak

anatomik yapısında dejenerasyona neden olduğu vurgulanmıştır (Özörgücü ve diğ., 1990). Tripathi ve Schlösser (1979) Carbendazimin bazı bitkilerde kök gelişimini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Herbisitler yabancı otların normal gelişimini çeşitli aşamalarda durdurarak yok edilmelerini sağlayan kimyasallardır. Bitki metabolizmasının değişik evrelerinde etkili olan bu kimyasallar, metabolizmanın bozulmasına ve bitkinin ölmesine neden olurlar. Herbisitlerin bitkiler üzerindeki etkileri araştırıldığında, Penoksilin'in mısır ve pamukta klorofil a ve b miktarlarını kontrol bitkilere oranla azalttığı saptanmıştır (Güven ve Yürekli, 1989).

2,4-D'nin bitki ve hayvan hücrelerinde mitotik aktiviteyi indirgediği, kromozom ve hücre yapısında anormalliklere yol açtığı (Pavlica ve Nagy, 1991) buğdayda sitotoksik etkiler oluşturduğu (Brezeanu ve diğ., 1976), *Guizotia*'da tohum çimlenme yüzdesini düşürdüğü (Singh ve Verma, 1999), bazı bitkilerde bitki gelişimini azalttığı ve fotosentezde inhibe edici rol oynadığı (Sasaki ve diğ., 1968) bildirilmiştir. Atrazine'in *Vicia faba*'da genotoksik etkiler meydana getirdiği rapor edilmiştir (De Marco ve diğ., 1992).

Türkoğlu (2005) tarafından *Vicia faba* bitkisi kullanılarak yapılan bir çalışmada da Paraquat herbisitinin farklı doz ve sürelerde bitkinin kök ve tohumlarına uygulanması sonucunda kontrole oranla mitotik indekste ve DNA miktarında azalma saptandığı ifade edilmiştir. Köke uygulamada ayrıca kromozomlarda hasarlar meydana geldiği, anafaz köprüsü, yapışkanlık, kalgın kromozom, kırılma ve fragment oluşumu gibi anomaliler gözlendiği belirtilmiştir.

Çevresel kirleticilerin mutajenik etkilerinin değerlendirilmesi için model olarak kullanılan bazı bitki türleri *Allium cepa, Arabidopsis thaliana, Crepis capillaris, Glycine max, Hordeum vulgare, Lycopersicum esculentum, Nicotiana tobccum, Pisum sativum, Tradescantia clone, Vicia faba* ve *Zea mays* bitkileridir (Grant, 1994).

Araştırmamız ile *G. max* tarlalarında hastalık, zararlı ve yabancı otlarla mücadele için kullanılan bazı pestisitlerin *Glycine max* (L.) Merrill cv. May 5312 üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Böylece çevre ve insan sağlığı açısından yapılacak değerlendirmelere katkıda bulunması beklenmektedir.

1.1. Soya (*Glycine max* (L.) Merrill)

Anavatanı Çin olan *G. max* L. (soya), Uzak Doğu'nun en eski ürünlerinden birisidir. 4000–5000 yıl önce ortaya çıktığı düşünülmektedir. Soyaya ait ilk yazılı kayıt milattan önce 2838 yılında Çin imparatoru Shen Nong tarafından yazılan Materia Medica adlı kitapta yer almaktadır. Yüzyıllardır Çinliler, Japonlar, Koreliler ve Güneydoğu Asyalılar soyayı beslenmelerinde en önemli protein ve yağ kaynağı olarak kullanmışlardır. Soyanın protein içeriğinin yüksek olması nedeniyle de, bu küçük ve eski fasulye "sarı mücevher", "büyük hazine", "doğanın mucize proteini" gibi isimler almıştır. Şimdi ise soya dünyadaki açlık sorununa bir çare ve geleceğin proteini olarak görülmektedir (Liu, 1997). Önemli özelliklerine rağmen soya fasulyesi, yüzyıllar boyunca doğuya özgü bir ürün olarak kalmıştır. Avrupaya ilk olarak Alman botanikçi Engelbert Kaempfer tarafından tanıtılmıştır.

İsveçli botanikçi Later Carl von Linnaeus soyaya *Glycine max* L. sistematik ismini vermiştir. "Glycine" Latince'de "tatlı" anlamına gelmektedir ve baklagillerin tüm yer fıstığı türleri için kullanılmaktadır. "Max" kelimesi ise "geniş" anlamındadır ve soya bitkisinde yer alan geniş nodüllerden gelmektedir (Liu, 1997). Soyanın Melchior (1964)'a göre taksonomik olarak sınıflandırılması Tablo 1.1'de gösterilmektedir.

Kültürü yapılan soya çeşitleri Soja alt cinsine aittir. Bu alt cinse dahil türler tek yıllıktır ve yabani olarak Orta ve Uzak Doğu Asya'da yetişmektedir. *G. max* L. Merrill, bu cinse ait iki önemli türden birisidir ve kromozom sayısı 2n=40'dır. Günümüzde kültürü yapılan çok sayıda soya çeşidi *G. max* L. Merrill türüne aittir (Arıoğlu, 1999; Weiss, 2000). Kültür bitkisi olan *G. max*, tek yıllık olarak yetişir. Soya bitkisi çalı şeklindedir ve uzunluğu 0,75 m'den 1,25 m'ye kadar değişir. Yetişme koşullarına göre seyrek veya yoğun olarak dallanır (Liu, 1997).

Soyada bitki boyu; çeşit, ekim sıklığı, ekim zamanı ve ortam koşullarına bağlı olarak 30–150 cm arasında değişmektedir. Çoğu çeşitlerde gövde tüylerle kaplıdır. Soya meyveleri legümen tipte olup üzeri tüylerle kaplıdır (Arıoğlu, 1999) (Şekil 1.1).

Soya kazık köklü bir bitkidir. Toprak ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak kökleri, 1,5–2,5 m derinlere kadar inebilmektedir. Soyada kök ve yan kökler üzerinde havada bulunan serbest azotu fiske etmek için *Rhizobium bredy japonicum* bakterileri tarafından oluşturulan nodüller (Şekil 1.1d) bulunmaktadır (Arıoğlu, 1999; Weiss, 2000; Gazzoni, 1994).

Tablo 1.1. Soyanın Melchior (1964)'a göre taksonomik olarak sınıflandırılması

Regnum	Plantae
Subkingdom	Cormobionta
Division	Spermatophyta
Subdivision	Angiospermae
Class	Dicotyledoneae
Subclass	Archichlamydae
Order	Rosales
Suborder	Leguminosinae
Family	Leguminosae
Subfamily	Papilionaceae, Fabaceae
Tribe	Phaseoleae
Subtribe	Phaseolinae (Glycininae)
Genus	Glycine L.
Subgenus	Glycine subg. Soja (Moench)
Species	Glycine max (L.) Merrill



Şekil 1.1. *Glycine max* L. Merrill (soya) bitkisi a) fide b) meyve c) tohum ve d) kök

Tohum sayısı, çeşit ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak degişmekle birlikte genellikle 2–3 tohum/meyve'dir. Tohumlar yuvarlak, oval veya elips seklindedir. Tohumun rengi genellikle sarıdır. Hilum rengi, sarı, siyah, kahverengi veya kızıl olabilmekte ve bu özellik çeşitleri birbirinden ayırmada önemli bir ölçüt olarak kabul edilmektedir (Weiss, 2000; Gazzoni, 1994). Olgun tohumlar temel olarak tohum kabuğu, embriyo ve bir veya daha fazla besin depo yapıları olmak üzere üç bölümden oluşur. Fakat soya tohumları, diğer birçok baklagil bitkisinde olduğu gibi, aslında endospermden yoksundur ve bir tohum kabuğu ve geniş, gelişmiş bir embriyo içermektedir. Embriyo, besin depo yapıları olarak görev yapan iki tane kotiledon içerir (Liu, 1997).

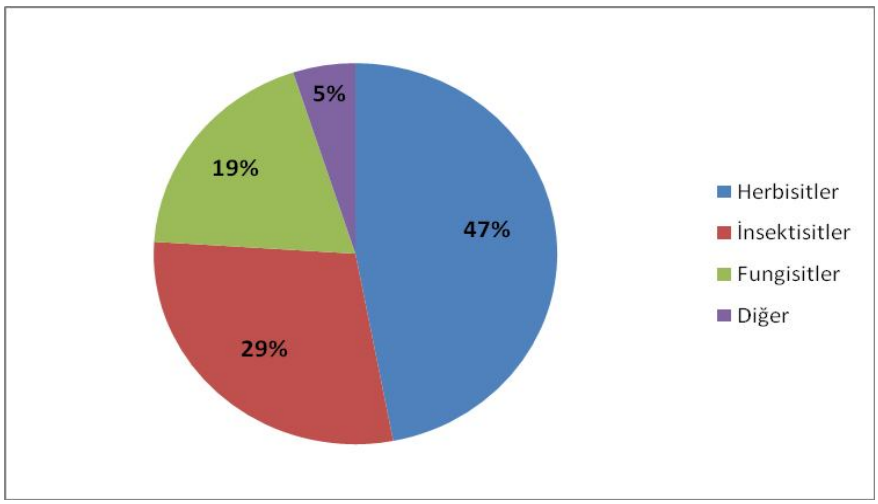
Depo proteinleri bitkilerde genellikle tohum, tüber ve köklerde birikmektedir, ancak angiospermlerde depo proteinleri denilince tohum depo proteinleri anlaşılmaktadır. Bitki depo proteinleri tahıl tohumlarının %50'sini meydana getirmektedir. Tohum içinde protein kitlesi halinde bulunmakta ve tohum çimlenmesi esnasında gerek duyulan iki element olan nitrojen ve sülfürü sağlamaktadırlar (Higgins, 1984; Zhou ve Fan, 1993). Bitki depo proteinleri kimyasal yapı itibarı ile birbirinden çok küçük farklılıklar gösteren birkaç gruptan meydana gelmektedir.

1.2. Pestisitler

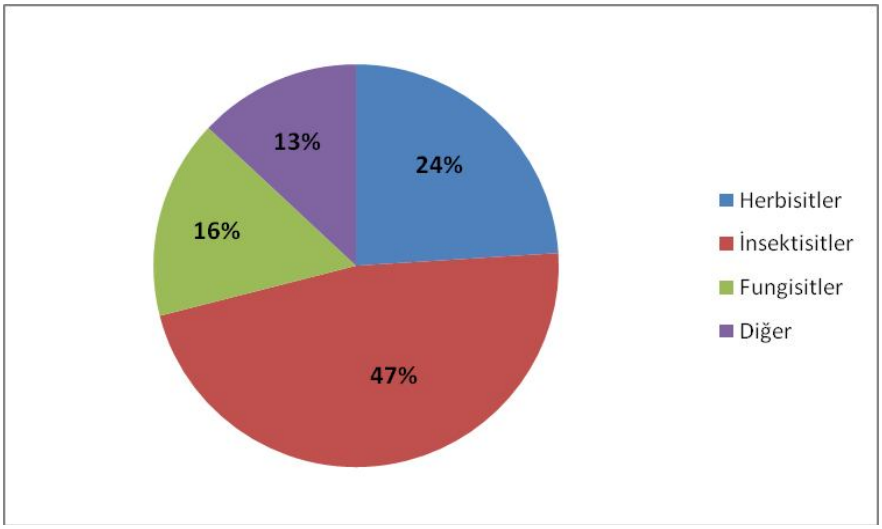
Dünyada pestist üretimi 3 milyon ton civarındadır. Pestisitlerin yıllık tutarı ise 25-30 milyar dolar arasında değişmektedir. Herbisitler, pestisitler içinde %47'lik bir payla birinci sırayı almaktadır. Bunu %29 ile insektisitler izlemekte, fungisitlerin ise %19'luk bir payı bulunmaktadır. Herbisitler ve insektisitler kullanımın %70'in üstündeki bir bölümünü kapsamaktadır. Diğer pestisit grupları ise %5'lik bir paya sahiptir (Delen, 2008) (Şekil 1.2). Türkiye'de pestisit üretiminin %47'si insektisit, %24'ü herbisit, %16'sı fungisit ve %13'ü diğerleridir (Turabi, 2007) (Şekil 1.3).

Dünya pestisit piyasasındaki payın %80'i gelişmiş ülkelerin iken Türkiye'nin payı %0,6'dır (Özmen, 2007; Öztürk, 2007; Kantarcı, 2007). Ülkemizdeki yıllık pestisit tüketimi, AB ülkelerininki ile kıyaslandığında, hektara düşen pestisit miktarı olarak AB ülkelerinin çok gerisinde olduğumuz görülmektedir. Hektara kullanılan pestisit miktarımız 1990'larda 400-500 g iken [84], 2006 yılında 705 g'a ulaşmıştır (Delen, 2008). Bu artışa rağmen, Hollanda'nın hektara 13,8 ve Yunanistan'ın 13,5 kg'lık tüketimleri ile kıyaslandığında bizim tüketimimizin daha az olduğu belirtilebilir. Ancak, ülkemizin oldukça heterojen bir pestisit tüketimi olduğu unutulmamalıdır

(Delen ve diğ., 1995; Delen ve diğ., 2005). Ege ve Akdeniz Bölgeleri tüketim toplamı, genel olarak ülke tüketiminin %34'den fazlasını, hatta bazı yıllar %50'sine yakınını oluşturmaktadır. Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerindeki kullanım ise, ülke tüketiminin ancak %10'u kadardır (Turabi, 2004).



Şekil 1.2. Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı (Tiryaki ve diğ., 2010)

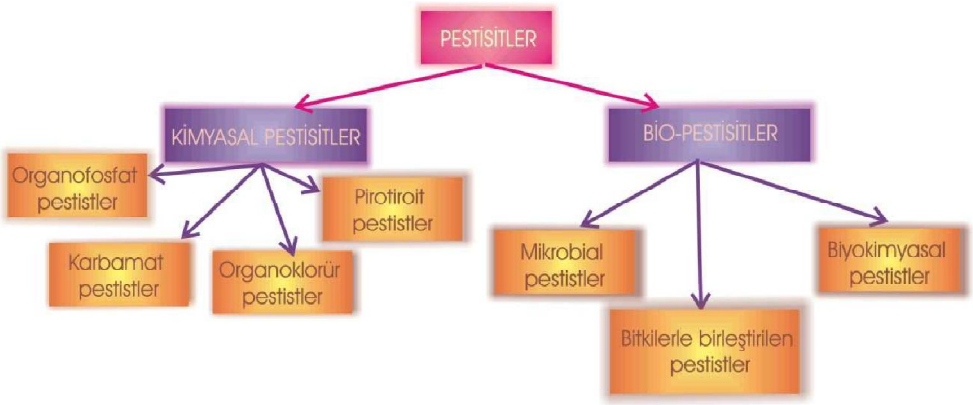


Şekil 1.3. Pestisit gruplarına göre Türkiye'de tarım ilacı kullanımı (Tiryaki ve diğ., 2010)

Doğada insan, bitki ya da hayvanlara zarar veren varlıkların etkilerini önleme, yok etme, azaltma ya da bu varlıkları geri püskürtme amacıyla kullanılan kimyasal madde veya madde karışımlarına "pestisit" adı verilmektedir (URL-1). Kimyasal maddeler, çok etkili olmaları, gerektiği zaman kullanılabilmeleri, geniş alanlara uygulanabilmeleri nedeni ile bu kadar yaygın kullanılmaktadırlar. Pestisitler yalnız

ileri tarım ülkelerinde değil artık tüm dünyada yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. En kolay ve en ucuz yöntem olan pestisit kullanımı tarımsal savaşta en çok tercih edilen yöntemdir. Günümüzde pestisit olarak kullanılan pek çok kimyasal madde vardır. Bu kimyasallar; yabani otlar gibi istenmeyen bitkilere karşı kullanıldıklarında herbisit, böcekleri öldürmek amacıyla kullanıldıklarında insektisit, küf ve mantar gibi hastalık ve zararlıları öldürmek amacıyla kullanıldıklarında fungisit gibi isimler alırlar (URL-2). İçerdikleri etken maddelere göre ise pestisitler kimyasal pestisitler ve biyo-pestisitler olarak iki grupta incelenmektedir (Şekil 1.3). Bunlardan kimyasal pestisitler, hastalık ve zararlıları engellemeye ya da öldürmeye yönelik olarak sentezlenen kimyasal maddeleri içerirler. Şekil 1.3'te görüldüğü gibi kimyasal pestisitler de kendi içinde dört ayrı gruba ayrılmışlardır. Bu gruplardan biri de karbamat pestisitlerdir. Asetilkolin enzimini düzenleyen bir enzimin bozulmasına yol açarak sinir sistemini etkileyen karbamat pestisitlerin de birkaç alt grubu vardır ve bu gruplara göre fungisit ya da insektisit olarak kullanılmaktadırlar. Bu gruplardan biri de hem ülkemizde hem de diger ülkelerde yaygın olarak kullanılan bir fungisit grubu olan ditiyokarbamat pestisitleridir (Delen ve diğ., 2010) (Şekil 1.4).

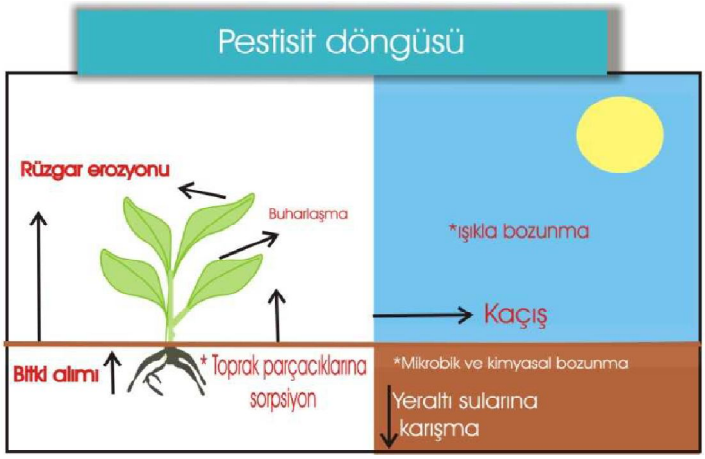
Pestisit kirliliği, pestisitlerin çevrede yarattığı beklenmedik etkilerdir. Kullanılan insektisitlerin %98'i ve herbisitlerin %95'i, hedeflerinden sapıp, hedef olmayan türlere bulaşabilir, havaya, suya, dip tortusuna ve gıdalara karışabilir (Miller, 2004). Pestisitler, üretim alanlarından veya muhafaza tanklarından sızdıklarında, tarlalardan aktığında, atıldığında, hava yoluyla kullanıldığında ve yosunları öldürmek amacıyla suya karıştırıldığında, toprak ve suyu kirletebilir (Tashkent, 1998). Pestisitlerin doğayı ne kadar kirlettiği, kullanılma yöntemlerine, şekillerine ve zamanlarına göre değişebilir (Miller, 1991).



Şekil 1.4. İçerdikleri etken maddelerin özelliklerine göre pestisit türleri (Karakoç ve diğ., 2001)

Dünya nüfusunda görülen artış beslenme gibi önemli bir sorunu da beraberinde getirmektedir. Yeterli besin maddelerini üretmek içinde tarımsal verimin birim alan başına arttırılması gerekmektedir. Çünkü tarıma açılacak alanların artık sınırına gelinmiş durumdadır. Verimi arttırıcı uygun toprak işlenmesi, yeterli gübreleme, sulama ve iyi tohum kullanmanın yanı sıra bitkisel üretimi sınırlayan hastalık, zararlı ve yabancı otların verimi engelleyici etkilerini ortadan kaldırmak gereklidir.

Pestisitler özelliklerine göre, buharlaşarak, rüzgârla taşınarak, yağmurla birlikte yer altı sularına ya da yüzey sularına karışarak sadece uygulandığı bölgeye değil, çok daha uzak mesafelere taşınabilirler (Şekil 1.5). Pestisitlerin doğaya yayılmaları ve kalıcılıkları; ışık, su, ortamın asitliği ya da toprağın özelliklerine bağlı olarak değişebilmekte, çok hızlı bir şekilde bozunabilmekte ya da aksine kalıcılıkları daha da artabilmektedir (Wakabayashi, 2004).



Şekil 1.5. Pestisitlerin dogadaki dönüşümleri (URL-8)

Pestisitler canlılara iki şekilde etki eder:

a) Doğrudan etki: Deri ve solunum yoluyla veya pestisitler ile direkt temas etmiş gıda maddelerinin tüketilmesi ile bu etki gerçekleşir. Doğrudan zehirleyici etki, zehirlilik düzeyine ve canlıların bu pestisitlerle temas etme derecesine bağlıdır. Canlı bünyesine girdikten sonra uzun süre değişmeden kalabildikleri gibi, bozulmaya uğrayarak ara ürünler de oluşturabilirler.

b) Dolaylı etki: Pestisit kalıntıları içeren bitkilerin ve hayvan dokularının besin maddesi olarak tüketilmesi sonucunda dolaylı etki gerçekleşir. Klorlandırılmış hidrokarbonlar vücut yağ dokusunda birikirler. Bu tür besin almış canlıda ölüm veya fizyolojik bozukluklar meydana gelebilmektedir. Pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki

etkileri şu şekilde olmaktadır. Bir pestisitin toksisitesi, onun yan etkiler oluşturma yeteneği anlamına gelmektedir. Yan etkiler; baş ağrısından koma, konvulsiyon ve ölüm gibi ciddi durumlara kadar değişiklik gösterebilmektedir. Bazı pestisitler ise dönüşümlü ya da dönüşümsüz zararlara neden olabilmektedir. Pestisitlerin vücuda girişi daha çok besin maddeleri ile gerçekleşmektedir. Bu besinler de çoğunlukla meyve ve sebzelerdir. Pestisit kalıntılarının birikimi için en uygun doku yağ dokusudur. Bu yüzden diğer dokularda görülen miktar daima yağ dokusundakinden azdır. Evlerde kullanılan deterjanlar da sindirim kanalına girmiş pestisitlerin emilim oranını arttırmaktadır (URL-9).

Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler havaya, su ve toprağa, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadır. Bir pestisitin çevredeki hareketi onun kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon tipi, uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir.

Pestisitlerin püskürtülerek uygulanması sırasında bir kısmı evaporasyon ve dağılma nedeniyle kaybolurken, diğer kısmı bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde kalmaktadır. Havaya karışan pestisit rüzgarla taşınabilir; yağmur, sis veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne dönebilir. Bu yolla hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşan pestisit, bunlarda kalıntı ve toksisiteye neden olabilir. Toprak ve bitki uygulamalarından sonra toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde asağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyu ve diğer su kaynaklarına ulaşabilirler. Eğim, bitki örtüsü, formülasyon, toprak tipi ve yağış miktarına bağlı olarak taşınan pestisitler, bu sularda balık ve diğer omurgasız su organizmalarının ölmesine; bu organizmalardaki pestisit kalıntısının insanların gıda zincirine girmesi ve kontamine olmuş suların içilmesiyle kronik toksisitenin oluşmasına neden olurlar. Toprağa geçen pestisitler güneş ışınlarının etkisiyle fotokimyasal degradasyona, bitki, toprak mikroorganizmaları ve diğer organizmaların etkisiyle biyolojik degradasyona uğramakta; toprak katı maddeleri (kil ve organik madde) tarafından emilip depolanmakta veya kimyasal bozulmaya uğramaktadırlar. Toprak içine geçmiş pestisitler kapiller su vasıtasıyla toprak yüzeyine taşınmakta ve buradan havaya karışabilmektedir. Toprağın yapısı, kil tipi ve miktarı, organik madde içeriği, demir ve alüminyum oksit içeriği, pH'sı ve toprakta var olan baskın mikroorganizma türleri tüm bu olayları etkileyen faktörlerdir. Toprakta pestisitin tutulmasıyla hareketi ve biyolojik alımı engellenmekte ve çeşitli şekillerde degradasyonu ile ya toksik özelliğini kaybetmekte ya da daha toksik metabolitlerine

dönüşebilmektedir. Pestisitin kendisinin ya da toksik dönüşüm ürünlerinin hedef olmayan yerleri veya organizmaları kontamine etmesi istenmediğinden tüm bu olayların bilinmesi ve incelenmesi önem taşımaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız fungisitin etken maddesi olan Thiram; etki yeri özelleşmemiş olan fungisitlerden Dithiocarbamate ailesine dahildir. Dimethyldithiocarbamate'lardan thiram oldukça buharlaşıcıdır ancak diğerleri değildir. Asidik koşullarda dimethyldithiocarbamic aside parçalanırlar, bu asit alkali koşullarda stabil iken asidik ortamda stabil değildir. Ethylenebisdithiocarbamate'lar depolandıkları koşullarda bile oksijen ve neme maruz kaldıklarında hızla dekompoze olurlar. Önce metal bileşikten ayrılırlar oksidasyon sonucu carbon disülfide, Ethylene thiuram disülfide ve sonuçta sistemik özellikte ama fungisit etkisi olmayan karsinojenik Ethylene Thiourea'ya parçalanırlar. Dimethyldithiocarbamate'ların etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ancak bu alt grup üyelerinin bakır ve diğer ağır metallerle kompleks oluşturarak etkileri artar. Ethylenebisdithiocarbamate'larda proteinlerin sülfidril grupları ile etkileşime geçerek enzimleri ve hücresel fonksiyonları engelleyerek etki yaptığı bilinmektedir (Karakoç ve diğ., 2001).

Çalışmamızda kullandığımız insektisitin etken maddesi olan Cypermethrin; organik fosforlu insektisidlerden olan sentetik piretroitlerdendir. Bu bileşiklerin insektisidal etkilerinin mekanizması vektör organizmasında asetil kolin esteraz enzimiyle, dönüşümsüz bir şekilde birleşerek, inhibe edilmesi temeline dayanır. Kolaylıkla yağda çözünebildiklerinden bütün uygulama yollarından hızla emilirler. Sentetik piretroitler ne tam metabolize olurlar ne de çabucak zehirliliklerini kaybederler. Bu nedenle kalıntı ve birikimleri ciddi problemlere sebep olur. Sentetik piretroidler geniş insektisidal spektruma sahiptirler ve insektisit etkileri yüksek, sıcakkanlılara etkileri ise düşüktür.

Herbisitlerin bitkide karboksitransferaz enzimine etki ederek, malonil grubunun oluşumunu engellediği düşünülmektedir. Yağ asidi sentez kompleksine malonil grubu bağlanamadığı için lipid oluşumu da engellenmektedir (Wakabayashi, 2004). Çalışmamızda kullandığımız herbisitin etken maddesi olan Quizalofop-p-ethyl; fenoksi asetik asit ailesine dahildir. Bu aileye dahil olan herbisitler lipid biyosentez inhibitörleri (Graminisitler-Asetil Koenzim A karboksilaz (AKKaz) inhibitörleri) olarak bilinirler. Fenoksi asetik asit ailesine ait herbisitler, hem ksilem hem de floem yolu ile taşınarak bitkinin gelişmekte olan bölgelerine taşınabilme özelliğindedirler. Bu

nedenle bu gruptaki herbisitler çok yıllık ve tek yıllık geniş yapraklı zararlı otlarla mücadelede kullanılmaktadır. Herbisit alınımı özellikle bitkinin yapraklarından olmakla birlikte, kök yolu ile de olabilmektedir. Bitkideki etki bölgelerinden biri lipid sentezidir, hücresel düzeyde etkileri tam olarak tanımlanmamıştır ancak pek çok farklı etki bölgesi olduğu düşünülmektedir (Erciş ve Taştan, 1985). Bu herbisitlerin etkisi, bikarbonat (HCO_3) formunda CO_2 ilavesi ile asetil koenzim-A'yı, malonil koenzim-A'ya çevirmekte rol oynayan AKKaz enzimi üzerinde görülmektedir. Bu reaksiyon lipid biyosentezindeki ilk temel biyosentetik reaksiyondur (Burton ve diğ., 1987).

1.3. Genetik Belirleyiciler (Markörler)

Genom analizlerinde kullanılan genetik belirleyiciler; morfolojik, protein esaslı ve DNA esaslı olmak üzere başlıca üç tiptedir. Bir tür içindeki genotipler arasında var olan çeşitlilik (varyasyon) genom analizleri için temel oluşturmaktadır. Genetik bir markör olabilmek için belirleyici lokusunun bir test populasyonunun bireyleri arasında deneysel olarak tespit edilebilir çeşitlilik göstermesi gerekmektedir. Çeşitlilik, basit olarak kalıtılabilir bir fenotipten, tek bir nükleotit değişiminin tespitine kadar uzanabilen farklı biyolojik düzeylerde incelenebilir. Çeşitlilik tanımlandığında ve test populasyonunu oluşturan bütün genotipler bilindiğinde, lokuslar arasındaki rekombinasyon olaylarının sıklığı markörler arasındaki bağlantıyı belirlemede kullanılmaktadır.

1.3.1. Morfolojik belirleyiciler

İlk haritalama çalışmaları, şekil, renk, büyüklük ve uzunluk gibi basit Mendel kalıtımı gösteren özellikler üzerinde yoğunlaşmıştır. Morfolojik özellikler, genetik özellikleri kontrol eden genlerin bire bir cevabına sahiptir. Bu gibi durumlarda, morfolojik karakterler ya da fenotipler belirli bir gen için güvenilir belirleyiciler olarak kullanılabilir ve kromozomlar üzerinde genetik belirleyiciler olarak yarar sağlamaktadır. Pek çok canlıda (insan, fare, mısır, domates vb.) morfolojik belirleyiciler çalışılmış ve haritalanmıştır.

Morfolojik belirleyicilerin bir kısmı tek bir gendeki değişimleri temsil eden nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Diğer kısmı ise bu şekilde basit bir genetik temele sahip olmayabilir. Morfolojik belirleyicilerin gözlemi kolaydır, ancak tek bir ya da birkaç populasyonda kalıtım özelliği gösteren fazla sayıda morfolojik belirleyicinin bulunma durumu zor olabilmektedir (Liu, 1998).

1.3.2. Protein belirleyicileri

Proteinler, insan ve hayvanlar için besin kaynağı oldukları gibi aynı zamanda, bir organizmanın tanımlanmasını sağlayıcı yapısal bilgileri gösteren, bazen organizmanın evrimsel tarihinin anlaşılmasını mümkün kılacak bilgileri sunan moleküllerdir (Jain ve diğ., 1983). Bu bilgilere ulaşmak ise elektriksel alanda bulunan jelatinsi bir ortamda, değişik protein moleküllerinin, farklı şekilde hareket etmeleri prensibine dayanan protein elektroforezi ile mümkün olabilmektedir. Proteinler gen ürünleridir. Genlerin farklı alelleri, farklı aminoasit kompozisyonuna, büyüklüğüne ve modifikasyonuna sahip proteinleri oluşturabilmektedir. Proteinlerin yük veya büyüklüklerindeki farklılıklar jel elektroforezi ile rahatça saptanabilmektedir (Koornneef ve O'Brien, 1990).

Elektroforetik analizler, gen ürünleri olan enzimlerin ya da diğer proteinlerin yapısal değişikliklerinin ortaya çıkarılmasını sağlayan önemli analitik yöntemlerdir ve bu elektroforetik markörler DNA'nın üçüncü kuşak kopyası olduklarından genetik bilgilere çok yakındır (Zuckerkandl ve Pauling, 1965). Proteinlerin sunduğu bu bilgilerin güvenirliği, mRNA ve DNA moleküllerinden düşük de olsa, enzim ürünleri veya bunun gibi moleküllerden üstündür (Jain ve diğ., 1983). Proteinlerin bu özellikleri, kolay izole edilmeleri ve jel elektroforezinin proteinler arasındaki farklılıkları ayırt edebilme gücü fenotipik karakterleri karşılaştırmak için kullanılabilmelerini sağlamaktadır. Bu yüzden elektroforetik analizler genetik kaynaklara ulaşılmasında, genotipler arası farkların gösterilmesinde oldukça güçlü ve ucuz tekniklerdir ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde direkt DNA veya RNA seviyelerindeki çalışmalar yerine bu yöntemin tercih edilmesi daha avantajlıdır. Uzun süreden beri yapılan çalışmalarda, değişik şekillerdeki jel elektroforezi metodlarıyla, pekçok bitki türünün tohum veya yaprak proteinlerinin ya da enzimlerinin elektroforetik analiziyle, yukarıda bahsedilen, çeşitlerin saflığını göstermek, çeşitler arası tanımlama yapmak, biyosistematik analizlere yardımcı olmak, türlerin filogenetik ilişkilerini ortaya çıkarmak, genetik çeşitlilik hakkındaki bilgileri arttırarak değerli bilgiler elde edilmiştir (Hamrick ve diğ., 1991).

Biyokimyasal teknikler arasında yer alan SDS-PAGE bitki koleksiyonlarının genetik yapısını tanımlamadaki kolaylığı ve geçerliliği nedeniyle oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Sammonur, 1991). SDS-PAGE; proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemede yaygın olarak kullanılan poliakrilamid jel elektroforez tipidir. SDS bir anyonik surfaktan olup proteinlere sıkıca bağlanarak proteinlerin denatürasyonunu

sağlar. Yaklaşık 1 g protein başına 1,4 g SDS varlığında proteinler birim kütle başına sabit negatif bir yük kazanırlar. Yani protein molekülünde her üç aminoasitlik birime bağlanarak proteinlere homojen negatif bir yük kazandırır. Böylece proteinler yük bakımından eşitlendiği için moleküler ağırlıklarına göre ayırımları gerçekleşecektir.

Oluşan SDS-protein birleşimi elektroforez sırasında anoda doğru hareket kazanır. Jelin moleküler elek özelliğinden dolayı belirli bir sürede yol aldıkları mesafe moleküler ağırlığa göre proteinden proteine farklılık gösterecektir. Moleküler ağırlığı bilinen standart bir protein ile aynı ortamda yürütüldüklerinde örnek proteinlerin moleküler ağırlıkları belirlenebilir. Standart SDS-PAGE anodun aşağıda olduğu bir şekilde dikey olarak yürütülür. Protein örnekleri genellikle pH'sı 6-8 olan tris tamponları içinde çözülür. Bu tamponlar ortamı nötralize eden bileşik olarak SDS, disülfit bağlarını indirgeyen β-merkaptoetanol, yoğunluk verici olarak sükroz veya gliserol, iz boyası veya markör olarak da bromfenol mavisi içerir. Ayırımın gerçekleştirileceği jel genellikle dengeleme ve ayırma jeli olarak iki kısımdan oluşur. Bunlar akrilamid konsantrasyonları bakımından birbirlerinden farklıdır.

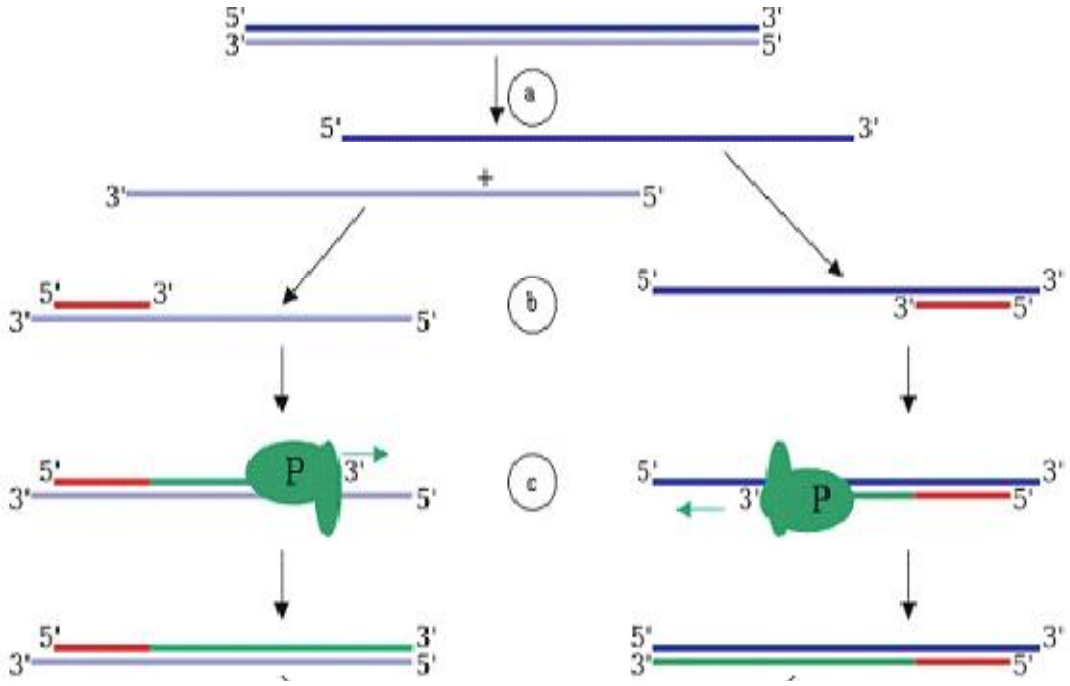
1.3.3. DNA belirleyicileri (Markörleri)

Genom dizilim kompozisyonunu temsil eden ve bu şekilde farklı bireylerde bulunan genetik farklılığın tespit edilmesine izin veren DNA belirleyicileri oldukça önem taşımaktadır. Küçük bir DNA parçasında bir türe ait bireyler arasında dizilim polimorfizmine dayanan kalıtılabilir farklılıkların tespitinde hibridizasyon ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) olarak iki yaklaşım kullanılmaktadır. İlk olarak geliştirilen DNA belirleyici sistemi olan Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği (RFLP) hibridizasyona dayanmaktadır (Bolstein ve diğ., 1980). Hibridizasyona dayalı bu belirleyicilerden sonra PZR teknolojisinin keşfi ile birlikte çok sayıda diğer belirleyici sistemler ortaya çıkmıştır. Bunlardan en önemlileri Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Basit Dizi Tekrarı (SSR), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) gibi belirleyicilerdir (Welsh ve McClelland, 1990; Williams ve diğ., 1990; Akkaya ve diğ., 1992; Vos ve diğ., 1995).

1.3.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

1983 yılında bulunan PZR, hedef bir DNA parçasının laboratuvar koşullarında çoğaltılmasına izin vermektedir. PZR sırasında çoğaltılmak edilmek istenen DNA bölgesinin yanlarında bulunan DNA dizilimlerine tamamlayıcı primer olarak

isimlendirilen kısa oligonükleotidler kullanılmaktadır. Hedef DNA ve iki primere ek olarak reaksiyon için gerekli diğer bileşenler olan; Taq DNA polimeraz, deoksinükleotidler, tampon çözelti, $MgCl_2$ ilavesi sonrasında herbiri 3 aşamadan oluşan; denatürasyon, bağlanma ve polimerizasyon döngülerin tekrarı ile reaksiyon tamamlanmaktadır. Denatürasyon aşamasında 94 ^{o}C'de çift zincirli DNA molekülleri birbirinden ayrılmaktadır. Bağlanma aşamasında primerlerde bulunan nükleotid içeriğine bağlı olarak sahip olacakları erime sıcaklığı (Tm) civarında bir sıcaklıkta, primerler hedef DNA yakınlarına bağlanacaktır. Polimerizasyon aşamasında ise 72 ^{o}C'de çalışan bir Taq DNA polimeraz aktivitesi ile hedef bölgenin kopyası zincir karşısına primerin bağlanma bölgesinden itibaren 5' yönden 3' yöne doğru sentezlenecektir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. PZR yöntemindeki aşamaların şematik olarak gösterimi. a.Denatürasyon, b.Bağlanma, c. Uzama. P: Taq DNA polimeraz

PZR, genetik materyaller üzerindeki çalışmalarda, nükleik asit karekterizasyonunda, moleküler klonlamada, dizi analizlerinde, rekombinant DNA teknolojisinde ve klinik uygulamalarda kullanılmaktadır.

1.3.3.2. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD)

Bu teknikte genellikle 10 baz çifti (bç) uzunluğunda rastgele baz dizilime sahip tek bir primer PZR ile çoğaltımında kullanılmaktadır. Primerlerin DNA'ya bağlandığı DNA bölgesinde var olan bir mutasyon sonucu PZR amplifikasyon ürünlerinin jel

elektroforezinde ayrılması sonrasında oluşacak bant görünümünde farklılık olacaktır. RAPD belirleyicileri günümüzde çok yaygın olarak kullanılan bir belirleyici tekniğini oluşturmaktadır. Özellikle ucuz oluşu ve uygulanması için DNA dizilim bilgisine gereksinim duyulmayışı gibi avantajları nedeniyle, genetik çeşitlilik ve genom haritalama çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Radyoaktif olarak yapılmaması ve basit olması nedeniyle bu teknik çoğu organizmada genetik çeşitliliğin tespit edilmesi için kullanılmıştır (Kumar, 1989). Bunun yanı sıra, moleküler parmak izi analizinde (Yu ve Nguyen, 1994; Baired ve diğ., 1992; Macgowan ve diğ., 1993; Stiles ve diğ., 1993), evrimsel analizlerde, genetik haritalamada (Uphoff ve Wricke, 1992; Kıss ve diğ., 1993) populasyon çeşitliliği analizlerinde (Chapco ve diğ., 1992; Kambhampat ve diğ., 1992; Dawson ve diğ., 1993) kullanılmaktadır.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Deney Materyali ve Büyüme Koşulları

Materyal olarak *G. max*'ın çimlenmiş tohumları, kök uçları ve yaprakları kullanıldı. Soya tohumları May Agro Tohumculuk firmasından ticari olarak elde edildi. Deney materyaline muamele için soya tarlalarında verimi arttırmak amacıyla kullanılan; Pomarsol Forte 80 WP (%80 Thiram) fungisiti, Arrivo 25 EC (250g/L Cypermethrin) insektisiti ve The end EC (50g/L Quizalofop-p-ethyl) herbisiti ticari olarak temin edildi.

Ellişer adetlik gruplar halinde seçilen tohumlar önce %96'lık etil alkol çözeltisinde 1 dakika, daha sonra %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 20-25 dakika bekletilerek yüzeysel sterilizasyon yöntemi (Ellis ve diğ., 1988) ile üzerlerine yapışmış bakteri ve mantarlardan temizlendi ve distile su ile yıkandı. 20x14x6 cm boyutlarında petri kaplarına alındı.

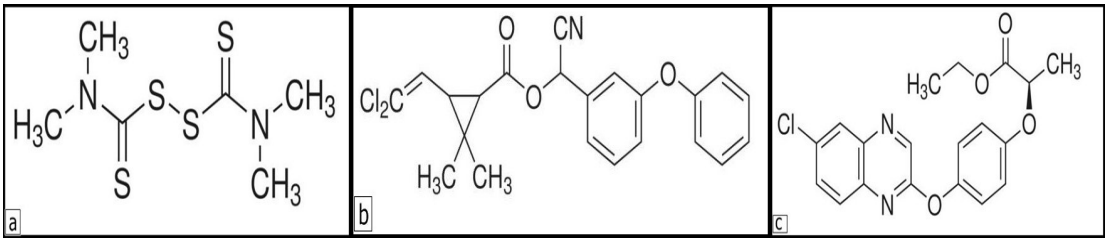
Her pestisit için saptanan kök uzunluğunu yarıya indiren değer (EC50) ve bu değerin iki katı (EC50x2) olmak üzere iki farklı konsantrasyon ve kontrol grubu için distile su kullanılarak deneylere başlandı. Soya tohumları her pesitisit için hesaplanan ortalama EC50 değerleri dikkate alınarak distile su ile hazırlanmış 0,08 M (EC50) ve 0,16 M (2xEC50) Pomarsol Forte 80 WP, 9,6 M (EC50) ve 19,2 M (2xEC50) Arrivo 25 EC ve 0,8 M (EC50) ve 1,6 M (2xEC50) The end EC pestisitlerinin solüsyonlarıyla muamele edildi. Tohumlar; 20x14x6 cm boyutlarındaki kurutma kağıdı içeren ve her pestisit dozundan 10'ar ml eklenmiş petri kaplarında çimlendirildi. Her doz için 50 tohum çimlendirildi. Kontrol grubu olarak distile su ile 50 tohum çimlendirildi (Tekin ve Bozcuk, 1998). Petri kaplarında tohum çimlenmesi başladıktan 3 gün sonra çimlenmiş tohumlar plastik saksılara ekildi. Her saksıya 10 adet fide ekildi. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.2. Kullanılan Pestisitler ve Etken Maddeleri

Çalışmamızda kullanılan pestisitler ve özellikleri Tablo 2.1'de ve yapısal formülleri Şekil 2.1'de gösterildi.

Tablo 2.1. Kullanılan pestisitler ve özellikleri

Ticari Adı	Türü	Etken Madde	Formül	Moleküler Ağırlığı (g/mol)
Pomarsol Forte 80 WP	Fungisit	Thiram	$(CH_3)N_2CSS_2CSN(CH_3)_2$	240,43
Arrivo 25 EC	İnsektisit	Cypermethrin	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	416,3
The End EC	Herbisit	Quizalofop-p-ethyl	$H_{19}Cl_{17}N_2O_4$	372,80



Şekil 2.1. Kullanılan pestisitlerin etken maddelerinin yapısal formülleri a) Thiram, b) Cypermethrin ve c) Quizalofop-p-ethyl

Fungisit olarak Pomarsol Forte 80 WP (%80 Thiram, Bayer) kullanıldı. Etken maddesi olan Thiram etki yeri özelleşmemiş bir fungisittir ve dithiocarbamate grubunun dimethyldithiocarbamate allt grubuna dahildir. Pomarsol Forte 80 WP ülkemizde ruhsatlıdır. Toprak üstü ilaçlaması olarak soyada sap çürüklüğü *(Fusarium spp., Macrophomina phaseoli., Rhizoctonia spp., Stemphylium spp.)* hastalığını önlemede kullanılmaktadır. Sinonimleri; Bis(dimethylthiocarbamoyl) disulfide, Bis(dimethylthiocarbamyl) disulfide, Tetramethylthiuram disulfide ve Thiram'dır.

İnsektisit olarak Arrivo 25 EC (250g/L Cypermethrin, Hektaş) kullanıldı. Etken maddesi olan cypermethrin sentetik piretroitlerdendir. Sentetik piretroitler kontakt ve mide zehiri etkilidirler. İnsektisit etkileri yüksek, sıcakkanlılara etkileri ise düşüktür. 1973 yılında ışığa dayanıklı sentetik piretroitler sentezlenmiştir. 1975 yılından sonra böceklere karşı hızla kullanılmaya başlanmıştır. Arrivo 25 EC'nin etken maddesi sarımsı kahverengi renkte ve sıvı haldedir. Kontakt ve mide zehiri etkilidir. Kontakt etkisi ani olup yeterli kalıcı etkiye sahiptir. Yurdumuzda üretilen etkili maddelerdendir ve ruhsatlıdır. Soyada görülen zaralılardan tohum böceklerine karşı kullanılmaktadır. Sinonimleri; (R,S)-a-Cyano-(3-phenoxyphenyl)methyl3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate ve Alphamethrine'dir.

Herbisit olarak The end EC (50g/L Quizalofop-p-ethyl, Agrogeneral) kullanıldı. Etken maddesi olan Quizalofop-p-ethyl aryloxyphenoxypropionic herbisit grubuna dahildir. Soya tarlalarında darıcan (*Echinocloa crus galli*), kanyaş (*Sorghum halepense*), köpek dişi ayrığı (*Cynodon dactylon*), karadarı, tilki kuyruğu, yabani kuş yemi ile mücadelede kullanılır. Sinonimleri; DPX-Y6202, Ethyl (R)-2-[4-(6-chloro-2 quinoxalyloxy) phenoxy] propionate ve Quinofop-ethyl'dir.

2.3. Pestisitler İçin EC50 Değerlerinin Belirlenmesi

Sterilize edilmiş soya tohumları 24 saat süre boyunca distile su ve farklı pestisit konsantrasyonu ile muamele edilerek kök gelişimi sağlandı. 20 adet çimlenmiş tohum daha sonra distile su ve tarla konsantrasyonları temel alınarak hazırlanan 10 farklı Pomarsol Forte 80 WP (0,00125, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16 ve 0,32 M), Arrivo 25 EC (0,075, 0,15, 0,3, 0,6, 1,2, 2,4, 4,8, 9,6, 19,2 ve 38,4 M) ve The end EC (0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 ve 6,4 M) etken maddeli pestisit konsantrasyonlarıyla 20x14x6 cm boyutlarındaki petri kaplarında kurutma kağıtları arasında 3 gün boyunca muamele edilerek çimlendirildi. Önerilen tarla konsantrasyonları Pomarsol Forte 80 WP için 0,01 M, Arrivo 25 EC için 0,6 M ve The end EC için 0,1 M'dır. Pestisit solüsyonlarını hazırlamak için, farklı pestisitlerin stok solüsyonları distile su ile ve test konsantrasyonları hazırlanan bu stok solüsyonlardan seyreltilerek hazırlandı. Kontrol ve farklı pestisit uygulama guruplarındaki kök uzunlukları 3. gün sonunda ölçüldü ve kök uzunlukları hesaplandı (%T/C). Her pestisit için kök uzunluğunu yarıya indiren değerler (EC50) belirlendi. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.4. Fotosentetik pigment analizi

15 gün boyunca saksıda yetiştirilerek en az 4-5 yapraklı hale gelen bitkilerin yapraklarına 3 gün boyunca püskürtme yöntemiyle farklı pestisitlerin farklı dozları uygulandıktan sonra alınan yaprak örnekleri çeşme suyunda yıkandı. Yapraklar kurulandıktan sonra hassas terazide 100 mg yaprak tartıldı ve 10 ml % 80'lik aseton ilave edilerek havanda ezilerek iyice parçalandı. Elde edilen ekstraksiyon % 80'lik aseton ile yıkanıp 20 ml'lik santrifüj tüplerine filtre kağıdı yardımıyla süzüldü. Buradan alınan örnekler 3000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi. Ham klorofil ekstraktlarının absorbsiyon değerleri (Abs), 470, 645 ve 663 nm dalga boylarına ayarlanan spektofotometrede ölçüldü. Elde edilen değerler Denklem (2.1), Denklem (2.2), Denklem (2.3) ve Denklem (2.4)'e göre;

Klorofil a (mg/g yaprak) = [(12.7xAbs663)-(2.6xAbs645)]xml Aseton/mg yaprak dokusu (2.1)

Klorofil b (mg/g yaprak) = [(22.9xAbs645)-(4.68xAbs663)]xml Aseton/mg yaprak dokusu (2.2)

Karotenoid (µg/ml) =(1000Abs470-3.27x[klorofil a]-104[klorofil b]/227 (2.3)

Toplam klorofil= klorofil a + klorofil b (2.4)

hesaplandı (Bradford, 1976). Yaprak dokusunun 1 gramındaki klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid miktarları bulundu (Arnon, 1949). Tüm deneyler üç tekrarlamalı olarak gerçekleştirildi.

2.5. Sitolojik incelemeler

Pestisit uygulaması sonrasında gelişen kök uçları Carnoy fiksatifinde (3 alkol: 1 glasial asetik asit) fikse edildi ve % 70 alkol çözeltisinde inceleme yapılana kadar saklandı. Mitoz bölünmenin incelenmesi amacıyla %2'lik aseto-orsein ile ezme preparasyon yapıldı. Materyaller 1 N HCl ile 60°C'de 10 dakika etüvde bekletilerek hidroliz edildikten sonra aseto-orsein ile boyandı. Hazırlanan ezme preparatların her birinden en az 2500'er hücre sayılarak, mitotik indeks hesaplandı. Mitoz bölünmenin değişik safhalarındaki hücreler incelenerek; kromozomlardaki anormallik çeşitleri (mikronukleus, kalgın kromozom, kromozom köprüleri, c-mitoz, polarite, v.b.) ve frekansları araştırıldı. Hazırlanan preperatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi ve fotoğraf makinesi ataçmanlı araştırma mikroskobunda fotoğrafları çekildi (İnce, 1989). Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.6. Moleküler İncelemeler

2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu ve Miktar ve Saflık Tayini

Pestisit uygulaması sonrasında gelişen kök uçlarından alınıp DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bu yöntemde ilk önce 100 mg kök ucu örneği havan kullanarak sıvı azot içinde parçalandı ve üzerine 400 µl Tampon AP1 ve 4 µl RNase A eklendi ve 65 ºC'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. Bu karışıma 130 µl Tampon AP2 eklenip karıştırılarak 5 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. 14,000 rpm (>20,000 xg)'de 5 dakika boyunca santrifüj sonrası üst sıvı mor santrifüj tüpüne (QIA Shredder Mini Spin Column) pipetlendi ve 14,000

rpm (>20,000 xg)'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen sıvı yeni 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 1,5 katı Tampon AP3/E pipetlenerek karıştırıldı. Karışım beyaz santrifüj tüpüne (DNeasy Mini Spin Column) transfer edilerek 8,000 rpm (>6,000 xg)'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre yeni toplama tüpüne geçirilip üzerine 500 µl Tampon AW eklendi ve 8,000 rpm (>6,000 xg)'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı atılarak filtrenin üzerine tekrar 500 µl Tampon AW eklendi ve 14,000 rpm (>20,000 xg)'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Filtrat 1,5 ml'lik yeni santrifüj tüpüne geçirildi ve filtrenin üzerine 100 µl Buffer AE eklenip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 8,000 rpm (>6,000 xg)'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu aşamada filtreden DNA ayrıldı ve genomik DNA (gDNA) elde edildi. İzole edilen gDNA'lar, kullanılacağı zamana kadar -20°C'de saklandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. DNA izolasyonunda izlenen aşamalar

İzole edilen gDNA'ların gözlemlenmesi için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jel hazırlanırken; 0,5 g agaroz tartıldı ve 50 ml 0,5X Tris-Borat-Etilendiamintetraasetikasit tamponu (TBE, Sigma) içinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Karışım 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 3 µl Etidyum Bromid ilave edildi. Önceden tarak yerleştirilen kasete jel döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra kasetten tarak dikkatlice çıkarıldı. Hazırlanan jel, yatay elektroforez tankına yerleştirildi ve üzeri kapanıncaya kadar 1xTBE tamponu ile 4 µl dH_2O, 1 µl örnek gDNA ve 1 µl yükleme boyası karıştırılarak jelde oluşturulan kuyulara mikro pipet yardımı ile yüklendi. İlk kuyucuğa DNA standardı (Fermantas) yüklendi. Örnekler 90 voltta yaklaşık 2 saat yürütüldü. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV jel görüntüleme cihazı (UVP-GelDoc-it, imaging system) yardımıyla gözlendi ve fotoğrafları çekildi. İzole edilen gDNA'ların UV spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm işlemi kuvarts küvetlerle yapıldı. Spektrometrik sonuçlara göre DNA molekülünün miktar ve saflık tayini hesaplandı (URL-3).

2.6.2. RAPD ve Verilerinin Değerlendirilmesi

Williams ve arkadaşları (1990) tarafından geliştirilen RAPD tekniği koşullara göre değiştirilerek optimize edildi. Uygulamalarda her zaman aynı termal döngü cihazı kullanıldı. Sadece çoğaltım sıcaklık ve süreleri kullanılan primerlerin baz içeriğine bağlı olarak her PZR için ayrı ayrı optimize edildi (Tablo 2.2). Çalışmada kullanılacak primerler soya bitkisi ile yapılan diğer RAPD çalışmalarında en çok kullanılan ve sonuç alınan primerler arasından belirlendi ve Thermo Scientific firmasına sentezlettirildi.

Elde ettiğimiz gDNA ile Sigma PZR kiti kullanılarak RAPD tekniği gerçekleştirildi. Bitkiden izole edilen saf gDNA kullanılarak yapılan RAPD koşulları toplam hacim 25 µl olacak şekilde Tablo 2.3'teki ve RAPD reaksiyon döngü koşulları Tablo 2.4'teki gibi düzenlendi.

Reaksiyon için 20 primer kullanıldı ve reaksiyon her primer için ayrı ayrı ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çoğaltım termal döngü cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyonda kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için gDNA içermeyen bir negatif kontrol kullanıldı. Çoğaltım sonrasında reaksiyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde 1X TBE tamponu kullanılarak 90 voltta 1 saat 20 dakika yürütüldü. İlk kuyucuğa

DNA standardı (Fermantas) yüklendi. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV jel görüntüleme cihazı yardımıyla görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan AD serisi RAPD primerlerinin dizileri ve T_m değerleri

Primer Sayısı	Primer	Sekans 5'--3'	Tm (°C)	GC Oranı %
1	AD1	GTTGCGATCC	32	60
2	AD2	GTGCCTAACC	32	60
3	AD3	ACGCGCATGT	32	60
4	AD4	GACGCCACAC	34	70
5	AD5	CCAGCTTAGG	32	60
6	AD6	CCCGCTACAC	34	70
7	AD7	GAGCGTCGAA	32	60
8	AD8	TGCGAGAGTC	32	60
9	AD9	CAGCCCAGAG	34	70
10	AD10	TCGCCGCAAA	32	60
11	AD11	GGCACGTAAG	32	60
12	AD12	CCCAGTCACT	32	60
13	AD13	TCGGCGGTTC	34	70
14	AD14	CCATTCCCCA	32	60
15	AD15	ACAGGTGCGT	32	60
16	AD16	GGACGACAAG	32	60
17	AD17	CAGAGGTCCC	34	70
18	AD18	TCCGATGCTG	32	60
19	AD19	GTCGTTCCTG	32	60
20	AD20	AAAGGGGTCC	32	60

Tablo 2.3. RAPD-PZR tekniğinde kullanılan bileşenler

RAPD-PCR Bileşenleri	Miktar	Konsantrasyon
Distile su	9 µl	-
PCR Tamponu (dNTP ile birlikte)	12.5 µl	1X
MgCl2	1 µl	25 mM
Primer	1 µl	0.3 µM
DNA Polimeraz	0.5 µl	1 U
gDNA	1 µl	20 ng
Toplam	25 µl	-

Tablo 2.4 Optimize edilen RAPD-PZR döngüsü

RAPD-PCR Aşaması	Sıcaklık ºC	Süre	Döngüler
Ön Denatürasyon	98	1 dakika	1
Denatürasyon	98	30 saniye	40
Bağlanma	34	20 saniye	
Uzama	72	30 saniye	
Son Uzama	72	30 saniye	1
Saklama	+4	-	-

Jel fotoğrafları üzerinden görüntülenen PZR ürünlerine ait bantların okunmasında sadece net görünen bantlar değerlendirmeye alındı. RAPD profilinde gözlenen polimorfizm; kontrol RAPD profiliyle karşılaştırıldığında yeni bir bandın varlığı ya da normal bandın yokluğu şeklinde değerlendirildi (Ouzounidou, 1997). Genomik kalıp stabilitesi (GKS) değerlendirilmesi ise Denklem (2.5)'e[1] göre;

$$\%GKS = (1- a/n) \times 100 \quad (2.5)$$

hesaplandı.

2.7. Biyokimyasal İncelemeler

2.7.1. Protein izolasyonu, miktar tayini ve standart eğrinin hazırlanması

Toplam protein izolasyonu için 72 saat pestisit muamele edilmiş soya tohumları kullanıldı. 0,8 gram soya tohumu sıvı azot yardımıyla toz haline getirildi. Örnek üzerine 500 µl toplam protein izolasyon tamponu (Tablo 2.8) eklenerek homojenize edildi. Homojenize edilmiş örnek 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Tüpler 15 dakika 70°C'de bekletildikten sonra maksimum hızda 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve elde edilen bu protein örnekleri -20°C'de saklandı.

Tohumdan izole edilen toplam protein konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla Bradford (Boya- Bağlama veya Coomasie brillant blue) yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Bu yöntemde Coomassie brillant blue G-250 boyasının, farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde 595 nm'de mavi renk ortaya koyması esasından yararlanıldı. Hazırlanan protein standart çözeltilerinin son konsantrasyonu Tablo 2.5'te gösterildi.

Tablo 2.5. Protein standart çözelti konsantrasyonları

Küvet No	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA son konsantrasyonu (µg/ml)	0	20	80	140	200	280	340	400

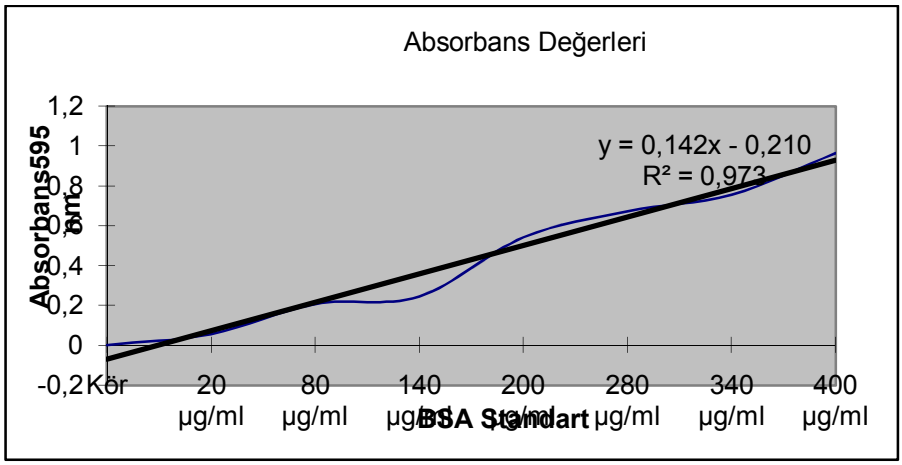
Kör çözelti tek kullanımlık protein küvetinde, küvete 3 ml fosfat tuzlu tampon (Phosphate Buffer Saline, PBS) (Sigma) konularak hazırlandı. Hazırlanan kör 595 nm'de spektrofotometrede okutuldu ve elde edilen absorbans değeri tüm örneklerin

[1] a: Her uygulama örneğinde belirlenen polimorfik RAPD profilidir, n: Kontroldeki toplam bant sayısıdır.

absorbans değerlerinden çıkarıldı. Her küvete 3 ml Bradford çözeltisi ve 50 µl BSA örneği koyulduktan ve karıştırıldıktan sonra 5 dakika süreyle beklendi. 5 dakikanın sonunda birinci küvetten başlanarak tüm küvetler 595 nm'de köre karşı okutuldu. Deney sonucunda tüm küvetlerdeki protein miktarlarının absorbans değerleri Tablo 2.6 'da ve standart eğri grafiği Şekil 2.3'te gösterildi.

Tablo 2.6. Protein konsantrasyon ve absorbans değerleri

Standart Protein Konsantrasyonları	Kör	20 µg/ml	80 µg/ml	140 µg/ml	200 µg/ml	280 µg/ml	340 µg/ml	400 µg/ml
Absorbans Değerleri	0	0,055	0,207	0,245	0,542	0,674	0,757	0,966



Şekil 2.3. Protein standart eğri grafiği

Analizler için tohumdan izole edilen protein örnekleri -20°C'den alındıktan sonra buz üzerine konuldu. Uygulama grupları ve kontrol grubu için ayrı olarak kullanılan kuvartz küvete 1:10 oranında sulandırılmış 5 µl protein örneği ve 3 ml Bradford çözeltisi eklendi. Hazırlanan örnekler 5 dakika bekletildikten sonra 595 nm'de ölçüm yapıldı. Deney sonunda elde edilen standart eğriye bağlı olarak toplam çözünür protein miktarı belirlendi. Tüm deneyler üç tekrarlamalı olarak gerçekleştirildi.

2.7.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

SDS-PAGE için ayırma ve yükleme jelleri olarak iki farklı jel kullanıldı. Poliakrilamid jel düzgün bir yüzey oluşması amacıyla iki elektroforez camının arasına döküldü. Jel iki cam arasına dökülmeden önce camlar iyice temizlendi. Bu amaçla, camlar yıkandıktan sonra etanol ile silindi. Jeli hazırlama aşamasında, TEMED (N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine) ve APS (Amonyum Persülfat) hariç diğer bütün

maddeler bir behere alındı. Jel karışımına en son APS ve TEMED eklenerek beklemeden hızlı bir şekilde karışım iki cam arasına döküldü. Dökme işleminden sonra jelde örneklerin yüklenebileceği boşluklar oluşturmak amacıyla tarak yerleştirildi. Jel dökülürken hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Jelin polimerleşmesi için bir saat beklendi. Jel polimerleştikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve iki cam arasındaki jel elektroforez tankına yerleştirildi. Kuyucuklar içinde kalan jel artıkları yürütme tamponu ile temizlendi. Analiz için yapraktan izole edilen protein örnekleri -20°C'den alındıktan sonra buz üzerine konularak steril deiyonize su ile 1:10 oranında sulandırıldı. Spektrofotometrik sonuçlar kullanılarak sulandırılmış örneklerden her bir kuyucukta 10 µg protein olacak şekilde hesaplama yapıldı. Bu sonuçlara göre 1,5 ml'lik santrifüj tüpündeki örnekler alınarak, üzerlerine protein miktarının üç katı oranında örnek yükleme tamponu eklenerek son hacim steril deiyonize su ile 30 µl'ye tamamlandı. Santrifüj tüpleri içerdikleri proteine göre etiketlenerek, 100°C'deki ısıtıcı blok içinde 5 dakika süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda protein örnekleri yükleme jelindeki kuyucuklara yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra tankın kapağı kapatılarak sistem güç kaynağına bağlandı. Jelin yürümesi için güç kaynağı 90 V ve 120 dakika olarak ayarlandı. Yürüme işlemi sonlandırıldıktan sonra jel, cam plaklar arasından çıkarılarak kapaklı plastik bir kaba alındı ve boyama işlemine geçildi. Jelin üzerine tamamen kaplayacak şekilde boyama çözeltisi dökülerek, bu şekilde bir gece boyunca 20 devir/dakika hızında çalkalama cihazında çalkalanarak boyandı. Gece boyunca boyanan jeldeki boyama çözeltisi dökülerek jel 1 saat boyunca yıkama çözeltisinde çalkalandı. Daha sonra jeldeki boya uzaklaşıncaya kadar sık aralıklarla yıkama çözeltisi yenilenip bantların belirgin hale gelmesi sağlandı. Yıkama işlemi sona erdikten sonra jel üzerindeki bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanması için jelin jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekildi. Daha sonra bu jel %7 asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

2.8. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Çözeltiler

Deneylerde kullanılan cihazların marka ve modelleri Tablo 2.7'de verildi. Protein izolasyonu deneyinde kullanılan çözeltinin içeriği Tablo 2.8'de gösterildi. SDS-PAGE deneyinde kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanışı Tablo 2.9'da gösterildi.

Tablo 2.7. Deneylerde kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Marka ve Modeli
-86°C Ultra Derin Dondurucu	Hettich Freezer
Buzdolabı	Arçelik,5243 NEB No-Frost
Saf Su Cihazı	Milipore,Direct-Q UV
Hassas Terazi	Radwag, PS 510/C/1
Vorteks	IKA, GENIUS3
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Yatay Elektroforez	Cleaver, MSMINI10
Dikey Elektroforez	Cleaver, CVS10CBS
Elektroforez Güç Kaynağı	Cleaver, CS-300
Isıtıcılı Blok	Variomag powertherm
Thermal Cycler	Techne, TC-3000
UV Transilüminatör	UVP-GelDoc-it, imaging system
UV Visible Spektrofotometre	Shimadzu UV mini-1240
Ultra Santrifüj	22R centrifuge BECKMAN COULTER
Mini Santrifüj	Sigma, 1-14
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, MR-HeiStandart
Sıvı azot tankı	MVE
pH-metre	Ohaus, Starter 3000
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Çalkalayıcı	Heidolph, Titramax

Tablo 2.8. Toplam protein izolasyon tamponunun içeriği

Toplam Protein İzolasyon Tamponu (10 ml)	56 mM Na_2CO_3, 56 mM 2- merkaptoethanol, 2mM EDTA, %12 Sucrose,% 2 SDS

Tablo 2.9. SDS-PAGE için kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı

Çözelti	İçerik ve hazırlanışı
1.5 M Tris Tamponu (pH 8.8) (100 ml)	18,16 g tris base 100 ml'ye deiyonize su ile tamamlandı. Filtre kağıdı ile filtre edildi. Otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.
1 M Tris Tamponu (pH 6.8) (100 ml)	12,11 g tris base 100 ml'ye deiyonize su ile tamamlandı. Filtre kağıdı ile filtre edildi. Otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.
%10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)(50 ml)	5 g SDS deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.
%10 APS (Amonyumpersülfat) (1 ml)	0,1 g APS deiyonize su ile 1 ml'ye tamamlandı. Kullanımdan hemen önce hazırlandı.
%15 Ayırma jeli (10 ml)	2,3 ml distile su, 5 ml Akrilamid/ Bis akrilamid (%30), 2,5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 APS, 4 µl TEMED
% 5 Yükleme jeli (5 ml)	3,4 ml distile su, 830 µl Akrilamid/Bis akrilamid (%30), 630 µl 1 M Tris (pH 6.8), 50 µl %10 SDS, 50 µl %10 APS, 5 µl TEMED
5 X Koşturma tamponu (pH 8.3) (250 ml)	3,75 g tris base, 18 g glisin, 5 g SDS deiyonize su ile 250 ml'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.
Boyama çözeltisi (1 L)	1 g Coomassie Brillant Blue, 500 ml metanol, 100 ml glasial asetik asit deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Filtre kağıdıyla süzüldü. Karanlıkta oda sıcaklığında saklandı.
Yıkama çözeltisi (2,5 L)	125 ml Metanol, 175 ml Glasial asetik asit deiyonize su ile 2500 ml'ye tamamlandı. Karanlıkta oda sıcaklığında saklandı.

2.9. İstatistiksel Analizler

Çimlenme yüzdelerinin değerlendirilmesinde, ortalama EC değerinin saptanmasında, klorofil ve karotenoid miktarlarının belirlenmesinde ve mitotik indeks belirlenmesinde gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ONE-WAY ANOVA) ve TUKEY HSD testi kullanılarak karşılaştırıldı ($P<0.05$). RAPD uygulaması sonucunda elde edilen tüm verilerin analizi POPGENE Version 3.2 ve Vision WorksLS Version 6.8 programları kullanılarak değerlendirildi. SDS-PAGE analizi ile elde edilen protein bant profilleri Vision WorksLS Version 6.8 programı, ONE-WAY ANOVA ve TUKEY HSD testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel analizler SPSS 16.0 paket programı ile yapılmıştır (SPSS Inc, Chicago, USA).

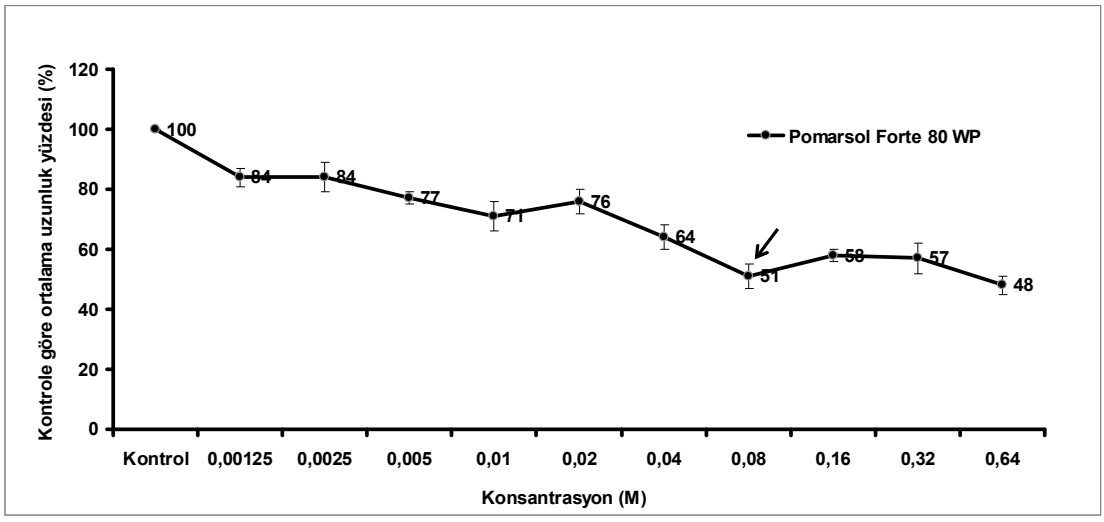
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Fizyolojik Bulgular

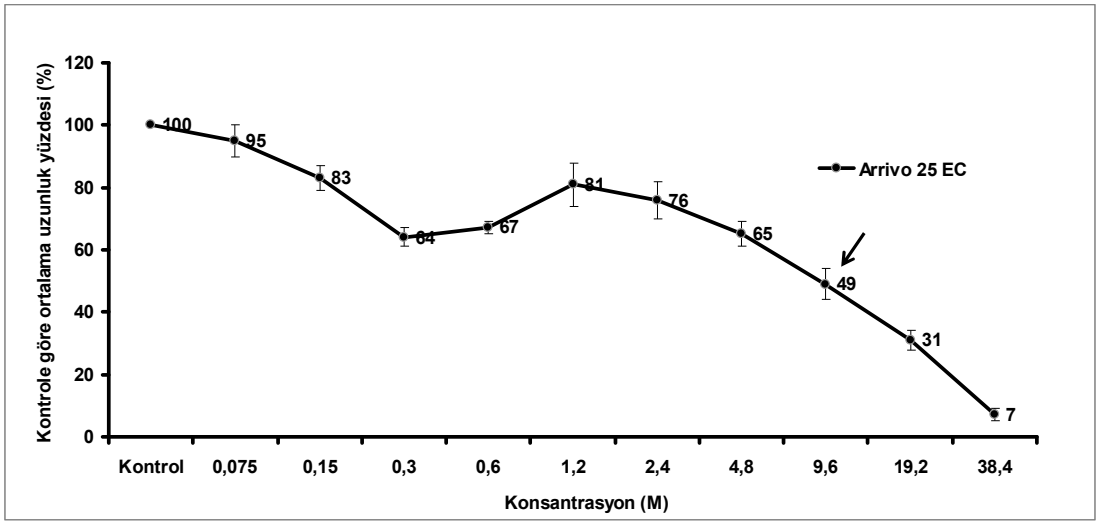
3.1.1. Pestisitler İçin Belirlenen EC50 Değerleri

EC50 büyümeyi %50 engelleyen etkili konsantrasyonu belirtmektedir. Farklı pestisitlerin farklı konsantrasyonlarının soyada kök uzunluğunu yarıya indiren değer olan EC50 değerleri saptandı. Kullanılacak pestisit konsantrasyonları bu değerler temel alınarak belirlendi. Ticari olarak alınan pestisitler seyreltilerek kullanıldı. Seyreltme işlemi, Çevre Koruma Örgütü (EPA) tarafından önerildiği gibi en az 6 farklı ve birbirlerinin katları olan konsantrasyonlar hazırlanarak yapıldı. Seçilen konsantrasyonlarda hiç çimlenme gözlenmeyenler veri olarak değerlendirilmedi.

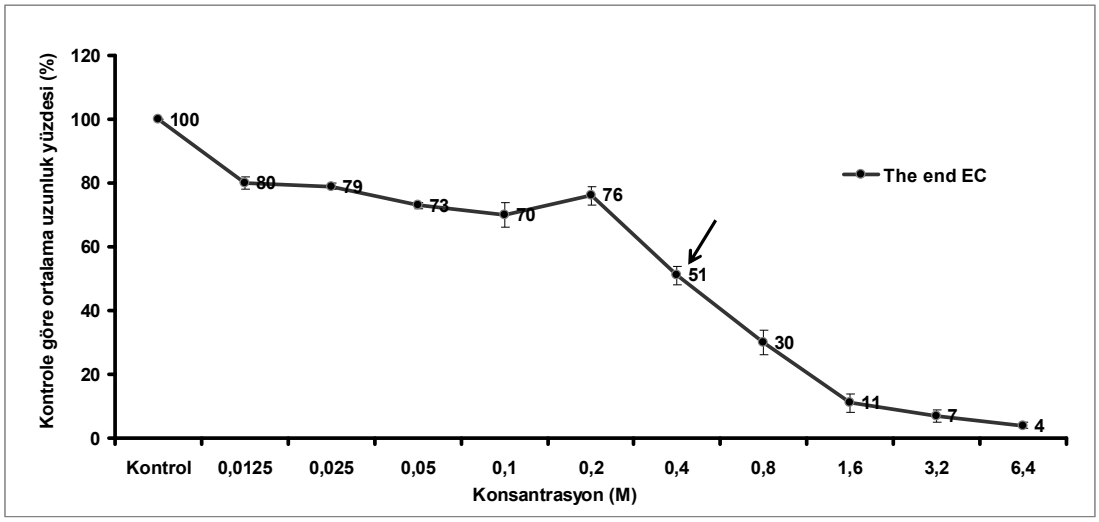
Ortalama EC50 değerleri Pomarsol Forte 80 WP için 0,08 M (Şekil 3.1), Arrivo 25 EC için 9,6 M (Şekil 3.2) ve The End EC için 0,4 M (Şekil 3.3) olarak hesaplandı. Buradan yola çıkılarak tüm deneysel prosedürde Pomarsol Forte 80 WP fungisiti için 0,08 M (EC50) ve 0,16 M (2xEC50), Arrivo 25 EC insektisiti için 9,6 M (EC50) ve 19,2 M (2xEC50) ve The End EC herbisiti için 0,4 M(EC50) ve 0,8 M (2xEC50) konsantrasyonları kullanıldı.



Şekil 3.1. Pomarsol Forte 80 WP için belirlenen EC50 değeri



Şekil 3.2. Arrivo 25 EC için belirlenen EC50 değeri



Şekil 3.3. The End EC için belirlenen EC50 değeri

3.1.2. Çimlenme yüzdesi değerleri

Çalışmamızda soya bitkisine farklı pestisitlerin farklı konsantrasyonları ile muamele sonrası, kontrol grubunda 72 saat sonunda %90 olan çimlenme yüzdesini konsantrasyon artışına paralel olarak Pomarsol Forte 80 WP sırasıyla %80 ve %72'ye, The End EC muamelesi %82 ve %70'e 25 Arrivo EC'nin 19,2 M konsantrasyonunun çimlenme yüzdesini %80'e düşürdüğü düşürdüğü gözlendi. 9,6 M Arrivo EC muamelesi sonrası kontrol grubuna göre çimlenme yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (F=6,218, sd=0,525, P=0,05), (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Farklı pestisitlerin belirlenen konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrası tohum çimlenme yüzdesindeki değişim

	Tohum çimlenme yüzdesi (%)		
Konsantrasyon	24 saat	48 saat	72 saat
K	78,16 ± 0,4	90,34 ± 0,4	90,91 ± 0,3
PX	48,56 ± 0,3*	80,59 ± 0,2	80,34 ± 0,3*
P2X	38,34 ± 0,4	72,01 ± 0,3*	72,88 ± 0,2
AX	76,75 ± 0,4	90,29 ± 0,4	90,73 ± 0,1*
A2X	42,69 ± 0,2*	80,64 ± 0,1	80,22 ± 0,3
TX	30,45 ± 0,5	82,91 ± 0,3*	82,85 ± 0,1
T2X	24.92 ± 0.6*	70.48 ± 0.4	70.71 ± 0.2*

* K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC, T2X: 0,8 M The End EC, ±: standart sapma ve *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Dünyada büyük ölçüde kullanılan pestisitlerin bitkiler üzerinde oluşturabileceği etkiler, değişik araştırıcılar tarafından incelenmiştir (Crafts ve Yamaguchi, 1960; Cireli, 1973; Brezeanu ve diğ., 1976; Grover ve Tyagi, 1979; Güven ve Yürekli, 1989; Aktaç ve diğ., 1994; Fayez ve diğ., 1994; Flaburiari ve Kristen, 1996; El-Nahas, 2000). Toprak ekilmiş tohum ve herbisit arasında bir bariyer oluşturduğundan, herbisitlerin tohumlara etkisi birçok çalışmada direk olarak tohumların pestisitlerle muamele edilmesi sonucu incelenmiştir (Tomkins ve Grant, 1972; El-Khodary ve diğ., 1990; Barakat ve Hassan, 1998). Tohum çimlenmesi ve mitoz bölünmeden birindeki bozukluk kök büyümesi ve gelişimi için ciddi sonuçlara sebep olabilir. Bu durum *Pisum sativum* ve *Zea mays*'ın kökleri için kök büyümesinde ciddi yaralanmalara sebep olan sulfonylurea herbisitleri Chlorsulfuron ve Metsulfuron'ın farklı konsantrasyonlarıyla açıkça gösterilmiştir (Fayez ve Kristen, 1996). Ruiz-Santaella ve arkadaşları (2003) fenoksi asetik asit ailesinden Cyhalofop-butyl herbisitinin *Echinochloa muricata*'da tohum çimlenmesini %50 azalttığını bulmuştur. Sasaki ve arkadaşları (1968) 2,4–dicloro-phenoxy asetik asit (2,4-D) herbisitinin *Pinus*'ta kullanımının tohum çimlenme yüzdesini azalttığını rapor etmiştir ve benzer sonuçlar Chopra ve Singh (1978) tarafından aynı 2,4-D herbisiti ile muamele edilmilş *Guizotia*'da bulunmuştur. Aynı zamanda farklı konsantrasyonlarla yapılan çalışmalar tohum çimlenme yüzdesinin konsantrasyon artışına paralel olarak azaldığını göstermiştir. Endosülfan herbisitinin *Lens culinaris*'de (1994), Benomyl fungisitinin *Allium cepa*'da (2005) artan konsantrasyonlarda kullanımı tohum çimlenmesini azaltmıştır.

3.1.3. Fotosentetik pigment miktarı

Soya yapraklarına uygulanan farklı pestisit dozlarının klorofil miktarını azalttığı gözlendi. Farklı pestisitlerin uygulanan farklı dozlarında klorofil miktarındaki azalma en çok klorofil b'de gözlendi. Klorofil a'nın miktarında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmedi. Toplam klorofil miktarının kontrol'e göre 0,08 M ve 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP uygulamasıyla sırasıyla %9 ve %29, 9,6 M ve 19,2 M Arrivo 25 EC uygulamasıyla %39 ve %51, 0,4 M ve 0,8 M The End EC uygulamasıyla %62 ve %64 azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi (F=7,328, sd=1,825, P=0,05). Karotenoid miktarı kontrol'e göre 0,08 M ve 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP uygulamasıyla sırasıyla %3 ve %21, 9,6 M ve 19,2 M Arrivo 25 EC uygulamasıyla %17 ve %26, 0,4 M ve 0,8 M The End EC uygulamasıyla %35 ve %45 azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi (F=4.689, sd=1,829, P=0,05) (Tablo 3.2). Yapılan bir çalışmada Simazin fungisitinin Hill reaksiyonunu engelleyerek fotosentezi durdurduğu gözlenmiştir (Ashton ve diğ., 1960). *Alopecurus myosuroides* Huds. bitkisinin bir herbisit olan Chlorotoluron'a dirençli ve duyarlı biyotipleriyle yapılan bir çalışmada ise, duyarlı bitkilerin fotosentezlerinin uygulamadan 10 saat sonra engellendiği saptanmıştır (Sharples ve diğ., 1997). *Galium aparine* L. ile yapılan bir çalışmada quinmerac, quinclorac, dicamba, piridin ve piclorom içeren oksin herbisitlerinin *Galium* sp. yapraklarında hücre ölümünün teşvikine yardım eden H_2O_2 üretimini teşvik ettiği gösterilmiştir (Grossman ve diğ., 2001).

Tablo 3.2. Soya yapraklarına uygulanan farklı pestisit dozlarının klorofil içeriğine etkisi

Konsantrasyon	Klorofil a (mg /g)	Klorofil b (mg /g)	Total klorofil (mg /g)	Karotenoid (µg /ml)
K	0,85 ± 0,02	1,11 ± 0,18	1,96 ± 0,15	12,22 ± 0,30
PX	0,86 ± 0,05	1,02 ± 0,26	1,89 ± 0,21	11,86 ± 0,59
P2X	0,85 ± 0,06	0,79 ± 0,05	1,66 ± 0,10	9,74 ± 0,40*
AX	0,85 ± 0,03	0,68 ± 0,03	1,53 ± 0,02*	10,19 ± 0,76
A2X	0,84 ± 0,01	0,55 ± 0,12*	1,49 ± 0,12	9,16 ± 0,25
TX	0,82 ± 0,09	0,43 ± 0,12	1,21 ± 0,03	7,98 ± 0,85
T2X	0,81 ± 0,03	0,40 ± 0,05*	1,20 ± 0,04*	6,78 ± 0,43*

* K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC, T2X: 0,8 M The End EC, ±: standart sapma ve *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Herbisitler ekonomik bitkilerin hücre metabolizmasını özellikle fotosentez mekanizmalarını etkilerler. Yapılan çalışmalarda herbisit muamelelesinin ardından fotosentetik pigmentlerde ve fotosentezle ilişkili proteinlerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (F=7,611, sd=1,746, P=0,05) (Smilanick ve diğ., 1996). Bu bilgilerle tutarlı olarak çalışmamızda da klorofil ve karotenoid miktarını en fazla etkileyen pestisitin The End EC herbisiti olduğu gözlendi. Tablo 3.4'te görüldüğü gibi soya yapak pigmentleri pestisit muamelesinden istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere önemli ölçüde etkilendiği gözlendi. Tablodan da anlaşılacağı gibi, artan pestisit konsantrasyonuyla birlikte yaprakların klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlendi (F=7,639, sd=0.525, P=0.05). Pestisit stresi altında, klorofil b içeriği klorofil a miktarından daha fazla etkilendiği gözlendi. Bütün pestisit konsantrasyonları klorofil ve karotenoid miktarına olumsuz etkide bulunmuştur ancak The End EC herbisiti kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klorofil b miktarına diğer pestisitlerden daha fazla azaltıcı etki göstermiştir. Toplam klorofil a miktarı 0,8 M The End EC uygulamasıyla yaklaşık olarak % 4 azalırken, klorofil b mikarındaki azalma % 63 oranında olmuştur. Karotenoid miktarı pesitisit muamelesi sonucu azalma göstermiştir. 0,8 M The End EC uygulaması karotenoid miktarını kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diğer pesitisitlere göre daha fazla olmak üzere % 47 oranında azalma gözlenmiştir.

Azalan pigment miktarı çok sayıda nedenden kaynaklanabilir (Padmaja ve diğ., 1990; Wu ve diğ., 2003). Çalışmamızda karotenoid miktarı farklı pestisit konsantrasyonları ile muamele sonrası azalmıştır ama azalma oranı klorofil miktarındaki azalma oranından fazla değildir. Karotenoid miktarındaki bu azalma bu pestisitlerin sadece pigment degredasyonunu arttırdıklarını değil biyosentez mekanizmalarını da baskıladıklarını göstermiştir. Karotenoid sentezinden sorumlu çoğu enzim membran bağımlıdır, bu nedenle karotenoid biyosentezindeki azalma bu enzimlerin bu pestisitlerle etkileşime geçmelerinden dolayı olabilir. Membran proteinlerinin ve yağların çeşitli piretroidler tarafından inhibisyonu rapor edilmiştir (Stelzer ve Gordon, 1988; Michelangeli ve diğ., 1990).

3.2. Sitolojik Bulgular

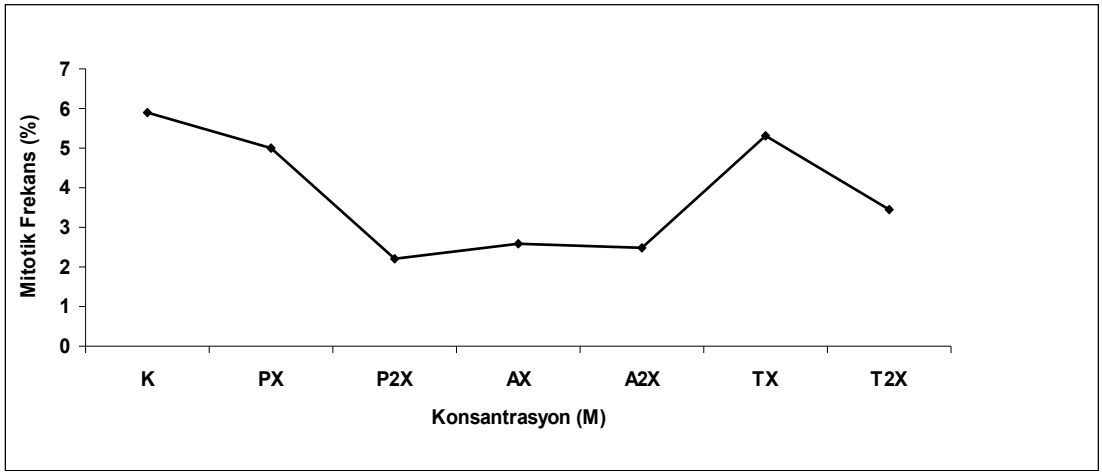
Soyaya farklı pestisitlerin farklı konsantrasyonları ile 72 saat muamele sonrası MI kontrol grubunda %5,90 iken 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP muamelesi ile %5,00'e ve 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP muamelesi ile %2,21'e düştüğü gözlendi. Bu değerle birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere mitotik indeksin kontrole göre

neredeyse %50 bir azalma olduğu gözlendi (F=7,218, sd=1.985, P=0,05) (Tablo 3.3 ve Şekil 3.4). Bu bulgularla tutarlı olarak tohum çimlenmesi gözlemlerimiz boyunca da kök büyümesinin 72 saat sonunda en fazla 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı bulundu (F=5,298, sd=1,925, P=0,05).

Tablo 3.3. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitotik frekans yüzdesi üzerine etkisi

Konsantrasyon	Sayılan toplam hücre sayısı	Bölünen toplam hücre sayısı	Mitotik frekans (%)
K	1500	88	5,90
PX	1500	75	5,00
P2X	1500	33	2,21*
AX	1500	57	2,59
A2X	1500	37	2,50*
TX	1500	80	5,31
T2X	1500	51	3,45

* K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC, T2X: 0,8 M The End EC ve *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.



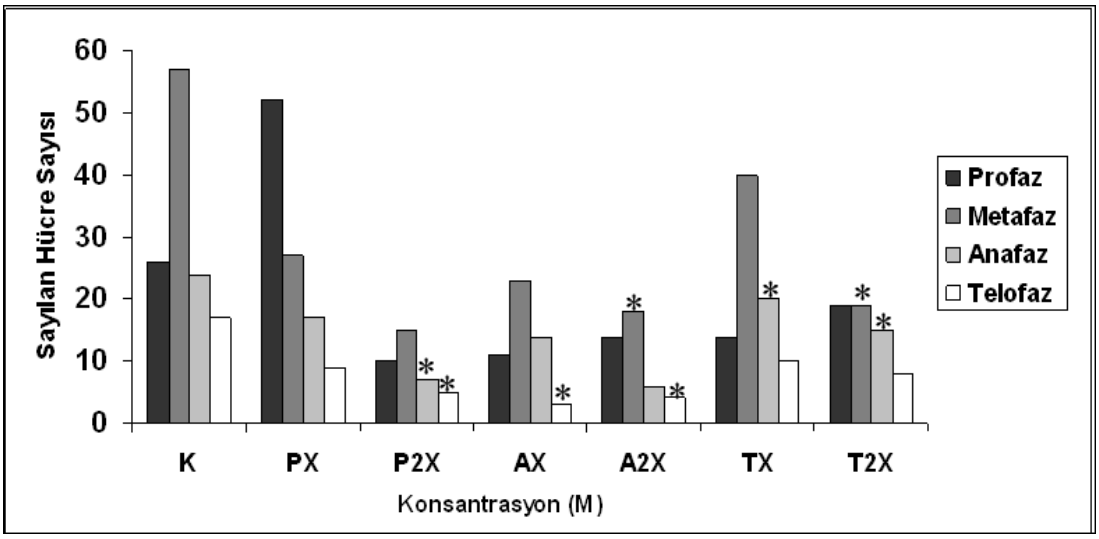
Şekil 3.4. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitotik frekans yüzdesi üzerine etkisi (K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)

Mitotik indeks (MI)'teki azalma, kontrole göre %22'nin altına düşerse letal etki (Antonsie-wiez, 1990), %50'nin altına düşerse subletal etki (Panda ve Sahu, 1985) değeri olarak kabul edilmektedir. Bu değerler, sitotoksik sınır değerleridir (Sharma,1983). Bitkilerde ve hayvanlarda gözlenen kromozom aberasyonları,

kardeş kromatid degişimleri ve mikronükleus oluşumları, kimyasalların DNA ile etkileşime girdiklerini ve hasara neden olduklarını göstermektedir (Saxena ve diğ., 2005). Kromozom aberasyonları ve mikronükleus analizleri genotoksisitenin değerlendirilmesi için son derece güvenilir analizler olarak gösterilmektedir (Rieger ve diğ., 1990; Panda ve Sahu, 2002; Patra ve diğ., 2003; Schneiderman ve diğ., 1971; El-Ghamery ve diğ., 2000; Webster ve Davidson, 1969; MacLeod, 1969; Van't Hoff, 1968; Bruneri, 1971; Badr ve İbrahim, 1987; Chauhan ve diğ., 1998; Soliman, 2001; Patil ve Bhat, 1992).

MI inhibisyonunun; G1 fazının bloke olmasıyla DNA sentezinin baskılanması (Schneiderman ve diğ., 1971; El-Ghamery ve diğ., 2000), S fazının süresindeki artış (Webster ve Davidson, 1969; MacLeod, 1969), hücrenin mitoza girmesini engelleyen G2 fazının bloke olması (El-Ghamery ve diğ., 2000; Van't Hoff, 1968; Bruneri, 1971), çevresel kimyasalların biyolojik sistemin DNA/protein sentezi üzerindeki etkisi (Badr ve İbrahim, 1987; Chauhan ve diğ., 1998), uzamış bir G2 periyodu veya DNA sentezinin baskılanmasıyla mitozun interfazda bloke edilmesi (Soliman, 2001), pestisitin DNA nükleotidleri ile etkileşime geçmesi ve bu nedenle, DNA sentezinin (DNA/nükleoprotein dengesi) inhibe olması (Patil ve Bhat, 1992) gibi nedenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin evrelerine etkisi kontrol grubuyla kıyaslandığında profaz evresi dışında tüm evrelerinde istatistiksel olarak anlamlı belirgin azalmalar olduğu saptandı (F=6,718, sd=1,098, P=0,05). Özellikle 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP ve Arrivo 25 EC'nin her iki konsantrasyonundaki mitoz bölünmenin her evresinde sayılan hücre sayısı kontrole göre belirgin bir azalma gösterdi. 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP muamelesi ile mitoz bölünmenin her evresinde sayılan hücre sayısında çok az azalma gösterdi ve özellikle mitoz bölünmenin profaz safhasında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (F=9,650, sd=1,065, P=0,05) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi (K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)

Mitoz bölünmenin farklı evrelerinde farklı pestisitlerin anormallik yüzdelerini incelemek için her evrede anormal hücreler sayılarak, anormallik yüzdeleri saptandı. Pestisit muamelesi sonrası anormal hücre yüzdesinde artış gözlendi. Anormal hücre yüzdesindeki bu artış bütün pestisit konsantrasyonlarında ve konsantrasyon artışına paralel olarak istatistiksel olarak anlamlı olarak gerçekleşti (F=8,431, sd=0,982, P=0,05) (Tablo 3.4).

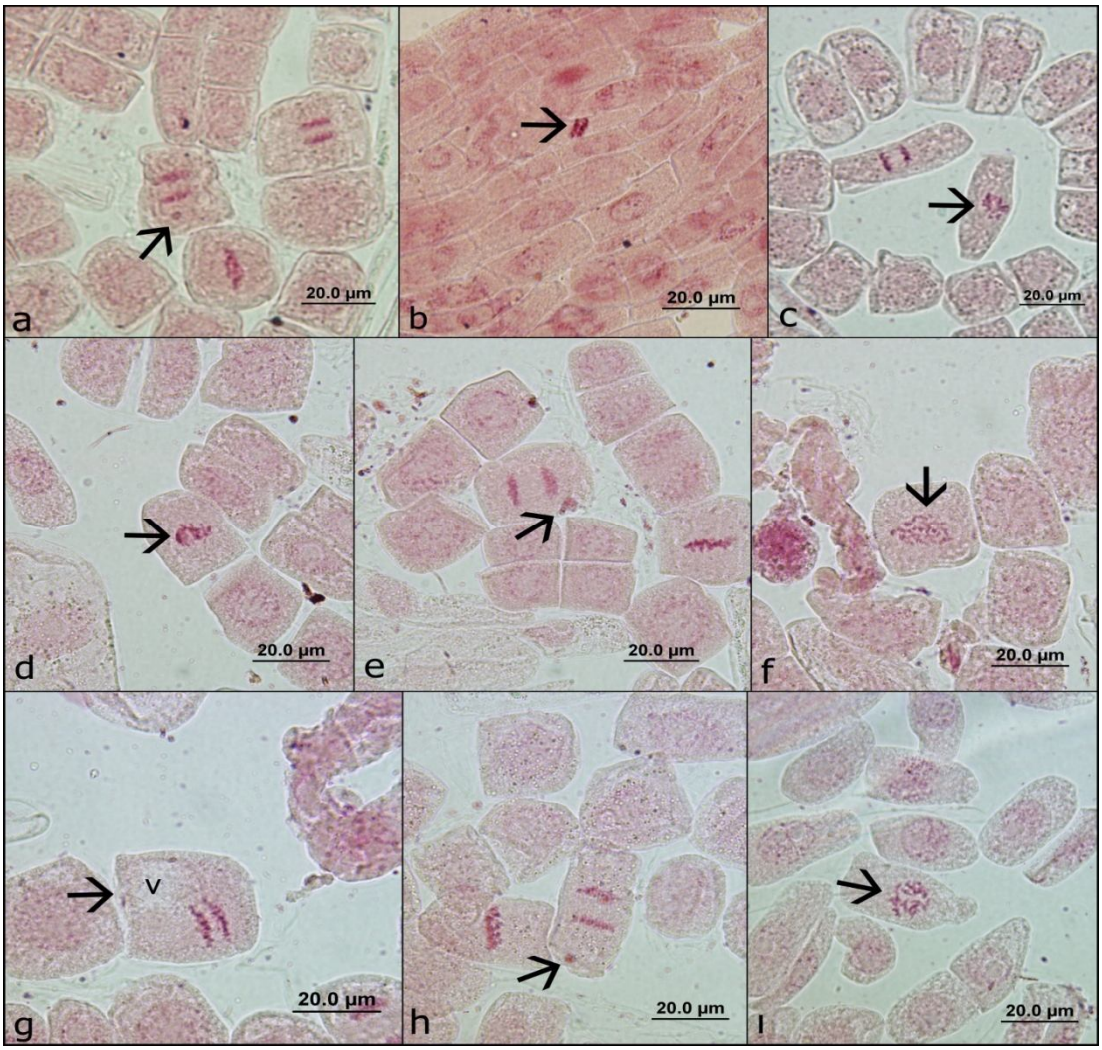
Tablo 3.4. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitotik anormallik yüzdesi üzerine etkisi

Konsantrasyon	Profaz			Metafaz			Anafaz			Telofaz		
	N	A	%	N	A	%	N	A	%	N	A	%
K	26	-	-	57	-	-	24	-	-	17	-	-
PX	35	17	32,69	20	7	25,92	11	6	35,29*	7	2	22,22*
P2X	9	1	10,00	9	6	40,00*	6	1	14,28*	4	1	20,00*
AX	6	5	45,45	17	6	26,08*	12	2	14,28*	3	-	-
A2X	37	2	5,12	15	3	16,66*	9	1	10,00*	4	1	20,00*
TX	9	5	35,71	27	13	32,50*	17	3	15,00*	8	2	20,00*
T2X	16	3	15,78	10	9	90,00*	12	3	20,00*	3	5	62,50*

* K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC, T2X: 0,8 M The End EC, N: Normal bölünen hücre sayısı, A: Anormal bölünen hücre sayısı, %: Anormallik yüzdesi ve *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Chauhan ve arkadaşları (1986) tarafından yapılan bir çalışmada ise insektisit olarak kullanılan ve bir sentetik pretroit olan Cypermethrin'in sitogenetik etkileri, *Allium cepa* kök meristemi üzerinde çalışılmıştır. Bulunan sonuçlara göre; Cypermethrin'in mitozu önemli derecede baskıladığı ve konsantrasyon artışına bağlı olarak, hem kromozomal hem de mitotik anormalliklerde bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Anafazda mikronükleus oluşumu, vakuol oluşumu, c-mitoz, yapışma, vagrant kromozom ve metafazda ekvator düzleminde kayma en sık gözlenen anormallikler olarak belirlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Farklı pestisit konsantrasyonlarının mitotik anormallik üzerine etkisi a) 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP uygulması sonucu anafazda mikronükleus oluşumu, b) 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP uygulaması sonucu metafazda ekvator düzleminde kayma c) ve d) 9,6 M Arrivo 25 EC uygulaması sonucu yapışma, e) 19,2 M Arrivo 25 EC uygulaması sonucu vagrant kromozom oluşumu, f) 0,4 M The End EC uygulaması sonucu c-mitoz oluşumu, g) 0,8 M The End EC uygulaması sonucu vakuol oluşumu, h) 0,8 M The End EC uygulaması sonucu anafazda mikronükleus oluşumu ve i) 0,4 M The End EC uygulması sonucu c-mitoz oluşumu.

Koromozomal yapışma çoğu muamele sonrası mitotik bölünmenin her ikisi için gözlemlenmiştir. Yapışma uygun olmayan kromozomal katlanmalar ve aynı zamanda pestisitlerin DNA, proteinler ya da bunların her ikisinin oluşturduğu kromozomal bağlantılarla olan etkileşimi olarak tanımlanır (Badr ve İbrahim, 1987; Chauhan ve diğ., 1986). Chauhan ve arkadaşları (1998) Deltamethrin muamelesi sonrası elektron mikroskobu altında görülen subkromatin bağlantılarını rapor etmiştir. Yapışkan kromozomlar aynı zamanda kromozom organizasyonu için gerekli olan bazı özel histon olmayan proteinlerin fonksiyonundaki hasardan da ileri gelmektedir. Bu proteinlerin fonksiyonlarında meydana gelen bu değişim yapısal genlerdeki bir mutasyondan ya da toksik ajanlarla direk etkileşimden kaynaklanmaktadır.

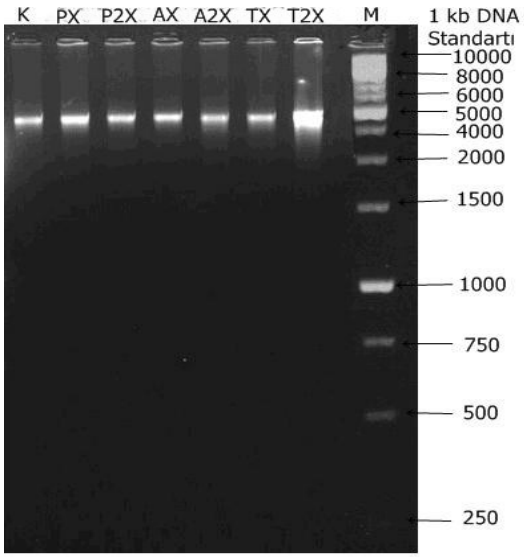
Levan (1938) c-mitoz'u hücrede iğ ipliklerinin etkisiz hale gelmesini takiben yoğunlaşmış kromozomların rastgele dağılımı olarak tanımlamıştır. Bütün petisitlerin ilk etkisi iğ ipliği mekanizmasının kısmen ya da tamamen etkisiz hale getirilmesini takiben kromozomların dağılımı olarak rapor edilmektedir (Jain ve Sarbhoy, 1987). C-mitoz pestisitlerin iğ ipliği inhibitörü olarak davrandığını kanıtlamaktadır. Diğer yandan mikronukleus oluşumu da kromozom kırıklarının (ya da mitotik anormalliklerin) sonucudur. Ancak DNA kırılmalarının moleküler mekanizması henüz tamamen anlaşılamamıştır. Bu şekilde gerçekleşen kromozom bozulmaları çevresel kirleticilerin farklı konsantrasyonları ve muamele zamanlarında birçok araştırıcı tarafından belirlenmiştir. (Chandra ve diğ., 2005; Panda ve Sahu, 1985; Saxena ve diğ., 2005; El-Ghamery ve diğ., 2000; Amin, 2001; Ateeq ve diğ., 2002; Rank ve diğ., 2002).

3.3. Moleküler Bulgular

3.3.1. gDNA Miktarı ve Saflık Dereceleri

DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak izole edilen gDNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.7'de verildi. Çalışmada UV Visible spektrofotometre ile elde edilen Abs260, Abs280 ve Abs260/Abs280 ve DNA konsantrasyon değerleri Tablo 3.4'de verildi. İzolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları arasında artan konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görüldü (F=5,798, sd=1,120 P=0,05) (Tablo 3.5). Genomik DNA tek bir bant halinde görülürken, az miktarda DNA kırılması 0,8 M The End EC uygulamasında gözlendi. Yükleme kuyucuklarında, TBE tampon çözeltisi içerisinde erimeden kalan DNA'ların

oluşturduğu aydınlanmalar görüldü. DNA kırılmalarının önemsenmeyecek miktarda olduğu izlendi. DNA miktarları 1,5 ile 6,75 ng/µl arasında değişim gösterdi, en düşük miktarda DNA 0,8 M The End EC uygulaması, en yüksek DNA miktarı 9,6 M Arrivo 25 EC uygulaması yapılan grupta tespit edildi. DNA saflığının bir ifadesi olan OD260/280 oranlarının ise 1,95 ile 1,21 arasında değiştiği belirlendi.



Şekil 3.7. İzole edilen gDNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü (M: Markör, K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)

Tablo 3.5. İzole edilen gDNA örneklerinin konsantrasyon değerleri

Konsantrasyon	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	DNA/RNA konsantrasyonu (µg/µl)
K	0,039	0,024	1,95	1,63
PX	0,122	0,101	1,21	6,7
P2X	0,120	0,099	1,21	6*
AX	0,135	0,106	1,27	6,75
A2X	0,127	0,104	1,22	6,35*
TX	0,042	0,030	1,4	2,1
T2X	0,030	0,021	1,43	1,5*

* K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC, T2X: 0,8 M The End EC ve *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda azami absorbsiyon özelliği göstermelerinden dolayı 260 nm'de ölçülen absorbsiyon değerleri (Abs260) miktar tayininde kullanılmıştır. Abs260'daki değerler DNA ve RNA'yı birbirinden ayırt etmeye yetmez. Ancak izolasyon aşamasında RNaz uygulanarak toplam nükleik asitler içinde yer alan RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Abs280 değeri ortamda bulunan protein moleküllerinin yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir. Saflaştırılmış DNA'da Abs260/Abs280 oranı ideal olarak 1.8-2.0 civarında olmalıdır. Bununla birlikte saflaştırılan DNA'nın Abs260/Abs280 oranı 1.2 seviyesine düşene kadar çeşitli uygulamalarda sorunsuzca kullanılabilmektedir. Spektrofotometre verileri ve agaroz jel görüntüleri değerlendirilerek, kontrol ve pestisit uygulaması yapılan gruplara ait DNA'ların RAPD-PZR uygulamaları için yeterli miktar ve saflıkta olduğuna karar verildi.

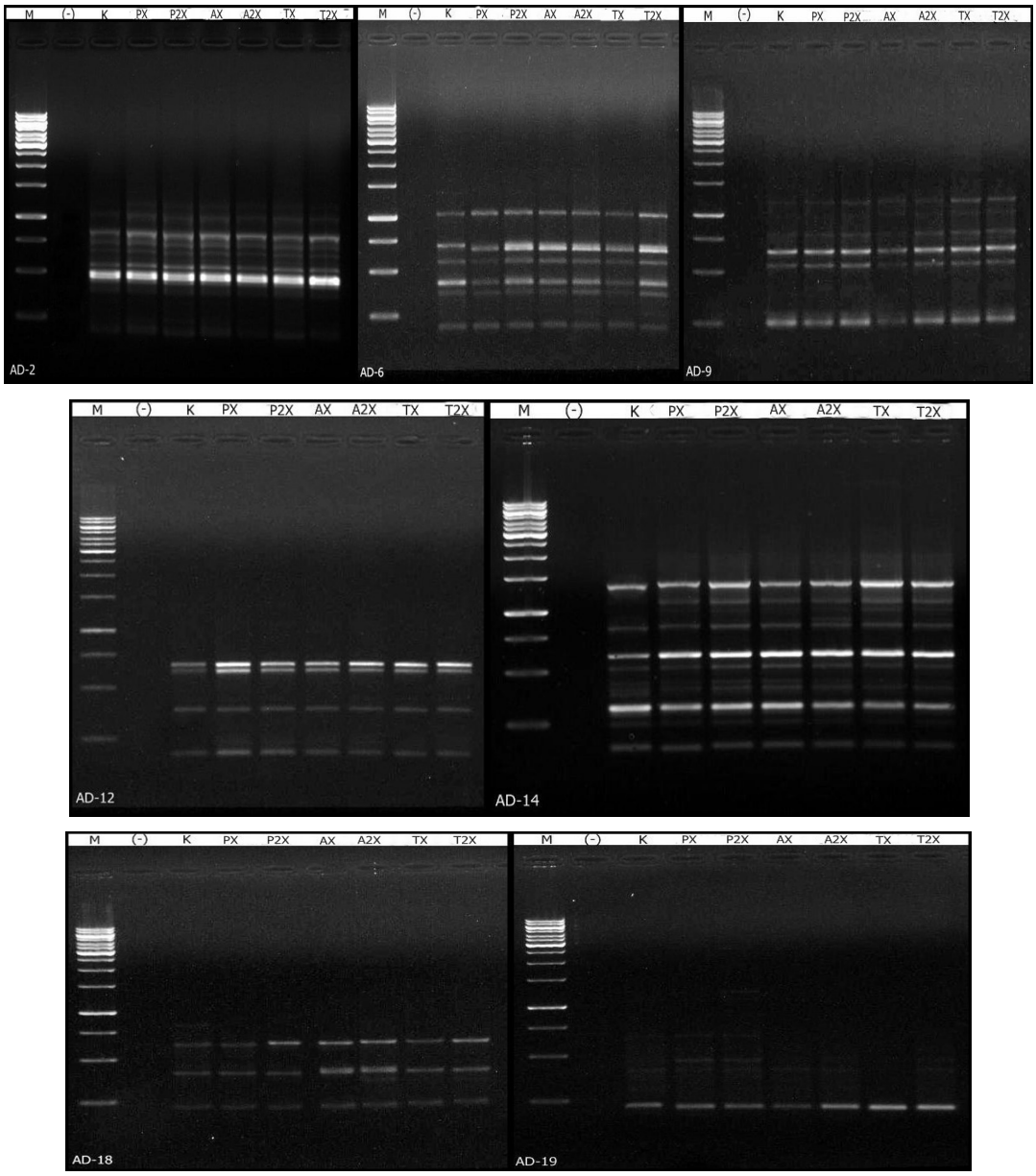
3.3.2. RAPD Profillerinin Analizi ve Değerlendirilmesi

RAPD analizi için 20 adet 10 bazlık primerler soya bitkisi ile yapılan diğer RAPD çalışmalarında en çok kullanılan ve sonuç alınan primerler arasından belirlendi. Bu primerlerden elde edilen çoğaltım ürünleri değerlendirmeye alındı ve 18 tanesinin tekrarlanabilir ve güvenilir PZR ürünleri verdiği tespit edildi. Elde edilen çoğaltım ürünleri %1 oranındaki agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UVP-GelDoc-it jel görüntüleme cihazında incelenerek fotoğrafları çekildi. RAPD sonuçlarının analizi ve sonuçların değerlendirilmesi çekilen fotoğraflar üzerinden yapıldı. Çoğaltım sonucunda oluşan bantların okunmasında sadece kuvvetli bantlar değerlendirmeye alındı.

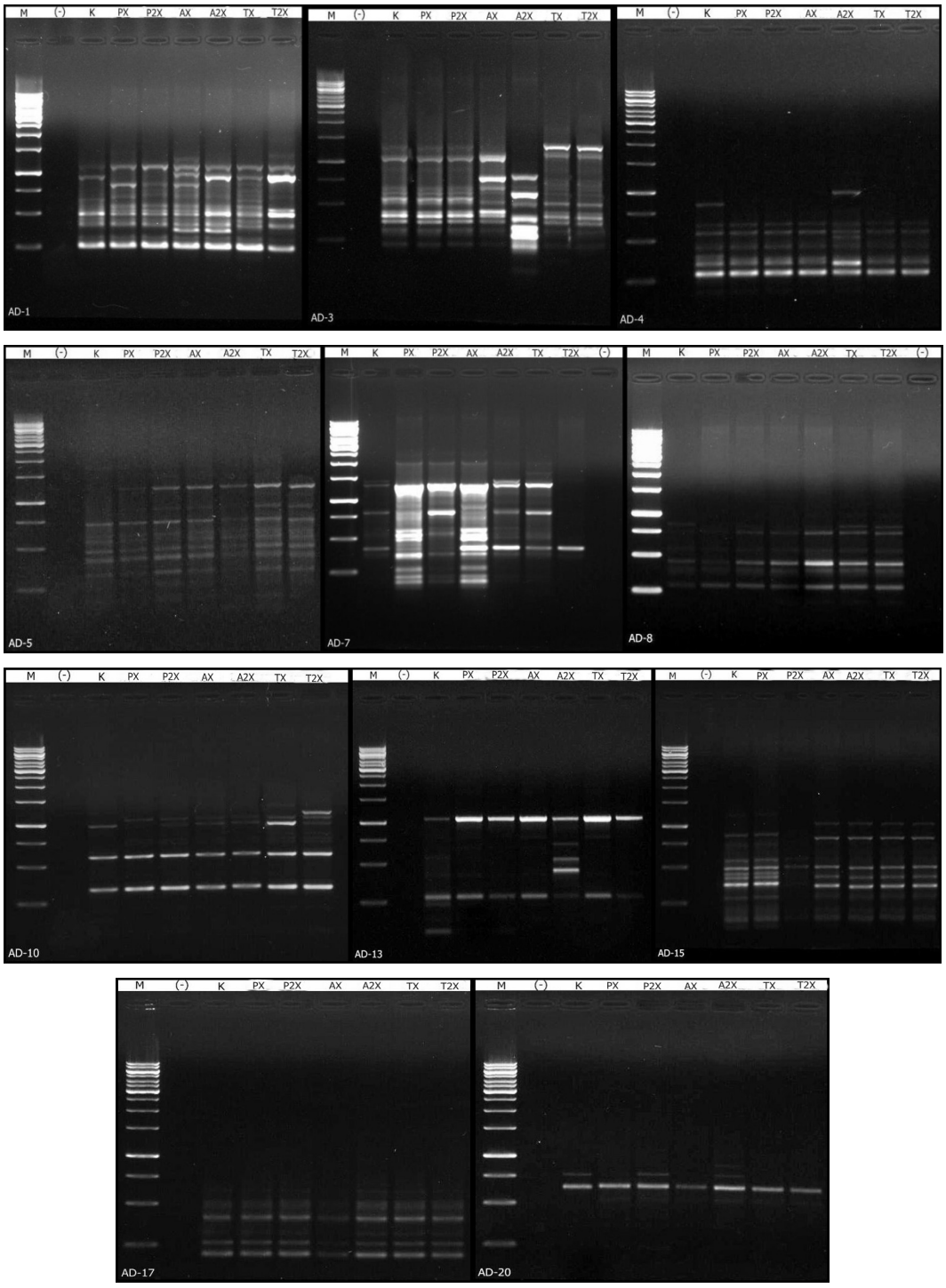
Farklı pestisitlerin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş soya DNA' larının 18 adet RAPD primeri ile taranması sonucunda, 7 adet RAPD primeri (AD-2, AD-6, AD-9, AD-12, AD-14, AD-18, AD-19) tüm gruplar arasında kontrol grubuna göre monomorfik bant profili gösterdi. Bu primerlerle elde edilen çoğaltım ürünlerinin hepsi agaroz jel elektroforezi sonucunda aynı bant profili gösterdi (Şekil 3.8).

Diğer 11 RAPD primeri ile yapılan çalışmada ise kontrol grubuna göre polimorfik bant profili elde edildi. Bu primerlerle elde edilen çoğaltım ürünlerinin hepsi agaroz jel elektroforezi sonucunda farklı bant profili gösterdi (Şekil 3.9).

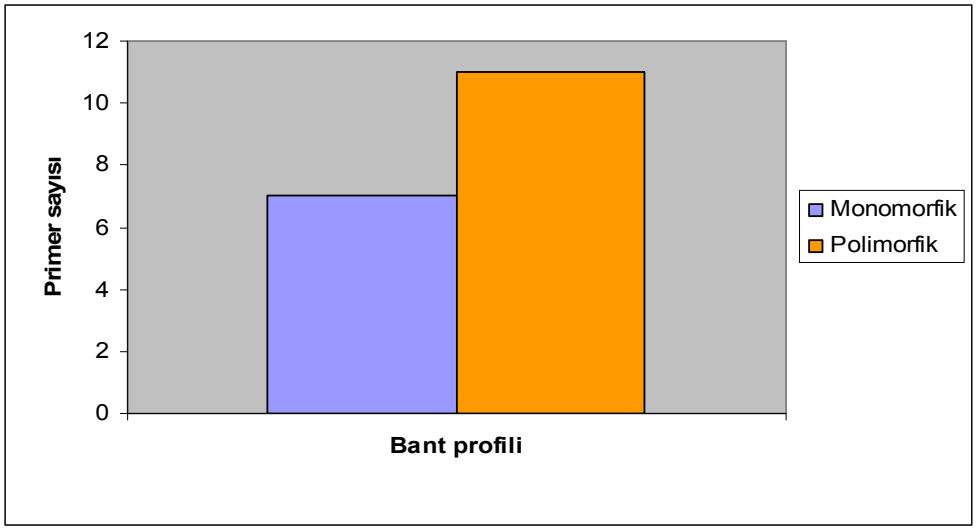
Tüm primerler ile elde edilen agaroz jel görüntüleri incelendiğinde 6 farklı uygulama grubu için belirlenen toplam monomorfik ve polimorfik primerler Şekil 3.10'da gösterildi.



Şekil 3.8. AD-2, AD-6, AD-9, AD-12, AD-14, AD-18 ve AD-19 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen monomorfik bant profilleri (M: Markör, (-): Negatif Kontrol, K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)



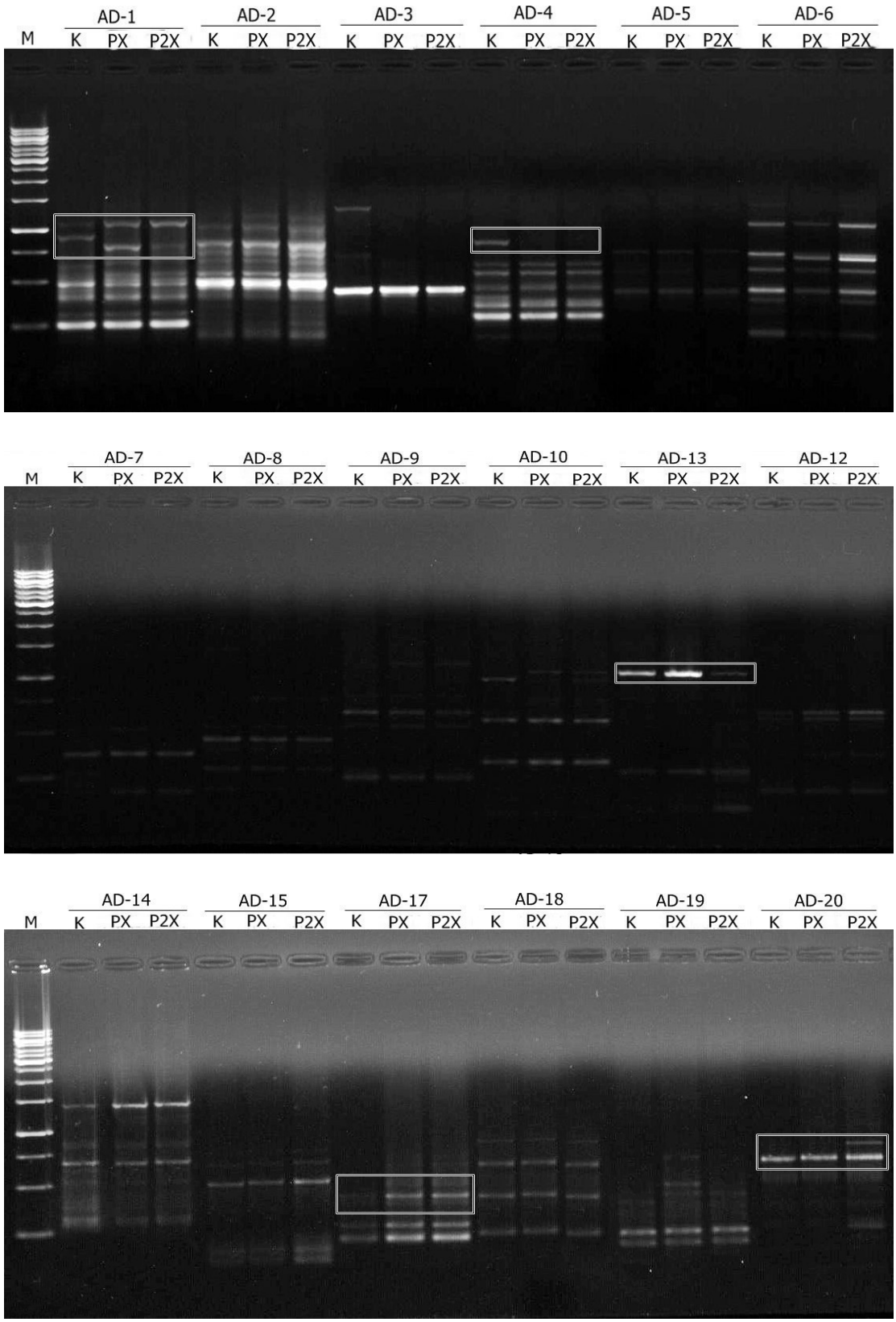
Şekil 3.9. AD-1, AD-3, AD-4, AD-5, AD-7, AD-8, AD-10, AD-13, AD-15, AD-17 ve AD-20 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri (M: Markör, (-): Negatif Kontrol, K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)



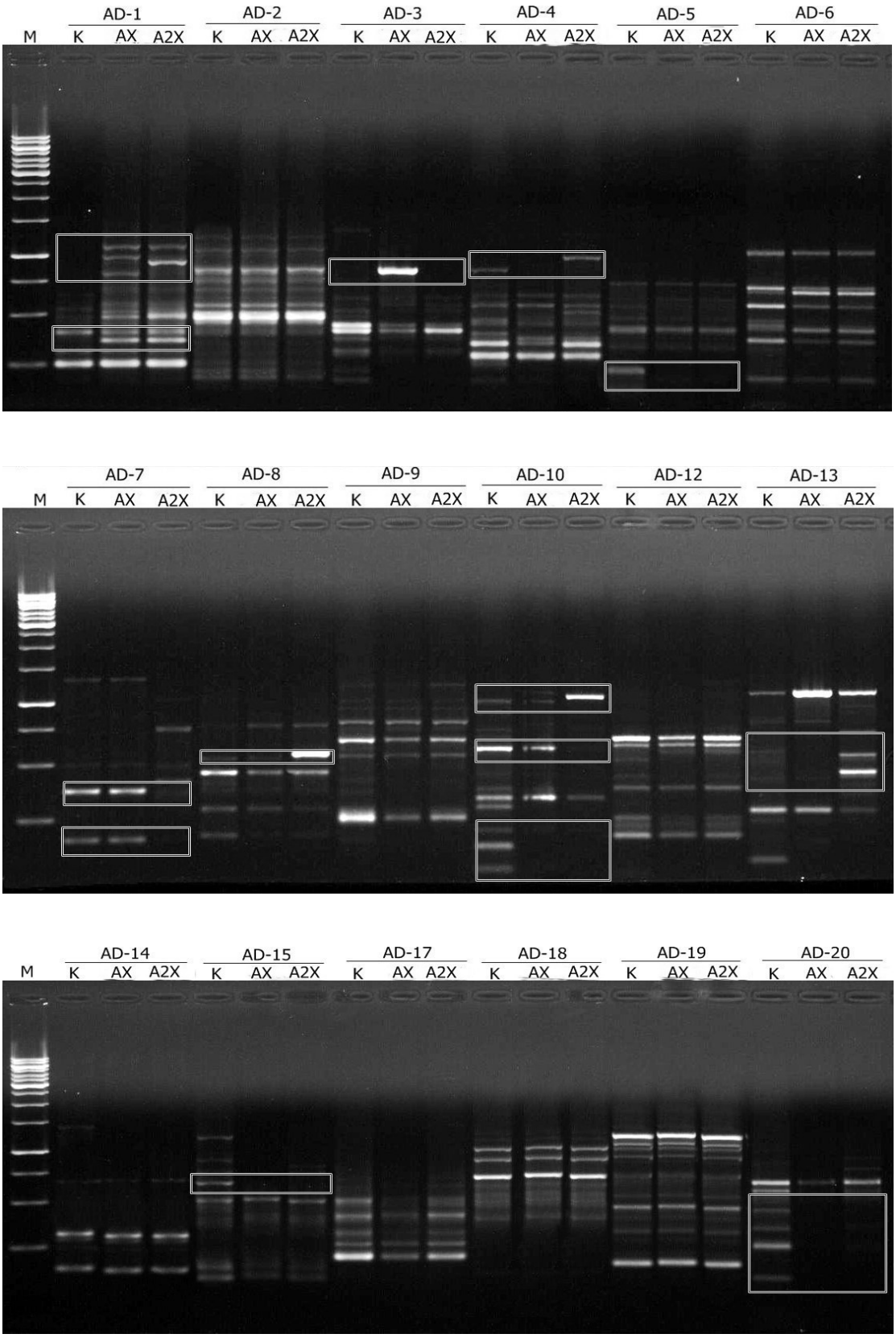
Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan monomorfik ve polimorfik primer sayıları

Ayrıca uygulama gruplarına ait DNA'lar ile yapılan PZR analizleri sonucunda kontrol grubuna göre polimorfik ve monomorfik görülen 18 adet primerin uygulama grupları arasındaki dağılımları da incelendi. Bu primerlerin jel görüntüleri Şekil 3.11, Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te gösterildi.

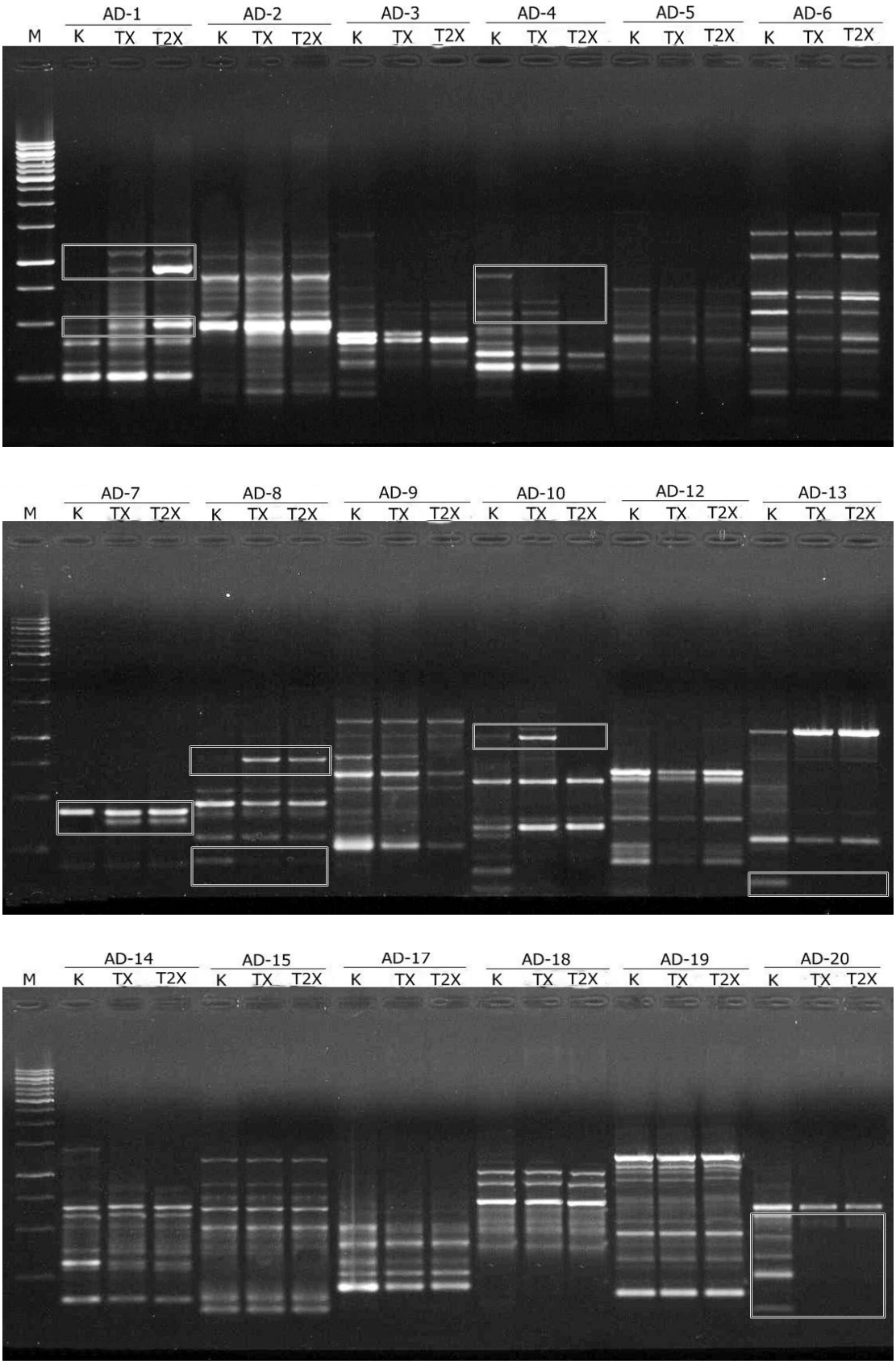
Analizler sonucunda kontrole grubuna göre 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP uygulaması için 15 adet monomorfik ve 3 adet polimorfik, 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP uygulaması için 13 adet monomorfik ve 5 adet polimorfik, 9,6 M Arrivo 25 EC uygulaması için 11 adet monomorfik ve 7 adet polimorfik, 19,2 M Arrivo 25 EC uygulaması için 10 adet monomorfik ve 8 adet polimorfik, 0,4 M The End EC uygulaması için 11 adet monomorfik ve 7 adet polimorfik ve 0,8 M The End EC uygulaması için 12 adet monomorfik ve 6 adet polimorfik bant profili gösteren primer olduğu gözlendi (Tablo 3.6 ve Şekil 3.14.). Bazı primerlerin uygulama grupları arasında ortak olduğu gözlendi. Polimorfik bantlar kontrol grubuna göre bant varlığı ya da yokluğuna göre değerlendirildi ve Pomarsol Forte 80 WP uygulamasının diğer uygulamalara göre büyük farklılık gösterdiği tespit edildi.



Şekil 3.11. Pomarsol Forte 80 WP uygulaması sonrası polimorfik bant profili gösteren primerler (M: Markör, K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP ve P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP)



Şekil 3.12. Arrivo 25 EC uygulaması sonrası polimorfik bant profili gösteren primerler (M: Markör, K: Kontrol, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC ve A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC)

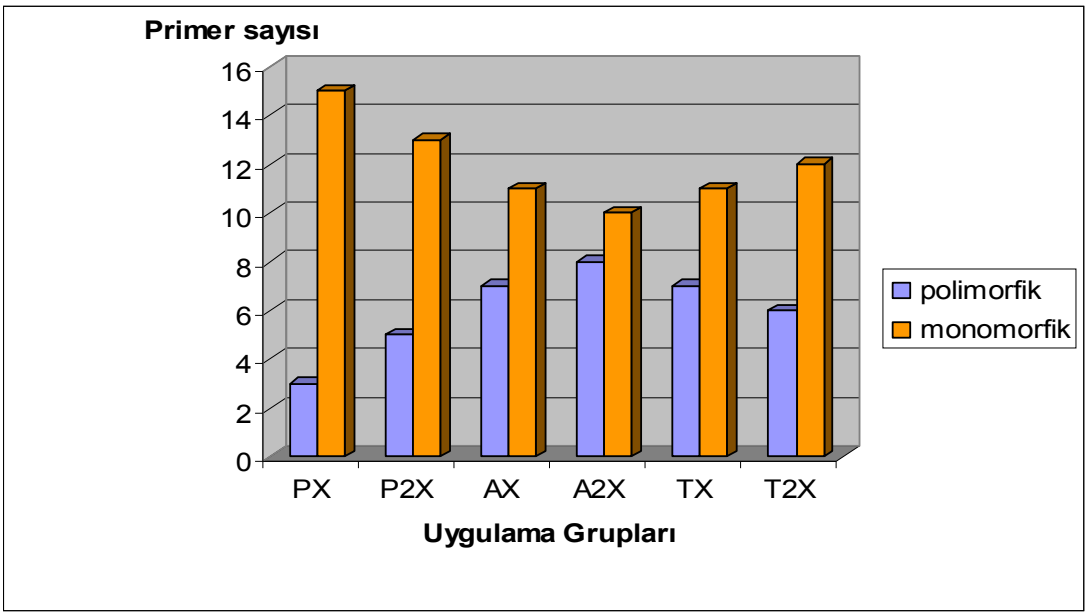


Şekil 3.13. The End EC uygulaması sonrası polimorfik bant profili gösteren primerler (M: Markör, K: Kontrol, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)

Tablo 3.6. Uygulama gruplarına göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi

Uygulama grupları	Monomorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler	Polimorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler
PX	AD-2, AD-3, AD-5, AD-6, AD-7, AD-8, AD-9, AD-10, AD-12, AD-13, AD-14, AD-15, AD-18, AD-19, AD-20	AD-1, AD-4, AD-17
P2X	AD-2, AD-3, AD-5, AD-6, AD-7, AD-8, AD-9, AD-10, AD-12, AD-14, AD-15, AD-18, AD-19	AD-1, AD-4, AD-13, AD-17, AD-20
AX	AD-2, AD-5,AD-6, AD-7, AD-9, AD-12, AD-13, AD-14, AD-17, AD-18, AD-19	AD-1, AD-3,AD-4,AD-8, AD-10, AD-15, AD-20
A2X	AD-2, AD-3, AD-6, AD-8, AD-9, AD-12, AD-14, AD-17, AD-18, AD-19	AD-1, AD-4, AD-5, AD-7, AD-10, AD-13, AD-15, AD-20
TX	AD-2, AD-3, AD-5, AD-6, AD-9, AD-12, AD-14, AD-15, AD-17, AD-18, AD-19,	AD-1, AD-4, AD-7, AD-8, AD-10, AD-13, AD-20
T2X	AD-2, AD-3, AD-5, AD-6, AD-9, AD-10, AD-12, AD-14, AD-15, AD-17, AD-18, AD-19,	AD-1, AD-4, AD-7, AD-8, AD-13, AD-20

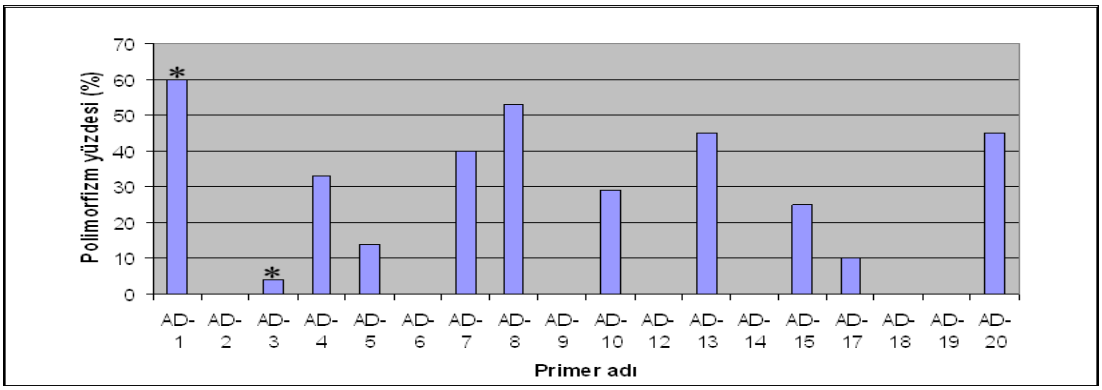
* PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC'dir.



Şekil 3.14. Çalışmada kullanılan primerlerle uygulama gruplarına ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları (PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)

Bu çalışmada uygulama grupları arasında kullanılan RAPD primerlerinin kontrol grubuna göre %61'inin polimorfik olduğu belirlendi ve bu primerlerin pestisit uygulanan soya grupları arasındaki genetik farklılığın ayırımında kullanılabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca uygulama grupları arasındaki kontrol grubuna göre en polimorfik RAPD primerlerini saptamak için, polimorfik bant profili gösteren 11 primerin RAPD amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren bütün primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü hesaplandı (Tablo 3.7). 146 ile 1077 baz çifti büyüklüğü arasında değişen toplam 62 adet polimorfik bant tespit edildi. Yeni PZR ürünlerinin ortaya çıkması gerçekleşir çünkü yapısal değişikliklerden sonra bazı oligonükleotid bağlanma bölgeleri oligonükleotid primerler için erişilebilir hale gelebilir ya da mutasyonlardan, ya da büyük delesyonlardan, ya da homolog rekombinasyonlardan dolayı DNA dizisinde değişiklik meydana gelebilir [38]. Çalışmamızda kullanılan bütün uygulama gruplarında yeni bant oluşumu gerçekleşti (Tablo 3.7). Padmesh ve arkadaşları (1999) *Andrographis paniculata'*daki genetik değişiklikleri değelendirmek için 10 bazlık 10 adet primer kullandı ve her primer için ortalama 6.1 bant elde etti.

Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda değerlendirmeye alınan 18 RAPD primeri, toplam 308 adet bant verdi. Bu bantlardan 62 adedi polimorfik, 246 adedi monomorfik bantlardır. Primerler değerlendirildiğinde; en fazla polimorfik bant veren primerin % 60 oranıyla AD-1; en fazla monomorfik bant veren primerin % 96 oranıyla AD-3 olduğu gözlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=5,309, sd=1,459, P=0,05). Primerlerin reaksiyon sonucunda oluşturduğu çoğaltım ürünlerinin sayısı 6 ile 30 arasında değişmektedir. Bu veriler esas alındığında, elde edilen bantların %20'sinin polimorfik olduğu belirlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Çalışmada kullanılan RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri (*: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında p<0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklı)

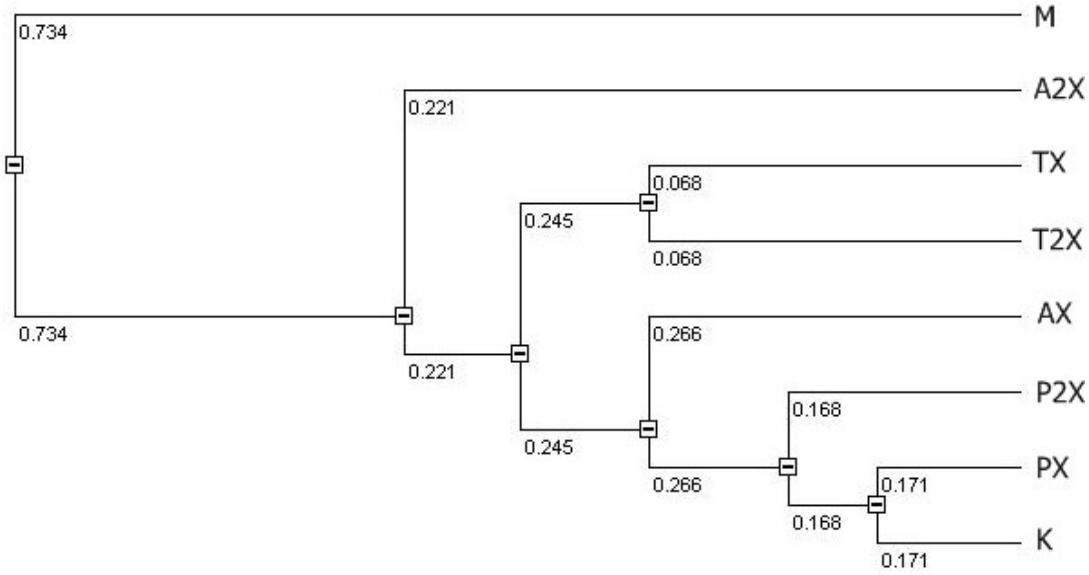
Tablo 3.7. RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü (baz çifti, bp)

			Pomarsol Fotre WP 80		Arrivo 25 EC		The End EC	
Primerler	Kontrol		PX	P2X	AX	A2X	TX	T2X
AD-1	5	-	636	636	0	0	0	0
		+	848; 471	848	1077; 848; 636; 351	1077; 848; 351	381; 906; 1077	381; 906; 1077
AD-3	5	-	0	0	0	0	0	0
		+	0	0	825	0	0	0
AD-4	6	-	854	854	626	626	854	345; 420; 854
		+	0	0	0	854	0	0
AD-5	3	-	0	0	325	325	0	0
		+	0	0	0	0	0	0
AD-7	5	-	0	0	0	357; 488	0	0
		+	0	0	0	0	396	396
AD-8	6	-	0	0	0	422	276	276
		+	0	0	0	0	715; 833	715; 833
AD-10	5	-	0	0	325	252; 325	0	0
		+	0	0	0	628	1264	0
AD-13	3	-	0	1086	0	0	146	146
		+	0	0	0	447; 538	0	0
AD-15	7	-	0	0	418; 454	418; 454	0	0
		+	0	0	0	0	0	0
AD-17	5	-	0	0	0	0	0	0
		+	385	385	0	0	0	0
AD-20	5	-	0	0	252	252	248	248
		+	0	769	0	0	0	0
Toplam	55		2 (-);3(+)	3 (-);3 (+)	6 (-);5(+)	7 (-);10(+)	4(-);7(+)	6 (-);6(+)

* PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC'dir.

Popgene analizi sonucunda Nei (1972)'ye göre hesaplanan, UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Aritmetic Mean) metoduna göre çizilen dendrogram Şekil 3.16'de verildi.

Nei (1972)'ye göre hesaplanan uygulama grupları arasındaki genetik mesafeye dayalı olarak UPGMA metodu ile uygulama grupları arasında bir dendrogram elde edildi. Bu dendrogram incelendiğinde kontrol grubu ile 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP uygulamasının aynı dala ayrıldığı ve en yakın genetik mesafeye sahip olduğu ancak 19,2 M Arrivo 25 EC uygulamasının tamamen farklı bir dala ayrılarak kontrol grubuna göre en uzak genetik mesafeye sahip olduğu gözlendi. The End EC uygulaması kontrol grubundan farklı bir dala ayrılarak genetik olarak farklılık gösterdi ancak konsantrasyon farkı bu farklılığa etki etmedi.



Şekil 3.16. Uygulama grupları arasındaki dendrogram (M: Markör, K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)

Genomik kalıp stabilitesi (GKS) değeri, RAPD profillerindeki değişiklikleri yansıtan niteliksel bir ölçüdür ve polimorfik bant veren 11 primer için hesaplanan genomik kararlılık değerleri Tablo 3.8'da gösterildi. Genomik kalıp stabilitesi değeri en fazla 9,6 M Arrivo 25 EC uygulamasıyla azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi. Diğer uygulama gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Tablo 3.8. Genomik kalıp stabilitesi (GKS, %) değerleri

		Pomarsol Forte 80 WP		Arrivo 25 EC		The End EC	
Primerler	Kontrol (%)	PX (%)	P2X (%)	AX (%)	A2X (%)	TX (%)	T2X (%)
AD-1	100	40,0	60,0	100	100	100	100
AD-3	100	100	100	80,0	100	100	100
AD-4	100	83,3	83,3	83,3	66,6	83,0	50,0
AD-5	100	100	100	66,6	66,6	100	100
AD-7	100	100	100	100	40,0	60,0	60,0
AD-8	100	100	100	100	83,3	50,0	50,0
AD-10	100	100	100	80,0	40,0	80,0	100
AD-13	100	100	66,6	100	100	83,3	83,3
AD-15	100	100	100	71,6	71,6	100	100
AD-17	100	80,0	80,0	100	100	100	100
AD-20	100	100	80.0	80,0	80,0	80,0	80,0
Ortalama	100	91,1	88,0	87,2	76,9*	85,0	83,9

* PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC, T2X: 0,8 M The End EC ve *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

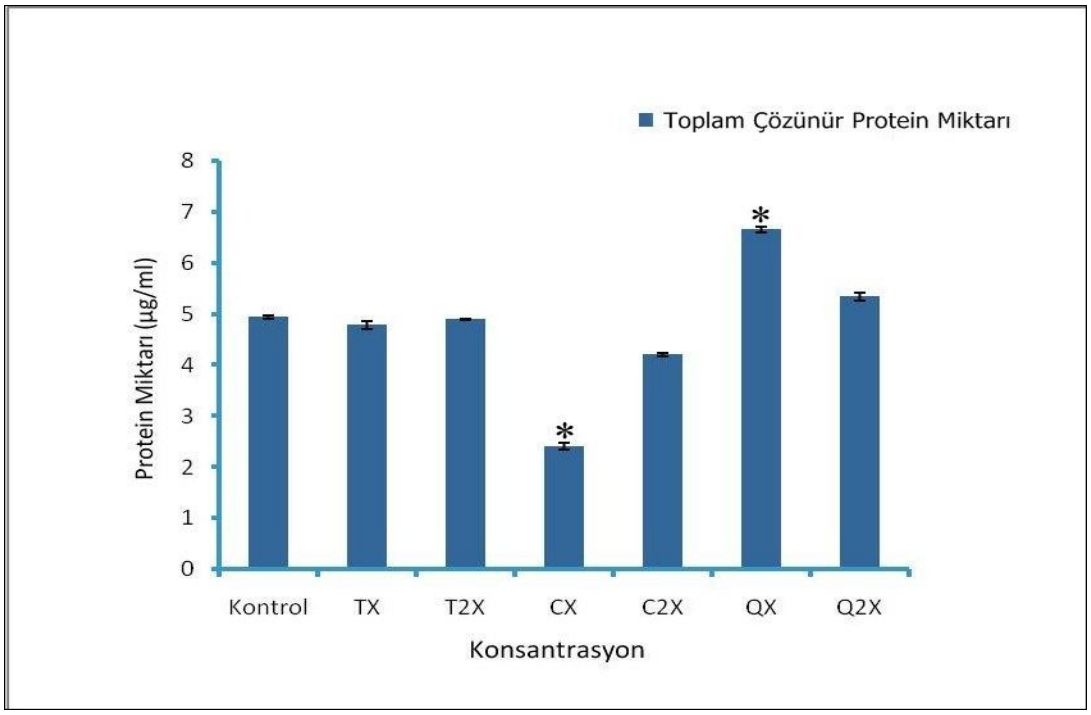
Genomik kalıp stabilitesi; DNA hasarının düzeyi, DNA tamiri ve replikasyonunun verimliliği ile ilgilidir. Bu nedenle, çok yüksek düzeyde DNA hasarı düşük düzeyde DNA değişimleriyle karşılaştırıldığında zorunlu olarak genomik kararlılığı azaltmaz, çünkü DNA tamiri ve replikasyonu DNA hasarının yüksek sıklığıyla baskılanır (Ateinzar ve Jha, 2006).

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; tüm pestisit grupları ile muamele sonrası ortalama genomik kalıp stabilitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlendi. Genomik kalıp stabilitesindeki değişim klorofil ve karotenoid miktarındaki ve genomik DNA miktarındaki değişimden daha fazla duyarlı, çimlenme yüzdesindeki ve toplam çözünür protein miktarındaki değişimden daha az duyarlı olarak bulundu. Benzer sonuçlar Atienzar ve arkadaşları (1999), Liu ve arkadaşları (2005) ve Cenkci ve arkadaşları (2009) tarafından rapor edilmiştir.

3.4. Biyokimyasal Bulgular

3.4.1. Toplam Çözünür Protein Miktarı

SDS-PAGE analizi için izole edilen protein örneklerinin miktar tayini için Bradford yöntemi kullanıldı. Bradford yöntemiyle hazırlanan 1:10 oranında sulandırılan protein örnekleri spektrofotometrede 595 nm'de absorbansları ölçüldü. Ölçüm sonunda elde edilen absorbans değerleri hazırlanan standart protein grafiği yardımı ile protein miktarları hesaplandı (Şekil 3.17). Çalışmamızda toplam çözünür protein miktarında pestisit uygulamasını takiben bir azalma ve bu azalmanın en çok 9,6 M Arrivo 25 EC uygulaması sonucu olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F=9,494, sd=0,341, P=0,05). Pestisit uygulaması sonrası protein miktarında fungisit ve insektisit uygulamalarına istatistiksel olarak anlamlı parelel bir azalma, herbisit uygulamasında ise uygulanan 0,4 M'lık konsantrasyonda bir artış, 0,8 M'lık konsantrasyonda ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (F=7,112, sd=1.245, P=0,05). Diğer araştırıcılar yaptıkları çalışmalarda herbisit uygulamasının, konsantrasyonunun, formülasyonunun ve hücre büyümesinin aşamasının hayvan ya da bitki dokularında toplam çözünür protein miktarını azaltabileceğini ya da arttırabileceğini gösterdi (Duffard ve diğ., 1993; Blanco ve diğ., 1997; Peixoto ve Hall, 1998).

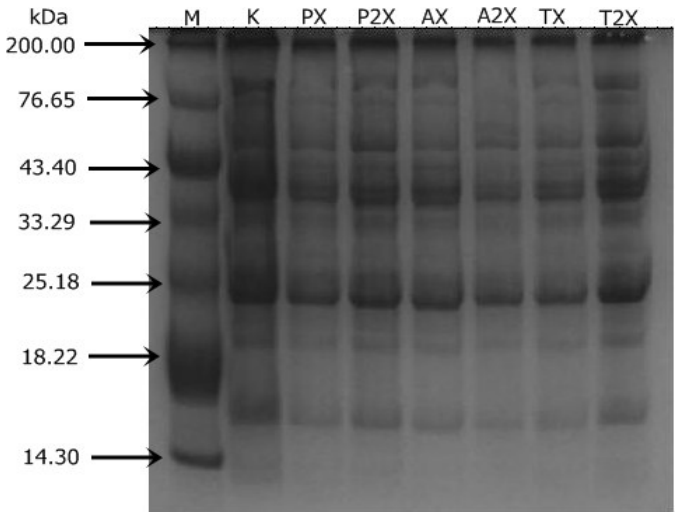


Şekil 3.17. Soya yapraklarına uygulanan farklı pestisit dozlarının tohumdaki toplam protein miktarı üzerine etkisi (PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC, T2X: 0,8 M The End EC ve *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı)

3.4.2. SDS-PAGE Verilerinin Analizi ve Değerlendirilmesi

Soya tohumlarındaki toplam protein bileşiminin belirlenmesi amacıyla elektroforez işlemi Laemmli (1970)'e göre yapıldı. Bu yöntemde ayırım yöntemi kullanıldı. Bitkideki proteinler SDS varlığında jel üzerinde yürütüldü. Her bir protein ve proteinlerin alt ünitelerini jel üzerinde tek bant oluşturacak şekilde ayırt etmek mümkündür. Bu metot proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemede kullanıldığı gibi saflaştırılmış proteinlerin saflık derecelerinin tayininde de sıkça kullanılır. SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptid zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptidlere de yüksek oranda (-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Bu yöntemde Coomasie Brillant Blue boyası kullanılmaktadır. Coomasie mavisi boyasının aktif grubu SO_3H'dır ve asidik ortamda proteinlerin serbest amino grubuna bağlanır. Sülfonik asit grubu, (+) yüklü amino grubuyla birleşir. Yürütme işleminden sonra jel aşağıda verildiği şekilde hazırlanan Coomasie Blue boyasına alınarak bu çözeltide gece boyu bekletildi. SDS-PAGE analizinden sonra elde edilen jeller UVP-GelDoc-it jel görüntüleme cihazı yardımıyla jellerin fotoğrafları çekildi (Şekil 3.18).

Analiz sonucunda elde edilen bant yüzdesi, bant ağırlığı (ng), moleküler ağırlıkları (kDa) (Tablo 3.9-3.15) ve toplam proteinin yoğunluk grafikleri (Şekil 3.19-3.25) uygulama gruplarına göre verildi. Kontrol grubuna göre tüm uygulama gruplarında meydana gelen protein bant profilindeki ve bantların moleküler ağırlığındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (F=8,212, sd=1,795, p=0,05).

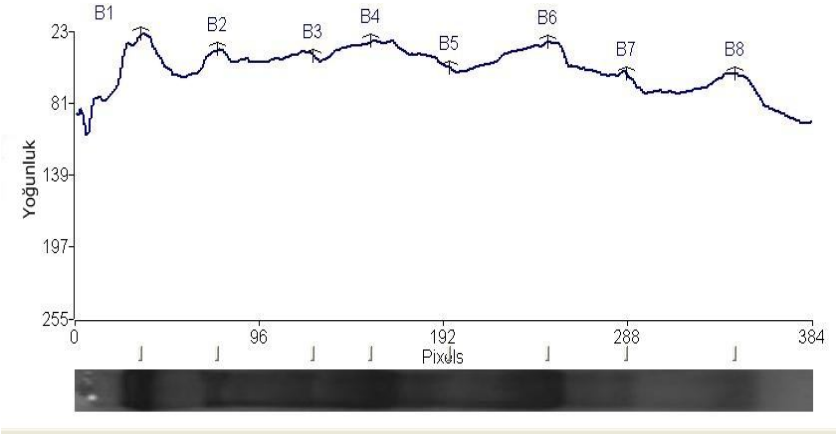


Şekil 3.18. SDS-PAGE sonrası oluşan toplam proteinlere ait bant profilleri (M: Markör, K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)

Tablo 3.9. SDS-PAGE yöntemi sonrası kontrol (K) grubundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Konsantrasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi (%)	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
K	B1	13,91	13,91± 0,63^{a}	217,97 ± 0,64^{a}
	B2	5,04	5,04 ± 0,45^{b}	93,75 ± 0,50^{b}
	B3	2,42	2,42 ± 0,20^{c}	53,48 ± 1,11^{c}
	B4	17,06	17,06 ± 0,34^{d}	41,13 ± 0,61^{d}
	B5	1,80	1,80 ± 0,11^{e}	32,89 ± 2,66^{e}
	B6	15,63	15,63 ± 1,58^{f}	23,47 ± 1,66^{f}
	B7	2,44	2,44 ± 0,42^{f}	21,18 ± 0,65^{f}
	B8	7,96	7,96 ± 0,48^{g}	15,88 ± 1,15^{g}

* Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark p<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir.

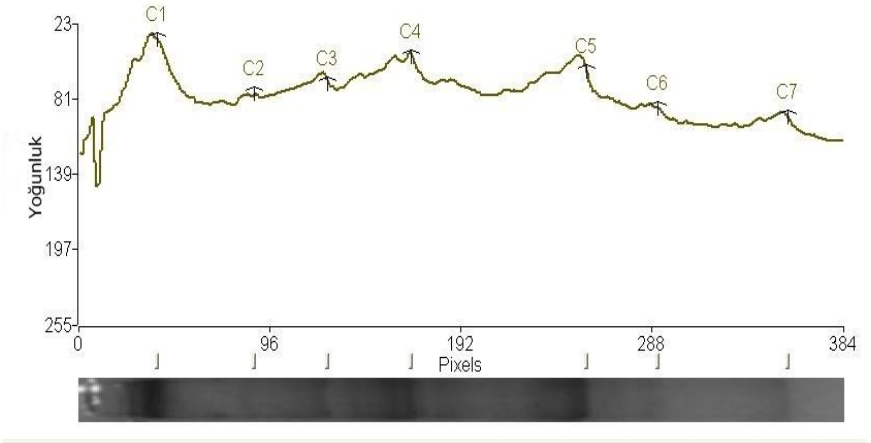


Şekil 3.19. Kontrol grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği

Tablo 3.10. SDS-PAGE yöntemi sonrası 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP (PX) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Konsantrasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi (%)	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
PX	C1	3,02	3,02 ± 0,31[a]	195,80 ± 0,48[a]
	C2	2,31	2,31 ± 0,21[b]	78,46 ± 0,68[b]
	C3	2,68	2,68 ± 1,35[c]	52,87 ± 0,04[c]
	C4	2,88	2,88 ± 0,03[d]	37,38 ± 0,50[d]
	C5	2,74	2,74 ± 0,12[e]	22,66 ± 0,86[e]
	C6	2,38	2,38 ± 0,04[e]	20,88 ± 0,94[e]
	C7	2,22	2,22 ± 0,52[f]	14,73 ± 1,12[f]

* Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark $p<0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir.

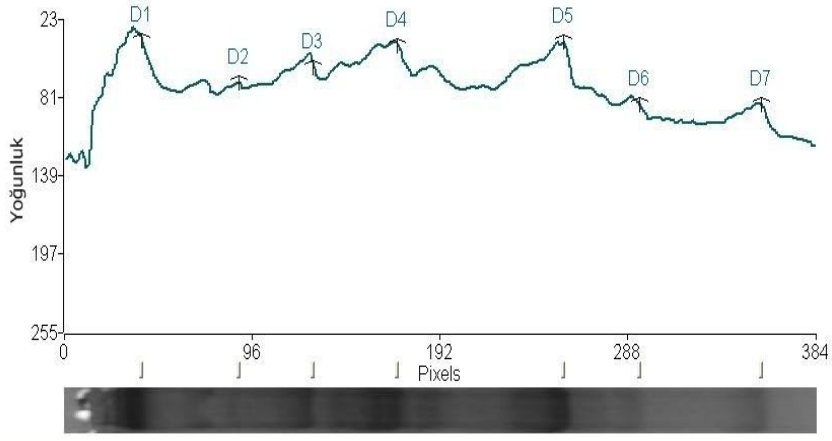


Şekil 3.20. 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP (PX) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği

Tablo 3.11. SDS-PAGE yöntemi sonrası 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP (P2X) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Konsantrasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi (%)	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
P2X	D1	2,96	2,96 ± 0,03^{a}	195,27 ± 0,64^{a}
	D2	2,60	2,60 ±3,03^{b}	77,24 ± 0,56^{b}
	D3	2,74	2,74 ± 0,14^{c}	52,53 ± 1,17^{c}
	D4	2,93	2,93 ± 0,40^{d}	35,51 ± 1,26^{d}
	D5	2,86	2,86 ± 0,51^{e}	27,53 ± 7,02d^{e}
	D6	2,34	2,34 ± 0,31^{ef}	19,00 ± 1,20^{ef}
	D7	2,30	2,30 ± 0,90^{f}	15,18 ± 1,00^{f}

*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark $p<0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir.

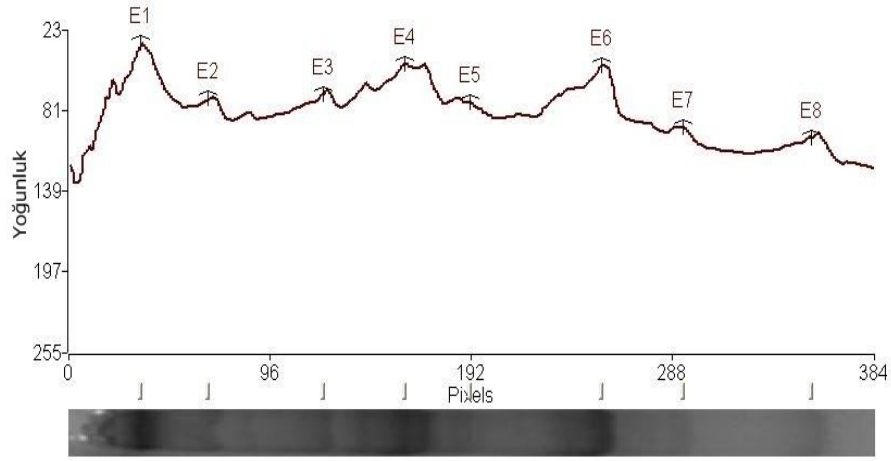


Şekil 3.21. 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP (P2X) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği

Tablo 3.12. SDS-PAGE yöntemi sonrası 9,6 M Arrivo 25 EC (AX) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Konsantrasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi (%)	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
AX	E1	5,61	5,61 ± 0,51[a]	218,66 ± 0,59[a]
	E2	2,31	2,31 ± 0,06[b]	107,18 ± 2,32[b]
	E3	16,59	16,59 ± 0,42[c]	55,75 ± 0,94[c]
	E4	3,38	3,38 ± 0,43[d]	39,14 ± 0,72[d]
	E5	13,42	13,42 ± 1,73[e]	31,43 ± 0,68[e]
	E6	6,70	6,70 ± 0,81[e]	23,93 ± 0,54[e]
	E7	4,19	4,19 ± 0,31[g]	19,29 ± 0,68[g]
	E8	13,77	13,77 ± 1,69[f]	16,05 ± 0,43[f]

*Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark $p<0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir.

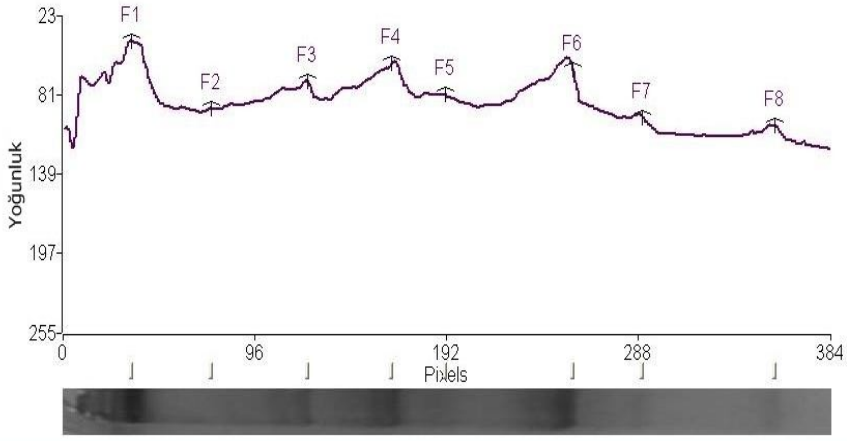


Şekil 3.22. 9,6 M Arrivo 25 EC (AX) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği

Tablo 3.13. SDS-PAGE yöntemi sonrası 19,2 M Arrivo 25 EC (A2X) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Konsantrasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi (%)	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
A2X	F1	2,81	2,81 ± 0,47^{a}	217,96 ± 0,55^{a}
	F2	2,50	2,50 ± 1,05^{b}	93,68 ± 0,52^{b}
	F3	2,44	2,44 ± 0,64^{c}	55,22 ± 0,81^{c}
	F4	2,64	2,64 ± 0,23^{d}	38,91 ± 0,87^{d}
	F5	2,62	2,62 ± 0,54^{e}	32,24 ± 0,50^{e}
	F6	2,77	2,77 ± 0,90^{f}	23,23 ± 0,59^{f}
	F7	2,35	2,35 ± 0,10^{g}	20,71 ± 0,74^{g}
	F8	2,28	2,28 ± 1,00^{h}	14,66 ± 1,04^{h}

* Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark $p<0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir.

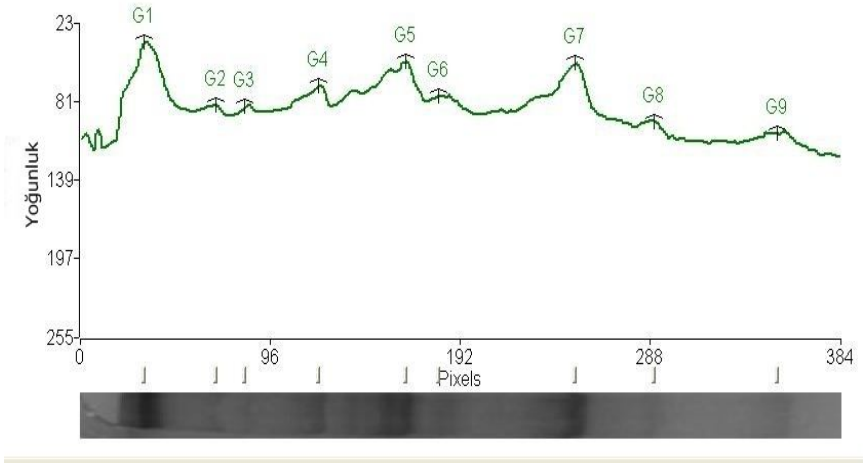


Şekil 3.23. 19,2 M Arrivo 25 EC (A2X) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği

Tablo 3.14. SDS-PAGE yöntemi sonrası 0,4 M The End EC (TX) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Konsantrasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi (%)	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
TX	G1	9,03	9,03 ± 1,80^{a}	227,93 ± 0,52^{a}
	G2	1,81	1,81 ± 0,43^{b}	103,29 ± 0,82^{b}
	G3	2,58	2,58 ± 0,52^{c}	82,3 ± 0,81^{c}
	G4	6,77	6,77 ± 0,32^{d}	54,99 ± 0,58^{d}
	G5	12,34	12,34 ± 0,41^{e}	38,09 ± 0,59^{e}
	G6	5,82	5,82 ± 0,52^{e}	34,03 ± 1,16^{e}
	G7	14,10	14,10 ± 0,61^{f}	23,47 ± 0,72^{f}
	G8	3,02	3,02 ± 0,78^{g}	20,58 ± 0,75^{g}
	G9	6,93	6,93 ± 0,14^{h}	16,78 ± 0,69^{h}

* Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark $p<0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir.

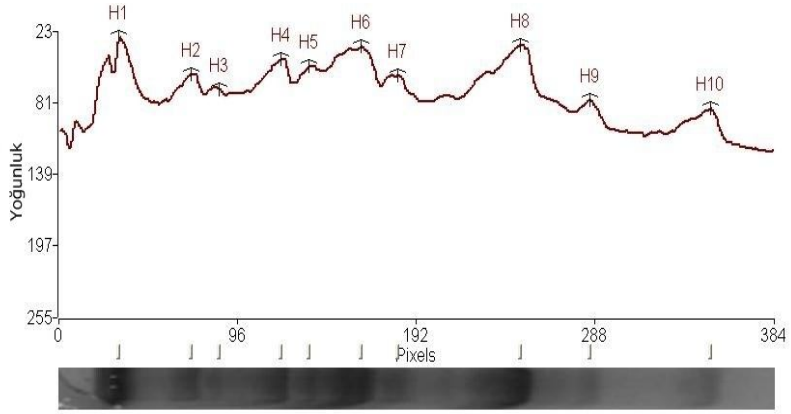


Şekil 3.24. 0,4 M The End EC (TX) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği

Tablo 3.15. SDS-PAGE yöntemi sonrası 0,8 M The End EC (T2X) ile muameleli gruptan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Konsantrasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi (%)	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
T2X	H1	9,52	9,52 ± 0,39[a]	227,94 ± 0,40[a]
	H2	5,11	5,11 ± 0,68[b]	96,41 ± 2,64[b]
	H3	1,05	1,05 ± 0,14[c]	77,22 ± 2,59[c]
	H4	6,22	6,22 ± 0,57[d]	55,75 ± 1,01[d]
	H5	2,89	2,89 ± 0,43[e]	46,66 ± 2,28[e]
	H6	8,39	8,39 ± 1,45[f]	38,87 ± 0,69[f]
	H7	3,40	3,40 ± 3,79[f]	35,14 ± 0,98[f]
	H8	15,93	15,93 ± 0,60[g]	23,19 ± 1,25[g]
	H9	4,43	4,43 ± 0,34[g]	20,47 ± 1,13[g]
	H10	8,83	8,83 ± 0,14[h]	15,38 ± 0,73[h]

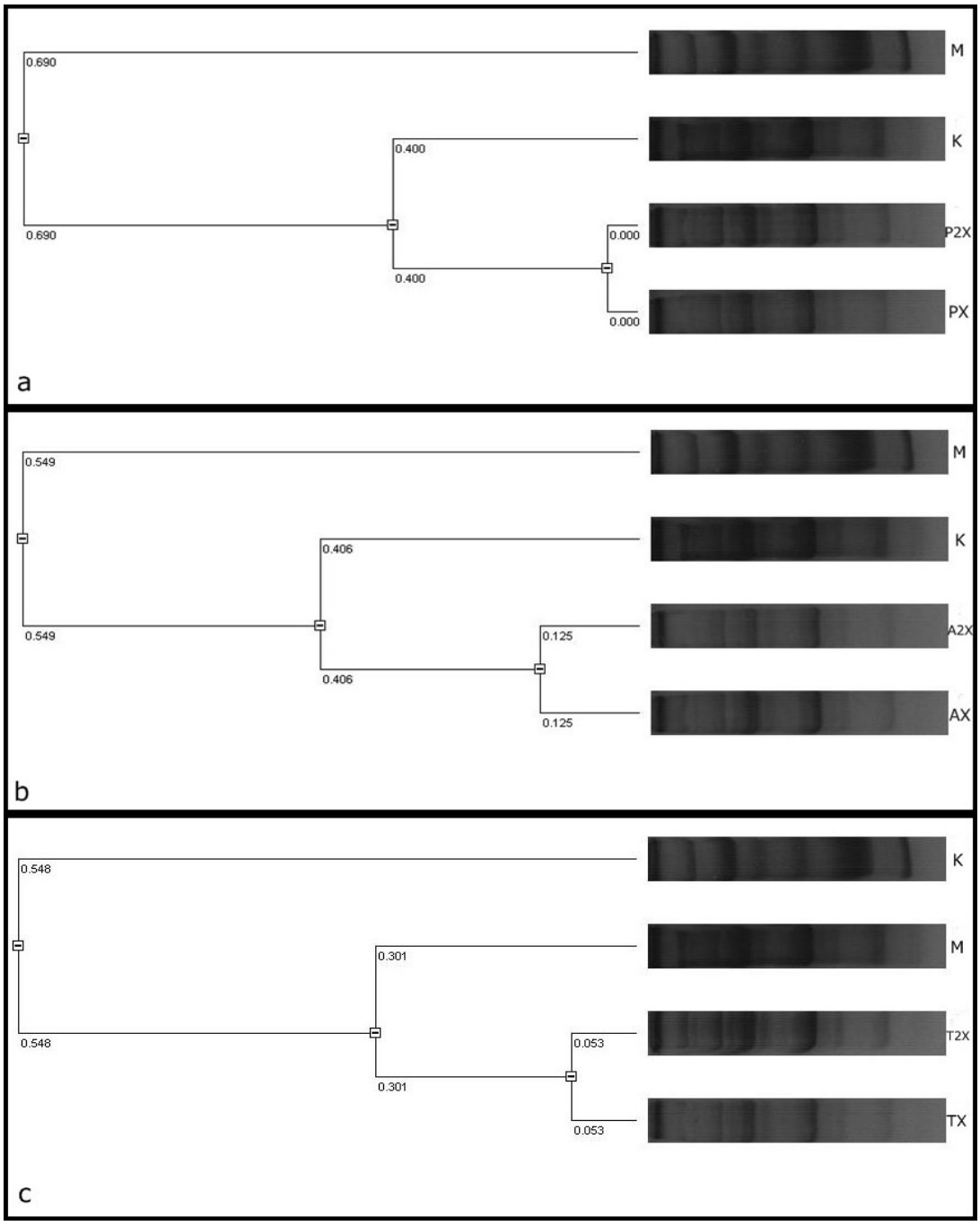
* Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark $p<0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir.



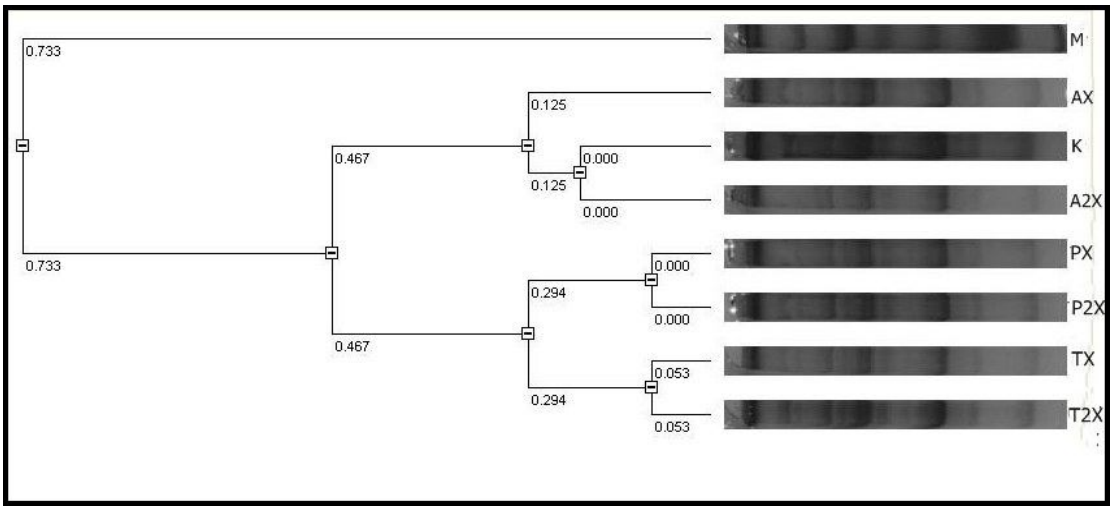
Şekil 3.25. 0,8 M The End EC (T2X) uygulama grubuna ait toplam protein yoğunluk grafiği

SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen rotein bant profillerinin uygulma grupları için ayrı değerlendirilmesi ile elde edilen dendogram ve uygulama grupları arasındaki uzaklık değerleri Şekil 3.27'de, tüm protein bant profillerinin birlikte değerlendirilmesiyle elde edilen dendogram ve genetik uzaklık değerleri Şekil 3.28 üzerinde gösterildi.

Çalışma sonucunda SDS-PAGE analizi ile uygulama grupları arasında toplam protein profili bakımından farklılık saptanmıştır. Elde edilen protein bant profillerinin Vision WorksLS Version 6.8 programıyla elde edilern dendograma göre Pomarsol Forte 80 WP ve The End EC uygulaması kontrolden ve birbirlerinden farklı protein profili göstererek ayrılırken, 19,2 M Arrivo 25 EC uygulaması kontrol grubuyla benzer protein profili gösterirken, 9,6 M Arrivo 25 EC uygulaması tamamen farklı bir protein profili göstererek diğerlerinden ayrılmıştır. Pomarsol Forte 80 WP uygulamasında konsantrasyon artışı protein profilini kontrole göre aynı oranda değiştirirken diğer iki uygulama konsantrasyon artışına bağlı olarak da protein bant profilinde değişiklik gösterdi (Şekil 3.26 ve 3.27).



Şekil 3.26. SDS-PAGE sonrası elde edilen protein bant profillerinin uygulma grupları için ayrı değerlendirilmesi ile elde edilen dendogram a) Pomarsol Forte 80 WP, b) Arrivo 25 EC ve c) The End EC (M: Markör, K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC ve T2X: 0,8 M The End EC)



Şekil 3.27. SDS-PAGE sonrası elde edilen tüm protein bant profillerinin birlikte değerlendirilmesiyle elde edilen dendogram (M: Markör, K: Kontrol, PX: 0,08 M Pomarsol Forte 80 WP, P2X: 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP, AX: 9,6 M Arrivo 25 EC, A2X: 19,2 M Arrivo 25 EC, TX: 0,4 M The End EC, T2X: 0,8 M The End EC)

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sitogenetik testler, maddelerin farklı sürelerde uygulanan çeşitli konsantrasyonlarının zararlı etkilerinin teşhis edilmesi ve organizmalar üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için uygundur (Kumar ve Singh, 1991; De Serres, 1992). Bu testler, test organizmaları üzerine zararlı etkileri bakımından önemli veriler sağlamakta ve kirlilik ölçüsünün biyodenetimi yanında, doğal çevrelerdeki organizmalar üzerine bütün toksik ve mutajenik maddelerin kombine etkilerinin değerlendirilmesi için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Al-Sabti, 1989). Yüksek yapılı bitkiler, çevresel kimyasalların sitotoksik (hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan etkileri), sitogenetik (kromozomlar üzerindeki etkileri) ve mutajenik (genetik değişime neden olan etkileri) etkilerinin mükemmel bir göstergesidir. Bu bağlamda yüksek yapılı bitkiler, kimyasalların kullanımı veya çevresel kirliliğin neden olduğu muhtemel genetik hasarın belirlenmesinde birinci sırada yer alan alternatif test sistemleri olarak deneysel çalışmalarda özgül avantajlara sahiptir. Yani, bitki köklerinin meristematik mitotik hücreleri çevresel kirleticilerin "klastojenite"sinin (kromozom kırılması ve/veya buna baglı olarak kromozom parçalarındaki kayıp, artma ya da düzensizliklerin olması) belirlenmesi için uygun bir sitogenetik materyaldir (Ma ve diğ., 1995).

Çalışmamızda çimlenme yüzdelerine ilişkin değerlerde düşüş gözlenmiştir. Konsantrasyon artışına paralel olarak çimlenme yüzdesindeki bu düşüş The End EC ve Pomarsol Forte 80 WP için belirgindir. Pestisitler, bitkileri çeşitli etmenlere karşı korumaları gibi olumlu etkilerinin yanı sıra, önerilen dozun aşılması durumunda biyotik strese neden olarak bitki metabolizması üzerinde birtakım değişikliklerede yol açmaktadır (Levitt, 1980). Pestisitlerin yapısında bulunan iyon ve moleküller, bazı enzimlerin katalitik etkisini engellemekte ve çimlenmede olumsuz bir etki meydana getirmektedir (Hopkins, 1995). Çimlenme değerlerindeki düşüşün, pestisitlerin içerdiği iyonların etkisiyle olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda pestisit uygulamasının mitoz bölünme evrelerinde azalmalar meydana getirdiği saptandı. Özellikle 0,16 M Pomarsol Forte 80 WP ve 9,6 M ve 19,2 M Arrivo 25 EC konsantrasyonlarında mitoz bölünmenin her evresinde hücre sayısı kontrole göre belirgin bir azalma gösterdi.

Bitkilerdeki mitotik bölünmedeki azalmanın bazı faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (Deysson, 1968; Shehata ve diğ., 2000). Bazı araştırıcılar mitotik indeksteki azalmayı herbisitin normal mitoz bölünmede, bölünen hücre sayısını azaltmasına (Badr, 1983; Haliem, 1990); bazıları protein sentezindeki inhibisyonuna (Kim ve Bendixen, 1987; El-Nahas, 2000), bazıları ise DNA sentezindeki inhibisyonuna bağlamışlardır (Badr, 1983; Adam ve diğ., 1990).

Pestisit uygulaması aynı zamanda mitotik anormalliklerde ve anormal hücre yüzdesinde artış gözlendi ve bu artış bütün pestisit konsantrasyonlarında belirgin ve konsantrasyon artışına paralel olarak gerçekleşti. Anafazda mikronükleus oluşumu, vakuol oluşumu, c-mitoz, yapışma, vagrant kromozom ve metafazda ekvator düzleminde kayma en sık gözlenen anormallikler olarak belirendi. Soliman (2004) pestisit uygulaması sonucu oluşan anafaz köprülerinin, kromozomların kırılmasını takiben proksimal kromatid birleşmesi ile oluşabileceğini rapor etmiştir. Çalışmamızda kromozom yapışması olayı görülmüştür, bulgularımız köprü oluşumlarını Grant ve Tomkins'in de belirttiği gibi kromozom kırıklarının yerine kromozom yapışması olayının meydana getirebileceğini desteklemektedir (Grant,1994; Tomkins ve Grant, 1972). Bu gözlemlerimiz Badr (1983) ve Mansour'un (1984) bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Araştırıcılar yapışmanın kromozomların yoğun kromatid kümelerine dönüşmesine yol açtığını ve böylece kromozomların genel yapılarının bozulduğunu rapor etmişlerdir. Mitotik konfigürasyondaki bozulmanın ve düzensiz evre oluşumunun, kromozomların hareket mekanizmasında veya ekvatoral plaktaki yerleşimlerindeki düzensizliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Soliman ve Ghoneam, 2004). Pestisit uygulaması sonrasında gözlenen c-mitoz oluşumunun, pestisitin iğ ipliği oluşumunu inhibe edici özelliğinden kaynaklandığını ve anafaz evresinde gözlenen mikronukleus oluşumunun ise mitozu takiben oluşan kalgın kromozom veya kromozom parçalarından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Mitotik indeks kontrol grubunda Pomarsol Forte 80 WP muamelesi ile kontrole göre neredeyse %50 bir azalma olduğu gözlemlendi. Bu bulgularla tutarlı olarak tohum çimlenmesi gözlemlerimiz boyunca da kök büyümesinin 72 saat sonunda en fazla Pomarsol Forte 80 WP uygulaması ile azaldığı bulundu. Bitki hücrelerinde mitotik indeksi azaltan olası mekanizmalar vardır. Biri G1 fazının baskılanmasından kaynaklanan DNA sentezi baskılanması ile mitotik indekste azalmadır. İkinci muhtemel mekanizma ise G2 fazının baskılanmasıyla hücrenin mitoz bölünmeye

başlamasının engellenmesidir. Mitotik indeksin azalması S fazında DNA sentezinin baskılanması ile de ilişkilendirilebilir (Schneiderman ve diğ., 1971).

Pestisit uygulaması sonrası protein miktarında fungisit ve insektisit uygulamaları ile birlikte konsantrasyon artışına paralel bir azalma, herbisit uygulamasında ise uygulanan 0,4 M'lık konsantrasyonda bir artış, 0,8 M'lık konsantrasyonda ise bir azalma gözlendi. Bu veriler değerlendirildiğinde soya bitkisinin fungisit ve insektisit uygulamalarından etkilenerek yapısal proteinlerinde bir yıkıma uğraması söz konusuyken, 0,8 M'lık herbisit uygulamasının bu strese karşı farklı bir metabolik yol ile cevap vererek bazı proteinlerde artış meydana getirdiğini düşünmekteyiz. Tohum depo proteinlerinin elektroforezinin geleneksel morfolojik yaklaşımlara göre avantajı, gelişme mevsimlerinden bağımsız olması, bitkilerin yetiştirilmesine gerek olmaması, materyalin tüm yıl boyunca elde edilebilir olması, hızlı analiz edilebilmesi, saklanmasındaki kolaylıklar ve ihtiyaç duyulan örneğin az olmasıdır (Dinelli ve Lucchese, 1999). Son yıllarda tohum depo proteinleri moleküler biyoloji çalışmalarında oldukça dikkat çekmektedir. Bunun sebebi ise proteinlerin ifadesi ve birikimleri aşamasının bitkilerde doku ve büyüme evresi yönünden özgün olmasıdır (Goldberg ve diğ., 1989). Pestisit uygulaması sonrası elde edilen tohum depo proteinlerinin SDS-PAGE analizleri fungisit ve insektisit uygulamasının kontrol grubundan ve birbirinden farklı protein profili gösterdi. 0,8 M herbisit uygulaması ayrı protein profili, 0,4 M herbisit uygulaması kontrol grubuna benzer bant görünümü ortaya koydu. Bu nedenle bundan sonra yapılacak çalışmalarda, SDS-PAGE analizi yerine daha hassas ayrım sağlayabilecek Gradient SDS-PAGE, IEF ve 2D analizlerinin tercih edilmesi ile uygulama grupları arasındaki farklılığın daha belirgin bir şekilde ortaya konulabileceği düşünülmektedir.

Tekrarlanabilir ve güvenilir PZR ürünleri veren 18 adet RAPD primeri ile yapılan tarama sonucunda, 7 adet RAPD primeri tüm gruplar arasında kontrol grubuna göre monomorfik bant profili, 11 RAPD primeri ise kontrol grubuna göre polimorfik bant profili gösterdi. Polimorfik bant profili gösteren 11 primerin RAPD amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren bütün primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü hesaplandı ve 146 ile 1077 baz çifti büyüklüğü arasında değişen toplam 62 adet polimorfik bant tespit edildi. Değerlendirmeye alınan 18 RAPD primeri, toplam 308 adet bant verdi. Bu bantlardan 62 adedi polimorfik, 246 adedi monomorfik bantlardır. Primerlerin reaksiyon sonucunda oluşturduğu çoğaltım ürünlerinin sayısı 6 ile 30 arasında değişmektedir. Bu veriler esas alındığında, elde edilen bantların %20'sinin

polimorfik olduğu belirlendi. Genomik kalıp stabilitesi değeri ise en fazla Arrivo 25 EC uygulaması ile azalmış, Pomarsol Forte 80 WP uygulamasından ise çok az etkilenmiştir. Uygulama grupları arasındaki genetik mesafeye dayalı olarak UPGMA metodu ile populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendograma göre fungisit uygulaması genetik farklılığa çok az etki ederek en yakın genetik mesafeye sahip oldu. Herbisit uygulaması kontrol grubuna göre genetik olarak farklılık gösterirken, insektisit uygulaması kontrol grubuna göre genetik olarak en uzak uygulama grubu olarak bulundu. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz RAPD verilerine göre tüm pestisit grupları ile muamele edilmiş kök uçlarındaki genomik DNA'nın bazı özel bağlanma bölgelerinin DNA hasarından kaynaklanan yapısal modifikasyonlar sonrası bazı oligonükleotid primerlere karşı erişilebilir hale gelmiş olabileceği düşünüldü. Çünkü yeni bantların ortaya çıkması DNA tamiri ve replikasyonunun etkinliği, DNA hasarının düzeyine bağlı olarak genomik kalıp stabilitesinin azalması sonucu olabilir (Ateinzar ve diğ., 1999).

DNA sıralamasını belirlemede ve moleküler tanımlamada kullanılan RAPD yönteminin başarısını, az miktardaki DNA ile yüksek oranda polimorfizm tespiti oluşturmaktadır (Williams ve diğ., 1990). Bitkilerin strese verdikleri yanıtlara göre genetik yapılarındaki çeşitliliği araştırmada RAPD'den yararlanılması uygundur. Çünkü RAPD belirleyicileri, diğer DNA belirleyici sistemleriyle karşılaştırıldığında kısmen hızlı, ucuz ve kolay bir yöntem olmakla birlikte, primerlerin bağlanma bölgelerine doğru olarak bağlanamaması sonucu, bazı düşük yoğunluklu bantların farklı PZR reaksiyonlarında oluşmadığı görülebilmektedir. Kullanılan kalıp DNA'nın yetersiz olarak hazırlanmış olması, RAPD belirteçlerinin tekrarlanabilirliğindeki aksamaların diğer önemli sebebidir (Xiao ve Hiroshi, 209). Bu problem, PZR koşullarının doğru olarak ayarlanması, dolayısıyla primerlerin bağlanma bölgeleriyle doğru olarak eşleştirilmesi ve iyi bir saflıkta, uygun konsantrasyonda DNA kullanılmasıyla ortadan kaldırılabilmektedir.

DNA dizileri, temel olarak filogenetik çalışmalarda, örnekler arasındaki ilişkileri incelemek amacıyla çoğaltılmaktadır. Yöntem, tanımlanmış kısa bölgelerin nükleotid dizilimini belirlemeyi ve bu dizilimlerin başka bir sistematik grupta yer alan örneklerdeki değişimine bağlı, sistematik analizlerini içermektedir. Son yıllarda dizi analizlerinde, spesifik DNA kısımlarının çoğaltılmasında PZR tekniğinin ve dizi analizlerinde otomasyonun sağlanması nedenleriyle büyük ilerlemeler olmuştur.

Çalışmamızda pestisit uygulaması sonucu klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarlarında bir azalma gözlendi. Toplam klorofil miktarı Pomarsol Forte 80 WP uygulamasında kontrol'e göre %29, Arrivo 25 EC uygulamasında %51, The End EC uygulamasında %64 azalmıştır. Karotenoid miktarı Pomarsol Forte 80 WP uygulamasında kontrol'e göre %21, Arrivo 25 EC uygulamasında %26, The End EC uygulamasında %45 azalmıştır. Bu veriler değerlendirildiğinde özellikle The End uygulamasının klorofil ve karotenoid miktarında meydana getirdiği azalma istatistiki açıdan daha önemli olduğu görülmüştür. Pestisit kullanımının klorofil miktarını azalttığı, CO_2 fiksasyonunu engellediği, Hill reaksiyonu ve Elektron taşınım sistemine olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (Hopkins, 1995). Klorofil ve karotenoid değerlerindeki düşüşün, pestisitlerin etkisiyle CO_2 fiksasyonunun engellenmesi, Hill reaksiyonu ve elektron taşınım sisteminin bozulmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Günümüzde yapılan bilimsel çalışmalar pestisitlerin daha güvenilir ve çevre için daha uygun olmasını amaçlamaktadır. Pestisit kullanımında izlenecek yol, bu ürünler hakkında her türlü bilginin sağlıklı olarak ortaya konulması ve bu bilgiler ışığında yapılacak eğitimlerle tarım ilaçlarının en iyi şekilde kullanımının sağlanmasıdır. Pestisitlerin etkili olabilmeleri için biyolojik aktivitelerinin güçlü olması gerekir ancak insan, hayvan ve çevre sağlığına zarar vermeyecek şekilde kurallara uygun kullanılmaları gerekir.

İyi bir pestisit; biyolojik olarak aktif olmalı, etkili olmalı, yeteri kadar stabil olmalı, kullanıcılar açısından, üçüncü şahıslar açısından, tüketiciler açısından ve besi hayvanları açısından güvenilir olmalı, yabani hayata ve faydalı organizmalara zararlı olmamalıdır. Bilinçsiz ve tavsiye dışı aşırı dozda ilaç kullanımının insan sağlığı üzerinde etkileri üretici kitlelere en iyi şekilde anlatılmalıdır. Zirai mücadele faaliyetleri, zararlı ve hastalık etmenlerine karşı birbirlerini tamamlayıcı, ekosistemdeki dengeyi koruyucu, zararlıların sadece ekonomik zararlarını önleyici şekilde seçilen entegre mücadele yöntemleri ile homojen olarak, zamanında ve tekniğine uygun olarak gerçekleştirilmelidir. Hastalık ve zararlılara karşı az miktarda pestisitle en uygun zamanda mücadele yapılarak ürünlerin korunması sağlanmalıdır.

Bugün için tarımda pestisit kullanımından tamamen vazgeçmek mümkün değildir. Ancak organizmalar üzerinde mutajenik, teratojenik veya kanserojenik etkileri olduğu bilinen pestisitlerin bu zararlarını mümkün olduğunca azaltacak önlem ve uygulamalara önem verilmelidir.

Bitki ve çevre için çoğunlukla toksik etkili olan pestisitlerin daha az kullanımı ve zararın en aza indirilmesi için, diğer destekleyici tarımsal uygulamaların kullanımı büyük oranda teşvik edilmeli, bu kimyasallara alternatif olabilecek yeni maddelerin kullanımı desteklenmeli, yüksek risk taşıyan kimyasalların kullanımı azaltılmalı ve kimyasal madde kullanımının anlamı genişletilmeli ve üreticilere anlatılmalıdır.

Elde ettiğimiz sonuçların fungisit, herbisit ve insektisit türü zirai mücadele maddelerinin de içinde bulunduğu pestisitlerin bitkiler üzerinde yarattığı etkilerin araştırıldığı birçok çalışmanın sonuçları ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Soya tarlalarında rutin olarak kullanılan bazı pestisitlerin soya bitkisinde genotoksik ve sitotoksik etkiler meydana getirebileceği tespit edilmiştir. Soyanın gıda sektöründeki önemi düşünülerek tüm bu sonuçlar ışığı altında üreticilerin özellikle doz aşımı konusunda bilinçlendirilmelerinin son derece önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

Adam Z. M., Ebad Z. A., Elkheir A., Alterations in nucleic acids, protein content and mitotic division of *Vicia faba* root tip cells as affected by malathion and tamaron insecticides, *Cytologia,* 1990, **55**, 349-355.

Al-Sabti K., Allium test for air and water borne pollution control, *Cytobios*, 1989, **58**, 71-78.

Aksoy O., Ekici N., Dane F., Mitotic changes in root meristems of *Lens culinaris* treated with Fusilade (fluazifop-p-butyl), *Asian Journal of Cell Biology,* 2008, **3**, 34-40.

Aktaç T., Ekinci F., Sıdal U., Sıdal F. E., Endosülfanın mercimek (*Lens esculanta)* kök ucu hücreleri üzerindeki etkileri, *Tr. J. Biology*, 1994, **18**, 27-37.

Ami B. H., Haim S. A., Direct effect of phosphamidon on isolated working rat heart electrical and mechanical function, *Toxicol Apply. Pharmacol.,* 1992, **110,** 429-434.

Amin A., Cytotoxicity testing of sewage water treatment using *Allium cepa* chromosome aberrations assay, *Pakistan Journal of Biological Sciences,* 2002, **5**, 1184-1888.

Angelis K. J., McGuffie M., Menke M., Schubert I., Adaption to alkylation damage in DNA measured by the comet assay, *Environ. Mol. Mutagen*, 2000, **36**, 146-150.

Antonsie-wiez D., Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Leda krin, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 1990, **26**, 79-96.

Arıoğlu H. H., Yağ bitkileri yetistirme ve ıslahı, *Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın.,* 1999, **220**, 204.

Arnon D. I., Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol*., 1949, **24**, 1-15.

Ashton F. M., Zweig G.,Nosan G. W., The effect of certain friaries on CO_2 fixation in red kidney beans, *Weeds*, 1960, **8**, 448-45.

Atamanalp M., Cengiz M., Bir sentetik piretroit insektisit (Cypermethrin)'in sublethal dozlarının *Capoeta capoeta* (Güldenstaedt, 1772)'da hemoglobin, hematokrit ve sediment seviyeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi, *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 2002, **19**, 169-175.

Ateeq B., Farah M. A., Ali M. N., Ahmad W., Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4D and butachlor evaluated by Allium root tip test, *Mutation Research,* 2002, **514**, 105-113.

Atienzar F. A., Cordi B., Donkin M. E., Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae *Palnaria palnata*, *Aquat. Toxicol.,* 2000, **50**, 1-12.

Atienzar F. A., Cordi B., Evenden A. J., Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene, *Environ. Toxicol. Chem.,* 1999, **18**, 2275-2282.

Atienzar F. A., Jha A. N., The randomm amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review, *Mutat. Res*., 2006, **613**, 76-102.

Badr A., Ibrahim A. G., Effect of herbicide glean on mitosis chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems, *Cytologia*, 1987, **52**, 293-302.

Badr A., Mitodepressive and chromotoxic activities of two herbicides in *Allium cepa*, *Cytologia,* 1983, **48**, 451-457.

Baired E., Cooper-Bland S., Waugh R., Demaine M., Powell W., Molecular characterization of inter specific and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, *Mol. Genet.,* 1992, **233**, 469-475.

Barakat H. M., Hassan H. Z., The mutagenic potentialities of some pollutants as revealed by cytological aberrations and protein mutations, *3rd Arab Conf.Modern Biotech.,* Cairo, Egypt, 14-17 December 1998.

Blanco J., Rubio C., Simón C., Increased incidence of Disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH), *Hum. Genet.,* 1997, **99**, 413-416.

Bolstein D., White R. L., Skolnick M., Davis, R. W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, **32**, 314-331.

Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the prencipal of protein-dye binding, *Annual Biochemistry*, 1976, **72**, 248-254.

Brezeanu A. G., Davies D. G., Shimabukuro R. H., Ultrastructural effects and translocation of methyl-2-(4-(2,4-dichlorophenoxy) phenoxy propanoate in wheat (*Triticum aestivum*) and wild oat (*Avena fatua*), *Can. J. Bot.,* 1976, **54**, 2038-2048.

Bruneri E., Synthesis of DNA and mitosis in relation to cell differentiation in the roots of *Vicia faba* and *Lactuca sativa*, *Cytologia*, 1971, **36**, 229-247.

Burton J. D., Gronwald J. W., Somers D. A., Connelly J. A., Gengenbach B. G., Wyse D. L., Inhibition of plant ACCase by the herbicides sethoxydim and haloxyfop, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 1987, **148**, 1039-1044.

Cenkci S., Yildiz M., Ciğerci I., Konuk M., Bozdağ, A., Toxic chemicals-induced gentoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings, *Chemosphere*, 2009, **76**, 900-906.

Chandra S., Chauhan L. K. S., Murthy R. C., Saxena P. N., Pande P. N., Gupta S. K., Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium cepa*, *Science of the Total Environment*, 2005, **347**, 46-52.

Chapco W., Ashton N. W., Martel R. K. B., Antonishyn N., Crosby W. L., A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population-genetics and systematics of Grasshoppers, *Genome*, 1992, **35**, 569-574.

Chauhan L. K. S., Dikshith T. S. S., Sundaraman V., Effect of Deltamethrin on plant cell cytological effects on the root meristems of *Allium cepa, Mut. Res.,* 1986, **171**, 25-30.

Chauhan L. K. S., Saxena P. N., Gupta S. K., Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Environmental and Experimental Botany*, 1999, **42**, 181-189.

Chauhan L. K. S., Saxena P. N., Sundararaman V., Gupta S. K., Diuron induced cytological and ultrastructural alterations in the root meristem cells of *Allium cepa*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1998, **62**, 52-163.

Chopra S., Singh R. P., Effect of gamma rays and 2,4-D on germination, growth and morphogenetic responses in *Guizotia abyssinica*, *Phytomorphology*, 1978, **92**, 82-87.

Cireli B., Kök büyümesinin inhibisyona uğratıldığı şartlarda hücrelerde meydana gelen strüktürel değişikliklerin elektron mikroskopla tetkiki ve bu değişikliklerin amino asit muhteviyatı bakımından ilişkileri, *Ege Üniv. Fen Fak. İlmi Raporlar Serisi*, 1973, **142**, 12-36.

Conte C., Mutti I., Puglisi P., Ferrarini A., DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution, *Chemosphere,* 1998, **37**, 2739-2749.

Cortes J. L., Pham X. Y., Tounsi A., Mass effects in weak decays of heavy particles, *The American Physical Society*, 1982, **25**, 188-194.

Coşkun E., Özörgücü B., Gönüz A., Tort N., Decis'in (İnsektisit) Soğan (*Allium cepa* L.) kökü meristem hücreleri üzerine etkileri, *XII. Ulusal Biyoloji Kongresi,* Edirne, Türkiye, 6-8 Temmuz 1994.

Crafts A. S., Yamaguchi, A., Absorbtion of herbicides by roots, *American Journal of Botany*, 1960, **47**, 248-255.

Dane F., Dalgıç Ö., The effects of fungicide benomyl (Benlate) on growth and mitosis in onion (*Allium cepa* L.) root apical meristem, *Acta Biologica Hungarica*, 2005, **56**, 119-128.

Dawson I. K., Chalmers K. J., Waugh R., Powell W., Detection and analysis of genetic-variation in *Hordeum Spontaneum* populations from Israel using RAPD markers, *Molecular Ecology*, 1993, **2**, 151-159.

De Marco A., De Simone C., Raglione M., Importance of the type of soil for the induction of micronuclei and the growth of primary roots of *Vicia faba* treated with the herbicides atrazine, glyphosate and maleic hydrazide, *Mutat. Res.*, 1992, **279**, 9-13.

De Serres F. J., Development of a specific-locus assay in the ad-3 region of two-component heterokaryons of Neurospora: a review, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1992, **20**, 225-245.

Delen N., Durmuşoğlu, E., Güncan A., Güngör N., Turgut C., Burçak A., Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve duyarlılık azalışı sorunları, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 3-7 Ocak 2005.

Delen N., *Fungisitler*, 1. Baskı, Nobel Yayınevi, İzmir, 2008.

Delen N., Kınay P., Yıldız F., Yıldız M., Altınok H. H., Uçkun Z., Türkiye tarımında kimyasal savaşımın durumu ve entegre savaşım olanakları, *Türkiye Ziraat Mühendisligi 7. Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 11 - 15 Ocak 2010.

Delen, N., Tosun N., Toros S., Öztürk S., Yücel A., Çalı S., Tarım ilaçları kullanımı ve üretimi, *T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları*, 1995, **26**, 1015-1028.

Deysson P., Antimitotic substances, *Inter. Rev. Cytol.,* 1968, **24**, 1-99.

Dinelli G., Lucchese C., Comparison between capillary and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of Lolium species and cultivars, *Electrophoresis*, 1999, **20**, 2524-2532.

Duffard A. M. E., Peretti A. F., Castro S., Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid butyl ester on chick liver, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1993, **25**, 204-211.

El-Ghamery A. A., El-Nahas A. I., Mansour M. M., The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*, *Cytologia*, 2000, **55**, 209-215.

El-Khodary S., Habib A., Haliem A., Effect of the herbicide tribunil on root mitosis of *Allium cepa*, *Cytologia*, 1990, **55**, 209-215.

El-Nahas A. I., Mutagenic potential of imazethapyr herbicide (Pursuit) on *Vicia faba* in the presence of urea fertilizer, *Pakistan J. Biol. Sci.*, 2000, **3**, 900-905.

El-Shabhaby O. A., Abdel Migid H. M., Soliman M. I., Mashaly I. A., Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2003, **6**, 23-28.

Ellis R. H., Barrett S., Alternating temperatures and rate of seed germination in lentil, *Annals of Botany*, 1994, **74**, 519-524.

Ellis R. H., Roberts E. H., Summerfield R. J., Cooper J. P., Environmental control of flowering in barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Rate of development as a function of temperature and photoperiod and its modification by low temperature vernelization, *Ann. Bot.,* 1988, **62**, 145-158.

Evseeva T. I., Geras'kin S. A., Shuktomova I. I., Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of Allium-test, *Journal of Environmental Radioactivity*, 2003, **68**, 235-248.

Fafona B., Vekemans X., Jardin P., Baudoin J. P., Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers, *Euphytica*, 1997, **95**, 157-165.

Fayez K.A., Gerken I., Kristen U., Ultrastructural responses of root caps to the herbicides chlorsulfuron and metsulfuron methyl, *Pl. Soil*., 1994, **161**, 1-8.

Fayez K. A., Kristen U., The influence of herbides on the root growth and proline content of primary roots and on the ultrastructure of root caps, *Environ. Exp. Bot.,* 1996, **36**, 71-81.

Fedtke C., Biochemistry and physiology of herbicide action, *Springer-Verlag*, Berlin, Germany, 15-18 February 1982.

Flaburiari A., Kristen U., The influence of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl on root growth and on the ultrastructure of root tips of germinating maize seeds. *Plant Soil*, 1996, **180**, 19-28.

Gazzoni D. L., Tropical Soybean: Improvement and production*, Plant Production and Protection Series*, 1994, **27**, 1-17.

Ghafoor A., Ahmad Z., Qureshi A. S., Bashir M., Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. Radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE, *Euphytica*, 2000, **123**, 367-378.

Goldberg R. B, Barker S. J., Perez-Grau L., Regulation of gene expression during plant embryogenesis, *Cell*, 1989, **56**, 149-160.

Grant W. F., The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens, *Mutation Research*, 1994, **310**, 175-185.

Grossman K., Kwiatkowski J., Tresch S., Auxin herbicides induce H_2O_2 overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.), *J. Exp. Bot.,* 2001, **52**, 1811-1816.

Grover I. S., Tyagi P. S., Cytological effects of some common pesticides in barley, *Environmental and Experimental Botany*, 1979, **20**, 243-245.

Güven A., Yürekli K., Bazı bitkilerde klorofil a ve b miktarlarına Penoksalin'in etkisi, *Canlılar ve Çevre,* 1989, **1**, 5-97.

Haliem A. S., Cytological effects of the herbicide sencor on mitosis of *Allium cepa, Egypt. J. Bot*., 1990, **33**, 93-104.

Hamrick J. L., Godt M. J. W., Murawski D. A., Loveless M. D., Correlation between species traits and allozyme diversity, Editors: Falker D. E., Holsinger, K. E., *Implications for conservation biology*, Oxford University Press, U.K., 1991.

Higgins T. J. V., Synthesis and regulation of major proteins in seeds, *Ann. Rev. Plant Physiology,* 1984, **35**, 191-221.

Hopkins W. G., Introduction to Plant Physiology, *John Wiley&Sons*, 1995, **449**, 115-271.

Işıl İ, Ünal M., Ünsal, N. P., Effects of Spermidine, Spermine and Cyclohexylamine on mitotic activity of 2X, 4X and 6X wheats, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2004, **3**, 83-88.

İnce H., Bitki preparasyon teknikleri, *Ege Üniv. Fen Fakültesi Yayınları*, 1989, **127**, 73-76.

Jain A. K., Sarbhoy R. K., Cytogenetical studies on the effect of some chlorinated pesticides effect on somatic chromosomes of *Lens* and *Pisum, Cytologia,* 1987, **52**, 47-53.

Jain S., Srıvastava J. P., Guotam P. L., Evaluation Of Genetic Resources Of Wheat For Salt Stress Tolerance, *Proceeding 6th International Wheat Genetics Symposium*, Kyoto, Japan, 28 November-3 December 1983.

Kantarcı M., Global BKÜ pazarı ve Ar-ge, *Tarım İlaçları Kongre ve Sergisi,* Ankara, Türkiye, 25-26 Ekim 2007.

Kara M., Şandan M. A., Ateş A., Cytogenetic effects of the insecticide Cypermetyrin on the root meristems of *Allium cepa* L., *Tr. J. Biology*, 1994, **18**, 323-331.

Karaca İ., Ay R., Karaca G., Pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri, *Hasad*, 2003, **245**, 86-89.

Karakoç Ö., Nak N., Boğlu İ., Ditiyokarbamat pestisitleri ve tayin yöntemleri, *BAÜ FBE Dergisi*, 2001, **12**, 112-135.

Kıss G. B., Csanadi G., Kalman K., Kalo P., Okresz L., Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers, *Molecular and General Genetics*, 1993, **238**, 129-137.

Kim J. C., Bendixen L. E., Effects of Haloxyfop and CGA-82725 on cell cycle and cell division of oat (*Avena sativa*) root tips, *Weed Sci.,* 1987, **35**, 769–774.

Kong M. S., Ma T. H., Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays, *Mutation Research*, 1999, **426**, 221-228.

Koornneef M., O'Brien S. J., *Genetic maps*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1990.

Köksal N., Cansev A., Gülen H., İpek A., Eriş A., Bazı yerel fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinin arasındaki akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi, *XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi,* Eskişehir, Türkiye, 31 Ağustos-2 Eylül 2006.

Kumar G., Singh R. P., Sushila nitrate assimilation and biomass production in *Sesamum indicum* L. seedlings in a lead enriched environment, *Water Air Soil Pollution*, 1991, **66**, 163-171.

Kumar R., The technique of polymerase chain reaction technique, *Methods in Cell and Molecular Biology*, 1989, **1**, 133-152.

Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, T4, *Nature*, 1970, **227**, 680-685.

Levan A., The effect of colhicine on root mitoses in *Allium*, *Hereditas,* 1938, **24**, 471-486.

Levitt J., Responses of plants to environmental stresses, *Academic press*, 1980, **1**, 3-18.

Linchtenthaler H. K., The stress concept in plants, *Annals of New York Academy of Sciences*, 1998, **851**, 187-198.

Liu B. H., Statistical genomics, linkage, mapping and QTL analysis, *CRC Press*, 1998, **7**, 62-75.

Liu K.S., *Soybeans*, 1st ed., Chapman and Hall, New York, 1997.

Liu W., Li P., Qi X., Zhou Q., Zheng L., Sun T. H., Yang Y.S., DNA changes in barely (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD, *Chemosphere,* 2005, **61**, 158-167.

L'vova T. S., Mutagenic action of 5 prospective pesticides on mouse bone marrow, in a culture of human perypheral blood lymphocytes and on Saccharomyces yeast, *Tsitol. Genet*., 1984, **18**, 455-457.

Ma T. H., Xu Z. D., Xu C., McConnell H., Rabago E. V., Arreola G. A., Zhang H., The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mutation Research*, 1995, **334**, 185-195.

Macgowan A. P., Odonaghue K., Nicholls S., Mclauchlin J., Bennet P. M., Reeves D., Typing of *Listeria* spp by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, *Journal of Medical Microbiology*, 1993, **38**, 322-327.

MacLeod R. M., Influence of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone, *Endocrinology,* 1969, **85,** 916-923.

Mansour K. S., Cytological effects of the herbicide Tribunile on *Vicia faba*, *Egypt. J. Bot.,* 1984, **27**, 191-198.

Mayers J. R., Davis J. W., Kean D., Yorgey B., Genetic analysis of processing traits in green bean (*Phaseolus vulgaris*), *Acta Hort.,* 2004, **637**, 369-375.

Melchior H., A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien, *Gebruder Borntrager*, 1964, **2**, 650.

Michelangeli F., Robson M.J., East J. M., Lee A. G., The conformation of pyrethroids bound to lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, **1028**, 49-57.

Miller G. T., *Sustaining the Earth*, 6th ed., Thompson Learning, California, 2004.

Miller P. C. H., Agricultural sprayer design to minimize environmental contamination, *Royal Society of Chemistry,* 1991, **4**, 308-331.

Nei M., Genetic distance between populations, *Am. Nat.*, 1972, **106,** 283-292.

Ouzounidou G., Moustakas M., Eleftheriou E. P., Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves, Arc. Env. Toxic., 1997, **32**, 154.

Özcan S., Gürel E., Babaoğlu M., *Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, 1.Baskı, S.Ü. Basımevi, Konya, 2001.

Özmen Y., AB müktesabatına göre hazırlanan bitki koruma ürünlerinin piyasaya arzı ile ilgili yönetmelik'in genel bir degğerlendirilmesi, *Tarım İlaçları Kongre ve Sergisi*, Ankara, Türkiye, 25-26 Ekim 2007.

Özörgücü B., Gönüz A., Demiray H., Antrakol'ün tütün üzerindeki etkileri, *X. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 18-20 Temmuz 1990.

Öztürk İ., Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisinde Metalaxyl'in stomalar üzerine etkisi, *Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2007, **28**, 28-39.

Öztürk İ., Tort N., Pyrimethanil uygulamalarının domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisi yaprağında oluşturabileceği fizyolojik değişikliklerin belirlenmesi ve ürün miktarı üzerine etkisi, *Alatarım*, 2006, **5**, 15-22.

Öztürk, S., *Tarım İlaçları*, 2. Baskı, Ak Basımevi, İstanbul, 2007.

Padmaja K., Parsad D. D. K., Parsad A. R. K., Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedling by cadmium acetate, *Photosynthetica,* 1990, **24**, 399-404.

Padmesh P., Sabu K. K., Seeni S., Pushpangadan P., The use of RAPD in assessing genetic variability in *Andrographis paniculata* Nees, a hepatoprotective drug, *Curr. Sci.,* 1999, **76**, 833-835.

Panda B. B., Sahu U. K., Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells od *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfotion, *Cytobios*, 1985, **42**, 147-155.

Pastori G. M., Foyer C. H., Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress, *Plant Physiology*, 2002, **129**, 460-468.

Patil B. C., Bhat G. I., A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosomal aberrations on lateral root meristems in *Clitoria ternatea* L., *Cytologia*, 1992, **57**, 259-264.

Patra J., Sahoo M. K., Panda B. B., Persistence and preventation of aliminium-and paraquat-induced adaptive response to methyl mercuric chloride in plant cells, *Mutation Research*, 2003, **538**, 56-61.

Pavlica M. D., Nagy, P. B., 2,4-D causes chromotine and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells, *Dept. Mol. Biol. Fac. Of Sci.,* 1991, **263**, 77-81.

Pavlica P., Besendorfer V., Rosa J., Papes D., The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur* L.) and shallot (*Allium cepa* var. ascalonicum), *Chemosphere*, 2000, **41**, 1519-1527.

Peixoto A. A., Hall J. C., Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of Drosophila, *Genetics,* 1998, **148**, 827-838.

Pinheiro C., Chaves M. M., Ricardo C. P., Alterations in carbon and nitrogen methabolism induced by water deficit in the stems and leaves of *Lupinus albus, L. J.Exp. Bot.,* 2001, **52**, 1063-1070.

Rank J., Lopez L. C., Nielsen M. H., Moretton J., Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEPH in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories, *Hereditas,* 2002, **136**, 13-18.

Rank J., Nielsen M. H., Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay, *Mutation Research*, 1998, **418**, 13-119.

Ruiz-Santaella J. P., Bakkali Y., Fischer A. J., De Prado R., Is it possible to detect *Echinochloa spp*. tolerance to ACCase-inhibiting herbicides using a simple quick tolerance test?, *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.,* 2003, **68**, 331-4.

Sammonur R. H., Using electrophoretic techniques in varietal identification, biosystematic analysis, phylogenetic gelations and genetic resources management, *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 1991, **4**, 221-226.

Sasaki S., Kozlowski T. T., Torrie J. H., Effect of pretreatment of pine seeds with herbicides on seed germination and growth of young seedlings, *Canadian Journal of Botany,* 1968, **46**, 255-262.

Savva D., DNA fingerprinting as a biomarker assay in ecotoxicology, *Toxicol. Ecotoxicol. News Rev.,* 1996, **3**, 110-114.

Savva D., Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1998, **41**, 103-106.

Saxena P. N., Chauhan L. K. S., Gupta S. K., Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: Spectroscopic basis of chromosome damage, *Toxicology*, 2005, **216**, 244-252.

Schneiderman N., Pearl L., Wilson W., Metcalf F., Moore J. W., Swadlow H. A., Stimulus control in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as a function of different intensities of intracranial stimulation, *Journal of Comparative Physiology*, 1971, **76**, 175-86.

Sharma C., Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals, *Current Science*, 1983, **52**, 1000-1002.

Sharples C. R., Hull M. R., Cobb A. H., Growth and Photosynthetic characteristics of two biotypes of the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) resistant and susceptible to the herbicide Chlorotoluron, *Annals of Botany*, 1997, **79**, 455-461.

Shehata M. M., Habib A., Khalifa N. S., Salama M. S., Cytological and biochemical effects of 5-florouracil and colchicine on *Vicia faba* plants, *Egypt. Biotech*., 2000, **7**, 218-233.

Singh R. M., Verma R. S., Effect of seeding rate and row spacing on the yield and quality of lentil (*Lens culinaris*) varieties, *Indian Journal of Agronomy*, 1999, **44**, 584-587.

Smaka-Kincl V., Stegnar P., Lovka M., Toman M. J., The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure, *Mutation Research,* 1996, **368**, 171-179.

Smilanick J. L., Gouin-Behe T., Margosan D. A., Bull C. T., Pathogenicity on citrus of *Pseudomonas syringae* strains that control postharvest green mold of citrus, *Phytopathology*, 1996, **86**, 33.

Soliman M. I., Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss.) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay, *Journal of Biological Sciences,* 2001, **1**, 1021-1027.

Soliman M. I., Ghoneam G. T., The mutagenic potentialities of some herbicides using *Vicia faba* as a biological system, *Biotechnology*, 2004, **3**, 140-154.

Steinkellner H., Kassie F., Knasmuller S., Tradescantia-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water, *Mutat. Res.,* 1999, **426**, 113-116.

Steinkellner H., Kong M. S., Helma C., Ecker S., Ma T. H., Horak O., Kundi,M., Knasmüller S., Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* 1998, **31**, 183-191.

Stelzer K. J., Gordon M. A., Interactions of pyrethroids with gramicidincontaining liposo mal membranes, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1988, **938**, 114-120.

Stiles J. I., Lemme C., Sondur S., Morshidi M. B., Manshardt R., Using randomly mplifıed polymorphic DNA for evaluating genetic-relationships among papaya cultivars, *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, **85**, 697-701.

Tekin F., Bozcuk S., *Helianthus annuus* L. var. Santafe (Ayçiçegi) tohumlarının çimlenmesi ve erken büyüme üzerine tuz ve dışsal stresin etkileri, *Tr. J. of Biology*, 1998, **22**, 331-340.

Theodorakis C. W., Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment, *Ecotoxicology*, 2001, **10**, 245-256.

Timlioğlu O., Pestisitlerin insandaki toksisitesi, *I. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu*, Ankara, Türkiye, 18-20 Kasım 1979.

Tiryaki O., Canhilal R., Horuz S., Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2010, **26**, 154-169.

Tomkins D. J., Grant W. F., Comparative cytological effects of the pesticides menazon, metrbromuron and tetrachloro-isophthalonitrile in *Hordeum* and *Tradescantia*, *Can. J. Genet. Cytol.,* 1972, **14**, 245-256.

Topaktaş M., Rencüzoğulları E., Kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde Carbosulfanın c-mitotik etkisi, *12. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Edirne, Türkiye, 06-08 Temmuz 1994.

Tripathi R. K., Schlösser E., Effect of fungicides on the physiology of plants, II. Inhibition of adventitious root formation by carbendazim and kinetin, *Journal of Plant Diseases and Protection,* 1979, **86**, 12-17.

Turabi M. S., Türkiye Cumhuriyeti'nde tarımsal ilaç, tesçil ve ruhsat sistemi, *Tarımsal ilaçlar ve Organik Tarım Konferansı,* Lefkoşa, KKTC, 9 Haziran 2004.

Turabi, M. S., Bitki koruma ürünlerinin ruhsatlandırılması, *Tarım ilaçları Kongre ve Sergisi*, Ankara, Türkiye, 25-26 Ekim 2007.

Uphoff H., Wricke G., Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sugar-beet (*Beta vulgaris* L) - mapping the genes for nematode resistance and hypocotyl color, *Plant Breeding*, 1992, **109**, 168-171.

URL-1: http://www.epa.gov/pesticides, (Ziyaret tarihi: 26 Şubat 2009).

URL-2: http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm, (Ziyaret tarihi: 17 Mart 2010).

URL-3: http://www.pubquizhelp.com/other/dnacalculator, (Ziyaret tarihi: 24 Mayıs 2012)

URL-4: http://www.sigmaaldrich.com/large/structureimages/25/mfcd00008325.png, (Ziyaret tarihi: 04 Eylül 2012).

URL-5: http://www.sigmaaldrich.com/large/structureimages/28/mfcd00055328.png, (Ziyaret tarihi: 04 Eylül 2012).

URL-6: http://www.sigmaaldrich.com/large/structureimages/86/mfcd09028086.png, (Ziyaret tarihi: 04 Eylül 2012).

URL-7: http://www.beyondpesticides.org/dailynewsblog/?p=3019, (Ziyaret tarihi: 11 Mart 2010).

URL-8: http://extoxnet.orst.edu/tibs/movement.htm, (Ziyaret tarihi: 06 Haziran 2009).

URL-9: http://www.dogainsanisbirligidernegi.org.tr/makaleler/pestisitler.doc, (Ziyaret tarihi: 14 Temmuz 2011).

Van't Hoff J., The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase exised root meristems, *Experimental Cell Research*, 1968, **51**, 167-176.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reıjans M., Van De Lee T., Hornes M., Fritjers A., Pot J., Peleman J., Kupier M., Zabeau M., AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**, 4407-441.

Wakabayashi K., Böger P., Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 2): Amino acid, lipid and cell wall biosynthesis, and other targets for future herbicides, *Weed Biology and Management*, 2004, **4**, 59-64.

Webster P. L., Davidson D., Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicine and Indol-3yl-acetic acid in *Vicia faba* roots, *Journal of Experimental Botany*, 1969, **34**, 671-685.

Weiss E. A., *Oilseed Crops*, 2nd ed., Blackwell Science Ltd., Oxford, 2000.

Welsh J., McClelland M., Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers, *Nucleic Acid Res.* 1990, **18**, 7213-7218.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**, 6531–6535.

Wu F., Zhang G., Dominy P., Four barley genotypes responddifferently to cadmium: Lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity, *Environ. Exp. Bot.*, 2003, **50**, 67-78.

Xiao L.Y., Hiroshi M., Susceptibility of a broad-leaved weed, *Acanthospermum hispidum*, to the grass herbicide fluazifop-butyl, *Weed Biol. Manag*., 2002, **2**, 98-102.

Yıldız M., Arıkan E. S., Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase–telophase chromosome aberration assay, *Caryologia*, 2008, **61**, 45-52.

Yıldız M., Ciğerci I. H., Konuk M., Fidan A. F., Terzi H., Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays, *Chemosphere*, 2009, **75**, 934-938.

Yıldız M., Gürkan M. O., Turgut C., Kaya Ü., Ünal G., Tarımsal savaşımda kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 25-26 Mayıs 2005.

Yüzbaşıoğlu D., Ünal F.,Sancak C., İlloksan herbisitinin *Allium cepa* L.'da genotoksik etkileri, *Turk. J. Biol.*, 2009, **33**, 283-290.

Yu L. X., Nguyen H. T., Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza Sativa* L), *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, **87**, 668-672.

Zhou X., Fan, Y. L., The endosperm-specific expression of a rice prolamin chimaeric gene in transgenic tobacco plants, *Transgenic Research*, 1993, **2**, 141-146.

Zuckerkandl E., Pauling L., Molecules as documents of evolutionary history, *J. Theor. Biol.,* 1965, **8**, 357-366.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Aksoy Ö., **Deveci A.**, Bazı pestisitlerin *Begonia semperflorens*'de polen çimlenmesi üzerine etkilerinin incelenmesi, *X. Ekoloji ve Çevre Kongresi*, Çanakkale, Türkiye, 4-7 Ekim 2011.

Aksoy Ö., **Deveci A.**, Tütünoğlu B., Genotoxic effects of Sportak on sweet corn (*Zea mays* L. Var Saccharata Sturt Cv. Merit)*, Moleküler Biyoloji Derneği 1. Uluslararası Kongresi,* İstanbul, Türkiye, 23-24 Kasım 2012.

Aksoy Ö., Erbulucu T., **Deveci A**., Tütünoğlu B., Duman N., Sportak'ın mısır (*Zea mays*) üzerindeki bazı morfolojik ve anatomik etkilerinin belirlenmesi, *Ekoloji 2011 Sempozyumu*, Düzce, Türkiye, 5-7 Mayıs 2011.

Deveci A., Aksoy Ö., Al G., The effect of Quizalofop-P-Ethyl on pollen germination of *Hyacinthus orientalis* (Liliaceae), *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.

Erbulucu T., Özen F., Aksoy Ö., **Deveci A**., Tükenme tehlikesinde olan *Amsonia orientalis* decne. (Apocynaceae)'in genetik çeşitliliğinin SDS-PAGE ile belirlenmesi, *1. Ulusal Disiplinlerarası Çevre Kongresi*, Sakarya, Türkiye, 14-16 Mayıs 2012.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Sakarya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sakarya'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. 2010 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.