

## VICIA FABAE L. (FABACEAE) KÖK UCU HÜCRELERİNDE FENOL TARAFINDAN TEŞVİK EDİLEN SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ

Kültiğın ÇAVUŞOĞLU\*, Emine YALÇIN\*\*, Songül DÖNMEZ\*, Kadriye KAYMAZ\*, Gonca ÖZDEMİR\*, Zeynep ÖZGÖRÜR\*, Duygu BALCI\*, Bahar ASLAN\*, Maral ÇAKIR\*

\*Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 28049-Debboy Mevkii, Giresun e-mail: kultigincavusoglu@mynet.com

\*\*Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 71450-Kırıkkale  
Alınış: 08 Nisan 2008, Kabul: 01 Eylül 2008

**Özet:** Bu çalışmada, *Vicia faba* L. kök ucu hücrelerine fenol'ün farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri araştırıldı. Test materyali olarak bakla tohumları kullanıldı. Çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve mikronukleus (MN) sıklığı sitotoksistenin indikatörleri olarak kullanıldı ve bu veriler istatistiksel parametreler ile ilişkilendirildi. Sitogenetik analizlere ilaveten, fenol ile muamele edilen bakla tohumlarının kök ucu meristemlerinde DNA analizleri gerçekleştirildi. Tohumlar kontrol ve fenol uygulama grupları olarak iki gruba ayrıldı ve 7 gün süresince fenol'ün üç farklı dozu (25, 50 ve 75 ppm) ile muamele edildi. Sonuçta, fenol'ün tüm uygulama grubu tohumlarda doza bağlı olarak çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımını azalttığı, MN oranını ise attırdığı tespit edildi. Ayrıca, fenol ile muamele edilen tohumlarda DNA ürünü kontrol grubundakilerden daha düşüktü. Bu nedenle, fenole maruz kalan DNA ürünleri agaroz jelde kontrol grubuna göre daha ileride bantlar verdi. Sonuç olarak, elde edilen veriler fenol'ün bakla kök ucu hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Fenol sitotoksiste, mikronukleus testi, tohum çimlenmesi, *Vicia faba* L.

## DETECTION OF CYTOTOXICITY INDUCED BY PHENOL IN ROOT TIP CELLS OF *VICIA FABAE* L. (FABACEAE)

**Abstract:** In this study, cytotoxic effects of different concentrations of phenol on *Vicia faba* L. root tips were investigated. The test material was used the seeds of broad bean. It was used germination percentage, root length, weight gain and micronucleus (MN) frequency as indicators of cytotoxicity, and correlate these data with statistical parameters. Additionally to the cytogenetic analysis, DNA analyses were performed from root tip meristem of broad bean treated with phenol. The seeds were divided into two groups: control, phenol treatment groups, and they were treated with different three doses (25, 50 and 75 ppm) of phenol during 7 days. As a result, it was determined that phenol fairly decreased the germination percentage, root length and weight gain depending on dose in seeds all treatment groups, whereas MN rate was increased. Besides, it was observed that the yield of DNA in seeds treated with phenol were lower than recorded in the control. Hence, DNA yields exposed to phenol was run ahead on agarose gel according to control group. In conclusion, obtained data indicated that phenol had cytotoxic effects on broad bean root tip cells.

**Key words:** Phenol toxicity, micronucleus test, seed cytogenetic, *Vicia faba* L.

## GİRİŞ

Fenol kimyasal formülü  $C_6H_6O$  ve moleküler ağırlığı 94.11 olan aromatik bir alkoldür. Benzen fenol, benzenol karbolik asit, hidrogenbenzen, mono-hidrogenbenzen, mono-fenol, fenol alkol, fenil-hidroksit ve fenilik asit gibi yaygın kullanılan formları bulunmaktadır (ENVIRONMENT CANADA 1998).

Fenol, hayvansal atıkların ve bitkilerin çürümeleri yani ayrışmaları sırasında toprak ve su içerisinde doğal olarak meydana geldiği gibi, odun, kâğıt, reçine, kauçuk, ilaç ve boya üretim sektörlerinden, mineral, çelik ve metal işleme tesisleri ile petrol rafineleri gibi çeşitli endüstri kollarından da bol miktarda çevreye yayılabilmektedir (DOBBINS vd. 1987). Çevredeki fenol kirliliğinin en büyük sebeplerinden birisi ise, tarım zararlılarına karşı kullanılan herbisit, insektisit ve fungusit gibi peptisitlerdir. Bu kimyasal maddeler yapılarında bol miktarlarda fenol içerdiklerinden, yağmur suları ve diğer etmenler sebebiyle toprağa ulaştıklarında toprağın fenol miktarının artmasına ve sonuçta bu topraklarda yetişen vejetasyonun olumsuz yönde etkilenmesine sebep olmaktadır (CANADIAN ENVIRONMENTAL 2000).

Fenoller protoplazmik zehirler olduklarından tüm canlı hücre türlerine zarar verebilmektedirler. İnsanlarda, fenol içeren su ve gıdaların vücuda alınması şiddetli böbrek bozukluklarına, görme kaybına, ağır sarsıntılara ve hatta ölümlere bile neden olabilmektedir (YENER & AKSU 1999).

Şimdiye kadar fenolün toksik etkileri üzerine özellikle hayvansal organizmalarda ve insanlarda gerek *in-vivo* gerekse de *in-vitro* koşullarda pek çok çalışma yapılmasına rağmen, fenol'ün bitkilerdeki toksik etkileri üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça yetersizdir. Bu çalışmada, *V. faba* kök ucu hücrelerinde fenol tarafından teşvik edilen toksisitenin boyutları belirlenmeye çalışılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Kök Uçlarının Hazırlanması

Bu çalışma 25, 50 ve 75 ppm'lik fenol (*BDH-England*) dozları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fenol solusyonları distile su (pH 6.7) içerisinde günlük olarak hazırlanmış ve araştırma materyali olarak sağlıklı ve aşağı yukarı eşit büyüklükteki bakla tohumları seçilmiştir. Tohumlar 24 saat süresince ultra-distile suda yıkanmış, kontrol ve uygulama grubundaki tohumlar içerisinde filtre kâğıtları (Whatman No. 1) bulunan 11 cm çapındaki petri kutularına yerleştirilmiş ve 23°C'lik etüvde 7 gün süresince çimlenmeye bırakılmıştır. Bu süre zarfında kontrol grubundaki tohumlar çeşme suyu, uygulama grubundaki tohumlar ise 25, 50 ve 75 ppm'lik fenol solusyonları ile muamele edilmiştir. Tüm petri kapları günlük olarak kontrol edilmiş ve tohumların kurummasına izin verilmeden 24 saatlik periyotlar ile çeşme suyu ve farklı konsantrasyonlarda fenol ilavesi yapılmıştır. Kökler 1.0-1.5 cm uzunluğuna ulaştığında, distile su ile yıkanmış ve standart ezme preparasyon teknikleri kullanılarak sitogenetik analizler için hazır hale getirilmiştir (WEI 2004).

### **Kök Uzunluğu, Ağırlık Kazanımı ve Çimlenme Yüzdesinin Belirlenmesi**

Çimlenen tohumlardaki kök ucu uzunlukları milimetrik cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Fenolün farklı dozlarına maruz kalan ve kalmayan tohumlardaki kök ucu uzunlukları radikula oluşumu esas alınarak belirlenmiştir. Tohumların ağırlık kazanımları, uygulama öncesi ve sonrasında hassas terazi ile ölçülen ağırlık farklarından yararlanılarak tespit edilmiştir. Çimlenme yüzdesi ise “Çimlenme (%) = çimlenen tohumlar/toplam tohum sayısı x 100” formülü dikkate alınarak hesaplanmıştır (ATİK vd. 2007).

### **MN Analizi**

Kök uçları altı saat “Clarke” fiksatorü (3:glasial asetik asit / 1:distile su) ile fikse edilmiş, 15 dakika %96’lık etanolde yıkanmış ve +4 °C ’de %70’lik etanolde saklanmıştır. Sonraki aşamada, kök uçları 60 °C’de 17 dakika 1N HCl içerisinde hidrolize edilmiş, süre sonunda 30 dakika %45’lik asetik asit içerisinde bekletilmiştir. Mikroskopik gözlemler için, kök uçları 24 saat asetokarmin ile boyanmış, boyama işleminden sonra kök meristemleri ayrılmış ve %45’lik asetik asit’de ezilmiştir (STAYKOVA vd. 2005, WEI 2004).

*MN* sıklığını belirlemek için, her preparatta 1000 hücre sayılmıştır. Mikronukleuslu hücrelerin varlığı binoküler ışık mikroskobu (Japan, Nikon Elipse E600) altında tespit edilmiş ve X500 büyütmede fotoğraflanmıştır. *MN* sayımı FENECH vd. (2003) tarafından belirlenen kriterler dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir: Bu kriterlere göre: (i) *MN* çapı ana nukleusun 1/10 olmalı, (ii) *MN* ile hücrenin temel çekirdeğinin kenarları birbirlerine temas edebileceği gibi etmeyebilirde, fakat temas ettiği durumlarda bu aradaki sınırın belirgin bir şekilde ayırt edilmesi gerekmektedir, (iii) *MN* boyandığında temel çekirdeğin aldığı renge yakın bir renk almalıdır.

### **DNA İzolasyon Protokolü**

DNA izolasyonu SHARMA vd. (2002) tarafından kullanılan protokole bağlı kalarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon için, kök uçları (2 g taze doku) sıvı nitrojen içerisinde ezilmiş, ezilen kök uçları 1M Tris-HCl, 0.5M EDTA, 5M NaCl, 1M β- merkaptotanol ve dH<sub>2</sub>O içeren solüsyon içerisine transfer edilmiştir. Daha sonra 65 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda 15 dakika 6800 rpm’de santrifüj edilmiş, supernatant dikkatli bir şekilde yeni bir polipropilen tüpe aktarılmış ve üzerine 5 M potasyum asetat ilave edilmiştir. Bu solüsyon buz banyosunda 2 dakika inkübe edilmiş ve 15000 rpm’de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant üzerine kloroform-izoamilalkol (24:1) ilave edilmiş, 1 dakika süresince çalkalanmış ve 15000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Sonraki aşamada yeni bir polipropilen tüpe aktararak, üzerine etanol-sodyum asetat (2:1) karışımı ilave edilmiş ve karışım -20 °C’de 40 dakika süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 15000 rpm’de santrifüj edilmiş, pellet %80’lik etanol ile yıkanmış, 30 dakika havada kurutulmuş ve 0.5 mL TE tamponunda çözülmüştür. Son aşamada ise % 0.8’lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantları elde edilmiştir.

### **İstatistiksel Analiz**

Gruplar arasındaki farklar Windows 10.0 versiyondaki SPSS programı yardımıyla, Varyans analizi (ANOVA) ve Duncan testleri gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Elde

edilen veriler  $\pm$  standart sapma (SD) olarak gösterilmiş ve P değeri 0.05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Kontrol ve fenol uygulama grubu tohumlarda çimlenme yüzdesi, kök ucu uzunluğu, ağırlık kazanımı ve MN sıklığı ile ilgili elde edilen veriler Tablo 1-5 ve Şekil 1-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** *V.faba* tohumlarının çimlenme yüzdesi üzerine fenol'ün etkileri

Uygulama süresi (gün)	Gruplar	Dozlar (ppm)	Toplam tohum sayısı	Çimlenen tohumların sayısı	Çimlenmeyen tohumların sayısı	Çimlenme yüzdesi (%)
7	Grup I	–	30	29	1	97
7	Grup II	25	30	25	5	83
7	Grup III	50	30	21	9	70
7	Grup IV	75	30	14	16	47

\*Grup I (kontrol grubu)'deki tohumlar çeşme suyu ile, Grup II'deki tohumlar 25 ppm fenol ile, Grup III'deki tohumlar 50 ppm fenol ile, Grup IV'deki tohumlar 75 ppm fenol ile muamele edilmiştir.

Tablo 1'den de görüldüğü gibi, fenol ile muamele edilen tohumların çimlenme yüzdeleri, kontrol grubu tohumlardan oldukça farklıdır. En yüksek çimlenme yüzdesi kontrol grubu tohumlarda gözlenirken (%97 oranında), fenol ile muamele çimlenme yüzdesinde bir azalmaya sebep olmuştur. Fenolün 25, 50 ve 75 ppm'lik dozlarında çimlenme yüzdesi sırasıyla %17, %30 ve %53 oranında azalmıştır. Bu sonuçlar, çimlenme yüzdesi üzerine fenol'ün etkilerinin doza bağlı olduğunu göstermiştir.

**Tablo 2.** Kök uzunluğu üzerine fenol'ün etkileri

Uygulama süresi (gün)	Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ SD
7	Grup I	5.50	6.00	5.88 $\pm$ 0.12
7	Grup II	4.75	5.00	4.87 $\pm$ 0.08
7	Grup III	3.75	4.00	3.88 $\pm$ 0.08
7	Grup IV	2.50	2.75	2.64 $\pm$ 0.08

**Tablo 3.** Yedinci günün sonunda tohumların ortalama ağırlık kazanımları

Uygulama süresi (gün)	Gruplar	Dozlar (ppm)	Toplam tohum sayısı	Tohumların başlangıç ağırlığı (g)	Tohumların son ağırlığı (g)	Ağırlık kazanımı (g)
7	Grup I	–	50	1.43 $\pm$ 0.05	5.66 $\pm$ 0.08	4.23
7	Grup II	25	50	1.42 $\pm$ 0.05	4.33 $\pm$ 0.14	2.91
7	Grup III	50	50	1.43 $\pm$ 0.05	3.40 $\pm$ 0.08	1.97
7	Group IV	50	50	1.43 $\pm$ 0.06	2.62 $\pm$ 0.02	1.19

Ağırlık kazanımı ve kök uzunluğu ile ilgili Tablo 2 ve 3'deki sonuçlardan ise, fenol uygulamasının tohumların ağırlık kazanımı ve kök uzunluklarını önemli oranda engellediği görülebilmektedir. Uygulanan fenol dozları ile kök uzunluğu ve ağırlık kazanımları arasında ters bir orantının olduğu tespit edilmiştir. En yüksek kök uzunluğu ve ağırlık kazanımı kontrol grubu tohumlarında, en düşük kök uzunluğu ve ağırlık kazanımı ise 75 ppm'lik fenol dozunda gözlenmiştir. Kontrol grubu tohumların ağırlıkları başlangıç ağırlıklarına göre 4.23 g artarken, fenol'ün 75 ppm dozuna maruz kalan tohumlarda ise ağırlık başlangıca göre sadece 1.19 g artmıştır. Ayrıca ağırlık kazanımı ve kök uzunluğu bakımından kontrol ve fenol uygulama grupları arasında gözlenen farkların istatistiksel açıdan önemli olduğu da tespit edilmiştir (Tablo 5,  $P<0.05$ ).

**Tablo 4.** Fenolün *MN* sıklığı üzerine etkileri

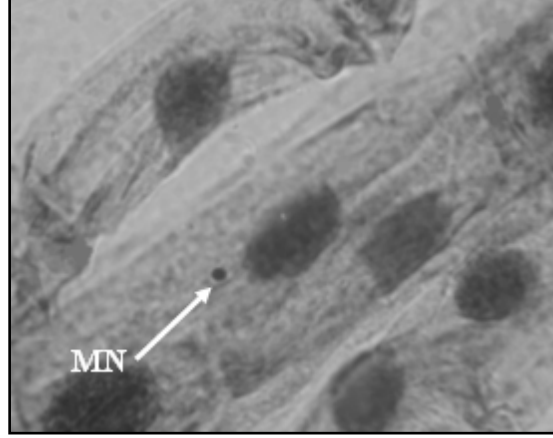
Uygulama süresi (gün)	Gruplar	Sayılan hücrelerin sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama $\pm$ SD
7	Grup I	1000	0	0	00.00 $\pm$ 0.00
7	Grup II	1000	9	15	12.27 $\pm$ 2.07
7	Grup III	1000	20	25	22.67 $\pm$ 1.67
7	Grup IV	1000	38	45	42.37 $\pm$ 2.04

**Tablo 5.** Yedinci günün sonunda uygulama grubu tohumlardan elde edilen kök uzunluğu, ağırlık kazanımı ve *MN* sıklığı verilerinin istatistiksel karşılaştırılması

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
<b>Kök uzunluğu(cm)</b>	5.88 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	4.87 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	3.88 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	2.64 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>
<b>Ağırlık kazanımı(g)</b>	5.66 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	4.33 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.40 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	2.62 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
<b><i>MN</i> sıklığı</b>	00.00 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	12.27 $\pm$ 2.07 <sup>c</sup>	22.67 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>	42.37 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>

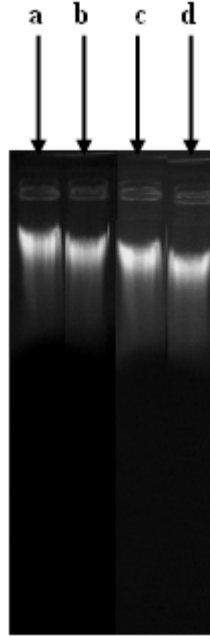
\*Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak verilmiştir. Aynı satır içerisinde farklı semboller ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

*V. faba* kök ucu meristem hücrelerinin mikroskopik araştırmaları sonucunda, kontrol grubu tohumlarda herhangi bir *MN* oluşumuna rastlanılmamıştır. Fakat fenol ile muamele edilen tüm tohumlarda değişik sayıda *MN* oluşumu gözlenmiştir (Şekil 1). *MN* sıklığı fenol dozlarındaki artışı ile birlikte artmıştır. Kısacası, *MN* sıklığı ve fenol arasında belirgin bir doz-etki ilişkisi vardır. *MN* sıklığı ile ilgili veriler Tablo IV'de gösterilmiştir. En yüksek *MN* sıklığına 75 ppm fenol dozunda, en düşük *MN* sıklığına ise 25 ppm fenol dozunda rastlanılmıştır. Ayrıca, *MN* sıklığı bakımından kontrol ve uygulama grupları arasında istatistiksel olarak önemli farklar tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ).



**Şekil 1.** Fenol ile muamele edilen *V. faba* kök ucu hücrelerinde MN'nin görünümü (X 500)

DNA konsantrasyonu üzerine MN oluşumunun etkilerini belirlemek için ise, kontrol ve uygulama grubu tohumların kök uçlarından DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, fenol ile muamele edilen örneklerde, kontrol grubuna göre daha düşük DNA ürünü gözlenmiştir. Diğer bir ifadeyle, fenol ile muamele edilen grupların DNA konsantrasyonlarının daha düşük olduğu ve agaroz jelde yürütülme işlemleri sırasında kontrol grubuna göre daha ileride bantlar verdikleri görülmüştür (Şekil 2).



**Şekil 2.** *V. faba* kök ucu meristem hücrelerinden elde edilen DNA'nın agaroz jel elektroforezi. a: kontrol grubu, b: 25 ppm fenol uygulama grubu, c: 50 ppm fenol uygulama grubu, 75 ppm fenol uygulama grubu

## TARTIŞMA VE SONUÇ

*MN* testi, kimyasal ajanla tarafından teşvik edilen sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi için kullanılan oldukça güvenilir bir tekniktir (MOZDARANI & KAMALI 1998). Bu çalışmada *MN* testi çimlenme yüzdesi, kök ucu uzunluğu ve ağırlık artışı gibi parametreler ile birlikte bir indikatör gibi kullanılarak *V. faba* kök ucu hücrelerinde fenol tarafından teşvik edilen sitotoksitenin boyutları belirlenmeye çalışılmıştır.

Sonuçta, fenol dozları ile çimlenme yüzdesi arasında negatif bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu tohumlar ile karşılaştırıldığı zaman, 25 ppm fenol dozunda çimlenme yüzdesi önemli oranda azalmış ve fenol dozlarındaki artış ile birlikte azalmaya devam etmiştir. En düşük çimlenme yüzdesi 75 ppm'lik fenol dozunda gözlenmiştir. Bu sonuçlar, çimlenme yüzdesinin fenol toksisitesinin belirlenmesinde hassas bir indikatör olabileceğini göstermiştir. Bu bulgu şimdiye kadar gerçekleştirilen mevcut sitotoksik çalışmalar ile de paralellik göstermektedir. Örneğin MUSCOLO vd. (2001) *Fagus sylvatica* L. and *Pinus laricio*'da fenolik bileşiklerin tohum çimlenmesi sırasında solunum enzimlerini etkilemek suretiyle tohum çimlenmesini engellediğini göstermişlerdir. Benzer bir çalışmada ise WEINBERGER & VLADUT (1981) bazı fenol bileşiklerinin *Pinus banksiana* Lamb. and *Betula papyrifera* March. türlerinde çimlenme yüzdesini azaldığı rapor etmişlerdir.

Kimyasal toksikitenin en önemli belirtilerinden biri ise, kök büyümesi ve tohum ağırlığının engellenmesidir (BURTON 1984). Bu çalışmada, fenol uygulanan tohumların kök uzunluğu ve ağırlık kazanımlarındaki değişimlerde belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçta 25, 50 ve 75 ppm'lik fenol dozlarının kök büyümesini büyük ölçüde engellediği belirlenmiştir. Örneğin, 25 ppm fenol dozunda kök büyümesi, kontrol grubuna göre yaklaşık 1.21 kez daha düşmüş ve bu düşüş fenol dozlarındaki artış ile birlikte daha da belirgin hale gelmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 25, 50 ve 75 ppm'lik fenol dozlarında kök büyümesi sırasıyla %17, %34 ve %55 azalmıştır. Tüm bu sonuçlara bakıldığında fenol'ün çimlenme yüzdesi ve kök uzunluğu üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu görülebilmektedir. Bu olumsuz etkinin, fenol'ün yapısında bulunan hidroksil (OH) iyonların solunum sistemi enzimleri ile etkileşime girerek onları bloke etmesi veya engellemesi, klorofil miktarını azaltması ve kloroplast hasarına sebep olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Zira fenol'ün çimlenme ve kök gelişimi üzerinde bu tarz etkilerinin olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Örneğin eğrelti türü olan *Salvinia molesta* ile gerçekleştirdiği bir çalışmada 2.5 ppm fenol konsantrasyonunun kloroplast hasarına sebep olduğu gösterilmiştir. Benzer bir çalışmada ise, yabani bir ot türü olan *Lemna minor*'de 1.0 ppm fenol dozunun klorofil kaybına yol açtığı belirlenmiştir (ÖZYİĞİT vd. 2007).

Tohumlardaki ağırlık kazanımı ile bulgular ise, uygulama periyodu süresince maruz kalınan fenol dozlarına bağlı olarak ağırlık kazanımının olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir. Örneğin, yedinci günün sonunda kontrol grubu tohumların ağırlıklarında başlangıca göre %296'lık bir artış gözlenirken, 25, 50 ve 75 ppm fenol dozları ile muamele edilen tohumlarda ise başlangıca göre sırasıyla %205, %138 ve %83'lik bir artış gözlenmiştir. Yani fenol tohumların ağırlık kazanımının baskılanmasına ve azaltılmasına neden olmuştur. Ağırlık kazanımı üzerine fenolün toksik etkisinin

mekanizması henüz tam olarak açıklanamamasına rağmen, bunun fenolün hücre bileşenleri ile etkileşime girerek bloklayıcı bir ajan gibi iş görmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Örneğin, UGREKHELIDZE vd. (1999) fenol'ün yapısında bulunan hidroksil grubunun (OH) çeşitli moleküllerin fonksiyonel grupları ile bağlanma yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu bağlanma besin maddelerinin bitki dokularına girişini blok edebilecektir. Örneğin WALLSTEDT vd. (2001) yüksek yapılı bitkilerde fenol'ün doğrudan veya dolaylı olarak besin alımını azalttığını rapor etmişlerdir. Tohumlardaki ağırlık kaybı için diğer bir önemli sebep ise terleme oranının artışı olarak düşünülmüştür. Zira MCFARLANE vd.(1987) soya bitkilerinde bir fenol türevi olan nitrobenzen alımının terleme oranını artırdığını bildirmişlerdir. Belirtilen tüm bu koşullar, dokuların besin içeriklerinde önemli değişmelere sebep olacağından, ağırlık kazanımı önemli ölçüde etkileyebilecektir. Ağırlık kazanımı üzerine fenolün etki mekanizması tam olarak ortaya konulmasa bile, genel anlamda ağır metallerin etki mekanizması ile benzerlik gösterdiği söylenebilir. Zira SHARMA & DUBEY (2005) ağır metal iyonlarında içinde bulunduğu çeşitli kimyasal ajanların bitki dokuları içerisine anyon ve katyonların girişini bloke ettiğini, dokuların su içeriğini ve terleme oranını azalttığını belirtmişlerdir. Yine benzer tarzdaki çalışmalarda, Al bileşiklerinin bitkilerde çeşitli iz besinlerin alımını, taşınımını ve metabolizmasını engellediği, suyun alımını azalttığı, plazma membranlarının fonksiyonunu ve yapısını değiştirdiği, hücre duvarında yer alan polisakkaritlerin depolanmasını azalttığı ve köklerdeki terlemeyi önlediği rapor edilmiştir (PIETRASZEWSKA 2001). Bir diğer çalışmada ise, bitkilerde 5 mM Co varlığında makro ve mikro iz elementlerin alımının engellendiği ve canlı ağırlığının azaldığı tespit edilmiştir (LIU vd. 2000).

Bu çalışmada, ayrıca fenol'ün MN sıklığı üzerine etkileri de araştırılmıştır. Sonuçta, fenol ile muamele edilen tohumlarda, MN sıklığında fenol dozuyla ilişkili bir artış belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle, fenol dozundaki artış ile birlikte MN sıklığı da doğru orantılı bir şekilde artmıştır. En yüksek MN sıklığı 75 ppm fenol dozunda, en düşük MN sıklığı ise 25 ppm fenol dozunda gözlenmiştir (Tablo V). Tüm bu bulgular fenolün *V. faba* kök uçlarında MN oluşumunu teşvik eden toksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Fenol ile ilgili bu gözlemler, diğer araştırmacılar tarafından şimdiye kadar çalışılan farklı kimyasal maddelere ait sitotoksik veriler ile de benzerlik göstermektedir. Birçok çalışmada, farklı kimyasal ajanların iğ iplikleri, kromozom ve mitotik aygıt üzerinde hasarlara sebep olarak MN oluşumunu tetiklediği rapor edilmiştir (İNCEER vd. 2003). Özellikle, iğ ipliklerinin oluşumunun engellenmesinin kromozomlarda yapışkanlık, eşit olmayan kromatin dağılımı, çok kutuplu anafaz, kromozom köprüleri ve mitozda geri kalma gibi çeşitli anormalliklere yol açtığı belirlenmiştir (KARK 1979).

Bu çalışmada kullanılan fenol'ünde yukarıda belirtilen tarzda iğ iplikleri ve kromozomlar üzerinde etkili olarak, MN oluşumunu tetiklediği düşünülmüştür. Yani fenol'ün direk nükleik asitler, ya da onların yapısında yer alan bağlar veya pürün ve pirimidin gibi bazlar ile etkileşime girerek veya protein yapısındaki iğ ipliklerinin konformasyonunu değiştirmek (denaturasyon) suretiyle kromozomların mitozda gecikmelerine neden olabilir ve MN oluşumuna tetikleyebilirdi. Bu bulgu diğer araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen benzer çalışmalar tarafından da desteklenmektedir. Örneğin, STAYKOVA vd. (2005) *Allium cepa* kök uçlarında sentromersiz kromozom parçaları ve mitoz bölünmede tüm bir kromozomun geri kalmasından kaynaklanan MN oluşumu rapor edilmiştir. Benzer bir çalışmada ise, *V.*



*faba* kök ucu hücrelerinde CrO<sub>3</sub> konsantrasyonundaki artış ile birlikte kromozomal anormalliklerin ve *MN* sıklığının doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiştir (WEI 2004). Ayrıca, bizim bu çalışmamızda *MN* oluşumu ve DNA konsantrasyonu arasındaki ilişkide araştırılmıştır. Bu amaçla, *V. faba* kök ucu hücrelerinde DNA eldesi gerçekleştirilmiş ve DNA konsantrasyonlarını ölçmek DNA elektroforez tekniğini kullanmıştır. Sonuçta, DNA konsantrasyonunun fenolün 75 ppm'lik dozu için oldukça duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). DNA bantlarının uzunluğu farklı fenol konsantrasyonları ile muamele edilen tohumlarda, kontrol grubuna göre daha uzun olduğu belirlenmiştir. Diğer bir ifade ile kontrol grubu tohumlardan elde edilen DNA'nın ürünü fenol ile muamele edilen tohumlardan daha yüksekti ve bu nedenle elektroforez işlemi sırasında fenol ile muamele edilen tohumlardan elde edilen DNA'ya göre daha geride bant oluşumu gösterdi. Sonuç olarak, DNA ürününün kontrol > 25 ppm fenol > 50 ppm fenol > 75 ppm fenol şeklinde sıralandığı gözlemlendi. Bu sıralama genetik materyalin kaybı ile açıklanabilir. Şöyleki, *MN* oluşumu tüm bir kromozom veya kromozom parçasından kaynaklanan ve nükleus içindeki genetik materyalin kaybı ile ortaya çıkan bir durumdur. Bizim bu gözlemimiz *MN* oluşumunun DNA ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu bulgu şimdiye kadar diğer araştırmacılar tarafından detaylı bir şekilde rapor edilmediği gibi, kimyasal sitotoksitenin mekanizmalarını anlamak için araştırmacılar için yeni bir kaynaktan teşkil edebilecektir.

Tüm bu sonuçlardan, fenol'ün *V. faba* kök ucu hücrelerinde çeşitli sitotoksik etkilere sahip olduğu, çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu, ağırlık kazanımı ve *MN* sıklığı gibi parametrelerin ise bu etkilerin izlenmesi için uygun indikatörler olarak kullanılabilceği söylenebilir.

## KAYNAKLAR

- ATİK M, KARAGÜZEL O, ERSOY S, 2007. Sıcaklığın *Dalbergia sissoo* tohumlarının çimlenme özelliklerine etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 203–210.
- BURTON KW, MORGAN E, ROIG A, 1984. The influence of heavy metals on the growth of sitka-spruce in South wales forests. II green house experiments. *Plant Soil*, 78, 271–282.
- CANADIAN ENVIRONMENTAL, 2000. Priority substances list assessment report. Phenol Protection Act, pp. 1–73 (erişim: <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt>).
- DOBBINS DC, THORNTON-MANNING J, JONES DD, FEDERLE TW, 1987. Mineralization potential for phenol in subsurface soils. *Journal of Environmental Quality*, 16, 54–58
- ENVIRONMENT CANADA, 1998. *Priority Substances List supporting document for the environmental assessment of phenol*. Canadian Environmental Protection Act. Commercial Chemicals Evaluation Branch, Hull, Quebec, pp.1–7.
- FENECH M, CHANG WP, KIRSCH-VOLDERS M, HOLLAND N, BONASSI S, ZEIGER E, 2003. Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534, 65–75.

- İNCEER H, AYAZ S, BEYAZOĞLU O, ŞENTÜRK E, 2003. Cytogenetic effects of copper chloride on the root tip cells of *Helianthus annuus* L. *Turkish Journal of Biology*, 27, 43–46.
- KARK P, 1979. *Clinical and neurochemical aspects of inorganic mercury intoxication*, In *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp.147–197.
- LIU J, REID RJ, SMITH FA, 2000. The mechanism of cobalt toxicity in mung beans. *Physiologia Plantarum*, 110, 104–110.
- MCFARLANE JC, PFLEEGER T, FLETCHER J, 1987. Transpiration Effect on the Uptake and Distribution of Bromacil, Nitrobenzene, and Phenol in Soybean Plants. *Journal of Environmental Quality*, 16, 372–376.
- MOZDARANI H, KAMALI S, 1998. Antigenotoxic effects of cimetidine against benzene induced micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes. *Toxicology Letters*, 99, 53–61.
- MUSCOLO A, PANUCCIO MR, SIDARI M, 2001. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination. *Plant Growth Regulation*, 35, 31–35.
- ÖZYİĞİT İİ, KAHRAMAN MV, ERCAN Ö, 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 6 (1), 3–8.
- PIETRASZEWSKA TM, 2001. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48 (3), 673–686.
- SHARMA AD, GILL PK, SINGH P, 2002. DNA Isolation From Dry And Fresh Samples of Polysaccharide-Rich Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 415–415.
- SHARMA P, DUBEY S, 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 35–52.
- STAYKOVA TA, IVANOVA EN, VELCHEVA IG, 2005. Cytogenetic effect of heavy metal and cyanide in contaminated waters from the region of southwest Bulgaria. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4, 41–46.
- UGREKHELIDZE D, KVESİTADZE G, ARZIANI B, MITHAISHVILI T, PHIRIASHVILI V, 1999. Detoxication of phenol in annual plant seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42 (2), 119–124.
- WALLSTEDT A, SOMMARIN M, NILSSON MC, MUNSON AD, MARGOLIS HA, 2001. The inhibition of ammonium uptake in excised birch (*Betula pendula*) roots by batatasin-III. *Physiologia Plantarum*, 113, 368–376.
- WEI QX, 2004. Mutagenic effects of chromium trioxide on root tip cells of *Vicia faba*. *Journal of Zhejiang University Science*, 5, 1570–1576.
- WEINBERGER P, VLADUT R, 1981. Comparative toxic effects of some xenobiotics on the germination and early seedling growth of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) and white birch (*Betula papyrifera* March). *Canadian Journal of Forestry Research*, 11, 796–804.
- YENER J, AKSU Z, 1999. Atıksulardaki fenol ve klorofenollerin aktif karbon ve kurutulmuş aktif çamura adsorpsiyonu. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Science*, 23, 93–104.