KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİBBERELLİK ASİTİN (GA_3) *Allium cepa* L. var. *cepa* (*Alliaceae*) ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

BURÇAK TÜTÜNOĞLU

KOCAELİ 2015

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİBBERELLİK ASİTİN (GA_3) *Allium cepa* L. var. *cepa (Alliaceae)* ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

BURÇAK TÜTÜNOĞLU

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

Doç. Dr. Filiz VARDAR
Jüri Üyesi, Marmara Üniv. .....

Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 22.12.2015

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Dünya nüfusunun kontrolsüz artışına paralel olarak günümüzün en önemli sorunlarının başında ekolojik sistemlerin bozulması ve çevreye bırakılan çeşitli kirleticilerin sebep olduğu olumsuz etkiler gelmektedir. Bitkiler sesil doğaları gereği yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyebilecek birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadır. Stres faktörü ile karşılaşan bitki, stres koşulları ortadan kalktıktan sonra normal yaşama geri dönebilmekte ya da bu stres nedeniyle canlılığını yitirebilmektedir.

Biyotik ve abiyotik kökenli olabilen bu stres faktörleri bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal zararlar oluşturarak, ürün nicelik ve niteliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bitkiler bu olumsuz etkileri azaltmak veya engellemek amacıyla moleküler savunma mekanizmalarına sahiptirler. Stres koşullarında ve farklı toksik kimyasallarla muamele sonucunda bitki genotipinde polimorfizm meydana gelmektedir.

Bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) bir bitkideki bir veya daha fazla fizyolojik olayı kontrol veya modifiye eden, doğal ya da sentetik organik bir bileşiktir. BBD'lerin bir kısmı bitkilerde teşvik edici etkide bulunurken, diğer bir kısmı da engelleyici etkide bulunurlar, bu nedenle kimyasal düzenleyiciler olarak adlandırılmaktadırlar. Ticari amaçla en yaygın kullanılan gibberellik asit olan GA_3'ün bilinçsiz kullanımı da bitkide büyümeyi teşvik etmek yerine engelleyebilmektedir.

Çevresel kirliliğinin toksik etkilerinin belirlenmesinde çeşitli organizmalar biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. Duyarlılıklarının yüksek olması bitkilerin genetik hasarın tespitinde tercih edilme sebebidir. *Allium cepa* L. var. *cepa* (soğan) nın; kromozom sayısının az olması; kromozomlarının büyük, kolay gözlemlenebilir ve boyanabilir olması; kısa zamanda ve hızlı sonuçlar vermesi; çok sayıda mitotik hücre içermesi; kolay ulaşılabilir ve ekonomik olması nedeniyle *Allium* testi önemli avantajlara sahiptir.

Tüm bu avantajlardan dolayı, *A. cepa* mitoz bölünme üzerine fiziksel ve kimyasal mutajenlerin, kirletici etkenlerin, bitki ekstraktları ve benzer etken maddelerin sitogenetik etkilerinin araştırılmasında uzun yıllardır çeşitli araştırıcılar tarafından test materyali olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile biyoindikatör bir bitki olan *A. cepa*'da GA_3'ün meydana getirebileceği sitotoksik etkilerin kromozom anormallik testi ile RAPD PZR genetik analiz yöntemi kullanılarak da genotoksik etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Lisans ve lisansüstü eğitimim ve öğrenimimde, tez çalışmamda bilgi, beceri ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan, beni destekleyen ve karşılaştığım tüm zorlukları aşmamda sonsuz yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Özlem AKSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans döneminde laboratuvar çalışmalarımda ve yüksek lisansımı yaparken tez çalışmalarımda her daim deneyimlerinden yararlandığım, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, manevi desteğini hep hissettiğim, sabretmeyi onunla öğrendiğim iyi niyetli, güzel insan çok değerli hocam Sayın Araş. Gör. Asuman DEVECİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin birçok aşamasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım Biyoloji Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e, bilimsel tecrübeleri ile bana katkıda bulunan Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN'a, bu çalışmayı gerçekleştirirken deneyimlerinden yararlandığım ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Biyoloji Bölümü Öğretim elemanlarından Arş. Gör. Rabia ÖZBEK'e, Arş. Gör. Arda ACEMİ'ye, Arş. Gör. Serdar AKSAN'a ve çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Salih DİKİLİTAŞ'a ve Nadir Ali RIND'e ayrıca manevi desteklerini hep hissettiğim çok değerli arkadaşlarım Biyoloji ABD yüksek lisans öğrencileri Melis ZENGİN, Merve KÖSE, Aylin HOROZAL, Arzu SERTEL, Günce GÖÇ, Sinem BALCI ve Hümeyra ÖZKAN'a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında desteklerini esirgemeyen evlatları olmaktan gurur duyduğum sevgili annem Canan TÜTÜNOĞLU ve sevgili babam Şevki TÜTÜNOĞLU'na, ayrıca her daim yanımda olan ve desteğini her an hissettiğim canım ablam Çağla İLBAKAN'a yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Kocaeli Üniversitesi BAP 2014-020 No'lu proje ile maddi olarak desteklenmiştir.

Aralık – 2015 Burçak TÜTÜNOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER iii
ŞEKİLLER DİZİNİ v
TABLOLAR DİZİNİ vi
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR vii
ÖZET ix
ABSTRACT x
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 5
1.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sınıflandırılması ve Özellikleri 5
1.1.1. Gibberellinler 10
1.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ekosistem ve Canlılar Üzerine Etkileri 13
1.3. *Allium* Testi 15
1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 17
1.5. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu 18
1.5.1. RAPD PZR tekniğinin değişkenleri 19
1.5.2. RAPD PZR tekniğinin avantaj ve dezavantajları 20
1.5.3. RAPD PZR tekniğinin uygulama alanları 22
2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI 23
3. MALZEME VE YÖNTEM 29
3.1. Bitki Materyali 29
3.2. Gibberellik Asit (GA_3) Hakkında Genel Bilgi 29
3.3. Test Materyalinin ve Kimyasalların Hazırlanması 29
3.3.1. *Allium cepa* L. var. *cepa*'nın hazırlanması 29
3.3.2. Gibberellik asit çözeltilerinin hazırlanması 29
3.3.3. *Allium* testinde kullanılan çözeltilerin ve boyanın hazırlanması 30
3.4. Sitolojik İncelemeler 30
3.4.1. Kök inhibisyon testinin uygulanması ve EC_{50} değerinin belirlenmesi 30
3.4.2. Kromozom anormalliği testi 32
3.4.2.1. Fiksasyon, hidroliz, boyama ve preparatların hazırlanması işlemleri 32
3.4.3. Mikroskobik incelemeler 33
3.5. Moleküler İncelemeler 33
3.5.1. Genomik DNA izolasyonu, miktar ve saflık tayini 33
3.5.2. RAPD PZR ve verilerinin değerlendirilmesi 35
3.6. Deneylerde Kullanılan Cihazlar 38
3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi 38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 39
4.1. Morfolojik Bulgular 39
4.1.1. Gibberellik asit için belirlenen EC_{50} değeri 39
4.1.2. Çimlenme yüzdesi değerleri 40

4.2. Sitolojik Bulgular 42
4.2.1. GA_3'ün mitotik indeks üzerine etkileri 42
4.2.2. GA_3'ün *A. cepa*'daki kromozom anormallikleri üzerine etkileri 43
4.3. Moleküler Bulgular 49
4.3.1. gDNA miktar ve saflık dereceleri 49
4.3.2. RAPD profillerinin analizi ve değerlendirilmesi 50
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 62
KAYNAKLAR 69
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER 81
ÖZGEÇMİŞ 82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyolojik birikimle canlı bünyelerindeki konsantrasyon artışları 14
Şekil 2.1. Genotoksik ajanların hücrede oluşturabileceği çeşitli etkiler 25
Şekil 3.1. Farklı GA_3 konsantrasyonları ile muamele edilen A.cepa soğanlarında EC50 değeri belirlenirken kurulan deney düzeneği 31
Şekil 3.2. EC_{50} değeri belirlendikten sonra $EC_{50}/2$, EC_{50} ve 2x EC_{50} konsantrasyonları ile kurulan deney düzeneği 31
Şekil 3.3. DNA izolasyonunda izlenen aşamalar 34
Şekil 4.1. GA_3'ün *A.cepa* üzerindeki etkisi sonucu belirlenen EC_{50} değeri 39
Şekil 4.2. *A.cepa*'da GA_3 uygulaması sonucunda çimlenme yüzdesi değerleri 40
Şekil 4.3. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının mitotik indeks yüzdesi üzerine etkisi 42
Şekil 4.4. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi 43
Şekil 4.5. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının mitotik anormallik yüzdesi üzerine etkisi 45
Şekil 4.6. Kontrolde (0 ppm) normal bölünen hücreler ve kromozom anormallikleri 45
Şekil 4.7. 300 ppm GA_3 konsantrasyonundaki kromozom anormallikleri 46
Şekil 4.8. 600 ppm GA_3 konsantrasyonundaki kromozom anormallikleri 47
Şekil 4.9. 1200 ppm GA_3 konsantrasyonundaki kromozom anormallikleri 48
Şekil 4.10. İzole edilen gDNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü 49
Şekil 4.11. AD-01 ve AD-04 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen monomorfik bant profilleri 51
Şekil 4.12. AD-02, AD-03, AD-05, AD-06, AD-07, AD-08, AD-09, AD-10 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri 52
Şekil 4.13. OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri 53
Şekil 4.14. Çalışmada kullanılan monomorfik ve polimorfik primer sayıları 54
Şekil 4.15. Çalışmada kullanılan primerlerle uygulama gruplarına ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları 55
Şekil 4.16. Çalışmada kullanılan AD ve OPA serisi RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri 56
Şekil 4.17. Çalışmada kullanılan OPA (a) ve AD (b) serisi RAPD primerlerine ait uygulama grupları arasındaki dendrogramlar 59

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Fitohormon çeşitleri, bitkide üretildiği yerler ve ana işlevleri 9
Tablo 3.1. Gibberellik asit (GA_3) dozlarının ayarlanması 30
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan OPA serisi RAPD primerlerinin dizileri ve Tm değerleri 36
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan AD serisi RAPD primerlerinin dizileri ve Tm değerleri 36
Tablo 3.4. RAPD PZR tekniğinde kullanılan bileşenler 37
Tablo 3.5. Optimize edilen RAPD PZR döngüsü 37
Tablo 3.6. Deneylerde kullanılan cihazlar 38
Tablo 4.1. GA_3'ün farklı konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat muamele edilen *A.cepa* soğanlarındaki çimlenme yüzdesindeki değişim 41
Tablo 4.2. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının mitotik indeks yüzdesi üzerine etkisi 42
Tablo 4.3. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının normal bölünen hücrelerdeki mitoz bölünme evrelerine ait ortalama ve standart hata değerleri 44
Tablo 4.4. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının anormal bölünen hücrelerdeki mitoz bölünme evrelerine ait ortalama ve standart hata değerleri 44
Tablo 4.5. İzole edilen gDNA örneklerinin konsantrasyon değerleri 50
Tablo 4.6. Uygulama gruplarına göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi 55
Tablo 4.7. OPA serisi 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) 57
Tablo 4.8. AD serisi 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) 58
Tablo 4.9. Genomik kalıp stabilitesi (GKS, %) değerleri 61
Tablo 5.1. Ülkemiz ve diğer bazı ülkelerde kullanılan BBD'lere ait izin verilen kalıntı limitleri 68

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

Abs	: Absorbans değeri
bp	: Baz çifti
cm	: Santimetre
g	: Gram
g/mol	: Gram/mol
µl	: Mikrolitre
mg/L	: Miligram/Litre
mg/mL	: Miligram/mililitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
ng	: Nanogram
ng/µl	: Nanogram/mikrolitre
nm	: Nanometre
N	: Normalite
OD	: Optik yoğunluk
ppm	: Milyonda bir kısım
U	: Unit/birim
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar

2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksiasetik Asit
A.cepa L. var. *cepa*	: *Allium cepa* L. var. *cepa*
ABA	: Absisik Asit
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
EC_{50} değeri	: Etkin Konsantrasyon Değeri
dH_2O	: Distile Su
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
GA_3	: Gibberellik Asit
gDNA	: Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
GKS	: Genomik Kalıp Stabilitesi
IAA	: İndol Asetik Asit
KA	: Kromozom Anormallikleri Testi
$MgCl_2$	: Magnezyum Klorür
MI	: Mitotik İndeks
MI (%)	: Mitotik İndeks Yüzdesi
MN	: Mikronükleus
NAA	: Naftalin Asetik Asit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RNA	: Ribo Nükleik Asit
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
Tm	: Erime Süresi
UV	: Ultraviyole

GİBBERELLİK ASİTİN (GA_3) *Allium cepa* L. var. *cepa* (*Alliaceae*) ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Gibberellik asit bitkilerde çimlenme, vejetatif büyüme, çiçeklenme ve meyve oluşumunda etkili olan doğal bir bitki büyüme düzenleyicisidir. Bitki büyüme düzenleyicileri, yüksek konsantrasyonda kullanıldıklarında bitki büyümesini ve gelişimini engellemekte ve bitki dokularında anormalliklere neden olmaktadırlar. Tarımda verimi arttırmak amacı ile kullanılabilen bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşitli organizmalar üzerinde toksik etkiler oluşturduğu gözlenmiştir. *A. cepa* kök inhibisyon testi sonucunda, EC_{50} değeri 600 ppm olarak tespit edildi. Sitolojik çalışmalar için 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edilen *A. cepa* kök uçlarının meristematik hücrelerinde mitotik indeks ve kromozom anormallikleri saptandı. *A. cepa* kök ucu çimlenme yüzdesi 1200 ppm GA_3 muamelesi ile kontrol grubu ile kıyaslandığında % 90'dan % 26'ya, kontrol grubunda %18,5 olan mitotik indeks 1200 ppm GA_3 muamelesi ile %12,4'e düştü. Ayrıca mitoz bölünmenin farklı safhalarında ekvator düzleminde kayma, kromozom köprüleri, c-mitoz, nüklear tomurcuk gibi çeşitli anormallikler tespit edildi. RAPD için kullanılan 10 bazlık 20 primerden 234 adet bant elde edildi. Bu bantlardan (OPA serisi primerlerden 95 ile 1059 baz çifti büyüklüğü arasında ve AD serisi primerlerden de 217 ile 1206 baz çifti büyüklüğü arasında değişen) 20'sinin polimorfik olduğu tespit edildi. Elde edilen bantların %8'inin polimorfik olduğu belirlendi. Böylece ülkemizde yaygın olarak kullanılan ve biyosit olarak ta bilinen GA_3'ün hedef ve hedef olmayan organizmalar üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Allium cepa*, *Allium* Testi, Gibberellik Asit, RAPD PZR.

DETERMINATION OF CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF GIBBERELLIC ACID (GA_3) ON *Allium cepa* L. var. *cepa* (*Alliaceae*)

ABSTRACT

Gibberellic acid is a natural plant growth regulator which is effective in germination, vegetative growth, flowering and fruit formation in plants. When high concentrations of plant growth regulators are used, these plant growth regulators inhibit the plant growth and development and cause abnormalities in plant tissue. Plant growth regulators which can be used to increase the yield in agriculture, have been observed to constitute toxic effects on different organisms. EC_{50} value for GA_3 determined as 600 ppm as a result of *A. cepa* root inhibition test. Furthermore, for cytological analysis in meristematic cells of *A. cepa* root tips were treated with GA_3 for 24, 48 and 72 hours and analysed by mitotic index and chromosome aberrations. Percentage of *A. cepa* root tip germination reduced from 90% to 26% with 1200 ppm GA_3, mitotic index reduced from 18,5% to 12,4% with 1200 ppm GA_3 treatment compared to control group. In addition, different kinds of abnormalities (polar slip, chromosome bridges, c-mitoz and nuclear buds) were determined in different phases of mitosis. Total of 20 polymorphic bands were detected ranging between 95 and 1059 (from OPA primers) 217 and 1206 bp (from AD primers) from total of 234 bands obtained from 20 decamer primers used for RAPD and the percentage of polymorphism was detected as 8%. In this way, all of this enabled to understand the effects and mechanisms of action on target and non-target organisms of GA_3 which is known and used as a biocide commonly in our country.

Keywords: *Allium cepa*, *Allium* Test, Gibberellic Acid, RAPD PCR.

GİRİŞ

Canlılar doğaları gereği dış çevre ile sürekli etkileşim halindedir ve içinde bulundukları çevrede uygunsuz koşullar oluşması durumunda adaptasyon eksikliğine bağlı olarak stres koşullarına maruz kalırlar. Çevre şartlarının bir bitkinin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek kadar değişmesi halinde bitkide meydana gelen duruma stres denir (Büyük ve diğ., 2012). Bitkiler yaşamları boyunca biyotik ve abiyotik kökenli birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadır (Levitt, 1972). Biyotik faktörler; mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları sonucu oluşan stres faktörleridir. Abiyotik faktörler ise su, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörleridir (Lichtenhaler, 1996). Bu stres faktörleri bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal zararlar oluşturarak, ürün nicelik ve niteliğini olumsuz yönde etkileyebilir (Büyük ve diğ., 2012).

Tarımsal üretimde ve özellikle de bahçe bitkilerinde kullanılan gibberellinler, çoğunlukla Gibberella fungusundan fermantasyon yoluyla elde edilmektedir. Ticari amaçla en yaygın kullanılan GA_3'tür (Güleryüz, 1982; Walsh, 2003; Westwood, 1993). Malt sanayinde üretimden ve zamandan avantaj sağlamak, şeker kamışı, kereviz ve enginarda hasat verimini artırmak, kabakgillerde cinsiyet özelliğini kontrol etmek ve hibrit tohum üretiminde ebeveyn hatları muhafaza etmek için kullanılırlar. Ayrıca bitkilerde büyüme, gelişme ve bazı bitkilerde dormansinin sona ermesinde kullanılır (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Bitki büyüme düzenleyicilerinden gibberellinler, hem doğal olarak oluşmaları hem de toksik olmamaları nedeni ile biyokimyasal biyositler olarak da adlandırılırlar. Uygulama sonrası, ürün tüketilene kadar çok az düzeyde kalıntı bırakırlar.

Doğal olarak oluştuklarından insanlar doğal gıdalar ile de alırlar (Halloran ve Kasım, 1999; T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2001). Gibberellik asit bitkiler için çeşitli avantajlar sağlarken, hayvanlar üzerindeki etkileri kuşkuludur. GA_3 farelerde dalak ve timusta ayrıca dolaşımda etkili olmakla birlikte, kara kurbağalarında da karaciğer üzerinde etkilidir ve hepatosellular karsinoma nedenidir. GA_3 ayrıca laboratuvar farelerinde böbrek ve karaciğerde olumsuz etkilere neden olur, fakat tümöre neden olmaz. GA'ların sadece Swiss-albino farelerde eşey farklılaşma üzerine etkisi olduğu ve erkek yavru sayısını artırdığı bilinmektedir (Özmen ve diğ., 1995). İnsan lökosit sistemi üzerinde de timidin birleşmesinde etkisizken, üridin birleşmesini % 30-50 oranında baskıladığı bilinmektedir (Farrow ve diğ., 1976).

Allium cepa'nın hava, su ve toprak kirliliğinin neden olduğu muhtemel genetik hasarın belirlenmesinde, hayvan biyotestlerine alternatif olarak ucuz, kolay erişilen ve hızlı cevap veren model bir organizma olduğundan çok tercih edilen biyoindikatör bir bitkidir (Barbério, 2013; Ma ve diğ., 1995; Enan, 2006; Liu ve diğ., 2007; Cenkci ve diğ., 2009). Bitki kök uçları, doğada toprağa ve suya karışan kimyasallara maruz kalan ilk yapılar olduğundan biyolojik testler için çok faydalı materyallerdir. Çünkü *Allium* testi, son derece hassas ve tekrarlanabilir olduğu için kolay uygulanan, nispeten hızlı bir testtir (Fiskesjö, 1995). *A. cepa*; kromozom sayısının az olması, kromozomlarının büyük, kolay gözlemlenebilir ve kolay boyanabilir olması; kısa zamanda ve hızlı sonuçlar vermesi; çok sayıda mitotik hücre içermesi ve ekonomik olması nedeniyle *Allium* testi önemli avantajlara sahiptir (Kuras ve diğ., 2006; Rank, 2003).

US-EPA (Amerika Çevre Koruma Ajansı)'ya göre;

a) Tanımlayıcı testin amacı, doz-cevap ilişkisine bağlı olarak test edilen türlere ait tohum çimlenmesi ve kök uzaması parametreleri için EC_{50} değerini belirlemektir. Test edilen türlerin tohumları 1,5 ve 2,0 arasındaki bir oranda (örneğin, 2, 4, 8, 16, 32, ve 64 mg/L) geometrik bir seri olacak şekilde seçilen kimyasalın en az 6 konsantrasyonuna maruz bırakılmalıdır.

b) Konsantrasyon aralığı, çimlenme ve kök uzaması parametreleri için doz-cevap ilişkisine bağlı olarak EC_{50} değerinin belirlenmesi amacıyla seçilmelidir.
c) Test solüsyonları ve ekstraktlar kullanımdan önce kimyasal konsantrasyonları belirlemek için analiz edilmelidir.
d) Seçilen tohumlarda tarafsız bir şekilde her bir test konsantrasyonuna maruz bırakılmalıdır.
e) En az 10 tohumla ve en az 3 tekrar olacak şekilde her bir konsantrasyon ve kontrol grubu test edilmelidir.

A. cepa, test edilecek türler arasındadır. US-EPA'ya göre fiziksel ve kimyasal mutajenlerin toksisitesini saptamak için kullanılabilecek bitki türleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

1- *Lycopersicon esculentum* (domates)
2- *Cucumis sativus* (hıyar)
3- *Lactuca sativa* (marul)
4- *Glycine max* (soya fasulyesi)
5- *Brassica oleracea* (lahana)
6- *Avena sativa* (yulaf)
7- *Lolium perenne* (çokyıllık İngiliz çimi)
8- *Allium cepa* (soğan)
9- *Daucus carota* (havuç)
10- *Zea mays* (mısır)

Bu nedenle, mitoz bölünme üzerine fiziksel ve kimyasal mutajenlerin, kirletici etkenlerin, bitki ekstraktları ve benzer etken maddelerin sitogenetik etkilerinin araştırılmasında uzun yıllardır çeşitli araştırıcılar tarafından test materyali olarak kullanılmaktadır. *Allium* testinin, memeli test sistemleri ile benzer sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Teixeira ve diğ., 2003; El-Shabbaby ve diğ., 2003).

Çevresel kirleticilere maruz kalmış organizmaların nükleik asit ve protein içeriklerinde değişmeler olabilir ve biyosentez metabolizmasındaki değişiklikler kirleticilerin belirlenmesine yönelik bir belirteç olarak kullanılabilir (Singh ve Tewari, 2003). Canlılar üzerindeki genetik hasarın belirlenmesinde kullanılan test ve

tekniklerden bazıları mitoz bölünme, kromozom anormallikleri (KA) ve RAPD PZR tekniklerdir.

RAPD PZR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), hızlı ve kolay bir teknik olmasının yanı sıra kullanılan teçhizat ve malzemelerin diğer moleküler tekniklere göre daha ucuz olması sebebiyle birçok avantaja sahiptir (Tingey ve diğ., 1992; Rafalski ve diğ., 1991; Mathieu-Daude ve diğ., 1997; Waugh ve Poweil, 1992). Ancak, belirteçlerin dominant olması nedeniyle heterozigotları teşhis etmede zorluk (Mathieu-Daude ve diğ., 1997), PZR koşulları değiştiğinde farklı sonuçlar vermesi; hatta örneklerin saklanma koşullarının bile sonuçları etkilemesi (Muralidharan ve Wakeland, 1993; Schierwater ve Ender, 1993) gibi dezavantajları da mevcuttur.

Çalışmamızda, bitki büyüme düzenleyicilerinden gibberellik asitin (GA_3) olası etkilerinin, *A. cepa* üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesine yer verilmiştir. Genetik hasarın belirlenmesinde mitoz bölünme, kromozom anormallikleri (KA) ve RAPD PZR teknikleri uygulanmıştır. Bu sayede, farklı konsantrasyonlarda uygulanan GA_3'ün *A. cepa* da meydana getirebileceği genotoksik etkilerin tespit edileceği düşünülmektedir. Böylece ülkemizde yaygın olan ve biyosit olarak da bilinen GA_3'ün bilinçsiz ve yanlış kullanımından kaynaklanabilecek zararın hedef ve hedef olmayan organizmalar üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlanacaktır.

1. GENEL BİLGİLER

Gelişen dünya, artan nüfus ile beraber, gıda ve gıda ürünlerine olan ihtiyaç da hızla artmaktadır. Artan bu ihtiyacın karşılanması amacıyla tarımsal verimliliğin arttırılmasına yönelik olarak çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) yaygın olarak kullanılmaktadır (Morsünbül ve diğ., 2010). İnsanların yeterli beslenebilmesi amacıyla 1960-1970'li yıllarda tarımda "yeşil devrim" adı verilen ve tamamen üretimi artırmaya yönelik çalışmalara hız verilmiştir. Üretimi artırmak amacıyla sentetik kimyasal tarım ilaçları, mineral gübreler, büyümeyi düzenleyici maddeler ve hormonların kullanımı teşvik edilmiştir. Amerika Çevre Koruma Ajansı tarafından, büyüme düzenleyicileri: Böcek veya bitkilerin büyümelerini geciktiren veya hızlandıran kimyasallar olarak tanımlanmış ve biyositler kategorisinde sınıflandırılmıştır (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

1.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Sınıflandırılması ve Özellikleri

Bitki gelişmesi için güneş ışığına, havanın CO_2'ine, toprağın ise su, mineral ve diğer besin maddelerine ihtiyaç duyar. Vejetasyon ilerledikçe bitki büyür, gelişir ve bir kısım hücre, doku ve organlar oluşarak, kendine özgü şekil alır. Normal büyüme ve gelişmenin meydana gelebilmesi için bir takım iç ve dış faktörlerin birlikte rol oynadığı bilinmektedir. Bitkideki büyüme ve gelişmeyi düzenleyen temel iç faktörler kimyasal özelliktedir.

Bitki bünyesinde oluşup, büyüme ve gelişmeyi düzenleyen bu maddelere hormonlar ya da fitohormonlar adı verilmektedir. Bitki hormonları, doğal olarak bitki tarafından çok az miktarda üretilen, üretildiği dokudan başka dokulara taşınan, taşındığı dokunun gelişimi ve değişimi üzerinde etkili olan organik maddelerdir. Dolayısıyla bir bitkinin her dokusu, miktarı değişmekle birlikte çeşitli hormonları içermektedir. Belirli hücrelerde üretilen hormonlar diğer hücrelere transfer edilerek bitki gelişimi kontrol edilir (Karakuş ve Köker, 2007). Bazı bitki hormonları (sitokinin ve absisik asit) meristematik dokuda sentezlenir, vasküler doku ile taşınır, bazıları (oksin)

vasküler dokuya girmeksizin dokudan dokuya direkt olarak taşınır bazıları da (etilen) aynı doku içinde kullanılır ve sentezlenir.

Bir bileşiğin bitki hormonu olarak nitelendirilmesi için şu özelliklerinin olması gerekir (Kaynak ve Ersoy, 1997);

1. Bitki bünyesinde oluşması,
2. Oluştuğu yerden başka bir yere taşınabilir olması,
3. Taşındığı yerde değişik yaşam olaylarını yönetmesi veya düzenlemesi,
4. Çok düşük konsantrasyonlarda bile bu etkilerini gösterebilmesi gerekir.

Bitki hormonlarının sentetik türevleri olan kimyasal maddelere bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) adı verilir (Akgül, 2008; Çetinkaya ve Baydan, 2006). Bu nedenle BBD'ler sentetik fitohormonlar olarak da adlandırılırlar. Bu maddeler yüksek bitkilerin kök, gövde, dal, yaprak, tohum çeşitli organlarından ve bir kısım mantarlardan elde edilmektedirler.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin bir kısmı bitkilerde uyarıcı veya teşvik edici etki gösterirken bir kısmı da büyümeyi engelleyici veya yavaşlatıcı hatta durdurucu etki gösterirler. Gelişmeyi teşvik edici ve engelleyici maddeleri birbirinden kesin sınırlarla ayırmak pek mümkün değildir. Çünkü bitki büyüme düzenleyicileri, bitki büyümesinin değişik evrelerinde ve değişik bitki organlarına değişik konsantrasyonlarda uygulandıklarında farklı etkiler gösterebilmektedir (Kocaçalışkan, 2003).

Tarımsal üretimi arttırma durumundaki ülkeler, bitki büyüme hormonlarının yanında bazı biyositleri de yoğun olarak kullanmaktadırlar. Tüm bu kimyasalların kullanımı aynı zamanda çevre kirliliğine de sebep olmaktadır. Bu maddelerin yarılanma ömürleri uzun olup, toprakta, sebze ve meyveler üzerinde kalmakta, besin zinciri ile insana kadar ulaşmakta ve kanserojenik, mutajenik ve teratojenik etkilere neden olmaktadır.

Üretimde miktar ve kaliteyi arttırmak amacıyla tarımda kullanımı teşvik edilen, sentetik kimyasalların ve BBD'lerin kontrolsüz ve bilinçsiz bir şekilde aşırı miktarlarda kullanımı sonucunda ürünlerde oluşan kalıntılar insan ve çevre sağlığı üzerinde çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır. Özellikle BBD'ler canlı sistemden

tamamen atılamayıp organlarda depolanmakta ve fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Yılmaz ve Yüksel, 2002). Günümüzde, doğal dengenin bozulması, gıdalarda oluşan kimyasal kalıntıların besin zinciri ile insan sağlığını tehdit edecek boyutlara ulaşması üreticileri ve tüketicileri doğal, organik ve sağlıklı tarım ürünlerinin üretimine ve tüketimine yönlendirmiştir (Kaftanoğlu, 2003; Uygur, 2005).

BBD'lerin önemi ilk kez 1930'lu yıllarda anlaşılmış, bu tarihten itibaren de tarımsal ürünlerdeki fonksiyonları araştırılmaya çalışılmıştır. Bitki fizyolojisi konularında yapılan çalışmalar, BBD'nin bitki büyüme ve gelişmesindeki rollerini ortaya çıkarmış ve zamanla bitki bünyesinde sadece büyümeyi teşvik eden maddelerin değil, aynı zamanda büyümeyi engelleyen maddelerin de sentezlendiği anlaşılmıştır (Güleryüz, 1982; Raven ve diğ., 1992).

Tarımda BBD'nin kullanım amaçları başlıca şu şekilde sıralanabilir:

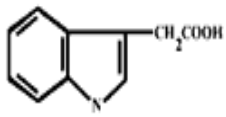
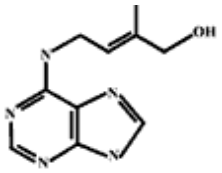
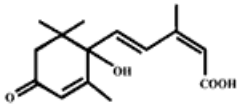
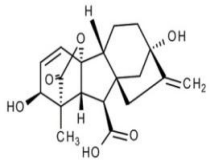
1. Çelikle çoğaltmayı sağlamak,
2. Tohumların çimlenme gücünü artırmak,
3. Çiçeklenmeyi teşvik etmek veya geciktirmek,
4. Soğuğa dayanıklılığı artırmak,
5. Meyvelerde tohum oluşumunu artırmak,
6. Meyve iriliğini artırmak,
7. Meyve muhafaza süresini uzatmak,
8. Bitkilerin hastalık ve zararlılara dayanıklılığını artırmak,
9. Yabancı ot kontrolünü sağlamak,
10. Hasat öncesi meyve dökülmesine engel olmak,
11. Makinalı hasadı kolaylaştırmak için tüm bitkilerin aynı zamanda olgunlaşmasını sağlamak ve hasatta iş gücünü azaltmak,
12. Patateste dormansiyi kırmak,
13. Özellikle doku kültürü çalışmalarında kök-sürgün ve yumru oluşumunu teşvik etmektir (Budak ve diğ., 1994; Kaynak ve Ersoy, 1997).

Fitohormonların oksinler, sitokininler, etilenler, absisik asitler ve gibberelinler olmak üzere beş temel grubu mevcuttur. Bu gruplara "klasik beşli" de denilmektedir.

Son zamanlarda, oligosakkarinler, brassinosteroidler, jasmonatlar, salisilatlar ve poliaminler gibi, bitki büyümesine ve gelişmesine, çeşitli boyutlarda etki eden bileşikler de geliştirilmiştir. Bu listenin yeni keşfedilecek BBD'ler ile büyüyeceği tahmin edilmektedir (Basra, 2000). Fitohormonlar arasında etilen %23'lük oranla dünyada en yaygın kullanılan bitkisel hormonu teşkil ederken, oksin %20 ile ikinci, gibberellinler %17 ile üçüncü sırada yer almaktadır. Sitokinin ve absisik asitler ise dünyada henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır (Barut, 1995).

Fitohormonların çeşitleri, bitkide üretildiği yerler ve ana işlevleri Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Fitohormon çeşitleri, bitkide üretildiği yerler ve ana işlevleri

HORMON	BİTKİDE ÜRETİLDİĞİ YER	ANA İŞLEVLERİ
Oksin 	Tohum embriyosu, apikal tomurcukların meristemleri, genç yapraklarda üretilir.	Gövde uzamasını, kök büyümesini, hücre farklılaşmasını ve dallanmayı teşvik eder. Meyve gelişimini düzenler, apikal dormansiyi arttırır, fototropizma ve gravitropizma da iş görür.
Sitokinin 	Köklerde sentezlenir ve diğer organlara taşınır.	Kökün büyüme ve farklılaşmasını etkiler. Hücre bölünmesini ve büyümesini, çimlenmeyi teşvik eder. Ayrıca yapraklarda yaşlanmayı geciktirir.
Etilen $CH_2=CH_2$	Olgunlaşan meyve dokuları, gövdelerin nodyumları, yaşlanan yapraklar ve çiçeklerde üretilir.	Meyve olgunlaşmasını arttırır ve bazı oksin etkilerini bastırır. Türe bağlı olarak köklerin, yaprakların ve çiçeklerin büyümesini arttırır veya engeller.
Absisik Asit 	Yapraklar, gövdeler, kökler ve yeşil meyvelerde üretilir.	Büyümeyi engeller ve su stresi sırasında stomaların kapanmasını sağlar. Dormansinin kırılmasını engeller.
Gibberellin (GA_3) 	Apikal tomurcukların ve köklerin meristemleri, genç yapraklar ve embriyoda üretilir.	Tohum ve tomurcuk çimlenmesini, gövde uzamasını ve yaprak büyümesini arttırır. Çiçeklenmeyi ve meyve gelişimini teşvik eder. Kök büyümesini ve farklılaşmasını etkiler.

1.1.1. Gibberellinler

Gibberellinler, adını 1926 yılında Japon araştırıcılar tarafından pirinç bitkisinde çok fazla boylanmaya neden olan *Gibberella fujikuroi* adlı fungustan almıştır (Vardar, 1970). Brian ve arkadaşları tarafından 1955 yılında izole edilmiş ve gibberellik asit olarak adlandırılmıştır.

BBD'nin en geniş gruplarından birisi olan gibberellinler bitkilerin birçok büyüme ve gelişme mekanizmalarında rol oynayan bitkisel hormonlardır. Gibberellinler vejetatif ve reprodüktif evrede bitkilere uygulanırsa teşvik edici etki gösterdiklerinden dolayı ticari değere sahiptirler (Carlson ve Crovetti, 1988). Gibberellinler GA_3, GA_4, GA_7 karışımı ve potasyum gibberellat formlarında ticari olarak kullanılmaktadırlar (EPA, 1995).

Gibberellinler 110'dan fazla bileşiği içeren büyük bir gruptur. Araştırıcılar gibberellinlerin 19 veya 20 karbonlu gibberellan iskeletine sahip olduğunu ve çok sayıda karboksil grupları ile farklı sayı ve durumdaki hidroksil grupları içerdiğini ortaya koymuşlardır (Kaçar ve diğ., 2002; Vardar ve Güven, 1996). Gibberellinlerin temel etkisi, bitkilerin boyuna büyümesini sağlamaktır (Sun ve Gubler, 2004).

Gibberellinlerin metabolizması incelendiğinde yüksek bitkilerde benzer etki gösteren 89 adet gibberellin bulunmuştur. Bunlardan 64 adeti yüksek bitkilerde, 14 adeti ise *Gibberella fujikuroi* küf mantarında saptanmıştır. Bu gibberellinlerin pozisyonları, sayıları, hidroksil grupları ve tipleri birinden diğerine farklılık gösterir (Carlson ve Crovetti, 1990).

GA_3 bir gibberellin tipi olup, kimyasal formülü $C_{19}H_{22}O_6$'dır. Gibberellinlerin oluşumunda biyosentetik kademeler şöyledir: primer öncü madde asetattır, asetil CoA molekülünden mevalonik asit meydana gelir. 2 ATP molekülü ve kinaz enzimi ile mevalonik asit pirofosfat oluşur. Dekarboksilasyonla ardışık izopentenil pirofosfat (IPP) meydana gelerek 5-C'li olan bu izoprenoidden karotinoidler, gibberellinler, absisik asit ve sitokininler türevlenir. Gibberellinlerin biyosentez evreleri genellikle kloroplastlarda tamamlanır (Milborow, 1974).

BBD'lerin bitki içine girme oranı ve miktarları bu maddelerin etkilerini belirler. BBD'lerin bitki tarafından alınmalarına; bitkinin kutikula tabakasının yapısı ve kalınlığı, uygulanan kimyasalın formulasyonu, protoplazmadaki elektriksel yük, stoma sayısı ve büyüklüğü gibi faktörler etki etmektedir. BBD'ler kökler, yapraklar ve gövde tarafından absorbe edilirler. Taşınmaları ise ksilem, floem ve parankima hücreleri aracılığıyla gerçekleşir. Taşınmaları bileşiğin tipine, bitkinin türüne ve çevre koşullarına göre değişiklik gösterir.

Ticari amaçla en yaygın kullanılan GA_3'tür (Güleryüz, 1982; Walsh, 2003; Westwood, 1993). Günümüzde 76 kadar değişik gibberellin, bitki türlerinden ve *G. fujikuroi* fungusundan izole edilerek özellikleri belirlenmiştir. Tarımsal üretimde ve özellikle de bahçe bitkilerinde kullanılan gibberellin hormonu, çoğunlukla *G. fujikuroi* fungusundan fermantasyon yoluyla elde edilmektedir. Bugün bilinen 100'e yakın GA serisi bulunmakta olup, bunların 50'den fazlası bitki tohumlarında bulunmuştur. GA_3'ün günümüzde 187 adet çeşidi vardır.

Çok çeşitli fonksiyonlara sahip olan gibberellinler, gövde uzaması, büyümesi, yaprak büyümesi, çiçeklenmeyi teşvik etme ve diğer çeşitli büyüme, gelişme ve farklılaşma olaylarında etkili olmaktadırlar (Olszewski ve diğ, 2002; Tyler ve diğ., 2004; Swain ve Singh, 2005; Zhu ve diğ., 2006). Malt sanayinde üretimden ve zamandan avantaj sağlamak, şeker kamışı, kereviz ve enginarda hasat verimini artırmak, kabakgillerde cinsiyet özelliğini kontrol etmek ve hibrit tohum üretiminde ebeveyn hatları muhafaza etmek için kullanılırlar. Hücrenin hacim olarak büyümesi ve sonuçta bölünmesinde etkili BBD'lerdir. Ayrıca büyüme, gelişme ve bazı bitkilerde dormansinin kırılmasında kullanılırlar (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Gibberellinlerin bitkilerdeki bazı fonksiyonları şunlardır (Budak, 1994; Kaynak ve Ersoy, 1997; Kaynak ve İmamgiller, 1997; Kaynak ve Memiş, 1997):

a) Genetik olarak bodur bitkilerde uzamayı sağlar. Bazı bitki türlerinde erken çiçeklenmeyi teşvik ettiğinden çiçeklenme ve melezleme erkene alınabilmekte ve ıslah çalışmalarında sürenin kısaltılması mümkün olabilmektedir. Gibberellin uygulamasıyla büyüme hızlanacağından, bu bölgelerden alınacak parçaların virüssüz olma ihtimali de çok yüksek olacaktır.

b) Bazı tomurcuklarda veya yumrularda dormansinin kırılmasını sağlar, apikal tohumlarda da dormansiyi kırarak çimlenmeyi arttırır.
c) Uzun gün şartları ve soğuklama ihtiyacı gösteren bitkilerde, gibberellin uygulanması halinde bu şartlar sağlanmasa da çiçeklenme sağlanabilir.
d) Oksinlerde olduğu gibi bazı meyve türlerinde partenokarpik meyve gelişimini sağlar (özellikle oksinlerin etkili olmadığı türlerde etkilidir). Gibberellin çiçeklenmeden belirli bir süre önce verildiğinde çekirdeksizliği, çiçeklenmeden sonra verildiğinde ise tane irileşmesini sağlar.
e) Işığa hassas olan tohumlarda çimlenmeyi teşvik eder ve büyümenin geniş devresini uzatarak bitkilerin uzun süre yeşil kalmasını sağlar.

GA'in hayvanlara olan etkileri kuşkuludur. GA_3 farelerde dalakta plak oluşturma hücrelerinin ve dolaşımdaki beyaz kan hücrelerinin sayısını, hematokrit değeri ve timus ağırlığını artırır. Kara kurbağalarında karaciğer neoplazmalarına neden olur ve bu tümörler hepatosellular karsinoma olarak teşhis edilebilir. GA_3 ayrıca laboratuvar farelerinde böbrekte mononükleer yangı infiltrasyonuna ve karaciğerde mikro apselere ve hidropik dejenerasyona neden olur, ancak tümöre neden olmaz. Farelere gibberellinin ve östradiolün birlikte uygulanması uterus ağırlığında önemli artışa neden olmaktadır (Özmen ve diğ., 1995).

GA'in laboratuvar hayvanları için ağızdan akut LD50 ve LD100 değerleri oldukça yüksektir; ratlar ve fareler için ortalama >15.000 mg/kg'dır. 25 g/kg gibi çok yüksek dozlarda ağızdan uygulanması ölüme sebep olmamaktadır. Deriye ve göze irkiltici etkisi yoktur. 21 gün boyunca günde 2 saat 400 mg/L solunması ratlarda hastalık oluşturmamaktadır (Tomlin, 1997).

İnsan lökosit sistemi üzerine etkileri bakımından GA'in potasyum tuzları timidin birleşmesinde etkisizdir. Ancak, üridin birleşmesini % 30-50 oranında baskılar (Farrow ve diğ., 1976).

1.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Ekosistem ve Canlılar Üzerine Etkileri

Tarımsal alanda çalışan üreticilerin bilerek veya bilmeyerek yaptıkları yanlış tarımsal uygulamalar çeşitli çevre sorunlarına neden olmaktadır. Bu tip uygulamalar arasında zirai ilaç ve kimyasal gübre kullanımındaki yanlışlıklar ile sulama, toprak işleme ve bitkisel hormon kullanımındaki yanlışlıklar sayılabilmektedir.

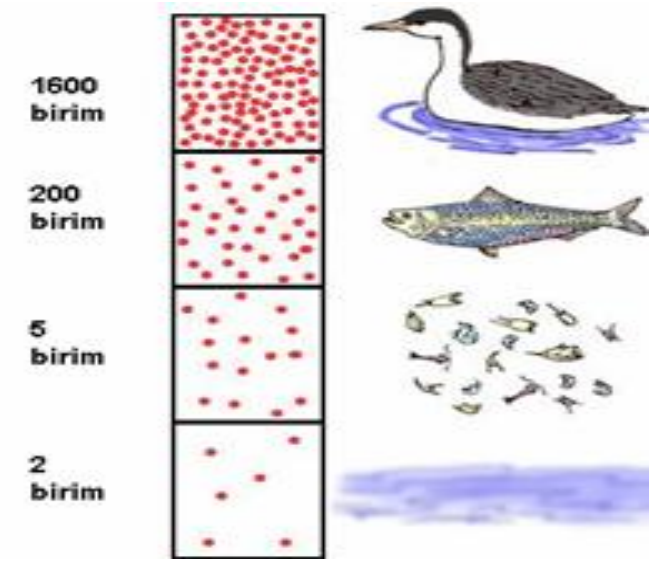
Söz konusu yanlış uygulamalar temel olarak,

1. Fazla ürün almak için gereğinden fazla BBD kullanımı
2. Uygulama zamanının doğru tespit edilememesi
3. Doz ayarlama ve uygulamada yeterli hassasiyetin gösterilememesi
4. BBD'lerin çevresel riskler ve sağlık riskleri göz önüne alınmadan uygulanması
5. Teknik bilgileri yetersiz kişiler tarafından yapılan uygulamalar şeklinde sıralanabilir (Akgül, 2008).

Yoğun ve bilinçsizce yapılan kimi tarım uygulamaları, bitkisel ve hayvansal besinler aracılığıyla toplum sağlığına yönelik ciddi tehlikelere dönüşebilmektedir. Bu tehlikeler sadece insan sağlığıyla sınırlı kalmayıp hava, toprak ve su üçlüsünü de içine alan ciddi bir ekosistem kirliliğine de neden olmaktadır (Sayılı ve Akman, 1994).

Bitkisel hormonların çevresel etkileri biyosit kullanımı sonucunda doğada oluşan çevresel etki hareketlerine benzerlik göstermektedir.

Güler ve Çobanoğlu'nun (1997) çalışmalarında belirttikleri üzere, EPA tarafından yapılan sınıflandırmada BBD'ler biyositler sınıfında belirtilmektedir. Tarımsal uygulamalarla toprağa ve sızma yolu ile yer altı sularına ve yüzeysel su kaynaklarına ulaşan bu maddeler canlı bünyelerinde biyolojik birikime neden olmaktadır ve bu durum Şekil 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Biyolojik birikimle canlı bünyelerindeki konsantrasyon artışları (URL-1)

İçme suları ve ürünlerde bulunan kalıntılar ile insan bünyesine geçebilen BBD'lerin insan sağlığına olası toksik etkileri mevcuttur. BBD'lerin konsantrasyonları ve uygulama zamanı da önemli bir konudur. Yetersiz veya fazla konsantrasyon olumsuz etkiler oluşturabileceği gibi, uygulama zamanının tam belirlenememesi de istenmeyen sonuçlara neden olabilir. Aynı düzenleyici, kısa zaman aralıklarıyla uygulandığında birbirinden tamamen farklı sonuçlar gösterebilmektedir. Örneğin, Naftalin Asetik Asit (NAA) çiçeklenme sonrasında elmada kimyasal seyreltme için kullanılırken, daha sonraki uygulamalarda hasat öncesi meyve dökülmesini önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Westwood, 1993; Akgül, 2008). BBD'lerin aşırı dozlarda kullanılması sonucunda ürünlerde kofluk ve şekil bozuklukları meydana gelmektedir. Bu ürünlerin üzerinde aşırı miktarda bulunan kalıntı maddeleri besin zinciri yolu ile canlı bünyelerine geçerek toksik etkilere neden olabilmektedir (Kaftanoğlu, 2003; Uygur, 2005).

BBD'ler; balıklar, kuşlar ve memelilerde çok toksik etki göstermezler. Toprak ve suda yaşayan omurgasızlar için toksiktirler. Suda eriyerek taban suyuna ulaşır ve böylece çevreye daha çok bulaşarak etki gösterebilirler. Toprakta önce birikirler, sonra zamanla parçalanırlar. BBD'ler bitkiler için de özellikle aşırı dozlarda (hormonal dozlar hariç) toksiktir. Çünkü bitkilerin enzim sistemini etkilerler.

Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde BBD'lerin kontrolsüz ve bilinçsizce kullanımı neticesinde sızma veya yüzeysel akış ile bu kimyasalların yer altı ve yer üstü su kaynaklarına iletilmesi söz konusu olmaktadır. Alıcı ortamlarda zamanla birikmeleri ile diğer biyositler gibi çevre üzerinde olumsuz etkileri gözlemlenebilmektedir.

1.3. *Allium* Testi

Yüksek yapılı bitkiler, kimyasalların kullanımı veya çevresel kirliliğin neden olduğu muhtemel genetik hasarın belirlenmesinde birinci sırada yer alan alternatif test sistemleri olarak deneysel çalışmalarda bazı avantajlara sahiptir. Bitki köklerinin meristematik mitotik hücreleri çevresel kirleticilerin "klastojenite"sinin (kromozom kırılması ve buna bağlı olarak kromozom parçalarındaki kayıp, artma ya da düzensizliklerin olması) belirlenmesi için uygun bir sitogenetik materyaldir (Ma ve diğ., 1995).

Çevresel kirleticilerin sitotoksik ve genotoksik etkileri, yaygın olarak kullanılan *Allium* kök büyümesi inhibisyonu testi ile belirlenen etkili konsantrasyon ve farklı uygulama süreleri temelinde mitotik indeks, mitotik anormallikler, kromozom anormallikleri ve mikronükleus oluşumları ile belirlenebilmektedir. Mitotik indeksteki 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).

Allium test metodu, kullanılan kimyasalın çeşitli toksik ve klastojenik etkilerini direkt olarak göstermektedir. Ayrıca, bitkiler insanoğlunun en büyük yiyecek kaynağını oluşturdukları için, çevresel kimyasalların, bitkiler üzerindeki etkilerinin araştırılması daha önemli ve faydalıdır. Bu tür araştırmalarda bitkilerin kullanılmasının birçok nedeni vardır. Bitkilerin depolanması, taşınması ve kullanılması çok kolaydır, ucuzdur, genellikle iri ve iyi gözlenebilen kromozomları vardır. Bitki kökleri biyolojik testler için çok faydalı materyallerdir. *Allium* kök uçları, kimyasalların neden olduğu biyolojik etkilerin araştırılmasında, *Allium* testinin ilk kez Levan tarafından bulunduğu günden beri kullanılmaktadır (Levan, 1938). *A. cepa* kök ucu hücrelerinde kromozomal anormalliklerine sebep olan çevresel kontaminantların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak

kullanılan basit ve maliyeti düşük bir testtir (Feretti ve diğ., 2007), ayrıca oldukça hassas ve kullanışlı bir yöntemdir. Diğer birçok deney sistemi ile karşılaştırılabilir sonuçlar sağlar.

Makroskobik ve mikroskobik etkileri gözlenebilir ve bu ikisi arasında iyi bir ilişki olduğu görülür. Makroskobik etki olarak kök büyümesini engellediği için en hassas parametre olarak göze çarpar. Bu büyüme inhibisyonu ile sonuçlanması beklenen herhangi bir direkt ve indirekt zararlı etkidir. Mikroskobik inceleme kromozom hasarı ve hücre bölünmesi bozukluklarının değerlendirilmesini sağlar, böylece toksik etkinin şiddeti, mekanizması veya potansiyel mutajenite hakkında ek bilgi sağlar.

Allium testi gibi diğer birçok kök ucu sistemleri de klasik bir metot şeklinde kullanılmakta olup, bu testlere örnek olarak *Allium/Vicia* kromozom anormallik testleri veya mikronükleus testleri, *Tradescantia* mikronükleus testleri verilebilir (Chakraborty ve diğ., 2009).

Allium testi, tüm mitotik evrelerdeki anormalliklerin belirlenmesini sağlamaktadır ve memeli test sistemleriyle iyi korelasyon göstermektedir (Rank ve Nielsen, 1997; Yıldız ve diğ., 2009). Genel hatlarıyla *Allium* testinin avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1) Kökleri test edilecek kimyasal ile direkt temas halinde olduğu için önemli bir *in vivo* model organizmadır.

2) Diğer test sistemlerine göre kolay elde edilmesi, ucuz olması, hücre döngüsünün kısa olması gibi nedenlerden dolayı sıkça tercih edilmektedir.

3) Ökaryotik bir canlı olan *A. cepa* mitoz ve mayoz geçirir, mutasyona uğrar. Kendiliğinden oluşan mutasyonlar nadiren gerçekleştiğinden, dolaylı yoldan insan sağlığını etkileyebilecek mutajenlerin tespit edilmesini doğru bir şekilde sağlar.

4) Kromozom sayısının ve yapısının sabit olması, kromozom morfolojisinin çeşitli olması nedenlerinden dolayı yapısal ve sayısal anormalliklerin tespit edilmesinde kullanılır (Arıkan, 2006; Firbas ve Amon, 2013).

Sitogenetik araştırmalarda kullanılan *A. cepa* L. var. *cepa* sistematik olarak şu şekilde sınıflandırılmaktadır (URL-2);

Alem (=Regnum) : *Plantae* – Bitkiler

Alt alem (=Subregnum) : *Tracheobionta* – Vasküler bitkiler

Süper Bölüm (=Super divisio) : *Spermatophyta* – Tohumlu bitkiler

Bölüm (=Divisio) : *Magnoliophyta* – Çiçekli bitkiler

Sınıf (=Classis) : *Liliopsida* – Monokotiledonlar

Takım (=Ordo) : *Asparagales*

Familya (=Familia) : *Alliaceae*

Alt Familya(=Subfamilia) : *Allioideae*

Cins (=Genus) : *Allium* L. – Soğan

Tür (=Species) : *Allium cepa* L. – Mutfak soğanı

Varyete (=Variety): *Allium cepa* L. var. *cepa*

Alliaceae familyası önceleri *Liliaceae* (Zambakgiller) ve *Amaryllidaceae* (Nergisgiller) familyalarının bir üyesi iken yeni kayıtlarda farklı bir familya olarak bildirilmektedir (Brewster, 1994; Schwartz ve diğ., 1996; Vural ve diğ., 2000).

1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonükleotitler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan oldukça özgün ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir (Persing, 1991).

PZR yönteminde temel bileşenler; kalıp DNA, kalıp DNA'nın dizilerini tamamlayan tek zincirli oligonükleotidler (primerler), deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP'ler),

tampon, $MgCl_2$ ve ısıya dayanıklı DNA polimerazdır. En çok kullanılan DNA polimeraz *Thermus aquaticus* adı verilen termofilik bakteriden izole edilir ki buna da Taq DNA polimeraz adı verilir (Siqueira ve Roças, 2003).

Reaksiyon üç basamaklı döngünün tekrarı şeklinde olur:

1. DNA'nın tek iplikçik haline gelmesi (denatürasyon)
2. Primerin bağlanması (annealing)
3. Uzama (elongasyon)

Bu yöntem, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır (Prichard ve Tait, 2001). Oligonükleotit primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit organik bazın bulunduğu deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur.

1.5. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Son zamanlarda moleküler genetikçiler genotoksisite ölçümleri için birkaç yeni, hızlı ve güvenilir metotlar geliştirmişlerdi. Bunlardan birisi de RAPD tekniğidir (Ferrero ve diğ., 1998; Swaileh ve diğ., 2007; Rong ve Yin, 2004). RAPD tekniğini kullanarak genotoksik etkileri değerlendirmede yapılan ilk çalışma Savva ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Atienzar ve Jha, 2006). Williams ve diğ. (1990) ile Welsh ve Mc Clelland (1990) tarafından geliştirilen RAPD tekniği, PZR metodu kullanılarak rastgele seçilmiş 10 bp'lik primerler yardımıyla genomik DNA'nın rastgele segmentlerinin amplifikasyonunu içerir (Beceril ve diğ., 1999, 2000; Luceri ve diğ., 2000; Atienzar ve diğ., 2000, 2002; Lee ve diğ., 2007). Bu metot genetik hasarı belirlemede basit, hassas ve etkilidir (Rong ve Yin, 2004). Hedef genom veya kullanılan primerler hakkında bilgi gerekmeksizin gelişigüzel amplifiye edilen bant profili avantajlı bir şekilde elde edilebilir. Elektroforetik olarak gözlendiğinde bant

profillerindeki değişiklikler, genetik materyalde oluşan hasar sonucu primer bağlanma alanlarındaki değişikliklerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Savva, 1996).

RAPD tekniğinin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PZR ile çoğaltma yapmasıdır.

Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir (Welsh ve Mc Clelland, 1990). Diğer PZR uygulamalarının aksine bu teknikte her bir PZR reaksiyonunda bir çift primer yerine tek primer kullanılır (Williams ve diğ., 1990).

1.5.1. RAPD PZR tekniğinin değişkenleri

RAPD PZR metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok değişken vardır (Rafalski ve diğ., 1994; Tingey ve Del Tufa, 1993). En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır (Halldén, 1998; Aljanabi ve diğ., 1999). $MgCl_2$ konsantrasyonu (Khandka ve diğ., 1997), Taq DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu (Rafalski ve diğ., 1994; Mathieu-Daudé ve diğ., 1997), dNTP konsantrasyonu (Khandka ve diğ., 1997), primer bağlanması (Atienzar ve diğ., 2000), başlangıç denatürasyonu (Doulis ve diğ., 2000) ve primer karışımları (Halldén, 1996) RAPD PZR tekniğini etkileyen diğer temel değişkenlerdir. Ayrıca PZR' de oluşan çelişkili sonuçlardan, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PZR koşulları ve PZR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir (Weeden ve diğ., 1992; Hansen ve diğ., 1998).

RAPD PZR çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD PZR tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir (Halldén, 1998). Primerler 9-10 bp uzunluğundadır. Kullanılan primerlerin, PZR' de kullanılan diğer primerlerde olduğu gibi herhangi bir palindromik dizi içermemesi, % 50-80 oranında G:C oranına sahip olması gerekir (Welsh ve McClelland, 1990). RAPD PZR tekniğinde çoğaltma,

kullanılan primerin uzunluğuna, primerin GC içeriğine ve primer dizisindeki tek bir nükleotidin yerine duyarlıdır.Bu teknikte $MgCl_2$, dNTP ve Taq DNA polimeraz konsantrasyonlarının çalışılan bitkilere özgü optimum koşullarının belirlenmesi reaksiyonun tekrarlanabilirliği açısından gereklidir (Williams ve diğ., 1990).

1.5.2. RAPD PZR tekniğinin avantaj ve dezavantajları

RAPD PZR tekniğinin avantajları:

1- Araştırılan taksonun genomik DNA dizisi ile ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir (Hillis ve Mortiz, 1990; Williams ve diğ., 1990; Welsh ve McClelland, 1990; Başıbüyük ve diğ., 2000).

2- Amplifikasyonda tek bir primer seti kullanılır ve bu oligonükleotid, özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğalma yapar (Welsh ve Petersen, 1991). RAPD yönteminde kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacağından, yakın türleri ayırma konusunda birçok yöntemden daha duyarlıdır (Mathieu-Daudé ve diğ., 1997).

3- RAPD hızlı ve kolay bir tekniktir, az iş gücü gerektirir ve kullanılan teçhizat ve malzemeler diğer tekniklere göre daha ucuzdur (Tingey ve diğ., 1992; Rafalski ve diğ., 1991; Waugh ve Poweil, 1992).

4- RAPD tekniğinde polimorfizm derecesi oldukça yüksektir (Nicese ve diğ., 1998; Waugh ve Poweil, 1992; Rafalski ve diğ., 1991; Weeden ve diğ., 1992). Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin farklı 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).

5- En önemlisi de az ve düşük kalitede DNA örneklerinde bile sonuç verir.

RAPD PZR tekniğinin dezavantajları:

1- Belirteçlerin dominant olması sebebiyle heterozigotları teşhis etmek zordur (Mathieu-Daudé ve diğ., 1997).

2- Reaksiyon birçok hassas değişkenle birbirine bağlı olduğu için elde edilen verilerin de tekrarlanabilirliği düşüktür.

3- Güvenirliliği sınırlıdır (Black, 1993). PZR koşulları değiştiğinde farklı sonuçlar verebilir; hatta örneklerin saklanma koşulları bile sonuçları etkileyebilir (Muralidharan ve Wakeland, 1993; Schierwater ve Ender, 1993).

4- Özellikle popülasyon çalışmalarında güvenirliliği az olduğu için tercih edilmez.

5- Az da olsa örneklerde bakteriyel kontaminasyon sonucu farklı bantlar çıkabilir (Black, 1993).

RAPD'in güvenilir bir biçimde uygulanması için örneklerin toplanması, DNA izolasyonları ve PZR koşullarının standart olması gerekir. Omurgalı ve omurgasız hayvanlar, bitkiler ve bakterilerde genotoksinlerin etkisi ile genomik DNA'da meydana gelen çeşitli DNA hasarı ve mutasyonların belirlenebildiğini gösteren bilimsel yayınlar RAPD'in güçlü bir biyobelirteç olduğunu göstermiştir (Savva ve diğ., 1994; Liu ve diğ., 2005, 2007; Enan, 2006; Wang ve diğ., 2007; Cenkci ve diğ., 2009, 2010). RAPD tekniğinde; genotoksik etkilerin teşhisi, kontrol ve uygulama örneklerinden elde edilen RAPD profillerinin karşılaştırılmasıyla yapılır (Atienzar ve Jha, 2006).

DNA hasarı ve mutasyonel olaylar, RAPD profillerinde yeni DNA bantlarının oluşmasına, kontrol grubu RAPD profillerinde mevcut olan DNA bantlarının kaybolmasına ve RAPD profillerinin görünüşünde değişikliklere neden olur. Toksik maddelerin etkisinde kontrol grubuna göre RAPD profillerindeki değişiklikler her bir

primer için genomik kalıp kararlılık yüzdesi (GTS%) olarak hesaplanır (Atienzar ve diğ., 1999).

1.5.3. RAPD PZR tekniğinin uygulama alanları

RAPD belirteçleri; genetik haritaların yapımı, popülasyon yapısının genetik analizi, bireylerin parmak izi, ayırt edici özelliklerin haritasının yapımı, genomun özel bölgesi için hedef belirteç belirlenmesi gibi değişik alanlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda, ekoloji ve popülasyon biyolojisinde de yaygın kullanım alanı bulmaktadır.

RAPD metodu prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının DNA parmak izleri, genotipin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, prenatal tanı, ebeveyn belirleme, kültür ve ırk belirlenmesi, adli tıp, klinik tanı, evrimsel sorunlar, lasyon biyolojisi, salgınlar ve ekoloji gibi alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Rafalski ve diğ., 1994). Ayrıca bu yöntem, klinik mikrobiyolojide, özellikle ayırt edilmesi çok zor olan bakterilerin belirlenmesinde kullanılır (Açık ve diğ., 2001).

2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Bu çalışmada, bitki büyüme düzenleyicilerinden Gibberellik Asitin (GA_3) *Allium cepa* L. var. cepa üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri *Allium* testi, Kromozom Anormallikleri Testi, RAPD PZR teknikleri kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma öncesinde, bitki büyüme düzenleyicileri ve uygulanacak testlerin karakteristikleri hakkında çeşitli literatür taramaları yapılmıştır. Bu bölümde çalışmaya referans olabilecek birtakım bilimsel araştırmalara yer verilmiştir.

Ruminska ve diğ. (1978), yünlü yüksükotu (*Digitalis lanata*) ile yaptıkları çimlendirme çalışmalarında, GA_3 uygulamasının, çimlenme oranını arttırdığını belirtmişlerdir. Kumar Mandal ve Krishna Basu (1981) yılında yaptıkları çalışmada tek başına X-ray ışınlarının ve IAA ile GA_3 birleşiminin *A. cepa* kök meristemindeki mitotik indeks ve kormozomal hasarın modifikasyonuna etkilerini araştırmışlardır. IAA ve GA_3'ün yüksek konsantrasyonlarda (100 ppm, 200 ppm) köklerde toksik etkiye neden olup büyümeyi inhibe ettiğini, fakat IAA ve GA_3 ile muameleden sonra X-ray ışınlarına maruz bırakılan köklerde kromozomal anormalliklerin azaldığını belirtmişlerdir. Fincher (1989) yılında yaptığı çalışmada, GA_3'ün çimlenmekte olan tohumlarda α-amilaz ve diğer hidrolitik enzimler ile büyüme ve gelişme için gerekli olan yapısal proteinlerin sentezini arttırarak çimlenmeyi sağladığını belirtmiştir. Tohum çimlenmesi sırasında embriyoda sentezlenen GA_3'ün, çimlenme olayının başlayabilmesi için, endospermdeki nişastayı şekerlere dönüştürebilen α-amilaz enziminin sentez ve aktivasyonunu arttırarak tohum rezervlerini harekete geçirdiğini ifade etmiştir.

Baydar (2000) yılında yaptığı çalışmada, GA_3'ün tohum verimini önemli miktarlarda düşürdüğünü, GA_3 uygulamalarının yağ asitleri sentezi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı, tomurcuk döneminde uygulanan GA_3'ün ise yağ sentezini artırdığı tespit etmiştir.

Çelik ve diğ. (2002) tarafından yapılan bir araştırmada; sıçanlara 25 gün boyunca içebildikleri ölçüde 75 ppm'lik IAA ve Kinetin vermişler ve sonuç olarak IAA'nın toksik etkiye sebep olduğu gözlemlemişlerdir. Jacobsen ve diğ. (2002) tarafından yapılan çalışmada, ABA teşvikli dormansinin kırılması ve tohum çimlenmesinin sağlanabilmesinde gibberellinlere gereksinim duyulduğu da bildirilmiştir. Ülkemizde yakın zamana kadar yasal olarak kullanılmakta olan 2,4-D üzerinde Yılmaz ve diğ. (2002) tarafından yapılmış bir çalışmada 2,4-D'in farelerin böbreklerinde bazı metabolik enzimleri olumsuz etkilediği tespit edilmiştir.

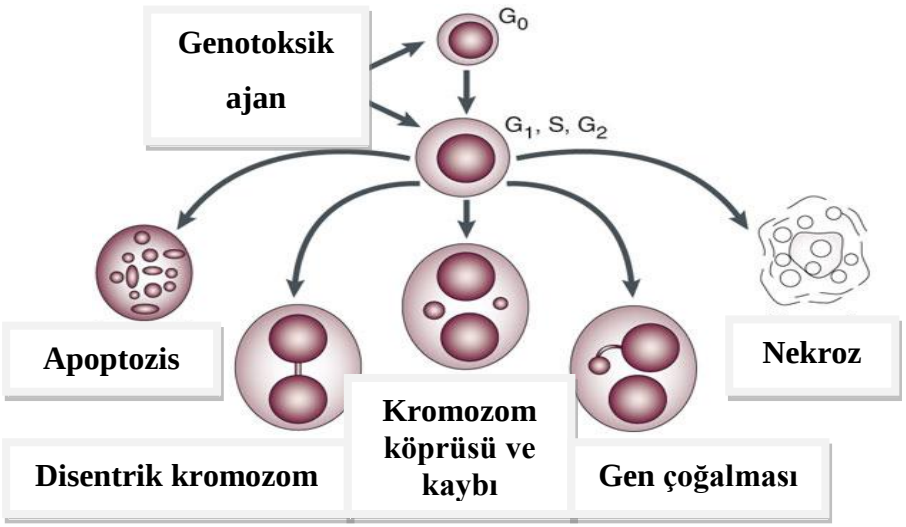
Çokuğraş ve diğ. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada; IAA'nın at ve insan kan serumundaki butirilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve IAA'nın inhibitör etki yarattığını ortaya koymuşlardır. Bu inhibisyon etkisi sonucunda canlıların sinirsel ileti sisteminde olumsuzluklara yol açtığı belirlenmiştir. Hassan ve Chaudhry (2004) yılında yaptıkları çalışmalarında *Cucumis sativus* fideleri üzerinde büyüme hormonları (kinetin, GA_3) ve ağır metal ($Pb(NO_3)_2$) etkilerini araştırmışlardır. GA_3 uygulamasının fide uzunluğunu arttırırken çapı azalttığını ayrıca yaş ve kuru ağırlığı da azalttığını kaydetmişlerdir. Anatomik olarak GA_3 uygulamasıyla birlikte internod, epidermis, kortikal kollenkima ve parankima, kambiyal bölge, ksilar bölge ve sünger dokuda da azalma olduğunu belirtmişlerdir. Dane ve Dalgıç (2005) yılında yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 5, 10, 20 mM) kullandıkları Benomyl (Benlate) fungusitinin *A. cepa* üzerindeki toksik etkilerini incelemişlerdir. Doz arttıkça hücre mitotik indekste ve kök uzunluğunda düşüş olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca bütün dozlarda mitotik evrelerde çeşitli anormallikler belirlemişlerdir. Morshed ve diğ., (2005), tuzlu su karidesleri üzerinde IAA, NAA, 2,4-D ve GA'nın toksik etkilerini araştırmışlar ve IAA'nın 4.39 ppm'lik EC_{50} değeri ile toksisitesinin bu dört BBD arasında en yüksek olduğunu NAA, 2,4-D ve GA'nın LC50 değerlerinin sırasıyla 5.75, 16.63 ve 20.13 ppm olduğunu belirlemişlerdir.

Yılmaz ve diğ. (2005) tarafından yapılan bir araştırmada; indole 3 asetik asit (IAA) hamile farelerin deri altına uygulanmış, IAA'ın üçüncü nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi IAA verilmeyen sağlıklı farelerden oluşan kontrol grubuna göre arttırdığı gözlemlenmiştir. Mitoz bölünmeye uğrayan hücrelerin

yüzdesindeki bu artış ise canlılar üzerinde genetik bozukluklara ve kanser riskinin artmasına neden olmaktadır.

Çelik ve diğ. (2006) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise; sekiz adet dişi sıçandan oluşan gruplar üzerindeki etkiler tespit edilmiştir. Gruplar, deneysel çalışmalar boyunca içebildikleri oranda 100 ppm'lik IAA, IBA ve kinetin uygulamasına 3 hafta maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda BBD'lerin alanin aminotransferaz (ALT), aspartate aminotransferaz (AST), lactate dehidrogenaz (LDH), amilaz ve kreatine fosfokinaz (CPK) enzim seviyeleri üzerine farklı etkileri olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; bu kimyasalların özellikle böbrek ve karaciğer enzimleri üzerinde toksik etkilere sahip oldukları görülmüştür.

Fenech (2007) yılında yaptığı çalışmada in vivo da genotoksinlere maruz kalan hücrelerdeki etkiler başarılı bir şekilde görüntülendiğini belirtmiştir. DNA hasarı olaylarının spesifik olarak hücrelerde binükleus oluşumuna ve (a) kromozom kaybı veya kromozom kırıklarının biyobelirteci olarak mikronükleus oluşumunu, (b) DNA yanlış onarımı ve telomer kaynaşmalarının biyobelirteci olarak nükleoplasmik köprüleri ve (c) çoğaltılmış DNA ve DNA onarım komplekslerinin eliminasyonunun biyobelirteci olarak da nüklear tomurcuklanmaya neden olduğunu ifade etmiştir (Şekil 2.1). Aynı zamanda sentromer ve telomer problarının kullanılmasıyla da mikronükleus oluşumu, nükleoplasmik köprüleri ve nüklear tomurcuklanmaya yol açan mekanizmalar hakkında bilgi sahibi olunabileceğini belirtmiştir.



Şekil 2.1. Genotoksik ajanların hücrede oluşturabileceği çeşitli etkiler

Melo ve diğ. (2007) yılında yaptıkları çalışmalarında, IAA'nın farelerin akyuvar hücreleri üzerinde etkilerini araştırmışlar, IAA'ya maruz bırakılmış nötrofillerde glikoz tüketiminde düşüş, glutamin tüketiminde de artış olduğu dolayısıyla akyuvar hücrelerinde bir tahribata yol açtığını gözlemlemişlerdir.

Yumurtacı ve arkadaşları (2007) yılında yaptıkları çalışmada Aktinomisin D'nin arpa bitkisindeki kök büyüme inhibisyonunu, mitotik aktivite, protein içeriği ve peroksidaz aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Hücre ölümü, kromozomal anormallikler ve peroksidaz aktivitesinin indüklenmesiyle birlikte nişasta ve protein içeriğinin ve mitotik indeksin azalmasına bağlı olarak, Aktinomisin D'nin arpa bitkisindeki kök büyüme inhibisyonuna neden olduğunu göstermişlerdir.

Akgül (2008) yılında yaptığı çalışmada, memeli hayvanlar ve kuşlara canlı ağırlık başına 100-300 mg 2,4-D verildiğinde ani ölümlerin oluştuğunu, canlı ağırlık başına 10 mg'ın üzerindeki dozlarda doğum ve üreme kusurlarının meydana geldiği bildirilmiştir. Çelik ve arkadaşları (2008) yılında yaptıkları çalışmada gibberellik asit ve kadmiyumun *Allium sativum* kök ucu hücrelerindeki mikronükleus frekansı ve lipid peroksidasyonunu araştırmışlardır. GA_3'ün kadmiyum etkisiyle MN frekansını önemli ölçüde azalttığını kaydetmişlerdir. Mitotik indekste GA_3 ve GA_3+Cd muamelesinde az da olsa düşüş gözlenmiştir. Prodanchuk ve diğ. (2008) tarafından fareler üzerinde yapılan bir araştırmada; Ivin, Triman ve Tetran verilen farelerin protein sentezlerinin olumsuz etkilendiği ve membran aktivitelerinde düşüş gözlendiği belirtilmiştir. Uçkan ve arkadaşlarının (2008) yılında larval endoparazitoid olan *Apanteles galleriae* üzerinde yaptıkları çalışmada, konak *Achoria grisella*'nın besinine farklı dozlarda verilen GA_3'ün, endoparazitoid *A. galleriae*'nın yumurtadan ergin oluşuncaya kadar geçen süre üzerinde yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğunu ve bu süreyi % 40 daha fazla uzattığını ve GA_3 uygulamasına bağlı olarak F_2 döllerinin sayısında azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bu durumun nedenlerini ise işlem görmüş olan dişilerde embriyonik gelişimin zarar görmesi ya da oogenezis veya spermatogenezis sırasında hatalı bir oluşumun meydana gelmiş olabileceği şeklinde yorumlamışlardır.

Ud-Deen ve Kabir (2009) yılında yaptıkları çalışmalarında GA_3, unikonazol, klorokolin kloria ve 2,3,6-TBA gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin *A. cepa*

üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Kullandıkları bitki büyüme düzenleyicilerin yüksek konsantrasyonlarının hücre boyutunu ve mitotik indeksi azaltırken, bölünme sırasında *A. cepa* kök hücrelerinde kromozomal anormallikleri arttırdığını belirtmişlerdir. Eren ve arkadaşları (2010) yılında yaptıkları çalışmada elektormanyetik alanın (EMF) *Lens clunaris*'in meristematik kök hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. EMF muamelesinin mitotik bölünme frekansını azaltmasına rağmen, hücre zarı ve sitoplazma deformasyonu ile birlikte hücresel Ca^{2+} depolanmasını ve kromozomal anormallikleri arttırdığını kaydetmişlerdir.

Güz ve Kılınçer'in (2012) yılında hazırladıkları derlemede entomoloji alanında DNA temelli çalışmalarda kullanılacak örneklerin muhafaza edilmesinden başlayarak DNA markörlerinin analizinde yaygın olarak kullanılan moleküler teknikleri açıklanmışlar ve RAPD PZR'nin de avantajları ve dezavantajlarını belirtmişlerdir. Kasamatsu ve arkadaşları (2012) yılında yaptıkları çalışmada GA_3'ün tükrükteki (insanda) hücresel α-amilaz ifadesini arttırdığını vurgulamışlardır.

Nassar ve arkadaşları (2012) yılında yaptıkları araştırmada GA_3'ün albino fareler üzerindeki sitogenetik, histolojik ve histokimyasal etkilerini incelemişlerdir. GA_3'ün kemik iliği hücrelerinde mitotik aktiviteyi azaltmasına karşın genotoksik etkiyi arttırdığını rapor etmişlerdir. Szulc ve arkadaşları (2012) yılında yaptıkları çalışmada *A. cepa* kök ucu meristemlerinden izole ettikleri DNA'yı RAPD PZR yöntemi ile çoğaltmışlardır ve bitki DNA'ları ile yapılan genotoksik analizlerde RAPD PZR yönteminin çok kullanışlı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Akgöl ve Rencüzoğulları (2013) yılında yaptıkları çalışmada Sabinene'in insandan elde edilen DNA'da genotoksik etkisini belirlemek amacıyla RAPD PZR yöntemini kullanmışlar ve Sabinene'in düşük dozlarda genotoksik olmadığını fakat yüksek dozda kullanılması durumunda genotoksik olabileceğini rapor etmişlerdir. Khanna ve Sharma (2013) yılında yaptıkları çalışmada farklı bitki ekstraktlarının genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin belirlenmesinde *A. cepa* kökleri ile yapılacak olan kromozomal anormallikleri yönteminin yaygın olarak kullanıldığını belirtmişlerdir. Moreira de Lima ve arkadaşları (2013) yılındaki çalışmalarında *Joannesia princeps* yaprak ekstraktının potansiyel genotoksik ve sitotoksik etkilerini belirlerken *Allium*

testi ile mikronükleus (MN) testini kullanmışlardır. *Allium* testinin görüntülemede ve çevresel ajanların genotoksisite ve sitotoksisitelerinin belirlenmesinde en etkili test olduğunu belirtmişlerdir. Aksoy ve arkadaşları (2015) yılında yaptıkları çalışmada Sportak fungisitinin *Zea mays* üzerindeki genotoksik etkilerini araştırırken, farklı Sportak konsantrasyonlardaki RAPD profillerine bakarak genomik kalıp stabilitesinin değiştiğini ve Sportak'ın bitki genomunda polimorfizme neden olduğunu ve doz artışına paralel olarak da mitotik indeksi azalttığını rapor etmişlerdir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Araştırma materyali olarak ticari olarak eşit büyüklükte temin edilmiş *Allium cepa* L. var *cepa* (mutfak soğanı) (2n=16) kullanıldı. Kullandığımız soğan varyetesi halk arasında "arpacık soğanı" olarak da bilinmektedir. Test öncesinde *A. cepa*'lar oda sıcaklığında kuru ve ışık görmeyen bir ortamda muhafaza edildi.

3.2. Gibberellik Asit (GA_3) Hakkında Genel Bilgi

GA_3 (Merck) sentetik diterpenoid asit grubu bir bitki büyüme düzenleyicisidir. GA_3, kokusuz 230ºC'ye kadar beyaz toz halinde bulunan bir kimyasaldır. Erime noktası 223-226ºC'dir. Suda çözünebilir (460 mg/mL). Çalışmamızda saf GA_3 kullanıldı ve saf su ile seyreltilerek 300, 600, 1200 ppm oranlarında çözeltiler hazırlandı.

3.3. Test Materyalinin ve Kimyasalların Hazırlanması

3.3.1. *Allium cepa* L. var. *cepa*' nın hazırlanması

A.cepa soğanları deneylerde kullanılmak üzere ticari olarak temin edildi. Deney için yaklaşık 10-20 mm çapında, 2-3 g ağırlığında *A.cepa* soğanları kullanıldı. Köklendirme işlemi yapılmadan önce, tabana yakın kabuklar soyularak, soğanların kök primordiyasına zarar verilmeden kuru kökler uzaklaştırıldı.

3.3.2. Gibberellik asit çözeltilerinin hazırlanması

Toz halindeki GA_3'ten, her doza ait sırasıyla 300 ppm için 0,15 g, 600 ppm için 0,30 g ve 1200 ppm için 0,60 g tartıldı ve 3'er mL (3000 µl) 1 N NaOH içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldükten sonra 500 mL distile su ile tamamlanarak çözeltiler hazırlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Gibberellik asit (GA_3) dozlarının ayarlanması

Dozlar (ppm)	1000 mL de	100 mL	200 mL	500 mL
300	300 mg	30 mg (0,03 g)	0,06 g	0,15 g
600	600 mg	60 mg (0,06 g)	0,12 g	0,30 g
1200	1200 mg	120 mg (0,12 g)	0,24 g	0,60 g

3.3.3. *Allium* testinde kullanılan çözeltilerin ve boyanın hazırlanması

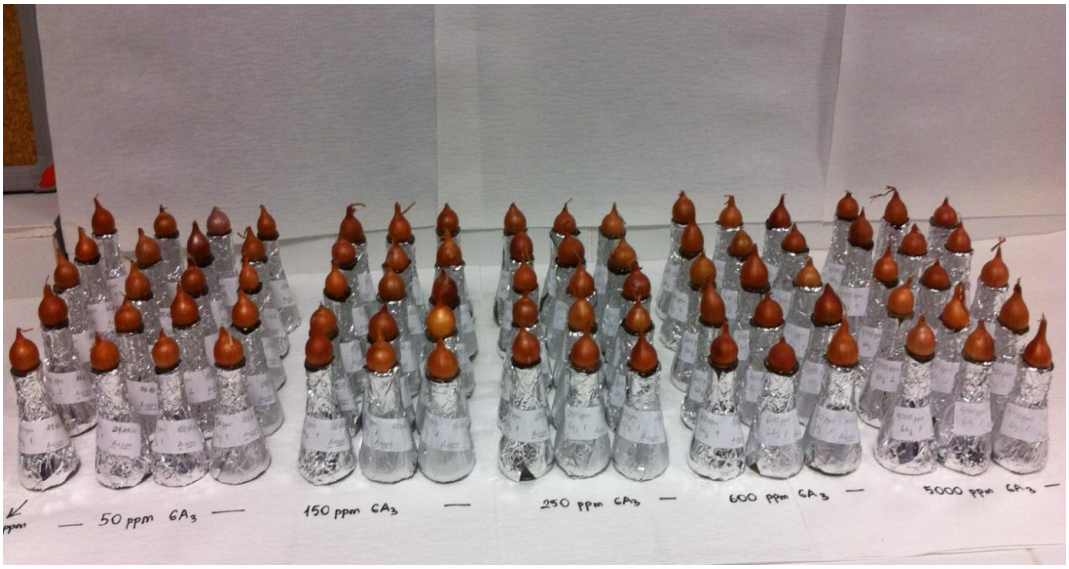
Hassas terazide tartılarak 250 mL'lik erlene konulan 2 g toz orsein, stok çözeltiden alınan 45 mL asetik asit içine ilave edilerek 45-50°C'de ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda erimeye bırakıldı. Isıtıcı tabladan indirilip soğumaya bırakıldıktan sonra 55 mL distile su eklenerek süzüldü (Ozban ve Özmutlu, 1994). 1 N HCl (Hidroklorik asit) hazırlanırken, % 37' lik HCl' den 82,5 mL alınıp distile su ile 1000 mL' ye tamamlandı.

3.4. Sitolojik İncelemeler

3.4.1. Kök inhibisyon testinin uygulanması ve EC_{50} değerinin belirlenmesi

Allium kök inhibisyon testi için uygun olan *A.cepa* soğanları seçildi ve test için gerekli hazırlık aşamaları uygulandı. Distile su ile 25 mL'lik erlenlerde *A.cepa* soğanları 24 saat süreyle köklendirildi. Bu süre sonunda iyi gelişme gösteren, homojen köklenenler kontrol ve farklı dozlarda GA_3 içeren çözeltilere 72 saat süre ile köklenmeye bırakıldı.

Denemeler esnasında her bir tekrar başına kontrol ve GA_3 çözeltisi için homojen köklenmiş 5' er soğan olmak üzere toplamda 165 soğan kullanıldı (Şekil 3.1). Etki konsantrasyonu (EC_{50}) belirlenirken 10 farklı GA_3 konsantrasyonu (50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 1000, 5000 ppm) kullanıldı. GA_3'ün sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelenmesi için yapılan *Allium* kök inhibisyon testi ile EC_{50} değeri hesaplandı. Laboratuvarda 22±2ºC sıcaklıkta ve direkt güneş ışığı almayacak şekilde 25 mL'lik erlenler alüminyum folyoya sarılarak denemeler gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Farklı GA_3 konsantrasyonları ile muamele edilen A.cepa soğanlarında EC_{50} değeri belirlenirken kurulan deney düzeneği

EC_{50} değeri belirlendikten sonra, uygulama çözeltileri olarak, 300 ppm ($EC_{50}/2$), 600 ppm (EC50) ve 1200 ppm ($2xEC_{50}$) olmak üzere üç farklı konsantrasyon kulllanılarak deneylere devam edildi (Şekil 3.2). Kontrol grubu için distile su kullanıldı. *Allium* test yöntemine uygun olarak 25 mL' lik erlenlerin içerisine hazırlanan konsantrasyonlarda GA_3 çözeltileri ilave edildi ve *A. cepa* bulbları laboratuvarda 22±2ºC sıcaklıkta bu çözeltiler içerisinde köklenmeye bırakıldı.



Şekil 3.2. EC_{50} değeri belirlendikten sonra $EC_{50}/2$, EC_{50} ve 2x EC_{50} konsantrasyonları ile kurulan deney düzeneği

Kontrol grubu ve her bir konsantrasyondan 5'er tane olmak üzere toplamda her bir doz için 15 *A.cepa*'dan 24, 48 ve 72 saatlerde de rastgele birbirine yakın olacak şekilde 10'ar kök ölçüldü ve kök uzunlukları ortalamalarına bakılarak her doza ait çimlenme yüzdesi değeri çıkarıldı. Denemeler üç tekrar halinde gerçekleştirildi.

3.4.2. Kromozom anormalliği testi

72 saatlik uygulama sonunda uzamış olan *A.cepa* kökleri bir pens ve bistüri yardımıyla yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda kesilerek taze hazırlanmış Carnoy fiksatifine (3 kısım % 95' lik etil alkol:1 kısım glasiyal asetik asit) alındı. Her bir konsantrasyon ve kontrol grubuna ait 15'er adet soğandan her birinden 10'ar adet olmak üzere ayrı ayrı fikseler yapıldı. Sonraki aşamalarda yapılacak sayımlar nedeniyle bir *A.*cepa'dan en az 10 adet kök fikse edildi. 24 saatlik fikse süresinden sonra materyaller %70'lik alkole alınarak, +4ºC'de buzdolabında saklandı.

3.4.2.1. Fiksasyon, hidroliz, boyama ve preperatların hazırlanması işlemleri

Fiksasyon işleminde uygulama sürelerinin sonunda *A.cepa* kök ucundan yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda kesilen örnekler Carnoy fiksatifine (3 kısım % 95' lik etil alkol:1 kısım glasiyal asetik asit) alınarak 24 saat +4ºC'de bekletildi. Bu işlem sonunda kökler % 70' lik etil alkol içerisine alınarak kullanılıncaya kadar buzdolabında +4ºC'de muhafaza edildi.

Meristem dokusu hücrelerinin ayrılıp kolay görüntülenebilmesi için hidroliz işlemi uygulandı. %70'lik etil alkol içerisinden alınan kök uçları 1 N HCl' de saat camında, bek aleviyle hidroliz edildi. Boyama için stok olarak hazırlanmış olan %2'lik aseto-orsein yarı yarıya seyreltilerek kullanıldı. %1'lik boyanın kullanımından önce 9:1 (aseto-orsein:HCl) oranında 1 N HCl eklendi. Bunun amacı, saat camı içerisinde ve bek alevinin üzerinde boyama yapılırken, aynı zamanda hidrolizi de sağlamaktır. Saat camı içerisinde boyanmış ve hidroliz edilmiş olan kökler lam üzerine alınarak %1'lik aseto-orsein ile boyandı. Boyamanın daha yoğun olduğu 1-2 mm uzunluğundaki kök ucu kısmı lam üzerinde bırakılıp, geri kalan kısım atıldı. Üzerine lamel kapatılarak ezme-yayma preparat tekniği uygulandı.

3.4.3. Mikroskobik incelemeler

Çalışmamızda bilgisayara görüntü aktarma ve floresans ataçmanına sahip olan Olympus BX51 marka araştırma mikroskobu kullanıldı. Mikroskobik gözlemde her kök için dört tesadüfi bölgedeki toplam hücre, bölünen hücre ve bölünme safhaları, 10x40 büyütmede sayıldı. Mitotik indeks hesabında her doz için hazırlanan 5 preparatın her birinden 200 hücre olmak üzere toplamda 1000 hücre sayıldı.

Bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla mitotik indeks yüzdesi belirlendi (Souza ve diğ., 2013).

Mitotik indeks hesaplamalarından sonra her preparattaki anormal hücreler incelendi. En çok gözlenen kromozom hasarları tespit edildi. Bölünen hücrelerdeki fragment, köprü, kromozom yapışması, yanlış kutuplaşma ve mikronükleus oluşumu gibi kromozomal hasarların oranları hesaplandı.

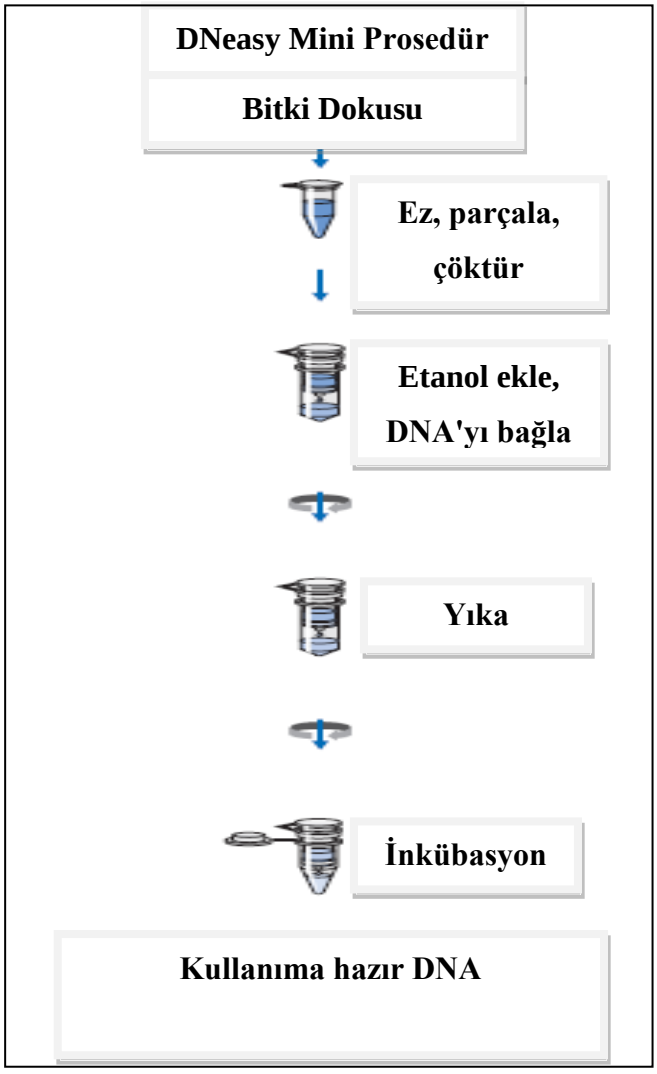
Elde edilen veriler her konsantrasyon için dağılımı içeren genel bir tabloya aktarıldı. SPSS 18 programında yapılan istatistik analizleri ile sonuçlar değerlendirildi. Kromozom anormallikleri 10x100 büyütmede çekilen fotoğraflarla gösterildi.

3.5. Moleküler İncelemeler

3.5.1. Genomik DNA izolasyonu, miktar ve saflık tayini

GA_3 uygulaması sonrasında gelişen kök uçlarından alınıp DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bu yöntemde ilk önce yaklaşık 200-300 mg kök ucu örneği havan kullanılarak 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. 10 dakika içerisinde karışım ara ara vortekslendi. Bu karışıma 130 µl Tampon AP2 eklenip vortekslendikten sonra 5 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi (-20ºC'de bekletme de tercih edilebilir). 14.000 rpm (>20.000 xg)'de 5 dakika boyunca santrifüj sonrası üst sıvı (yaklaşık 400 µl) 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 (yaklaşık 600 µl) Tampon AP3/E eklendi ve 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. Filtre 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 3.3).



Şekil 3.3. DNA izolasyonunda izlenen aşamalar

İzole edilen gDNA'ların gözlemlenmesi için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jel hazırlanırken; 1 g agaroz tartıldı ve 100 mL 1x Tris-Asetat-EDTA (TAE, AppliChem) içinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Karışım 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 4 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 1x TAE tamponu ile 4 µl dH_2O, 1 µl örnek gDNA ve 1 µl yükleme boyası karıştırılarak jelde oluşturulan kuyucuklara mikro pipet yardımı ile yüklendi. İlk kuyucuğa 100 bp 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 BMG SPECTROstar Nano ile 260 nm/280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm işlemi mikroplakalarda her bir örnekten 2'şer µl kullanılarak yapıldı. Spektrometrik sonuçlara göre DNA molekülünün miktar ve saflık tayini hesaplandı (URL-3).

3.5.2. RAPD PZR ve verilerinin değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan primerler *A. cepa* ile yapılan diğer RAPD çalışmalarında en çok kullanılan ve sonuç alınan primerler arasından belirlendi (Tablo 3.2 ve Tablo 3.3) ve Thermo Scientific firmasına sentezlettirildi. PZR bileşenleri miktarları, Williams ve arkadaşları (1990) tarafından geliştirilen RAPD tekniği koşullarına 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 3.4).

Elde ettiğimiz gDNA ile One Taq Master Mix ve Sigma PZR kiti kullanılarak RAPD tekniği gerçekleştirildi. Bitkiden izole edilen saf gDNA kullanılarak yapılan RAPD koşulları toplam hacim 25 µl olacak şekilde Tablo 3.5'teki ve RAPD reaksiyon döngü koşulları Tablo 3.5'daki 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 TAE tamponu kullanılarak 100 voltta 1 saat yürütüldü. İlk kuyucuğa 100 bp DNA standardı (Fermantas) yüklendi. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV jel görüntüleme cihazı yardımıyla görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan OPA serisi RAPD primerlerinin dizileri ve Tm değerleri

Primer Sayısı	Primer	Sekans 5'-------3'	Tm (°C)	GC oranı (%)
1	OPA 01	CAGGCCCTTC	34	70
2	OPA 02	TGCCGAGCTG	34	70
3	OPA 03	AGTCAGCCAC	32	60
4	OPA 04	AATCGGGCTG	32	60
5	OPA 05	AGGGGTCTTG	32	60
6	OPA 06	AGGGGTCTTG	32	60
7	OPA 07	GAAACGGGTG	32	60
8	OPA 08	GTGACGTAGG	32	60
9	OPA 09	GGGTAACGCC	34	70
10	OPA 10	GTGATCGCAG	32	60

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan AD serisi RAPD primerlerinin dizileri ve Tm değerleri

Primer Sayısı	Primer	Sekans 5'-------3'	Tm (°C)	GC oranı (%)
1	AD 01	GTTGCGATCC	32	60
2	AD 02	GTGCCTAACC	32	60
3	AD 03	ACGCGCATGT	32	60
4	AD 04	GACGCCACAC	34	70
5	AD 05	CCAGCTTAGG	32	60
6	AD 06	CCCGCTACAC	34	70
7	AD 07	GAGCGTCGAA	32	60
8	AD 08	TGCGAGAGTC	32	60
9	AD 09	CAGCCCAGAG	34	70
10	AD 10	TCGCCGCAAA	32	60

Tablo 3.4. RAPD PZR tekniğinde kullanılan bileşenler

RAPD PZR Bileşenleri	Miktar	Konsantrasyon
Buffer (1X One Taq MM)	12,5 µl	1X
Distile su	9,5 µl	-
$MgCl_2$	0,5 µl	25 mM
Primer	1 µl	0,3 µM
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl	1 U
gDNA	1 µl	20 ng
Toplam	25 µl	-

Tablo 3.5. Optimize edilen RAPD PZR döngüsü

RAPD PZR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngüler
Ön Denatürasyon	94	1 dakika	1
Denatürasyon	94	1 dakika	48
Bağlanma	37	30 saniye	
Uzama	72	1 dakika	
Son Uzama	72	5 dakika	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 (3.6)'e[1] göre;

$$\%GKS = (1- a/n) \times 100 \quad (3.6)$$

hesaplandı (a: uygulamaya ait polimorfik bant sayısı, n: kontroldeki bant sayısı).

3.6. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazların marka ve modelleri Tablo 3.6'da verildi.

Tablo 3.6. Deneylerde kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Marka ve Modeli
Hassas Terazi	Radwag, PS 510/C/1
Hassas Terazi	Sartorius TE214S
Mikroskop	Olympus BX51
Mikrodalga Fırın	Arçelik
pH-metre	Ohaus, Starter 3000
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, MR-HeiStandart
Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı	Thermo EC330 - Cleaver, CS-300
Isıtıcı tabla	Grant
Vorteks	IKA, GENIUS3
Saf Su Cihazı	Milipore, Direct-Q UV
Buzdolabı	Arçelik
Sıvı azot tankı	MVE
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Thermal Cycler	Applied Biosystems/Proflex PCR System
UV Transilüminatör	UVP-GelDoc-it, imaging system
UV Visible Spektrofotometre	BMG LABTECH/ BMG SPECTROstar Nano
Mini Santrifüj	Sigma, 1-14
Mikropipet Takımı	Eppendorf (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
Isıtıcılı Karıştırıcı	IKA MS 3 basic
PZR kabini	ESCO PCR Cabinet

3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

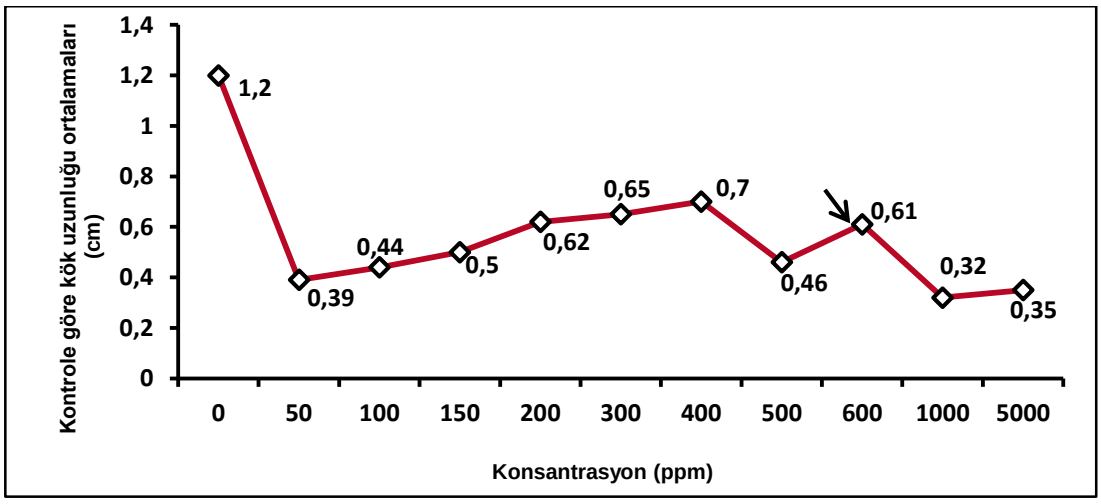
Gibberellik asit (GA_3) muameleli *Allium cepa* kök uzunluklarında 24, 48, 72 saat sonundaki değişimlere bağlı olarak çimlenme yüzdesi değerleri ve mitotik indeks değerleri ile normal ve anormal bölünen hücre sayılarındaki değişimler için incelenen her bir özellik açısından 3 tekrar yapıldı. Değişimlere ait değerlere SPSS 18'de ANOVA, Tukey HSD ve TAMHANE testi yapıldı. Önemlilik değeri $P< 0,05$ olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Morfolojik Bulgular

4.1.1. Gibberellik asit için belirlenen EC_{50} değeri

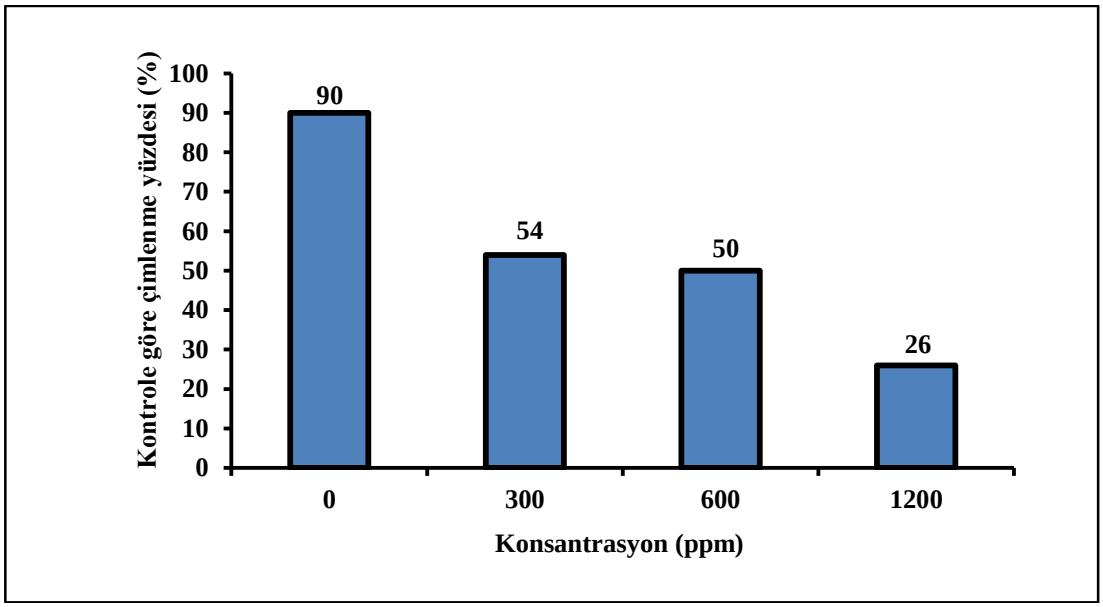
A.cepa'ya uygulanan farklı GA_3 konsantrasyonları için EC_{50} değeri saptandı, bu değerin yarısı ($EC_{50}/2$) ve iki katı ($2xEC_{50}$) da kullanılarak çalışmalara devam edildi. Ticari olarak alınan GA_3'ün farklı konsantrasyondaki çözeltileri seyreltilerek kullanıldı. Seyreltme işlemi, Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından önerildiği gibi en az 6 farklı ve birbirlerinin katları olan konsantrasyonlar hazırlanarak yapıldı. Seçilen konsantrasyonlarda hiç çimlenme gözlenmeyenler veri olarak değerlendirilmedi. EC_{50} değerinin belirlenmesi sırasında denemelerde 10 farklı GA_3 konsantrasyonu (50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 1000, 5000 ppm) kullanıldı. GA_3 için ortalama EC_{50} değeri 600 ppm olarak hesaplandı (Şekil 4.1). Buradan yola çıkılarak tüm deneysel çalışmalarda GA_3 için 300 ppm ($EC_{50}/2$), 600 ppm (EC_{50}) ve 1200 ppm ($2xEC_{50}$) konsantrasyonları kullanıldı.



Şekil 4.1. GA_3'ün *A.cepa* üzerindeki etkisi sonucu belirlenen EC_{50} değeri

4.1.2. Çimlenme yüzdesi değerleri

Çalışmamızda *A. cepa* soğanlarının GA_3'ün farklı konsantrasyonları ile muamelesi sonucunda, kontrol grubunda 72 saat sonunda %90 olan çimlenme yüzdesinin GA_3 konsantrasyonlarında, konsantrasyon artışına paralel olarak sırasıyla %54, %50 ve %26'ya düştüğü gözlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *A.cepa*'da GA_3 uygulaması sonucunda çimlenme yüzdesi değerleri

Kontrol ve GA_3'ün farklı konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat muamele edilen *A.cepa* soğanlarındaki çimlenme yüzdesindeki değişime göre kök uzunluklarına ait ortalama ve standart hata değerleri Tablo 4.1' de verildi. 24 saat muamele edilen *A.cepa* soğanlarında kök uzunluğu ortalamaları kontrol ve GA_3 konsantrasyonlarına (50, 100, 150, 200, 300, 500, 600, 1200, 5000 ppm) göre en düşük 0,34 cm ve en yüksek 0,74 cm olarak tespit edildi. 50, 150 ve 5000 ppm konsantrasyonlarındaki azalmalar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, 50, 150 ppm e göre 5000 ppm deki azalma kontrole göre önemli bulundu. 48 saat muamele edilen *A.cepa* soğanlarında kök uzunluğu ortalamaları kontrol ve GA_3 konsantrasyonlarına (50, 100, 150, 200, 300, 500, 600, 1200, 5000 ppm) göre en düşük 0,75 cm ve en yüksek 1,43 cm olarak tespit edildi. 5000 ppm konsantrasyonundaki azalma kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, 50, 150 ve 600 ppm e göre 5000 ppm deki azalma kontrole göre önemli bulundu.

72 saat muamele edilen *A.cepa* soğanlarında kök uzunluğu ortalamaları kontrol ve GA_3 konsantrasyonlarına (50, 100, 150, 200, 300, 500, 600, 1200, 5000 ppm) göre en düşük 1,37 cm ve en yüksek 2,24 cm olarak tespit edildi. 5000 ppm konsantrasyonundaki azalma kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, 50, 100, 200, 300 ppm e göre 5000 ppm deki azalma kontrole göre önemli bulundu.

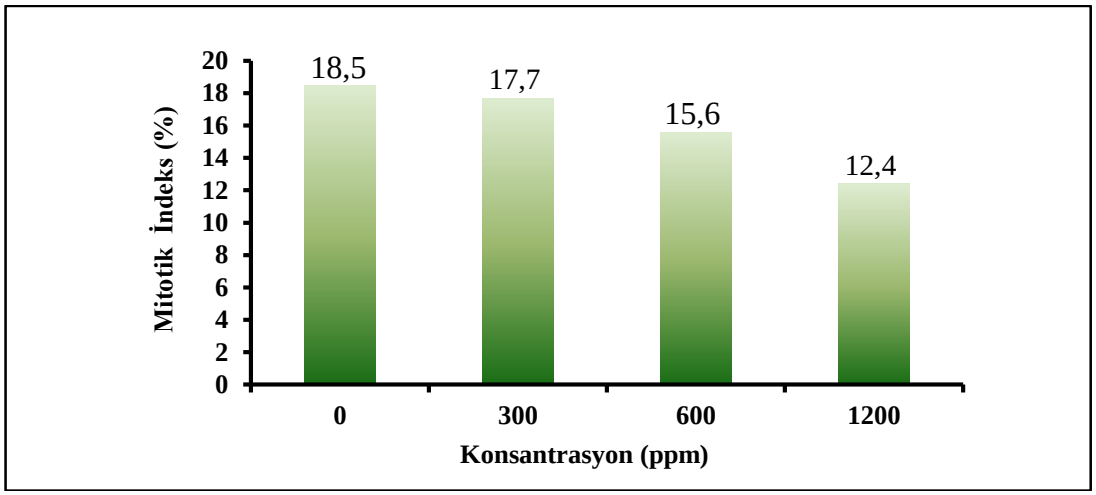
Tablo 4.1. GA_3'ün farklı konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat muamele edilen *A.cepa* soğanlarındaki çimlenme yüzdesindeki değişim

Konsantrasyon ppm	24 saat	48 saat	72 saat
	Kök Uzunluğu (cm) $\bar{x}$ ±SH*	Kök Uzunluğu (cm) $\bar{x}$ ±SH*	Kök Uzunluğu (cm) $\bar{x}$ ±SH*
0	0,74±0,03a	1,43±0,11a	2,24±0,09a
50	0,37±0,01b	0,87±0,05bce	1,70±0,08bc
100	0,47±0,02cd	0,98±0,05bcef	1,63±0,08bc
150	0,35±0,01bef	0,87±0,04bce	1,85±0,22abc
200	0,51±0,02c	1,21±0,06af	1,75±0,08bc
300	0,46±0,02cd	1,15±0,05adf	1,68±0,09bc
500	0,47±0,02cd	0,95±0,05bcde	1,37±0,08b
600	0,40±0,01bdef	0,86±0,03ce	1,84±0,10ac
1200	0,48±0,02cd	1,10±0,05ab	1,81±0,09c
5000	0,34±0,01bf	0,75±0,04c	1,57±0,09bc
Toplam	0,46±0,007	1,01±0,02	1,74±0,03

* $\bar{X}$ ±SH (*A. cepa* kök uzunluğu ortalaması ± Standart hata) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05), SH; Standart Hata, $\bar{X}$; Ortalama. **Her bir deney grubu sonucu 15 bireyden oluşan 3 tekrara aittir.

4.2. Sitolojik Bulgular

A. cepa soğanlarının GA_3'ün farklı konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrası mitotik indeks (MI) değeri kontrol grubunda %18,5 iken 300 ppm GA_3 muamelesi ile %17,7, 600 ppm GA_3 muamelesi ile %15,6 ve 1200 ppm GA_3 muamelesi ile de %12,4'e düştüğü gözlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının mitotik indeks yüzdesi üzerine etkisi

4.2.1. GA_3'ün mitotik indeks üzerine etkileri

A. cepa soğanlarının GA_3'ün farklı konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonrası mitotik indeks yüzdelerine ait ortalama ve standart hata değerleri Tablo 4.2'de verildi.

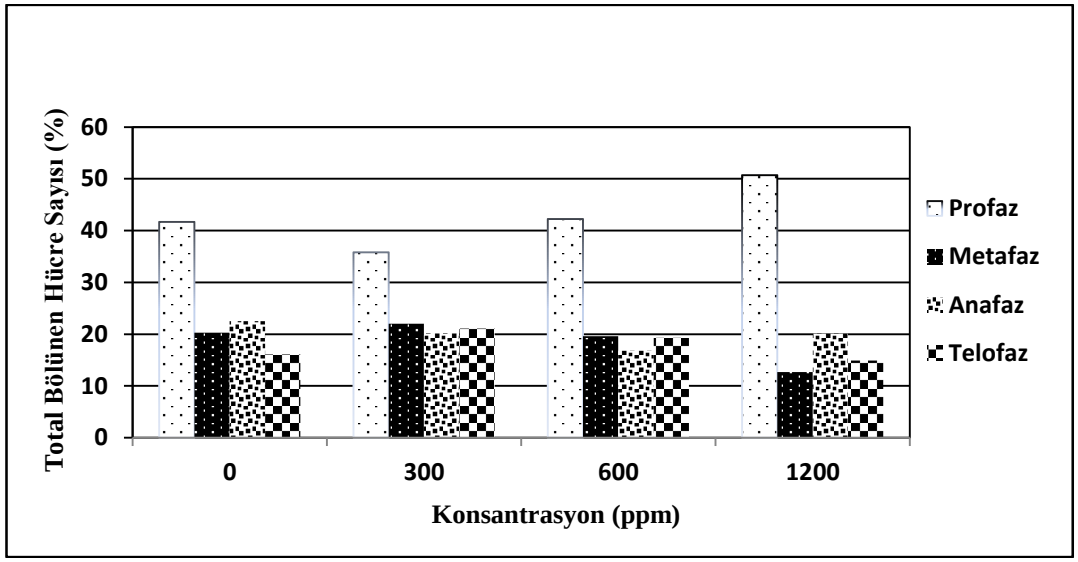
Tablo 4.2. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının mitotik indeks yüzdesi üzerine etkisi

Konsantrasyon ppm	Minimum/Maximum Değerleri	Mitotik indeks (%) $\bar{x}$ ±SH*
0	16,00-28,00	19,27±1,18a
300	10,00-34,00	18,05±2,35ab
600	11,50-24,00	17,55±1,34ab
1200	8,00-17,00	12,66±1,01b
Toplam	8,00-34,00	16,88±0,86

* $\bar{X}$ ±SH (*A. cepa* kök uzunluğu ortalaması ± Standart hata) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05), SH; Standart Hata, $\bar{X}$; Ortalama. **Her bir deney grubu sonucu 15 bireyden oluşan 3 tekrara aittir.

4.2.2. GA_3'ün *A.cepa*'daki kromozom anormalliklerine etkileri

GA_3'ün farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilen *A.cepa* soğanlarında mitoz bölünmenin farklı evrelerindeki (profaz, metafaz, anafaz, telofaz) total bölünen hücre sayısı yüzdeleri Şekil 4.4'de verildi.



Şekil 4.4. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi

Normal hücre yüzdesindeki değerlere bakıldığında, kontrol ve tüm GA_3 konsantrasyonlarında profaz ve telofaz evrelerinde anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 4.3). Metafaz ve anafaz evrelerinde kontrole göre tüm GA_3 konsantrasyonlarında fark olduğu gibi sırasıyla 300 ppm, 600 ppm ve 1200 ppm den (metafazda), 600 ppm de 300 ppm ve 1200 ppm den (anafazda) istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F= 6,442; df=3; P= 0,05; F= 2,735; df=3; P= 0,05). Anormal hücre yüzdesindeki bu artış tüm GA_3 konsantrasyonlarında ve konsantrasyon artışına paralel olarak değişiklik göstermekle birlikte, mitoz bölünme evrelerine göre GA_3 konsantrasyonları kontrole göre kıyaslandı (Tablo 4.4). Profaz evresinde tüm konsantrasyonlar, metafaz ve telofaz evresinde sırasıyla 300 ve 600 ppm GA_3 konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F= 8,980; df= 3; P= 0,05; F= 2,926; df=3; P= 0,05). Anafaz evresinde kontrole göre diğer konsantrasyonlarda anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Tablo 4.3. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının normal bölünen hücrelerdeki mitoz bölünme evrelerine ait ortalama ve standart hata değerleri

Konsantrasyon ppm	Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
	N	N	N	N
0	7,44±1,05a	3,77±0,37a	3,50±0,73a	3,11±0,70a
300	5,61±1,12a	1,72±0,82ab	2,33±0,62ab	2,61±0,49a
600	5,55±1,14a	1,38±0,56b	1,11±0,45b	2,22±0,61a
1200	3,27±1,33a	0,44±0,29b	1,44±0,72ab	1,66±0,50a

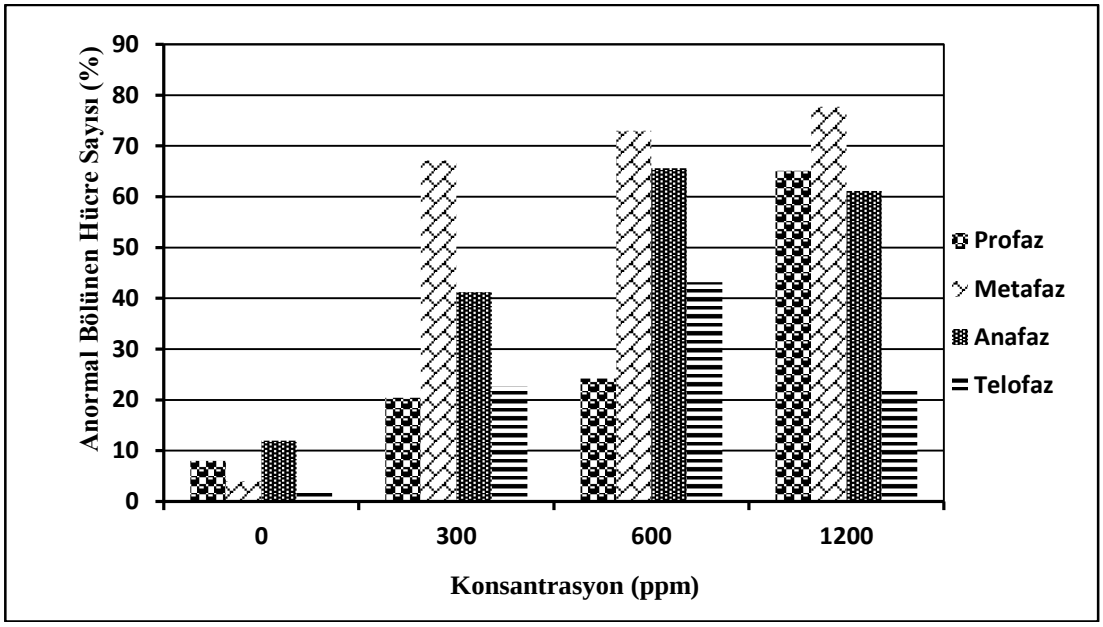
* $\overline{X}$ ±SH (*A. cepa* kök uzunluğu ortalaması ± Standart hata) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05), SH; Standart Hata, $\overline{X}$; Ortalama. **Her bir deney grubu sonucu 15 bireyden oluşan 3 tekrara aittir.

Tablo 4.4. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının anormal bölünen hücrelerdeki mitoz bölünme evrelerine ait ortalama ve standart hata değerleri

Konsantrasyon ppm	Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
	A	A	A	A
0	0,44±0,19a	0,22±0,12a	0,66±0,25a	0,11±0,07a
300	1,11±0,39ab	2,66±0,55b	1,38±0,29a	0,72±0,44ab
600	1,72±0,54abc	2,44±0,37b	1,88±0,44a	1,22±0,23b
1200	3,27±0,25c	1,22±0,33ab	1,11±0,43a	0,22±0,16a

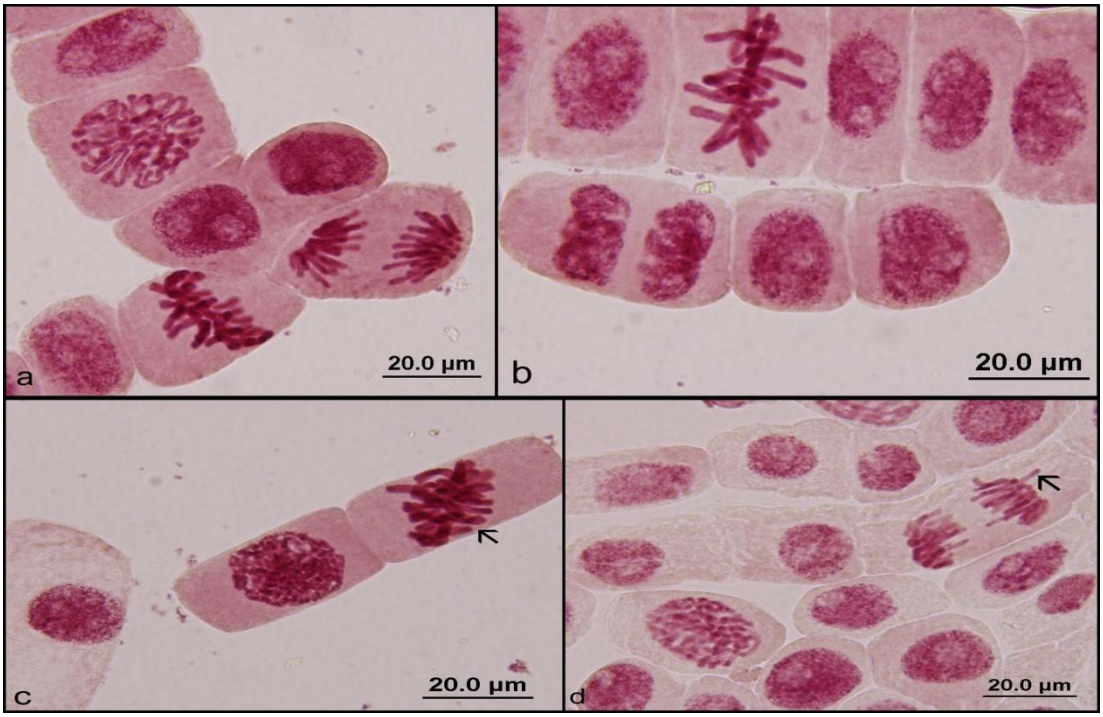
* $\overline{X}$ ±SH (*A. cepa* kök uzunluğu ortalaması ± Standart hata) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05), SH; Standart Hata, $\overline{X}$; Ortalama. **Her bir deney grubu sonucu 15 bireyden oluşan 3 tekrara aittir.

Mitoz bölünmenin farklı evrelerinde farklı GA_3 konsantrasyonlarının anormallik yüzdelerini incelemek için her evrede anormal hücreler sayılarak, anormallik yüzdeleri saptandı. GA_3 uygulaması sonrası anormal hücre yüzdesinde artış gözlendi (Şekil 4.5).



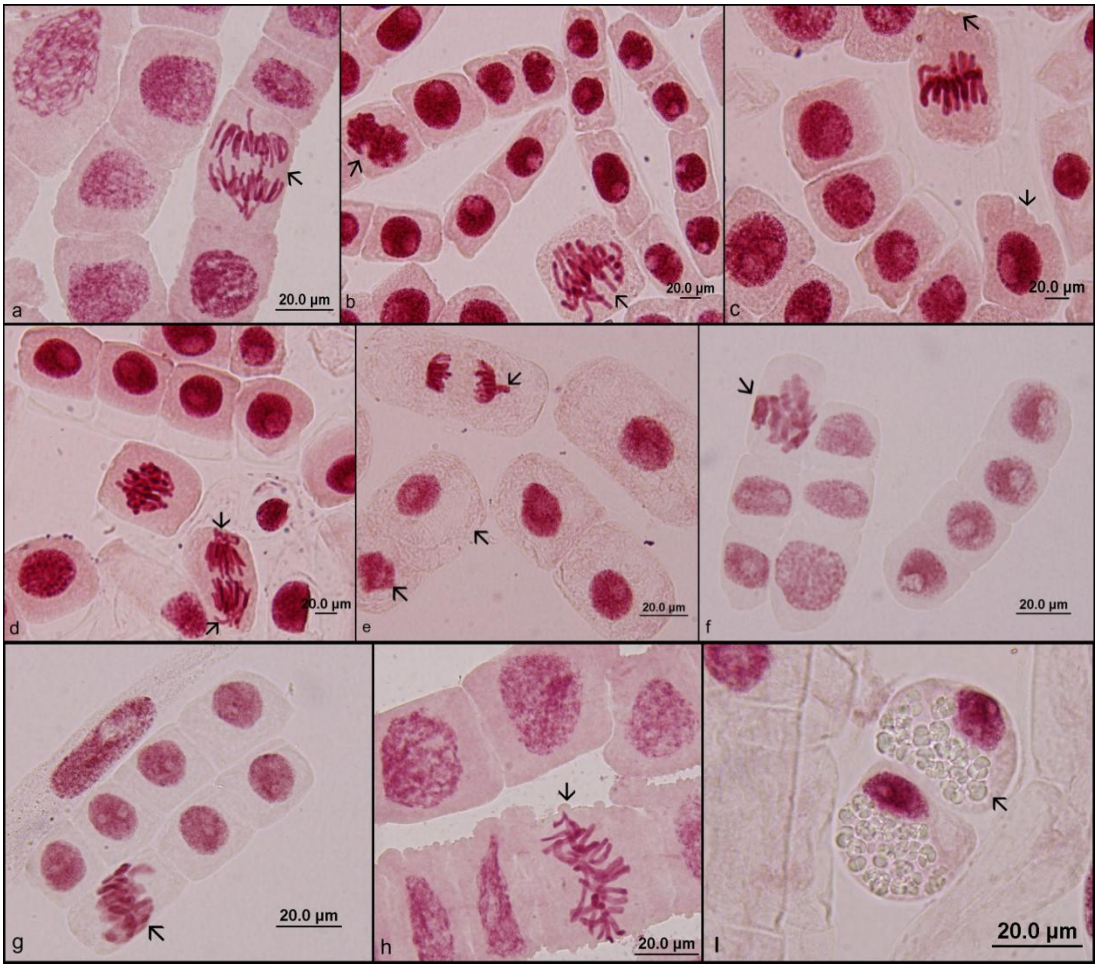
Şekil 4.5. Farklı GA_3 konsantrasyonlarının mitotik anormallik yüzdesi üzerine etkisi

Kontrolde (0 ppm) ekvator düzleminde kayma ve kalgın kromozom oluşumu en sık gözlenen anormallikler olarak belirlendi (Şekil 4.6).

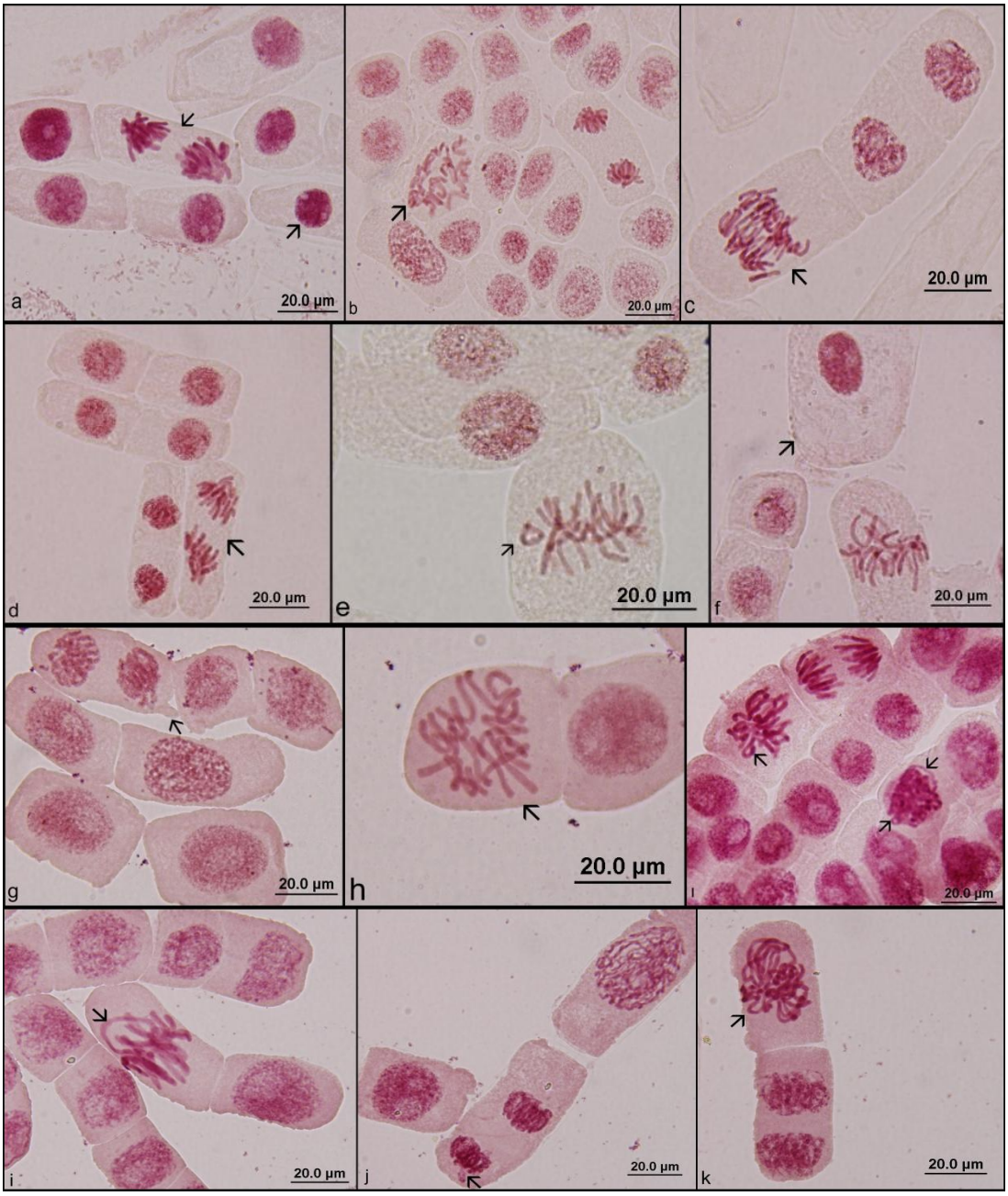


Şekil 4.6. Kontrolde (0 ppm) normal bölünen hücreler ve kromozom anormallikleri a- Normal profaz, metafaz ve anafaz, b- Normal metafaz ve sitokinez, c- Metafazda ekvator düzleminde kayma, d- Kalgın kromozom

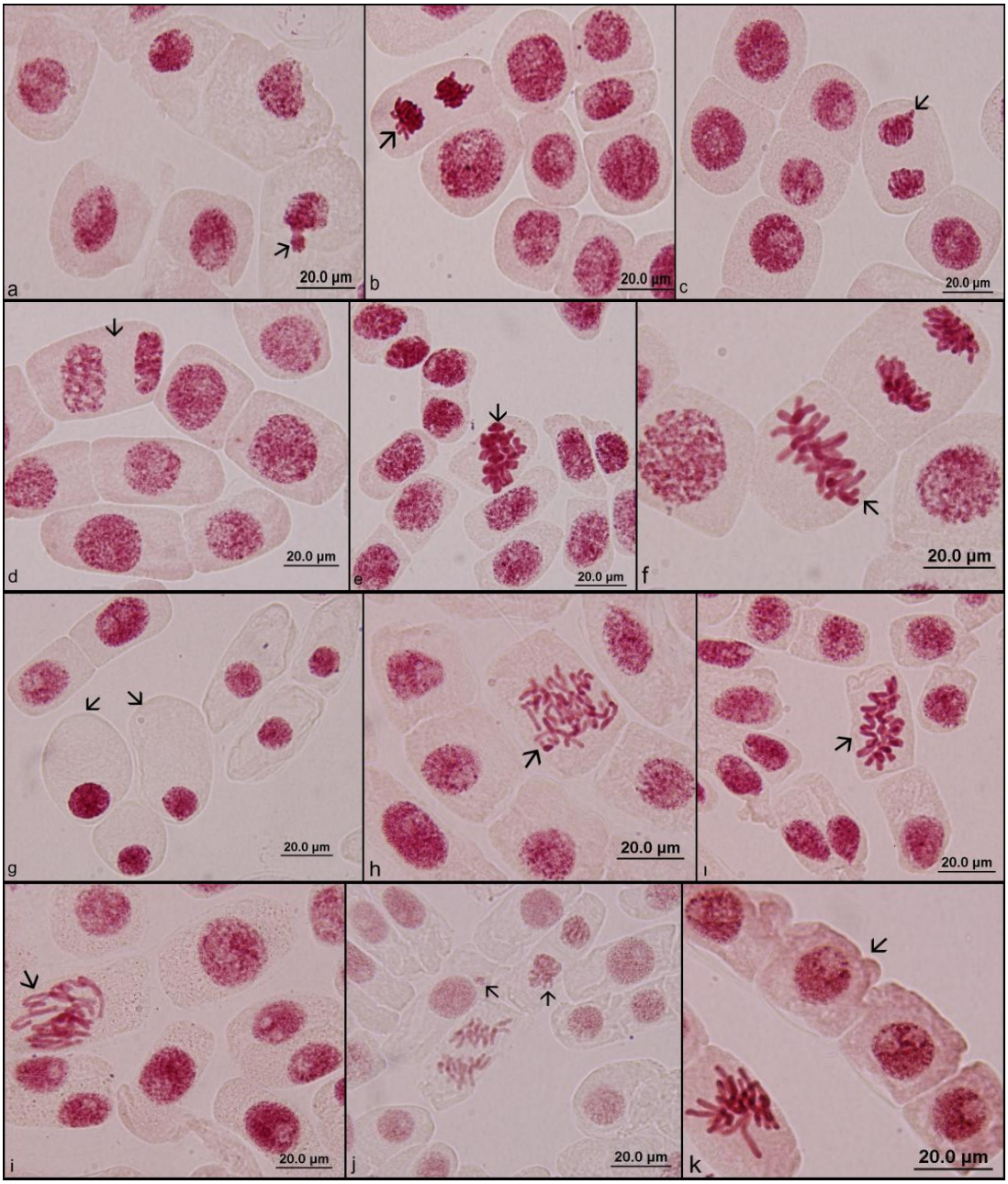
GA_3 muameleli uygulama gruplarında ise metafaz, anafaz ve telofazda ekvator düzleminde kayma, anafazda ve telofazda köprü oluşumu, nüklear tomurcuklar, c-mitoz, kalgın kromozom, kromozom ilmeği ve mikronükleus oluşumu, vakuolizasyon, hücre çeperinde deformasyon, kromatin granülasyonu, binükleus oluşumu, polar kayma en sık gözlenen anormallikler olarak belirlendi (Şekil 4.7, 4.8, 4.9).



Şekil 4.7. 300 ppm GA_3 konsantrasyonundaki kromozom anormallikleri a- Anafazda köprü oluşumu, b- Kromozom yapışması ve düzensiz metafaz, c- Hücre çeperinde deformasyonlar, d- Anafazda kromozom ilmeği ve kalgın kromozom, e- Telofazda kalgın kromozom, vakuolizasyon ve nükleus deformasyonu, f- Metafazda kromozom şişmesi, g- Metafazda ekvator düzleminde kayma ve kalgın kromozom, h- Hücre çeperinde deformasyon, ı- Amiloplast parçalanması



Şekil 4.8. 600 ppm GA_3 konsantrasyonundaki kromozom anormallikleri a- Anafazda ekvator düzleminde kayma ve piknotik nükleus, b- c mitoz, c- Anafazda köprü oluşumu ve kalgın kromozom, d- Anafazda ekvator düzleminde kayma, e- Kromozom ilmeği, f- Vakuolizasyon, g- Hücre çeperinde deformasyon, h- c mitoz, ı- Nüklear tomurcuk, kalgın kromozom ve kromozom ilmeği, i- Metafazda kromozom ilmeği oluşumu, j- Nüklear tomurcuk, k- Anormal metafaz

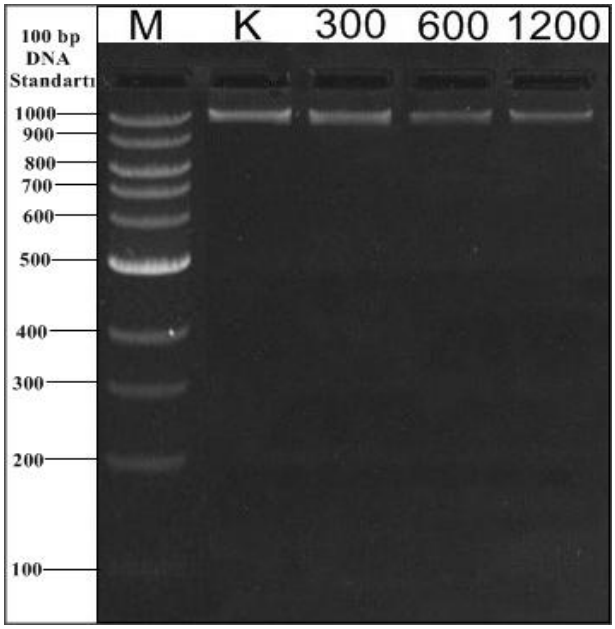


Şekil 4.9. 1200 ppm GA_3 konsantrasyonundaki kromozom anormallikleri a- Gen çoğalması ile oluşan nüklear tomurcuk, b- Telofazda nüklear tomurcuk, c- Telofaz sonu nüklear tomurcuk, d- Asimetrik hücre bölünmesi, e- Kromatin granülasyonu, f- Kromozomlarda şişme, g- Vakuolizasyon, h- ve ı- c mitoz, i- Kalgın kromozom ve kromozom ilmeği, j- Mikronükleus ve nüklear tomurcuk, k- Hücre çeperinde deformasyon

4.3. Moleküler Bulgular

4.3.1. gDNA miktar ve saflık dereceleri

DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak izole edilen gDNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.10'da verildi. Çalışmada BMG SPECTROstar Nano ile elde edilen Abs260/Abs280 ve DNA konsantrasyon değerleri Tablo 4.5'te verildi. Genomik DNA tek bir bant halinde gözlendi. Yükleme düzgün bir şekilde yapıldığından, yükleme kuyucuklarında, TAE tampon çözeltisi içerisinde tamamen erimiş halde olduğu gözlendi bu nedenle kuyucuklarda DNA kalmadı herhangi bir aydınlanma gözlenmedi. gDNA örneklerinin kuyucuklardan rahatça çıktığı ve elektroforezde yürüdüğü gözlendi. gDNA'larda kırılma olmadığı tespit edildi. DNA miktarları 94,03 ile 469,98 ng/µl arasında değişim gösterdi, DNA saflığının bir ifadesi olan OD260/280 oranlarının ise 1,76 ile 1,77 arasında değiştiği belirlendi.



Şekil 4.10. İzole edilen gDNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü (M: Markör, K: Kontrol, 300: 300 ppm GA_3, 600: 600 ppm GA_3, 1200: 1200 ppm GA_3)

Tablo 4.5. İzole edilen gDNA örneklerinin konsantrasyon değerleri

Konsantrasyon ppm	A260/A280	DNA/RNA konsantrasyonu (ng/µl)
0	1,77	239,78
300	1,77	259,94
600	1,77	469,98
1200	1,76	94,03

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 yaklaşık 1,8 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 GA_3 uygulaması yapılan gruplara ait DNA'ların RAPD PZR uygulamaları için yeterli miktar ve saflıkta olduğuna karar verildi.

4.3.2. RAPD profillerinin analizi ve değerlendirilmesi

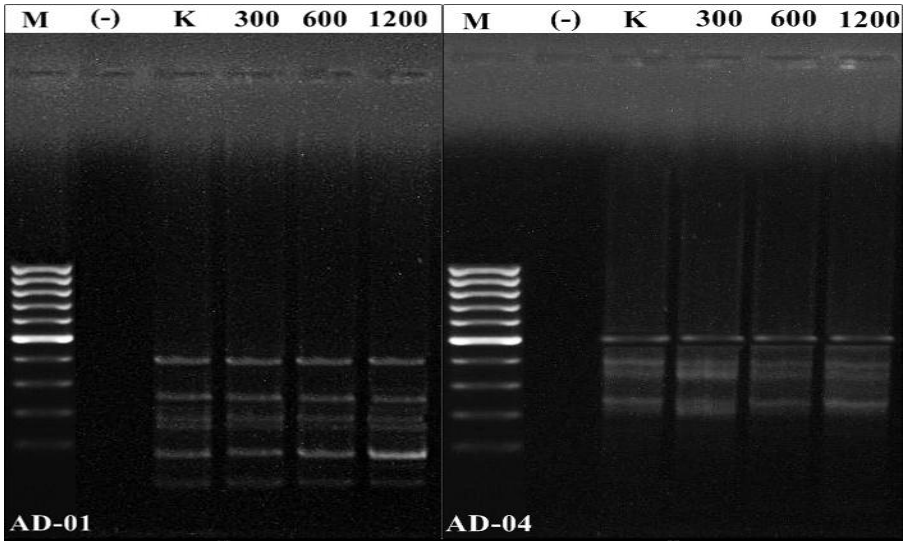
RAPD PZR analizi için 20 adet 10 bazlık primerler soğan ile yapılan diğer RAPD PZR çalışmalarında en çok kullanılan ve sonuç alınan primerler arasından belirlendi. Bu primerlerden elde edilen çoğaltım ürünleri değerlendirmeye alındı ve tüm primerlerin tekrarlanabilir ve güvenilir PZR ürünleri verdiği tespit edildi. Elde edilen çoğaltım ürünleri %1 oranındaki agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UVP-GelDoc-it jel görüntüleme cihazında incelenerek fotoğrafları çekildi. RAPD PZR sonuçlarının analizi ve sonuçların değerlendirilmesi çekilen fotoğraflar

üzerinden yapıldı. Çoğaltım sonucunda oluşan bantların okunmasında sadece kuvvetli bantlar değerlendirmeye alındı.

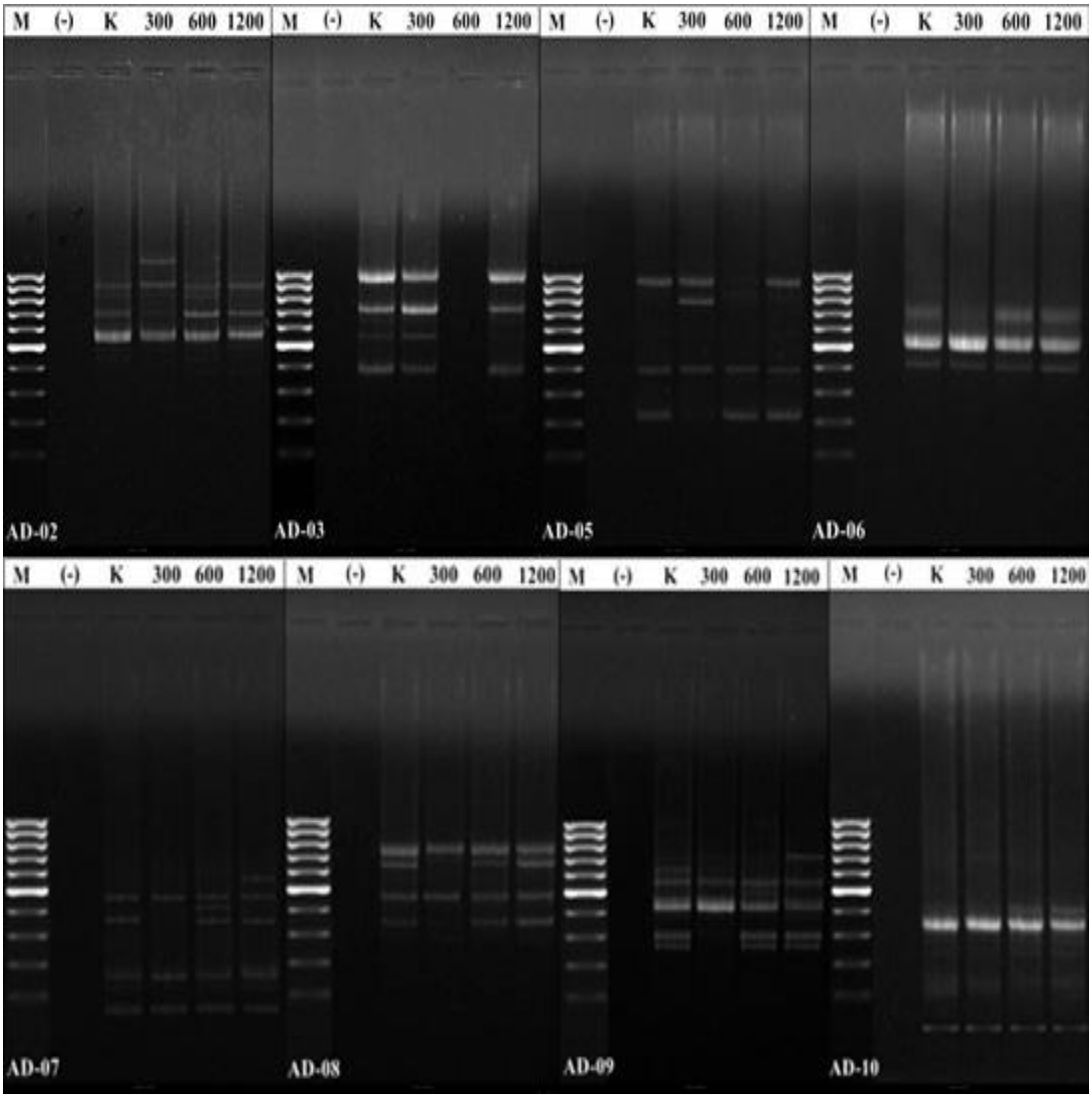
GA_3'ün farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiş *A.cepa* DNA'larının 20 adet RAPD primeri ile taranması sonucunda, 2 adet RAPD primeri (AD-01, AD-04) tüm gruplar arasında kontrol grubuna göre monomorfik bant profili gösterdi. Bu primerlerle elde edilen çoğaltım ürünlerinin hepsi agaroz jel elektroforezi sonucunda aynı bant profili gösterdi (Şekil 4.11).

Diğer 18 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 4.12 ve Şekil 4.13).

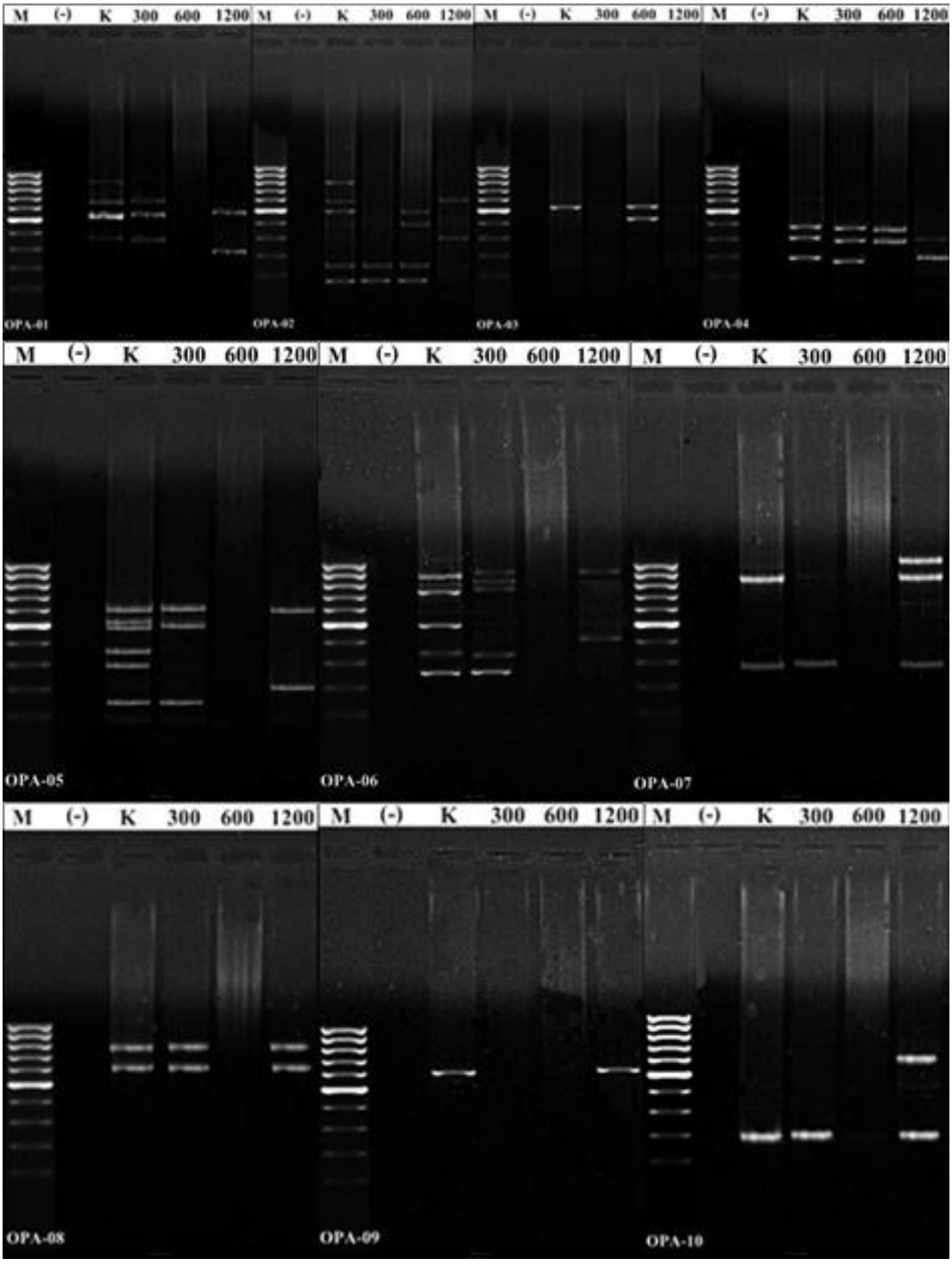
Tüm primerler ile elde edilen agaroz jel görüntüleri incelendiğinde 3 farklı uygulama grubu için belirlenen toplam monomorfik ve polimorfik primerler Şekil 4.14'de gösterildi.



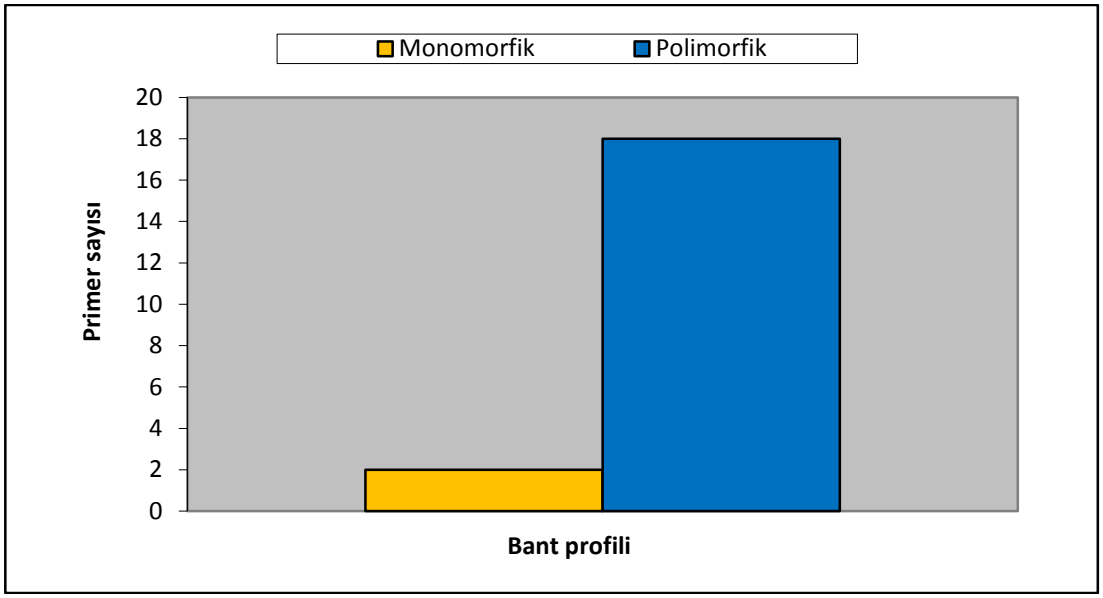
Şekil 4.11. AD-01 ve AD-04 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen monomorfik bant profilleri (M: Markör, (-): Negatif Kontrol, K: Kontrol, 300: 300 ppm GA_3, 600: 600 ppm GA_3, 1200: 1200 ppm GA_3)



Şekil 4.12. AD-02, AD-03, AD-05, AD-06, AD-07, AD-08, AD-09, AD-10 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri (M: Markör, (-): Negatif Kontrol, K: Kontrol, 300: 300 ppm GA_3, 600: 600 ppm GA_3, 1200: 1200 ppm GA_3)



Şekil 4.13. OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06,OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10 primerleri kullanılarak uygulama grupları arasında elde edilen polimorfik bant profilleri (M: Markör, (-): Negatif Kontrol, K: Kontrol, 300: 300 ppm GA_3, 600: 600 ppm GA_3, 1200: 1200 ppm GA_3)



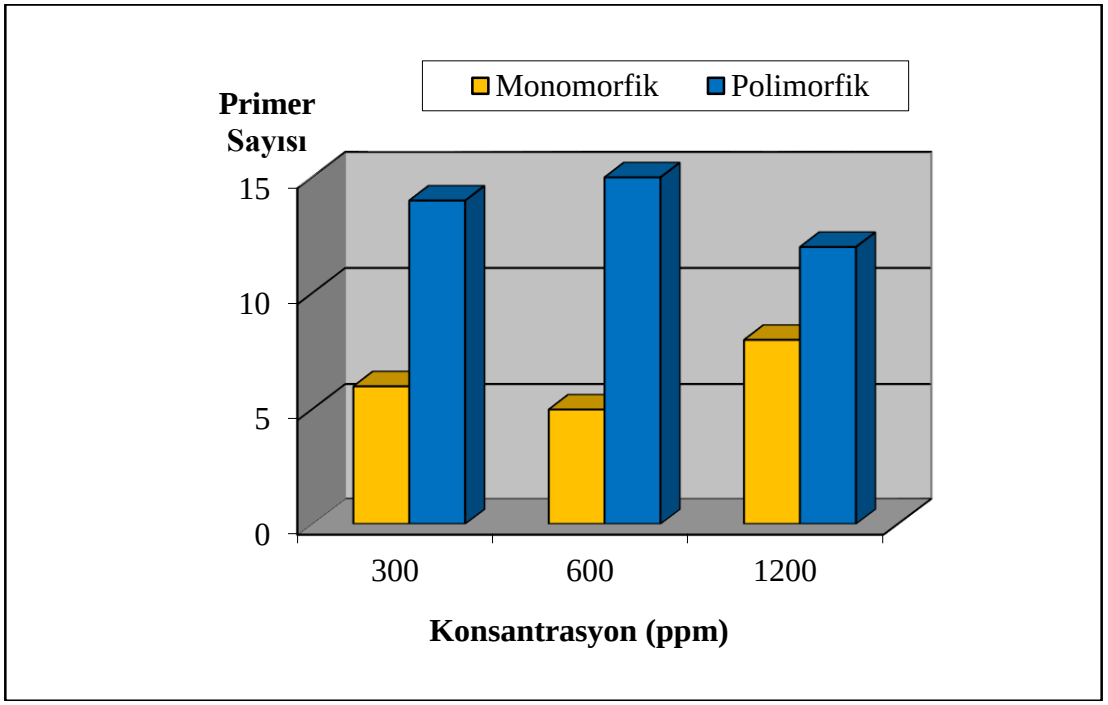
Şekil 4.14. Çalışmada kullanılan monomorfik ve polimorfik primer sayıları

Ayrıca uygulama gruplarına ait DNA'lar ile yapılan PZR analizleri sonucunda kontrol grubuna göre polimorfik ve monomorfik görülen 20 adet primerin uygulama grupları arasındaki dağılımları da incelendi.

Analizler sonucunda kontrole grubuna göre 300 ppm GA_3 uygulaması için 6 adet monomorfik ve 14 adet polimorfik, 600 ppm GA_3 uygulaması için 5 adet monomorfik ve 15 adet polimorfik ve 1200 ppm GA_3 uygulaması için 8 adet monomorfik ve 12 adet polimorfik bant profili gösteren primer olduğu gözlendi (Tablo 4.6 ve Şekil 4.15). Polimorfik bantlar kontrol grubuna göre bant varlığı ya da yokluğuna göre değerlendirildi ve her bir uygulama grubunun da hem uygulama grupları arasında hem de kontrole göre büyük farklılık gösterdiği tespit edildi.

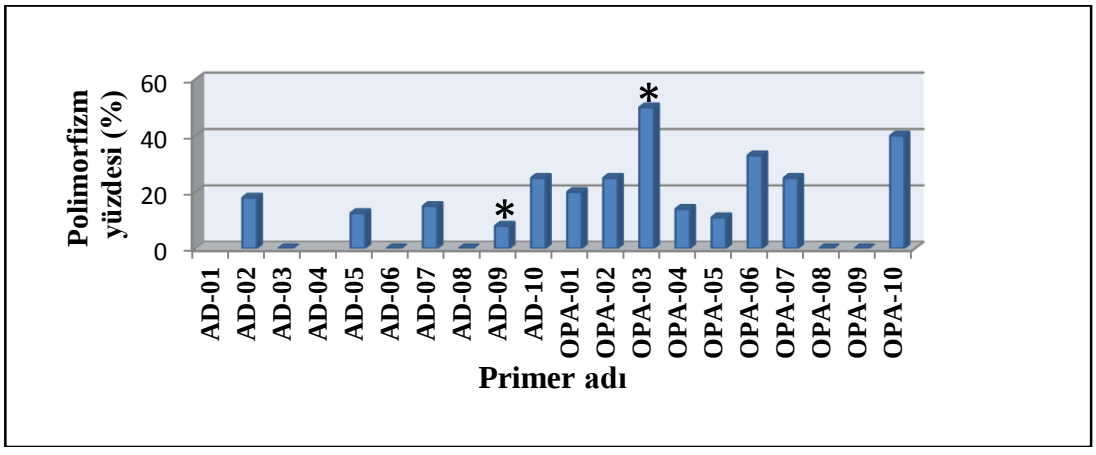
Tablo 4.6. Uygulama gruplarına göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi

Konsantrasyon ppm	Monomorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler	Polimorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler
300	AD-01, AD-03, AD-04, AD-10, OPA-08, OPA-10	AD-02, AD-05, AD-06, AD-07, AD-08, AD-09, OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-09
600	AD-01, AD-04, AD-06, AD-08, OPA-10	AD-02, AD-03, AD-05, AD-07, AD-09, AD-10, OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09
1200	AD-01, AD-02, AD-04, AD-05, AD-06, AD-08, OPA-08, OPA-09	AD-03, AD-07, AD-09, AD-10, OPA-01, OPA-02, OPA-03,OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-07, OPA-10



Şekil 4.15. Çalışmada kullanılan primerlerle uygulama gruplarına ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları

Bu çalışmada uygulama grupları arasında kullanılan RAPD primerlerinin kontrol grubuna göre %90 oranında polimorfik olduğu belirlendi ve bu primerlerin GA_3 uygulanan soğan 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 18 primerin RAPD çoğaltımı sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren bütün primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü hesaplandı (Tablo 4.7 ve Tablo 4.8). OPA serisi primerlerden 95 ile 1059 baz çifti büyüklüğü arasında ve AD serisi primerlerden de 217 ile 1206 baz çifti büyüklüğü arasında değişen toplam 20 adet polimorfik bant tespit edildi. Çalışmamızda kullanılan tüm uygulama gruplarında yeni bant oluşumu gerçekleşti. Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda değerlendirmeye alınan 20 RAPD primeri, toplam 234 adet bant verdi. Bu bantlardan 20 adedi polimorfik, 214 adedi monomorfik bantlardır. Polimorfik bant veren primerler değerlendirildiğinde; en fazla polimorfik bant veren primerin %50 oranıyla OPA-03; en fazla monomorfik bant veren primerin ise %92 oranıyla AD-09 olduğu gözlendi. Ayrıca kontrole kıyasla polimorfik bant veren bütün primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantları değerlendirildiğinde, AD-03, AD-06, AD-08, OPA-08 ve OPA-09 primerleri uygulama grupları içinde polimorfik bant profili göstermelerine rağmen, kontrole göre ekstra polimorfik bant göstermedikleri için polimorfizm yüzdeleri "0" olarak değerlendirildi. Bu veriler esas alındığında, elde edilen bantların %8'inin polimorfik olduğu belirlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Çalışmada kullanılan AD ve OPA serisi RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri

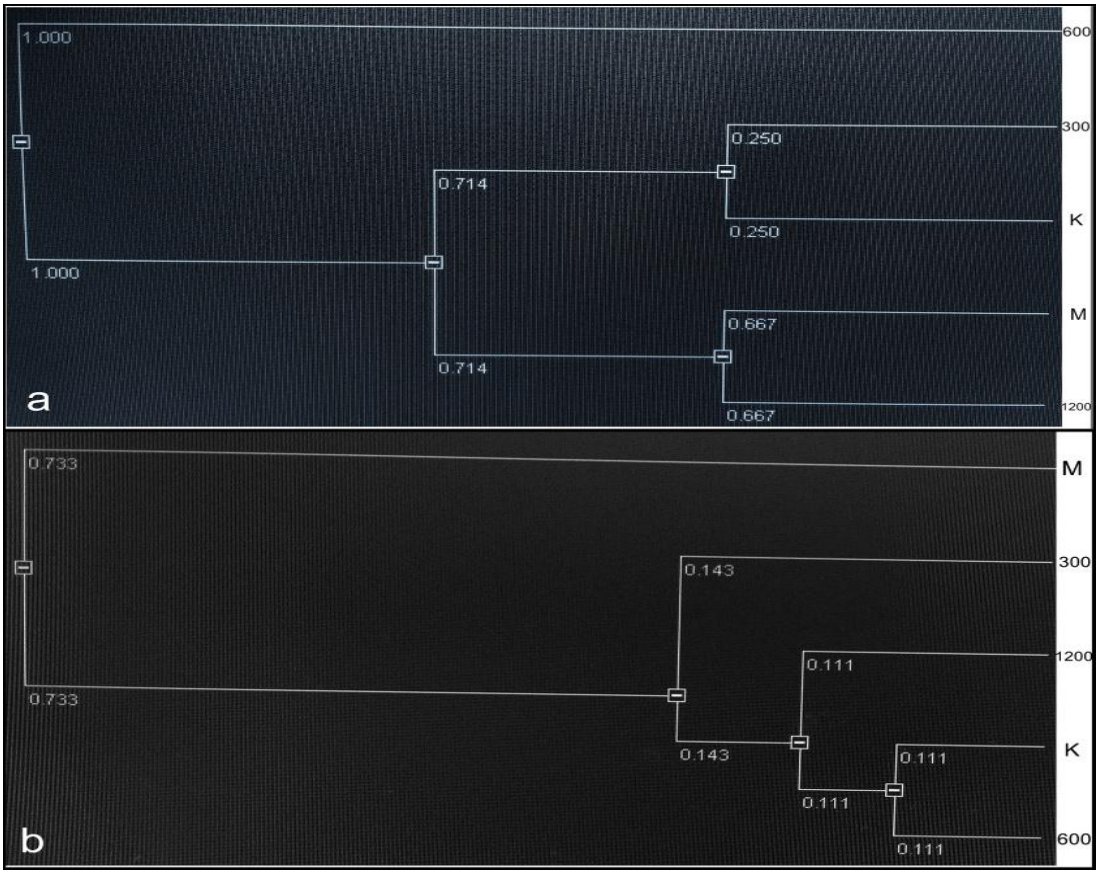
Tablo 4.7. OPA serisi RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü (baz çifti, bp)

Primerler	Kontrol (0 ppm)		GA_3 Konsantrasyonları (ppm)		
			300	600	1200
OPA 01	5	-	909;790	909;790;659; 527;366	909;790;659; 366
		+	0	0	285
OPA 02	5	-	800;574;488	800;574	800;488;145;86
		+	0	394	295
OPA 03	1	-	528	0	528
		+	0	437	0
OPA 04	3	-	190	190	389
		+	174	0	0
OPA 05	7	-	523	606;523;487;361; 300;143;95	523;487;361; 300;143
		+	0	0	203
OPA 06	8	-	651;568;500	908;819;748;651; 568;500;344;256	819;748;651;568; 500;344;256
		+	0	0	404;315;273
OPA 07	2	-	868	868;281	0
		+	0	0	1059
OPA 08	2	-	0	800;614	0
		+	0	0	0
OPA 09	1	-	614	614	0
		+	0	0	0
OPA 10	1	-	0	0	0
		+	0	0	625;422
Total	35		13(-);1(+)	28(-);2(+)	22(-);9(+)

Tablo 4.8. AD serisi 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)

Primerler	Kontrol (0 ppm)		GA_3 Konsantrasyonları (ppm)		
			300	600	1200
AD 02	3	-	0	0	0
		+	1206	814	0
AD 03	4	-	0	971;731;547;390	547
		+	0	0	0
AD 05	3	-	217	952	0
		+	800	0	0
AD 06	3	-	706	0	0
		+	0	0	0
AD 07	4	-	364	0	0
		+	0	419	571
AD 08	4	-	644;348	0	0
		+	0	0	0
AD 09	5	-	635;300;264	635	635
		+	0	0	736
AD 10	2	-	0	0	0
		+	0	404	409
Total	28		8(-);2(+)	6(-);3(+)	2(-);3(+)

Popgene analizi sonucunda Nei (1972)'ye göre hesaplanan, UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Aritmetic Mean) metoduna göre çizilen dendrogramlar Şekil 4.17'de verildi. Nei (1972)'ye göre hesaplanan uygulama grupları arasındaki genetik mesafeye dayalı olarak UPGMA metodu ile uygulama grupları arasında bir dendrogram elde edildi.



Şekil 4.17. Çalışmada kullanılan OPA (a) ve AD (b) serisi RAPD primerlerine ait uygulama grupları arasındaki dendrogramlar (M: Markör, K: Kontrol, 300: 300 ppm GA_3, 600: 600 ppm GA_3, 1200: 1200 ppm GA_3)

OPA serisi primerlere ait uygulama gruplarından 300 ppm GA_3 ve AD serisi primerlere ait uygulama gruplarından 600 ppm GA_3 kontrol ile aynı profil göstermektedir. OPA ve AD serisi primerlere ait uygulama gruplarından 600 ppm, 300 ppm ve 1200 ppm GA_3 konsantrasyonları farklı dallara ayrılmıştır.

OPA serisi primerlere ait dendrogramda (a) 600 ppm GA_3 ve 1200 ppm GA_3 konsantrasyonları, kontrol ve 300 ppm GA_3 konsantrasyonundan farklı bir genetik profil göstermiş olup, kontrol ve 300 ppm GA_3 konsantrasyonu kendi aralarında aynı genetik profile sahiptirler yani aralarında herhangi bir genetik farklılık gözlenmedi. Ayrıca 600 ppm GA_3 konsantrasyonu kontrol ve diğer uygulama gruplarından farklı bir genetik profil göstermiş ve ayrı bir dala ayrıldı.

AD serisi primerlere ait dendrogramda (b) 300 ppm GA_3 ve 1200 ppm GA_3 konsantrasyonları, kontrol ve 600 ppm GA_3 konsantrasyonundan farklı bir genetik profil göstermiş olup, kontrol ve 600 ppm GA_3 konsantrasyonu kendi aralarında aynı genetik profile sahiptirler yani aralarında herhangi bir genetik farklılık gözlenmedi. Ayrıca 300 ppm GA_3 ve 1200 ppm GA_3 konsantrasyonlarında kontrol ve 600 ppm GA_3 konsantrasyonundan farklı genetik profiller gözlenmiş ve ayrı dallara ayrıldı.

Dendrogramlar genel olarak değerlendirildiğinde OPA serisine ait primerlere ait uygulama gruplarından 600 ppm GA_3 konsantrasyonu, AD serisine ait primerlere ait uygulama gruplarından da 300 ppm GA_3 ve 1200 ppm GA_3 konsantrasyonlarının kontrol ve diğer uygulama gruplarından ayrı bir dala ayrıldığı ve farklı genetik profiller gösterdiği gözlendi.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; GA_3 ile muamele sonrası konsantrasyon artışına paralel olarak ortalama genomik kalıp stabilitesinde bir düşüş gözlendi. Genomik kalıp stabilitesindeki değişim genomik DNA miktarındaki değişimden daha fazla duyarlı, çimlenme yüzdesindeki değişimden daha az duyarlı olarak bulundu. Benzer sonuçlar Atienzar ve arkadaşları (1999), Liu ve arkadaşları (2005) ve Cenkci ve arkadaşları (2009) tarafından rapor edilmiştir. Genomik kalıp stabilitesi (GKS) değeri, RAPD profillerindeki değişiklikleri yansıtan niteliksel bir ölçüdür ve polimorfik bant veren 13 primer için hesaplanan genomik kararlılık değerleri Tablo 4.9'da gösterildi. Genomik kalıp stabilitesi değeri en fazla 1200 ppm GA_3 uygulamasıyla azaldığı gözlendi. Diğer uygulama gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmiştir.

Tablo 4.9. Genomik kalıp stabilitesi (GKS, %) değerleri

		GA_3 konsantrasyonları (ppm)		
Primerler	Kontrol (%)	300 (%)	600 (%)	1200 (%)
AD-02	100	67	67	100
AD-05	100	67	100	100
AD-07	100	100	75	75
AD-09	100	100	100	80
AD-10	100	100	50	50
OPA-01	100	100	100	80
OPA-02	100	100	80	80
OPA-03	100	100	0	100
OPA-04	100	67	100	100
OPA-05	100	100	100	86
OPA-06	100	100	100	63
OPA-07	100	100	100	50
OPA-10	100	100	100	0
Ortalama	100	92,3	82,4	74,1*

* 300: 300 ppm GA_3, 600: 600 ppm GA_3, 1200: 1200 ppm GA_3 ve *: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bitkiler doğada yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumlu ve olumsuz yönde etkileyecek birçok uyaranla karşılaşırlar. Büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek olan stres faktörleri ile karşılaşan bitki bu koşullar ortadan kalktıktan sonra ya normal yaşamına geri dönebilmekte ya da stres nedeniyle canlılığını yitirebilmektedir. Biyotik ve abiyotik kaynaklı olabilen bu stres faktörleri, bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal zararların yanı sıra ürün nicelik ve niteliğini de olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Hem doğal hem de sentetik olarak bitkide birtakım etkilere yol açan bitki büyüme düzenleyicileri genel olarak toksik olmamaları nedeni ile biyokimyasal biyositler olarak da adlandırılmaktadırlar. Uygulama sonrasında da ürün tüketilene kadar çok az düzeyde kalıntı bırakabilirler. Bitki büyüme düzenleyicilerinden GA_3, bitkide gövde uzaması, büyümesi, yaprak büyümesi, çiçeklenmeyi etkilendirme ve diğer çeşitli büyüme, gelişme ve farklılaşma olaylarında etkili olmakla birlikte yüksek konsantrasyonlarda bilinçsizce kullanıldıklarında toprak ve suda yaşayan organizmalar için toksik olabilmektedir. Öncelikle toprakta birikip sonra zamanla parçalanırlar. Bitkiler üzerinde de özellikle enzim sistemlerini etkiledikleri için toksik etkilere sahiptirler.

Allium testi, *A. cepa*'nın kromozom sayısının az olması, kromozomlarının büyük, kolay gözlemlenebilir ve boyanabilir olması, kısa zamanda ve hızlı sonuçlar vermesi, çok sayıda mitotik hücre içermesi, kolay ulaşılabilir ve ekonomik olması gibi avantajlardan dolayı tercih edilen önemli bir sitogenetik testtir. Özellikle mitoz bölünme üzerine fiziksel ve kimyasal mutajenlerin, kirletici etkenlerin, bitki ekstraktları ve benzer etkin maddelerin sitogenetik etkilerinin araştırılmasında uzun yıllardır çeşitli araştırıcılar tarafından test materyali olarak kullanılmaktadır.

Moreira de Lima ve arkadaşları (2013) yılındaki çalışmalarında *Joannesia princeps* yapraklarından elde ettikleri ekstraktın potansiyel genotoksik ve sitotoksik etkilerini belirlerken *Allium* testini kullanmışlar ve *Allium* testinin görüntülemede, çevresel ajanların genotoksisite ve sitotoksisitelerinin belirlenmesinde en etkili test olduğunu belirtmişlerdir.

Bu tez çalışması, dünyada genel olarak bitkideki büyüme ve gelişmeyi olumlu yönde etkilediği düşünülen bitki büyüme düzenleyicilerinin bilinçsizce yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıklarında hem uygulanan bitki üzerindeki hem de diğer canlılar üzerindeki olası sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yapıldı. Çalışma kapsamında seçilen bitki büyüme düzenleyicisi gibberellinlerden olup, ticari olarak en yaygın kullanılan GA_3 olarak seçildi. Yapılan deneyler sonucunda GA_3'ün; *Allium* testiyle kromozom anormalliklerine, genomik DNA izolasyonu ve ardından RAPD PZR tekniğiyle de moleküler düzeyde bitkideki olası sitotoksik ve genotoksik etkileri belirlenmeye çalışıldı.

Çalışmamızda çimlenme yüzdelerine ilişkin değerlerde konsantrasyon artışına paralel olarak düşüş gözlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri, bitki büyümesinin değişik devrelerinde ve değişik bitki organlarına farklı konsantrasyonlarda uygulandıklarında farklı etkiler gösterebilmektedir (Kocaçalışkan, 2003). BBD'lerin kontrolsüz ve bilinçsiz bir şekilde aşırı miktarlarda kullanımı neticesinde ürünlerde oluşan kalıntılar insan ve çevre sağlığı üzerinde çeşitli toksik etkilere de neden olmaktadır. Özellikle BBD'ler canlı sistemden tamamen atılamayıp organlarda depolanmakta ve fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Yılmaz ve Yüksel, 2002). Çimlenme yüzdesi değerlerindeki bu düşüşün, GA_3 konsantrasyonlarındaki artış ile doğru orantılı olarak gerçekleştiğini düşünüyoruz.

GA_3 konsantrasyon artışı ile birlikte, kontrol ve uygulama grupları kendi aralarında kıyaslandığında uygulanan doz arttıkça mitotik indeks yüzdesinde kontrollü bir düşüş gözlendi. Bitki hücrelerinde mitotik indeksi azaltan olası mekanizmalar vardır.

İlki 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). Bulgularımız Ud-Deen ve Kabir'in (2009) bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Bitkilerde ve hayvanlarda gözlenen kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimleri ve mikronükleus oluşumları, kimyasalların DNA ile etkileşime girdiklerini ve hasara neden olduklarını göstermektedir (Saxena ve diğ., 2005). Çalışmamızda gibberellik asit (GA_3) uygulamasının mitoz bölünme evrelerinde azalmalar meydana getirdiği saptandı. Özellikle 1200 ppm GA_3 konsantrasyonunda kontrol ve diğer uygulama gruplarına kıyasla mitoz bölünmenin tüm evrelerine bakıldığında total hücre yüzdesinde azalmaya karşın anormal bölünen hücre yüzdesinde artış gözlenmiştir. Bulgularımızla tutarlı olarak çimlenme gözlemlerimiz boyunca kök büyümesinin 72 saat sonunda en fazla 1200 ppm GA_3 uygulaması ile azaldığı bulundu.

Kontrolde (0 ppm) ekvator düzleminde kayma ve kalgın kromozom oluşumu en sık gözlenen anormallikler olarak belirlendi. GA_3 muameleli uygulama gruplarında ise metafaz, anafaz ve telofazda ekvator düzleminde kayma, anafazda ve telofazda köprü oluşumu, nüklear tomurcuklar, c-mitoz, kalgın kromozom, kromozom ilmeği ve mikronükleus oluşumu, vakuolizasyon, hücre çeperinde deformasyon, kromatin granülasyonu, binükleus oluşumu, polar kayma en sık gözlenen anormallikler olarak belirlendi. Mitotik şekillenmedeki bozulmanın ve düzensiz evre oluşumunun, kromozomların hareket mekanizmasında veya ekvatoral plaktaki yerleşimlerindeki düzensizliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Soliman ve Ghoneam, 2004).

En sık gözlediğimiz ekvator düzleminde kayma, kromozom köprüleri ve c-mitoz anormalliklerinin de konsantrasyon artışıyla bağlantılı olup, hücre bölünmesi esnasında oluştuğu belirlendi. Özellikle 1200 ppm GA_3 uygulaması sonucunda gözlenen c-mitoz oluşumunun, GA_3'ün iğ ipliği oluşumunu inhibe edici özelliğinden

kaynaklandığını ve mikronukleus oluşumunun ise mitozu takiben oluşan kalgın kromozom veya kromozom parçalarından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Fenech (2007) yılında yaptığı çalışmada in vivo da genotoksinlere maruz kalan hücrelerdeki etkileri görüntülemiş ve bir kromozom anormalliği olan ve mikronükleus tomurcuğu olarak da adlandırılan nüklear tomurcuk oluşumunu genotoksik ajan sonucu oluşan gen çoğalmasına bağlı olarak ortaya çıktığını belirtmiştir. Çalışmamızda tüm GA_3 konsantrasyonlarında fotoğrafladığımız nüklear tomurcuk oluşumu da Fenech'in sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

GA_3'ün tohum çimlenmesini teşvik etmesinin yanısıra (Karssen ve diğ., 1989; Karssen, 1995; Sharma ve diğ., 2004), çimlenmekte olan tohumlarda α-amilaz ve diğer hidrolitik enzimler ile büyüme ve gelişme için gerekli olan yapısal proteinlerin sentezini de arttırarak çimlenmeyi sağlamaktadır. Tohum çimlenmesi sırasında embriyoda sentezlenen GA_3, çimlenme olayının başlayabilmesi için, endospermdeki nişastayı şekerlere dönüştürebilen α-amilaz enziminin sentez ve aktivasyonunu arttırarak tohum rezervlerinin harekete geçmesini sağlamaktadır (Fincher, 1989). Kromozom anormallikleri testi ile 300 ppm GA_3 konsantrasyonunda gözlemlediğimiz parçalanmış nişasta tanecikleri de bu durumu ispatlamaktadır, tohumda gerçekleşen bu olayın köklerde de gerçekleşebileceğini düşünüyoruz. 600 ppm GA_3 ve 1200 ppm GA_3 konsantrasyonlarında doz artışına paralel olarak α-amilaz aktivasyonunun inhibe olduğu düşünülebilir.

Kontrol ve tüm uygulama gruplarından izole edilen genomik DNA'ların miktarına bakıldığında, EC_{50} değeri belirlenirken yürütülen deney sonuçlarına paralel olarak kök uzunlukları ortalamaları gibi DNA miktarlarının da hormesis etkisi göstererek doz artışına paralel olmayacak şekilde ölçüldüğü kaydedildi. gDNA saflık değerleri bu durumdan farklı olarak kontrol ve uygulama gruplarında A260/A280 değeri yaklaşık 1,76 – 1,77 olarak ölçüldü.

Tekrarlanabilir ve güvenilir PZR ürünleri veren 20 adet RAPD primeri ile yapılan tarama sonucunda, 2 adet RAPD primeri tüm gruplar arasında kontrol grubuna göre monomorfik bant profili, 18 RAPD primeri ise kontrol grubuna göre polimorfik bant profili gösterdi. Polimorfik bant profili gösteren 18 primerin RAPD çoğaltımı sonucu

kontrolde elde edilen toplam bant sayıları ve polimorfik bant veren bütün primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantlarının moleküler büyüklüğü hesaplandı ve OPA serisi primerlerden 95 ile 1059 baz çifti büyüklüğü arasında ve AD serisi primerlerden de 217 ile 1206 baz çifti büyüklüğü arasında değişen toplam 20 adet polimorfik bant tespit edildi. Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda değerlendirmeye alınan 20 RAPD primeri, toplam 234 adet bant verdi. Bu bantlardan 20 adedi polimorfik, 214 adedi monomorfik bantlardır. Polimorfik bant veren primerler değerlendirildiğinde; en fazla polimorfik bant veren primerin %50 oranıyla OPA-03; en fazla monomorfik bant veren primerin ise %92 oranıyla AD-09 olduğu gözlendi. Ayrıca kontrole kıyasla polimorfik bant veren bütün primerler için bulunmayan (-) ve bulunan (+) DNA bantları değerlendirildiğinde, AD-03, AD-06, AD-08, OPA-08 ve OPA-09 primerleri uygulama grupları içinde polimorfik bant profili göstermelerine rağmen, kontrole göre ekstra polimorfik bant göstermedikleri için polimorfizm yüzdeleri "0" olarak değerlendirildi.

Bu veriler esas alındığında, elde edilen bantların %8'inin polimorfik olduğu belirlendi. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz RAPD verilerine göre tüm uygulama 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 (Atienzar ve diğ., 1999).

Genomik kalıp stabilitesi değeri polimorfik bant veren 13 primer için hesaplandı ve en fazla 1200 ppm GA_3 uygulaması ile azaldığı gözlendi. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; GA_3 ile muamele sonrası ortalama genomik kalıp stabilitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlendi.

Genomik kalıp stabilitesindeki değişim genomik DNA miktarındaki değişimden daha fazla duyarlı, çimlenme yüzdesindeki değişimden daha az duyarlı olarak bulundu. Benzer sonuçlar Atienzar ve arkadaşları (1999), Liu ve arkadaşları (2005) ve Cenkci ve arkadaşları (2009) tarafından rapor edilmiştir.

Uygulama grupları arasındaki genetik mesafeye dayalı olarak UPGMA metodu ile populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrograma göre, OPA ve AD serisi primerlerle yapılan analizlerde farklı sonuçlar elde edildi. Dendrogramlar genel olarak değerlendirildiğinde OPA serisine ait primerlere ait uygulama gruplarından 600 ppm GA_3 konsantrasyonu, AD serisine ait primerlere ait uygulama gruplarından da 300 ppm GA_3 ve 1200 ppm GA_3 konsantrasyonlarının kontrol ve diğer uygulama gruplarından ayrı bir dala ayrıldığı ve farklı genetik profiller gösterdiği gözlendi.

Gibberellinlerin ticari olarak en yaygın olarak kullanılanı GA_3'tür.

GA_3;

a. Üzümlerde tane irileştirmek
b. Turunçgillerde döllenmeyi teşvik etmek, meyve dökümünü önlemek ve hasatı geciktirmek
c. Kiraz ve vişnede iri ve dayanıklı meyve elde etmek
d. Armut, şeftali ve biberde verimi arttırmak, don zararını önlemek
e. Marulda tohum verimini arttırmak
f. Tohumluk patateslerde çimlenmeyi teşvik etmek
g. Enginarda turfanda yetiştiricilik sağlamak

gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır.

GA_3'ün tüm bu olumlu etkilerinin yanı sıra bir takım dezavantajları da vardır. En önemlisi de insana, çevreye ve bitkiye zarar vermeyecek düzeyde ve hasattan belirli bir süre önce kullanılması gerektiğidir. Hormonların bitki büyüme ve gelişmesindeki etkilerinin anlaşılmasının ardından bu maddelerin sentetik üretimi ve ticari kullanımı hızlanmıştır. Sentetik BBD'lerin tüketilen bitki kısımlarına kalıntı etkisi yapması, bu maddelerin kullanımına sınırlamalar getirmiştir.

Başbakanlık Mevzuat Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğünce Resmi Gazetede, 16 Kasım 1997 tarih ve 23272 sayılı Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği yayınlanmış ve kullanılan maddelerle uyulması zorunlu kalıntı sınırları ve cezai uygulamalar belirtilmiştir.

Dünyada ve ülkemizde, ruhsatlanıp kullanıma verildikten sonra direnç, fitotoksisite, etkisizlik, çevrede birikim ve insan sağlığına olumsuz etkileri saptanan ilaçlar zamanla yasaklanmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA) kullanıma sunulacak her BBD için ayrıntılı rapor talep etmekte, bu raporla başvuran firmalar maddeleri için satış onayı alabilmektedir. Tablo 5.1.'de görüldüğü gibi kullanılmakta olan BBD'lerden bazıları için kalıntı limiti söz konusudur (Halloran ve Kasım, 2002).

Tablo 5.1. Ülkemiz ve diğer bazı ülkelerde kullanılan BBD'lere ait izin verilen kalıntı limitleri

ÜLKE ADI	BBD ADI	ÜRÜN ADI	KABUL EDİLEBİLİR EN YÜKSEK KALINTI DEĞERİ (ppm) mg/kg
TÜRKİYE	GA_3	Üzüm, turunçgiller sert çekirdekli meyveler Yumuşak çekirdekli meyveler, çilek	0.1 1.0
ABD	GA_3	Enginar, yaprak, sebzeler Yumuşak çekirdekliler, üzüm ve üzümsü meyveler Elma	<15 0.15 0.5

Gerekli tüm bilgiler üretici firmalar tarafından maddeyi taşıyan ambalajlardaki etiket üzerinde yazılı olmakla birlikte mutlaka bu yönergelere uyulması gerekmektedir. BBD'lerin uygulanmak üzere hazırlanması sırasında yapılan decimal hatalar bile olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. BBD'ler genelde çok düşük dozlarda kullanılmaktadır. Ancak "daha yüksek doz daha fazla etki" anlayışı ticari uygulamalarda hem bitkinin hem onu çevreleyen bitkilerin, toprağın ve insan hayatının tehlikeye girmesine neden olmaktadır. Yapılan deneyler ve elde edilen veriler, ülkemizde de yaygın olan ve biyosit olarak ta bilinen GA_3'ün bilinçsiz ve yanlış kullanımından kaynaklanabilecek zararın hedef organizmalarda olduğu kadar hedef olmayan diğer organizmalar üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlamıştır.

KAYNAKLAR

Açık L., Küçükkaraarslan A., Çelebi A., Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları, Plazmit Profilleri ve RAPD-PCR Analizleri, *G.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2001, **14**(1), 163-169.

Akgöl M., Rencüzoğulları E., Sabinene'in Genotoksik Etkisinin RAPD-PCR ile Saptanması, *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 2013, **29**(2), 1-12.

Akgül H., Büyüme ve Gelişim Düzenleyiciler, *Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Yayını*, 2008, **12.**

Aksoy Ö., Deveci A., Tütünoğlu B., Genotoxic Effects of The Fungicide Sportak on *Zea mays*, *Fresen. Environ. Bull.*, 2015, **2**, 552-559.

Aljanabi S. M., Forget L., Dookun A., An Improved and Rapid Protocol for The Isolation of Polisaccaride and Polyphenol-free Sugarcane, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, **17**, 1-8.

Antonsie-wiez D., Analysis of The Cell Cycle in The Root Meristem of *Allium cepa* under The Influence of Ledakrin, *Folia Histochem. Cyto.*, 1990, **26**, 79-96.

Arıkan E. S., Quizalofop-p-etil Herbisitinin *Allium cepa* L. Kök Meristem Hücreleri Üzerine Sitogenetik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2006, 181417.

Atienzar F. A., Conradi M., Evenden A. J., Jha A. N., Depledge M. H., Qualitative Assessment of Genotoxicity Using Random Amplified Polymorphic DNA: Comparison of Genomic Template Stability with Key Fitness Parameters in 60 *Daphnia magna* Exposed to Benzo[*a*]pyrene, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, **18**, 2275–2282.

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., Veiner P., Jha A. N., Depledge M. H., Evaluation of The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay for The Detection of DNA Damage and Mutations, *Mutat. Res.*, 2002, **521**, 151-163.

Atienzar F. A., Jha A. N., The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay and Related Techniques Applied to Genotoxicity and Carcinogenesis Studies: A Critical Review, *Mutat. Res.*, 2006, **613**, 76–102.

Barbério A., Elshorbagy W., Chowdhury R. K., Bioassays with Plants in The Monitoring of Water Quality, Water Treatment, *InTech*, DOI: 10.5772/2883.

Barut E., Gelecekte Bahçe Bitkilerinde Büyüme Düzenleyici Maddelerin Kullanımı, *Derim*, 1995, **7**(2), 51-73.

Basra A. S., *Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture: Their Role and Commercial Uses*, Haworth Press, United States, 2000.

Başıbüyük H. H., Bardakçı F., Belshaw R., Quicke D. L. J., *Phylogenetic Systematics*, Önder Matbaa, Sivas, 2000.

Baydar H., Gibberellik Asidin Aspir (Carthamus tinctorius L.)'de Erkek Kısırlık, Tohum Verimi ile Yağ ve Yağ Asitleri Sentezi Üzerine Etkisi, *Turk. J. Biol.*, 2000, **24**, 159–168.

Becerril C., Ferrero M., Sanz F., Castano A., Detection of Mitomycin C-induced Genetic Damage in Fish Cells by Use of RAPD, *Mutagenesis*, 1999, **5**, 449-456.

Becerril C., Acevedo H., Ferrero M., Sanz F., Castano A., DNA Fingerprint Comparison of Rainbow Trout and RTG-2 Cell Line Using Random Amplified Polymorphic DNA, *Ecotoxicology*, 2000, **10**, 115- 124.

Black W. C., PCR with Arbitrary Primers: Approach with Care, *Insect Molecular Biology*, 1993, **2**, 1–6.

Brewster J. L., Onions and Other Vegetable Alliums, *Crop Production Science Horticulture 3*, Cab International, Cambridge, UK, 1994.

Budak N., Çalışkan C. F., Çaylak Ö., Bitki Büyüme Regülatörleri ve Tarımsal Üretimde Kullanımı, *E.Ü Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1994, **31**, 289-296.

Büyük İ., Soydam-Aydın S., Aras S., Molecular Responses of Plants to Stress Conditions, *Turk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, 2012, **69**(2), 97-110.

Carlson R. D., Crovetti A. J., Commercial Uses of Gibberellins and Cytokinins and New Areas of Applied Research, *Plant Growth Substances*, 1988, 604-610.

Cenkci S., Yıldız M., Ciğerci I. H., Konuk M., Bozdağ A., Toxic Chemicals Induced Genotoxicity Detected by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seedlings, *Chemosphere*, 2009, **76**, 900-906.

Cenkci S., Ciğerci G. H., Yıldız M., Özay C., Bozdağ A., Terzi H., Lead Contamination Reduces Chlorophyll Biosynthesis and Genomic Template Stability in *Brassica rapa* L., *Environ. Exp. Bot.*, 2010, **67**, 467-473.

Chakraborty R., Mukherjee A., Mukherjee A. K., Evaluation of Genotoxicity of Coal Fly Ash in *Allium cepa* Root Cells by Combining Comet Assay with The *Allium* test, *Environ. Monit. Assess.*, 2009, **153**, 351–357.

Çelik A., Ünyayar S., Çekiç F. Ö., Güzel A., Micronukleus Frequency and Lipid Peroxidation in *Allium sativum* Root Tip Cells Treated with Gibberellic Acid and Cadmium, *Cell Biol. Toxicol.*, 2008, **24**, 159-164.

Çelik İ., Tuluce Y., Özok N., Effects of Indoleacetic Acid and Kinetin on Lipid Peroxidation Levels in Various Rat Tissues, *Turk. J. Biol.*, 2002, **26**, 193-196.

Çelik İ., Tuluce Y., Turker M., Antioxidant and Immune Potential Marker Enzymes Assessment in The Various Tissues of Rats Exposed to Indoleacetic Acid and Kinetin: A Drinking Water Study, *Pestic. Biochem. Phys.*, 2006, **86**, 180–185.

Çetinkaya A. M., Baydan E., Bitki Gelişim Düzenleyicilerin Zehirliliğine Genel Bir Bakış, *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 2006, **77**(4), 26-31.

Çokuğraş A. N., Bodur N., Comparative Effects of Two Plant Growth Regulators; Indole-3-Acetic Acid and Chlorogenic Acid on Human and Horse Serum Butyrylcholinesterase, *Pestic. Biochem. Phys.*, 2003, **77**, 24–33.

Dane F., Dalgıç Ö., The Effects of Fungicide Benomyl (Benlate) on Growth and Mitosis in Onion (*Allium cepa* L.) Root Apical Meristem, *Acta Biol. Hung.*, 2005, **56**, 119-128.

Doulis A. G., Harfouche A. L., Aravanopoulos F. A, Rapid, High Quality DNA Isolation from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) Needles and Optimization of The RAPD Marker Technique, *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, **17**, 1-14.

El-Shabbaby O. A., Abdel Migid H. M., Soliman M. I., Mashaly I. A., Genotoxicity Screening of Industrial Wastewater Using The *Allium cepa* Chromosome Aberration Assay, *Pak. J. Biol. Sci.*, 2003, **6**, 23-28.

Enan M. R., Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to Detect The Genotoxic Effect of Heavy Metals, *Biotechnol. Appl. Bioc.*, 2006, **43**, 147-154.

Enviromental Protection Agency (EPA), *Reregistration Eligibility Decisison (RED), Gibberellic Acid*, 1995.

Eren P., Vardar F., Birbir Y., İnan D., Ünal M., Cytotoxic Effects of an Electromagnetic Field on The Meristematic Root Cells of Lentils (*Lens clunaris* Medik.), *Fresen. Environ. Bull.*, 2010, **3**, 481-488.

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.

Farrow M. G., Blaydes D. F., Van Dyke K., The Effect of Plant Growth Substances and Natural Products on RNA and DNA Synthesis in Leucocytes, *Experientia*, 1976, **32**, 29-30.

Fenech M., Cytokinesis-block Micronucleus Cytome Assay, *Nature Publishing Group*, DOI: 10.1038/nprot.2007.77.

Feretti D., Zerbini I., Zani C., Ceretti E., Moretti M., Monarca S., *Allium cepa* Chromosome Abberation and Micronucleus Tests Applied to Study Genotoxicity of Extracts from Pesticide-treated Vegetables and Grapes, *Food Addit. Contam.*, 2007, **24**(6), 561-572.

Ferrero M., Castano A., Gonzalez A., Sanz F., Becerril C., Characterization of RTG-2 Fish Cell Line by Random Amplified Polymorphic DNA, *Ecotox. Environ. Safe.*, 1998, **40**, 50-64.

Fincher G. B., Molecular and Cellular Biology Association with Endosperm Mobilization in Germination Cereal Grains, *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 1989, **40**, 305-346.

Firbas P., Amon T., *Allium* Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia, *J. Bioremed. Biodeg.*, 2013, **4**, 1-5.

Fiskesjö G., *Allium* test Methods in Molecular Biology, *In vitro toxicity testing protocols*, 1995, **43**, 119-127.

Güler Ç., Çobanoğlu Z., *Pestisitler*, 52, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, İlköz Matbaası, Ankara, 1997.

Güleryüz M., *Bahçe Ziraatında Büyütücü ve Engelleyici Maddelerin Kullanılması ve Önemi*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 279, 1982.

Güz N., Kılınçer N., Böcek Sistematiğinde Moleküler Markörlerin Kullanımı. Derleme (Review) *Turk. Entomol. Bult.*, 2012, **2**(2), 125-145.

Halldén C., Characterization and Use of a Multiplex PCR- based System: Random Amplified Polymorphic DNA, Ph.D. Thesis, Department of Genetics Lund University, Lund, 1998.

Halldén C., Hansen M., Nilsson N. O., Hjerdin A., Sall T., Competition as a of Errors in RAPD analysis, *Theor. Appl. Genet.*, 1996, **92**, 1185-1192.

Halloran N., Kasım M. U., *Meyve ve Sebzelerde Büyüme Düzenleyici Madde Kullanımı ve Kalıntı Düzeyleri*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 1999.

Halloran N., Kasım M. U., Meyve ve Sebzelerde Büyüme Düzenleyici Madde Kullanımı ve Kalıntı Düzeyleri, *Gıda*, 2002, **27**(5), 351-359.

Hansen M., Halldén C., Sall T., Error Rates and Polymorphism Frequencies for Three RAPD Protocols, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, **6**, 139-146.

Hassan A., Chaudhry N. Y., Effect of Growth Hormones i.e., GA_3 and Kinetin and Heavy Metal i.e., $Pb(NO_3)_2$ on The Seedlings of *Cucumis sativus* L., *Pak. J. Biol. Sci.*, 2004, **7**(8), 1453-1462.

Hillis D. M., Moritz C., *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA, 1990.

Jacobsen J. V., Pearce D. W., Poole A. T., Pharis R. P., Mander L. N., Abscisic acid, Phaseic Acid and Gibberellin Contents Associated with Dormancy and Germination in Barley, *Physiol. Plantarum*, 2002, **115**, 428-441.

Kaçar B., Katkat A., Öztürk Ş., *Bitki Fizyolojisi*, 74, Vipaş A. Ş., Bursa, 2002.

Kaftanoğlu O., Ekolojik ve Organik Arı Ürünleri Üretimi, *2. Marmara Arıcılık Kongresi Bildiri Kitabı*, Uludağ Arıcılık Derneği Yayınları, Bursa, 2003.

Karakuş C., Köker R., Tarımda Bitki Gelişim Düzenleyicilerin (BGD) Kullanımı ve Hormon Riski, Üniversite Öğrencileri *2. Çevre Sorunları Kongresi*, İstanbul, Türkiye, 2007.

Karssen C. M., Zagorski S., Kepczynski J., Groot S. P. C., Key Role for Endogenous Gibberellins in The Control of Seed Germination, *Annals Botany*, 1989, **63**, 71-80.

Karssen C. M., *Hormonal Regulation of Seed Development, Dormancy and Germination Studied by Genetic Control*, In J Kigel, G Golili, eds, Seed Development and Germination, Marcel Dekker, New York, 1995.

Kasamatsu A., İyoda M., Usukura K., Sakamoto Y., Ogawara K., Shiiba M., Tanzawa H., Uzawa K., Gibberellic Acid Induces α-amylase Expression in Adipose-derived Stem Cells, *Int. J. Mol. Med.*, 2012, **30**, 243-247.

Kaynak L., Ersoy N., Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları, *A.Ü Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1997, **10**, 223-236.

Kaynak L., İmamgiller B., Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Fizyolojik Olaylardaki Rolleri, *A.Ü Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1997, **10**, 289-299.

Kaynak L., Memiş M., Bitki Büyüme Engelleyici ve Geciktiricilerinin Etki Mekanizmaları, *A.Ü Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1997, **10**, 237-248.

Khandka D. K., Tuna M., Tal M., Nejidat A., Goldhirsh A. G., Variability In The Pattern of Random Amplified Polymorphic DNA, *Electrophoresis*, 1997, **18**, 2852-2856.

Khanna N., Sharma S., *Allium Cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review, *Indian J. Pharm. Biol. Res.,* 2013, **1**(3), 105-119.

Kocaçalışkan İ., *Bitki Fizyolojisi*, DPÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Yayını, Kütahya, 420, 2003.

Köksal N., Cansev A., Gülen H., İpek A., Eriş A., Bazı Yerel Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinin Arasındaki Akrabalık İlişkilerinin Belirlenmesi, *XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 31 Ağustos-2 Eylül 2006.

Kumar Mandal, S., Krishna Basu, R., Cytological Effects of Single and Combined Treatments with X-rays, IAA and GA_3 in *Allium cepa*, *Cytologia*, 1981, **46**, 133-139.

Kumlay A. M., Eryiğit T., Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları, *İ.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2011, **1**(2), 47-56.

Kuras M., Nowakowska J., Sliwinska E., Pilarski R., Ilasz R., Tykarska T., Changes in Chromosome Structure, Mitotic Activity and Nuclear DNA Content from Cells of *Allium* Test Induced by Bark Water Extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC, *J. Ethnopharmacol.*, 2006, **107**, 211–221.

Lee Y. C., Yang V. C., Wang T. S., Use of RAPD to Detect Sodium Arsenite-Induced DNA Damage in Human Lymphoblastoid Cells, *Toxicology*, 2007, **239**, 108–115.

Levan A., The Effect of Colchicine on Root Mitoses in *Allium*, *Hereditas*, 1938, **24**, 471-486.

Levitt J., *Responses of Plants to Environmental Stresses*, London: Academic Press, New York, 697, 1972.

Liu W., Li P. J., Qi X. M., Zhou Q. X., Zheng L., Sun T. H., Yang Y. S., DNA Changes in Barley (*Hordeum vulgare*) Seedlings Induced by Cadmium Pollution Using RAPD Analysis, *Chemosphere*, 2005, **61**, 158-167.

Liu W., Yang Y. S., Zhou Q., Xie L., Li P., Sun T., Impact Assessment of Cadmium Contamination on Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings at Molecular and Population Levels Using Multiple Biomarkers, *Chemosphere*, 2007, **67**, 1155–1163.

Luceri C., Filippo D. C., Caderni G., Gambacciani L., Salvadori M., Giannini A., Dolara P., Detection of Somatic DNA Alterations in Azoxymethane-induced F344 Rat Colon Tumors by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, *Carcinogenesis*, 2000, **21**(9), 1753-1756.

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, *Mutat. Res.*, 1995, **334**, 185-195.

Mathieu-Daudé F., Ralph D., McClelland M., *Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for The Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*, CRS Press, New York, 1997.

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.

Melo M., Franco N., Ferreira M., Pugine S., Briato P., Costa E., Influence of Subcutaneous Indole 3 Acetic Acid Administration in Metabolism and Function of The Rat Leukocyte, *Res. J. Biol. Sci.*, 2007, **2**(5), 601-606.

Milborow B. V., Biosyntesis of Absisic Acid by Cell Free System, *Phytochemistry*, 1974, **13**, 131.

Moreira de Lima V., Tamara dos Santos Teixeira J., Vieira Gomes J., Kallut Almeida Netto L., Oliveira Bastos L., Luiz Cabral dos Santos H., Gonçalves L., Silva F. A., Pereira Berto B., Resende Borba H., *Joannesia princeps*: Evaluation of Aqueous Extracts Genotoxicity Utilizing *Allium cepa* Assay and Micronukleus Test, *Journal of Life Sciences*, 2013, **12**, 1249-1254.

Morshed M. H., Hossain M. S., Islam, M. A. U., Ali M. U., Ibrahim M., Islam M. S., Islam M. A., Toxicity of Four Synthetic Plant Hormones IAA, NAA, 2,4-D and GA Against *Artemia salina* (Leach), *Int. J. Agri. Biol.*, 2005, **7**(2), 240-242.

Morsünbül T., Solmaz S. K. A., Üstün G. E., Yonar T., Bitki Gelişim Düzenleyici (BGD)'lerinin Çevresel Etkileri ve Çözüm Önerileri, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 2010, **15**(1), 1-11.

Muralidharan K., Wakeland E. K., Concentration of Primer and Template Qualitatively Affects Products in Random-Amplified Polymorphic DNA PCR, *BioTechnology*, 1993, **14**, 362-364.

Nassar S. A., Ab.Zayed F., Hegab A. M., Mossaad M. N., Harfoush A. S., Cytogenetic, Histological and Histochemical Studies on The Effect of Gibberellin A_3 in Albino Rats, *J. Am. Sci.*, 2012, **8**(1), 608-622.

Nei M., Genetic Distance between Populations, *Am. Nat.*, 1972, **106**, 283-292.

Nicese F. P., Hormaza J. I., McGranahan, G. H., Molecular Characterization and Genetic Relatedness Among Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes Based on RAPD Markers, *Euphytica*, 1998, **101**, 199–206.

Olszewski N., Sun T., Gubler F., Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism and Response Pathways, *Plant Cell*, 2002, **14**, 61–80.

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.

Ozban N., Özmutlu Ö., *Mikropreparasyon Yöntemleri*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 1994.

Özmen M., Topçuoğlu Ş. F., Bozcuk S., Bozcuk A. N., Effects of Abscisic Acid and Gibberellic Acid on Sexual Differentiation and Some Physiological Parameters of Laboratory Mice, *Turk. J. Biol.*, 1995, **19**, 357-364.

Persing H. D., Polymerase Chain Reaction: Trends to benches, *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 1281-1285.

Prichard R, Tait A, The Role of Molecular Biology in Veterinary Parasitology, *Vet. Parasitol.*, 2001, **98**, 169-194.

Prodanchuk M., Zhminko O., Zhminko P., Effect of Some Plant Growth Regulators-Derivatives of N-Oxide-Pyridine on Protein-Synthesis Processes and Mitochondrial Membrane of Hepatocytes at Subchronic Ingestion to Rats, *Abstracts of the 45th Congress of the European Societies of Toxicology*, 2008, **180**(1), 177.

Rafalski J. A., Tingey S., Williams J. G. K., RAPD Markers a New Technology for Genetic Mapping and Plant Breeding, *AgBiotech News and Information*, 1991, **3**, 645-648.

Rafalski A., Tingey S. V., Williams J. G. K., RAPD markers, *Plant Molecular Biology Mannual*, 1994, **114**, 1-8.

Rank J., The Method of *Allium* Anaphase-Telophase Chromosommme Aberration Assay, *Ekologija (Vilnius)*, 2003, **1**.

Rank J., Nielsen M. H., *Allium cepa* Anaphase–Telophase Root Tip Chromosome Aberration Assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, Maleic Hydrazide, Sodium Azide and Ethyl Methanesulfonate, *Mutat. Res.*, 1997, **390**, 121-127.

Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E., *Regulating Growth and Development: The Plant Hormones*, Worth Publishers, New York, 1992.

Rong Z., Yin H., A Method for Genotoxicity Detection Using Random Amplified Polymorphism DNA with *Danio rerio*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2004, **58**, 96–103.

Ruminska A., Suchorska K., Weglarz Z., Effect of Gibberellic Acid on Seeds Germinations of Some Vegetable and Medicinal Plants, *Acta Hortic.*, 1978, **73**, 131- 136.

Savva D., Castellani S., Mattei N., Renzoni A., Walker C. H., The Use of PCR and DNA Fingerprints to Detect The Genotoxic Effects of Environmental Chemicals, *Proceedings of the 6th International Conference on Environmental Contamination*, Delphi, Greece, 1994.

Savva D., DNA Fingerprinting as a Biomarker Assay in Ecotoxicology, *Toxicol. Ecotoxicol.*, 1996, **3**, 110-114.

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.

Sayılı M., Akman Z., Tarımsal Uygulamalar ve Çevreye Olan Etkileri, *Ekoloji*, 1994, **12**, 28-32.

Schierwater B., Ender A., Different Thermostable DNA Polymerases May Amplify Different RAPD Products, *Nucleic Acids Res.*, 1993, **21**, 4647-4648.

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, *J. Comp. Physiol.*, 1971, **76**, 175-86.

Schwartz H. F., Mohan S. K., *Compendium of Onion And Garlic Diseases*, The American Phytopathological Society Press, USA, 54, 1996.

Sharma A. D., Thakur M., Rana M., Singh K., Effect of Plant Growth Hormones and Abiotic Stresses on Germination, Growth and Phosphatate Activities in *Sorghum biocolor* (L.) Moench Seeds, *Afr. J. Biotechnol.*, 2004, **3**(6), 308-312.

Sharma C. B. S. R., Plant Meristems as Monitors of Genetic Toxicity of Environmental Chemicals, *Curr. Sci. India*, 1983, **52**, 1000-1002.

Singh P. K., Tewari R. K., Cadmium Toxicity Induced Changes in Plant Water Relations and Oxidative Metabolism of *Brassica juncea* L. Plants, *J. Environ. Biol.*, 2003, **24**, 107– 112.

Siqueira J. F., Roças I. N., PCR Methodology as Avaluable Tool for Identification of Endodontic Pathogens, *J. Dent.*, 2003, **31**(5), 333-339.

Soliman M. I., Ghoneam G. T., The Mutagenic Potentialities of Some Herbicides Using *Vicia faba* as a Biological System, *Biotechnology*, 2004, **3**, 140-154.

Souza P. M. S., Corroque N. A., Morales A. R., Marin-Morales M. A., Innocentini Mei L. H., PLA and Organoclays Nanocomposites: Degradation Process and Evaluation of Ecotoxicity Using *Allium cepa* as Test Organism, *J. Polym. Environ.*, 2013, **21**, 1052–1063.

Sun T., Gubler F., Molecular Mechanism of Gibberellin Signaling in Plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2004, **55**, 197-223.

Swaileh K. M., Hussein, R., Ezzughayyar A., Evaluating Wastewater-induced Plant Genotoxicity Using Randomly Amplified Polymorphic DNA, *Environ. Toxicol.*, 2007, **23**, 117–122.

Swain S. M., Singh D. P., Tall Tales from Sly Dwarves: Novel Functions of Gibberellins in Plant Development, *Trends Plant Sci.*, 2005, **10**(3), 1360-1385.

Szulc M., Zgorska A., Ziembinska A., PCR-RAPD Optimization for Hospital Wastewater Genotoxic Influence Analysis on *Allium cepa* Root Meristem Cells, *Architecture Civil Engineering Environment*, 2012, **1**, 79-86.

T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, *Bitki Gelişimini Düzenleyiciler (BGD) Hormonlar*, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Zirai İlaç Yayın Serisi, 1, 2001.

Tingey S., Rafalski J. A., Williams J. G. K., Genetic Analysis with RAPD Markers, *Joint Pîant Breeding Symposia Series*, Minnesota, 1992.

Tingey S. V., Del Tufa J. P., Genetic Analysis With Random Amplified Polimorphic DNA Markers, *Plant Physiol*, 1993, **101**, 349- 352.

Teixeira R.O., et al., Assessment of Two Medicinal Plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in In Vitro and In Vivo Assays, *Gen. Mol. Biol.*, 2003, **26**, 551-555.

Tomlin C. D. S., *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 11th ed., The British Crop Protection Council, United Kingdom, 1997.

Tyler L., Thomas S. G., Hu J., Dill A., Alonso J. M., Ecker J. R., Sun T., DELLA Proteins and Gibberellin-regulated Seed Germination and Floral Development in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 2004, **135**, 1008–1019.

Uçkan F., Tüven A., Er A., Ergin E., Effects of Gibberellic Acid on Biological Parameters of The Larval Endoparasitoid *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae), *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 2008, **101**, 112-120.

Ud-Deen MD. M., Kabir G., Effects of Growth Regulators on Root Tip Cells of Onion, *Bangladesh J. Bot.*, 2009, **38**(1), 99-102.

URL-1: https://www.google.com.tr/search?q=B%C4%B0YOLOJ%C4%B0K+B%C4%B0R%C4%B0K%C4%B0M&es_sm=93&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0CCIQsARqFQoTCLal_9aC5ccCFcMHLAodQmMOmw&biw=1440&bih=795#imgrc=lWaYD1GwJZ14RM%3A (Ziyaret Tarihi: 08 Eylül 2015).

URL-2: http://eol.org/pages/1084354. (Ziyaret Tarihi: 08 Eylül 2015).

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

Uygur Ö. Ş., Organik Arıcılık, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2005, **5**, 103-106.

Vardar Y., *Bitki Fizyolojisine Giriş*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, İzmir, 1970.

Vardar Y., Güven A., *Bitki Fizyolojisine Giriş*, Fakülteler Kitapevi, İzmir, 1-213, 1996.

Vural H., Eşiyok D., Duman İ., *Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme)*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 440, 2000.

Walsh C. S., Concise Encyclopedia of Temperate Tree Fruit, Edited by: Baugher T. A., Singha S., *Plant Hormones*, Haworth Press, London, 245-250, 2003.

Wang J., Lu Y., Shen G., Combined Effects of Cadmium and Butachlor on Soil Enzyme Activities and Microbial Community Structure, *Environ. Geol.*, 2007, **51**, 1221-1228.

Waugh R., Poweil W., Using RAPD Markers for Crop Improvement, *Focus*, 1992, **10**, 186-191.

Weeden N. F., Timmerman G. M., Hemmet M., Kneen B. E., Lodhi M. A., Inheritance and Reliability of RAPD Markers, *Joint Plant Breeding Symposia Series*, Minnesota, 1992.

Welsh J., McClelland M., Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 7213-7218.

Welsh J., Petersen C., Polimorphisms Genereted By Arbitrarily Primed PCR İn The Mouse: Application To Strain İdentification And Genetic Mapping, *Nucleic Acids Res.*, 1991, **19**, 303-306.

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 Res.*, 1990, **18**, 6531-6535.

Westwood M. N., *Hormones and Growth Regulators*, Timber Press Inc, Portland, Oregon, USA, 1993.

Yılmaz R., Yüksel E., İndol 3 Asetik Asitin 3. Nesil Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik İndeks Üzerine Etkisi, *S.D.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, **12**(2), 46-49.

Yıldız M., Ciğerci İ. 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.

Yılmaz R., Yüksel E., 2,4-D Herbisitinin İleri Jenerasyonlarda Fare Böbrek Enzimleri Üzerine Etkisi, *Fırat Tıp Dergisi*, 2002, **7**(3), 818-822.

Yumurtacı A., Vardar F., Ünal M., Inhibition of Barley Root Growth by Actinomycin D: Effects on Mitotic Activity, Protein Content and Peroxidase Activity, *Fresen. Environ. Bull.*, 2007, **8**, 917-921.

Zhu Y., Nomura T, Xu Y., Zhang Y., Peng Y., Mao B., Hanada A., Zhou H.,Wang R., Li P., Zhu X., Mander L. N, Kamiya Y., Yamaguchi S., He Z., Elongated Uppermost Internode Encodes A Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in A Novel Deactivation Reaction in Rice, *The Plant Cell*, 2006, **18**, 442–456.

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

Aksoy Ö., Deveci A., **Tütünoğlu B.**, Genotoxic Effects of The Fungicide Sportak on *Zea mays*, *Fresen. Environ. Bull.*, 2015, **24**(2), 552-559.

Tütünoğlu B., Aksoy Ö., Morphological and Anatomical Effects of the Herbicide Roundup on *Zea mays* (Poaceae), *J. Func. Environ. Bot.*, 2014, **2**(4), 71-76.

Tütünoğlu B., Dikilitaş S., Aksoy Ö., Rind N. A., Benzoik Asit ve Kumarinin *Allium cepa* Üzerindeki Sitotoksik Etkileri, *1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi*, Bolu, Türkiye, 2-4 Eylül 2015.

Rind N. A., Dikilitaş S., Aksoy Ö., Dahot M. U., Rafiq M., **Tütünoğlu B.**, Study of Genetic Diversity among *Melia azedarach* L. Collected from Various Areas of Turkey, *Plant Genome Evolution*, Amsterdam, Netherlands, 6-8 September 2015.

Aksoy Ö., Deveci A., **Tütünoğlu B.**, Genotoxic Effects of Sportak on Sweet Corn (*Zea mays* L. var. saccharata Sturt cv. Merit), *Molecular Biyology Society I. International Congress*, İstanbul, Turkey, 23-24 November 2012.

Aksoy Ö., Türker S., **Tütünoğlu B.**, Morphological, Anatomical and Spectroscopic Investigations of The Toxic Effects of Roundup in Sweet Corn (*Zea mays* L. var. saccharata Sturt cv. Merit), *21. International Biology Congress*, İzmir, Turkey, 03-07 September 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, 05-07 Mayıs 2011.

ÖZGEÇMİŞ

22/08/1990 yılında Kocaeli'de doğdu. İlk öğretimini Sakarya'da ve orta öğretimini 2008 yılında Kocaeli'de tamamladı. 2009 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2013 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden bölüm 1.si olarak mezun oldu. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Şu an hala yüksek lisans öğrencisi olarak eğitimine devam etmektedir. 1 SCI kapsamlı, 1 ulusal indeksli, 5 bildiri olmak üzere 7 adet bilimsel çalışması mevcuttur.