



T. C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DROSOPHILA MELANOGASTER'DE TRİFLURALİNE KARŞI ALOE
VERA UYGULAMASININ KORUYUCU ETKİSİNİN ÇEŞİTLİ
PARAMETRELERLE BELİRLENMESİ

HAZIRLAYAN

ÖZGE ÇELİKTAŞ KÖSTEKÇİ

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ FAHRİYE ZEMHERİ NAVRUZ

BARTIN-2021



T. C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE TRİFLURALİNE KARŞI ALOE VERA UYGULAMASININ
KORUYUCU ETKİSİNİN ÇEŞİTLİ PARAMETRELERLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN

Özge ÇELİKTAŞ KÖSTEKÇİ

JÜRİ ÜYELERİ

- Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ - Bartın Üniversitesi
NAVRUZ
- Üye : Prof. Dr. Sinan İNCE - Afyon Kocatepe Üniversitesi
- Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yavuz ERDEN - Bartın Üniversitesi

BARTIN-2021

BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ danışmanlığında hazırlamış olduğum “*DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE TRİFLURALİNE KARŞI *ALOE VERA* UYGULAMASININ KORUYUCU ETKİSİNİN ÇEŞİTLİ PARAMETRELERLE BELİRLENMESİ” başlıklı Yüksek Lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

İmza

09. 02. 2021

Özge ÇELİKTAŞ KÖSTEKÇİ

ÖNSÖZ

Tezimin ve çalışmalarımın tüm aşamalarında bana her türlü desteğini, yardımını esirgemeyen, bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana yol gösterirken aynı zamanda bana göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Yavuz ERDEN hocama tezimin çalışmalarında bana yardım ettiği için teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her sıkıntıda, zorlukta yanımda olan, el ele yürüdüğüm ve bana olan desteğini esirgemeyen var oluşumun sebebi, fedakarlıklarını asla ödeyemeyeceğim, beni bugünlere getiren, sabırla, sevgiyle büyüten, bana inanıp güvenen en değerli kaynağım canım annem Pakize ÇELİKTAŞ'a, desteğini hiç esirgemeyen, yanımda olan canım kardeşim Özey ÇELİKTAŞ BAĞDAT'a ve maddi, manevi, her koşulda yanımda olan, desteğini hiç esirgemeyen eşim Osman KÖSTEKÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını 2019-FEN-CY-005 numaralı projesi ile Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir, teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Özge ÇELİKTAŞ KÖSTEKÇİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE TRİFLURALİNE KARŞI *ALOE VERA* UYGULAMASININ KORUYUCU ETKİSİNİN ÇEŞİTLİ PARAMETRELERLE BELİRLENMESİ**

Özge ÇELİKTAŞ KÖSTEKÇİ

Bartın Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ

Eş Danışman: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Bartın-2021, sayfa: 54

Pestisitler, doğal çevrede birçok canlı türü üzerinde toksik etkilere sebep olmaktadır. Pestisitlerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımının insan sağlığına ve çevreye birçok olumsuz etkisi vardır. Trifluralin (TRF), yabancı otları kontrol etmek için, pamuk ve soya fasulyesi gibi birçok yerde yaygın olarak kullanılan bir herbisittir. Özellikle suda yaşayan organizmalar için ekotoksosite, toksisite ve mutajeniteye neden olan bir maddedir. *Aloe vera* tropikal ve subtropikal yerlerde yetişen bitki olup iyi ekonomik potansiyale sahip doğal bir iyileştiricidir. Anti-enflamasyon, anti-hepatit, yara iyileşmesine iyi gelen ve kemopreventif özelliğe sahip doğal bir bitkidir. *Drosophila melanogaster*, laboratuvarında çalışılması kolay ve tercih edilen bir model organizmadır. Bu tez çalışmasında farklı konsantrasyonlarda TRF (0,1 mM) ve *Aloe vera* (%2,5, %5 ve %10) uygulanan *D. melanogaster* üzerinde, ömür uzunluğu testi, larval toksisite ve comet testleri yapıldı. Ömür uzunluğu testinde son birey ölene kadar devam edildi. Larval toksisite de 15. gün bireyler toplandı ve sayıldı. Comet analizinde ise *D. melanogaster*'lerde oluşan olası DNA hasarları ölçüldü. Çalışmamızın bulgularına göre ömür uzunluğu deneyinde dişi ve erkek populasyonda *Aloe vera* verilen dozlarda ömür uzunluğu ilerlemiştir. Larval toksisite deneyinin sonucuna göre TRF'nin belirlenen konsantrasyonunda larvanın yaşam oranını düşürdüğü, *Aloe vera*'nın ise en yüksek konsantrasyonda larvanın

yaşam oranını arttırdığı görüldü. Comet analizine göre; TRF'nin DNA hasarında artış meydana getirdiği ve buna karşılık *Aloe vera* ile uygulandığında etkilerin giderek azaldığı sonucuna varıldı. Sonuç olarak *Aloe vera*'nın, TRF'nin yanında koruyucu olarak kullanılabilir ve TRF'nin zararlı etkilerini azaltabilir olduğu görülmekte ve *Aloe vera* jelinin insan sağlığı ve canlılık için önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Drosophila Melanogaster*, Trifluralin, *Aloe Vera*, Ömür uzunluğu, DNA hasarı, larval toksisite

Bilim Alanı Kodu: 20326



ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DETERMINATION THE PROTECTIVE EFFECT OF *ALOE VERA* APPLICATION ON *DROSOPHILA MELANOGASTER* AGAINST TRIFLURALINE IN WITH VARIOUS PARAMETERS

Özge ÇELİKTAŞ KÖSTEKÇİ

Bartın University
Graduate School

Thesis Advisor: Assist. Prof. Dr. Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ

Co-Advisor: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Bartın-2021, pp: 54

Pesticides have caused toxic effects on many species in the environment. Unconscious and uncontrolled used of pesticides has many negative effects on human health and the environment. Trifluralin (TRF) is a herbicide widely for have weeds under control, such as cotton and soybeans used in many places. Particularly It has caused ecotoxia, toxicity and mutagenity, in aquatic organism. *Aloe vera* has grown in tropics and non-tropical zone and it has a natural therapeutic, anti-inflammation, anti-hepatitis and chemopreventive and a good economic potential. *Drosophila melanogaster* has an easily worked and preferred model organism in laboratory conditions. In this thesis study, lifespan, larval toxicity and comet assay were performed on *D. melanogaster* which was applied in different concentrations of TRF (0.1 mM) and *Aloe vera* (2.5%, 5% and 10%). The lifespan assay continued until the last fly died. Flies were numbered and collected after 15 days in the larval toxicity assay. Potential DNA damage in the *D. Melanogasters* measured with the comet assay. In this study results, Male and females flies had increased to lifespan in groups with *Aloe vera*. As a survival rate of larva had decreased TRF concentrations, it had increased at the highest *Aloe vera* concentration in the larval toxicity assay.

It was observed that as DNA damage was increased TRF groups, it was decreased in all *Aloe*

vera groups. As a result, *Aloe vera* can be used as a conservator and decreased the harmful effects of TRF. *Aloe vera* gel has considered to have an important role for human health and vitality.

Keywords: *Drosophila Melanogaster*, Trifluralin, *Aloe Vera*, longevity, DNA damage, larva toxicity

Scientific Field Code: 20326



İÇİNDEKİLER

BEYANNAME	iii
ÖNSÖZ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
1.1 Pestisitler Hakkında Genel Bilgiler	1
1.1.1 Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	2
1.2 Herbisitler Hakkında Genel Bilgi.....	3
1.2.1 Herbisitlerin Sınıflandırılması	4
1.3 Trifluralin (TRF)	5
1.4 <i>Aloe Vera</i>	7
1.4.1 <i>Aloe Vera</i> 'nın Tarihçesi.....	7
1.4.2 <i>Aloe Vera</i> Bitkisi.....	8
1.4.3 <i>Aloe Vera</i> 'nın Sistematik Yeri.....	9
1.4.4 <i>Aloe vera</i> 'nın Morfolojik Özellikleri.....	9
1.5 <i>Aloe Vera</i> jel.....	10
1.5.1 <i>Aloe Vera</i> Jel'de Aktif Bulunan Bileşenler	10
1.6 <i>Drosophila Melanogaster</i> ile İlgili Genel Bilgiler	11
1.6.1 <i>Drosophila Melanogaster</i> 'in Sistematik Yeri	12
1.6.2 <i>Drosophila Melanogaster</i> 'in Yaşam Döngüsü.....	13
1.6.2.1 Yumurta Evresi	14
1.6.2.2 Larva Evresi	14
1.6.2.3 Pupa Evresi	14
1.6.2.4 Ergin.....	14
1.7 Tek Hücreli Jel Elektroforezi (SCGE/COMET)	16
1.7.1 Comet Analizi Türleri	17
1.7.2 Tek Hücreli Jel Elektroforezi Basamakları.....	18
1.7.2.1 SCGE Yönteminde Hücrelerin Hazırlanması	19

1.7.2.2	Slaytların Hazırlanması	19
1.7.2.3	Lizis	19
1.7.2.4	Alkali Ortamda DNA Sarmalının Çözülmesi.....	20
1.7.2.5	Elektroforez	20
1.7.2.6	Nötralizasyon	20
1.7.2.7	Boyama.....	20
1.7.2.8	Değerlendirme	20
BÖLÜM 2 LİTERATÜR ÖZETİ.....		22
BÖLÜM 3 MATERYAL VE METOT		25
3.1	Materyal.....	25
3.1.1	Kullanılan Model Organizma	25
3.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.3	Kullanılan Alet ve Cihazlar	26
3.2	Metot.....	27
3.2.1	Besiyeri Ortamının ve İçeriğinin Hazırlanması	27
3.2.2	Eterizasyon (Bayılma) Yöntemi	28
3.2.3	Deney Düzenegi	29
3.2.4	Ömür Uzunluğu Deneyi için Ön Kültürlerin Oluşturulması ve Ergin Bireylerin Toplanması	30
3.2.5	Ömür Uzunluğu ve Larval Toksikite Kullanılacak Olan Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	30
3.2.6	Ömür Uzunluğu Deneyinde Ergin Bireylere TRF ve <i>Aloe Vera</i> 'nın Uygulanması 32	
3.2.7	Larval toksisite.....	33
3.2.8	COMET Hazırlıkları	33
3.2.8.1	COMET için Ön Kültürlerin Oluşturulması ve Ergin Bireylerin Toplanması	33
3.2.8.2	COMET Solüsyonların Hazırlanması	33
	Elektroforez solüsyonunun hazırlanması:	33
	Nötralizasyon solüsyonunun hazırlanması:	34
	Lizis solüsyonunun hazırlanması:	34
	Low Melting Agaroz (LMA) Hazırlanması	35

Normal Erime Noktalı Agaroz Hazırlanması	35
3.2.8.3 COMET Analizinin <i>Drosophila melanogaster</i> 'e Uygulanma Aşamaları	35
3.3 İstatistiksel Analiz	36
BÖLÜM 4 BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1 Dozun Seçilmesi.....	37
4.2 <i>İn Vivo</i> Ömür Uzunluğu Testinde Elde Edilen Bulgular.....	37
4.3 TRF ve <i>Aloe vera</i> 'nın <i>D. melanogaster</i> larvalarında yaşama oranı.....	40
4.4 COMET Deney Sonuçlarının Analizi	41
BÖLÜM 5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1. 1: Pestisitlerin tabiattaki döngüsü ve insan vücuduna alınımı.	2
Şekil 1. 4: TRF'nin genel yapısı	5
Şekil 1. 5: Trifluralinin keşfi ve gelişimi.	6
Şekil 1. 6: <i>Aloe vera</i> bitkisi	9
Şekil 1. 7: <i>Aloe Vera</i>	10
Şekil 1. 8: <i>Drosophila melanogaster</i> yaşam döngüsü.....	13
Şekil 1. 9: Ergin dişi ve erkek <i>Drosophila melanogaster</i>	15
Şekil 1. 10: Comet analiz basamakları	18
Şekil 1. 11: Comet analiz jel görüntüsü.	21
Şekil 1. 12: Cometin uç noktaları, % Kuyruk DNA=göç etmiş DNA'nın oranı ve Kuyruktaki DNA yüzdesi.	21
Şekil 3. 1: a) <i>D. melanogaster</i> kültürlerinin 25±1°C'de etüvde yetiştirilmesi. b) <i>D.</i> <i>melanogaster</i> 'lerin yetiştirildiği cam şişeler.	25
Şekil 3. 2: Eterizasyon işlemi.	29
Şekil 3. 3: Çalışma boyunca kullanılacak deney düzeneği	29
Şekil 3. 4: a) <i>Aloe vera</i> yaprağından çıkarılan jelin bulamaç hale getirilmiş hali. b) <i>Aloe</i> <i>vera</i> jelden elde edilen süzüntü.....	32
Şekil 3. 5: Ömür uzunluğu deneyi için ayrılan dişi ve erkek bireyler.....	32
Şekil 4. 1: a) DNA hasarını gösteren sınıflandırılmış comet görüntüsü. b-c) Yetişkin dişi ve erkek <i>D.melanogaster</i> 'in TRF (0,1 mM) ve <i>Aloe vera</i> 'nın (%2,5- %5 ve %10) farklı konsantrasyonlarına 15 gün boyunca maruz bırakılması sonucunda meydana gelen hasarın grafik ile gösterilmesi.....	42

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1. 1: TRF maddesinin genel özellikleri.....	5
Tablo 1. 2: <i>Aloe vera</i> 'nın tarihçesi.	8
Tablo 1. 3: <i>Aloe vera</i> 'nın sistematik yeri.....	9
Tablo 1. 4: <i>Aloe vera</i> jel bileşenleri.	10
Tablo 1. 5: <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Sistematik Yeri.....	12
Tablo 1. 6: Comet analizi türleri	18
Tablo 3. 1: Kullanılan alet ve cihazlar	27
Tablo 3. 2: Standart besiyeri içeriği	28
Tablo 3. 3: Asit karışımı içeriği	28
Tablo 3. 4: Deney Grupları	30
Tablo 3. 5: Elektroforez solüsyonlarının hazırlanması.	34
Tablo 3. 6: Nötralizasyon solüsyonlarının hazırlanması.....	34
Tablo 3. 7: Liziz solüsyonlarının hazırlanması.	35
Tablo 4. 1: <i>D. melanogaster</i> 'in dişi ve erkek populasyonlarına ait ortalama ömür uzunlukları (gün olarak) ve gruplar arası önem kontrolleri.....	39
Tablo 4. 2: TRF ve TRF + <i>Aloe vera</i> 'nın <i>D. melonagaster</i> larvalarının yaşama oranı üzerine etkisi. Grup 1: Kontrol, Grup 2: Ksilen, Grup 3: TRF, Grup 4: TRF + %2,5 <i>Aloe vera</i> , Grup 5: TRF + %5 <i>Aloe vera</i> , Grup 6: TRF + %10 <i>Aloe vera</i>	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

mL	: MİLİLİTRE
μ L	: MİKROLİTRE
M	: MOLAR
mM	: MİLİMOLAR
mm	: MİLİMETRE
kg	: KİLOGRAM
g	: GRAM
cm	: SANTİMETRE
N	: NORMALİTE
$^{\circ}$ C	: SANTİGRAT DERECE
dk	: DAKİKA
g/mol	: GRAM/MOL
♀♀	: DİŞİ
♂♂	: ERKEK

KISALTMALAR

<i>A. vera</i>	: <i>Aloe vera</i>
<i>D. melanogaster</i>	: <i>Drosophila Melanogaster</i>
DMSO	: Dimetil Sülfonoksit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
EtBr	: Etidyum Bromür
HBSS	: Dengelenmiş Tuz Solüsyonu (“Hank’s balanced salt solution”)
LMA	: Low Melting Agaroz
NMA	: Normal Melting Agaroz
M. Ö	: Milattan Önce
M. S	: Milattan Sonra
ORT	: Ortalama
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyon
SCGE	: Tek Hücreli Jel Elektroföresi
SDB	: Standart <i>Drosophila</i> Besiyeri
SH	: Standart Hata
SMART	: Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
TRF	: Trifluralin

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Pestisitler Hakkında Genel Bilgiler

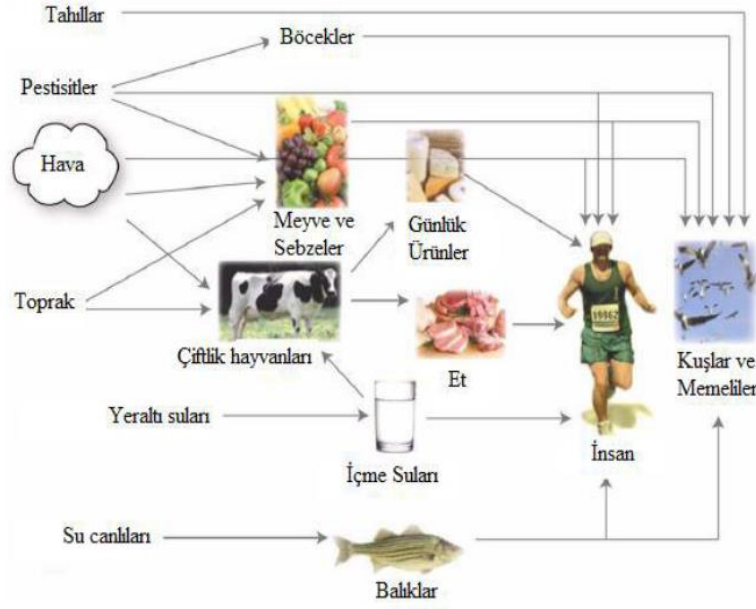
Gıda maddelerinin ilk üretiminden son tüketimine kadar geçen zamanda gıdalara zarar veren mikroorganizmaları ve diğer zararlıları (pestleri) uzaklaştırmak için kullanılan fiziksel, kimyasal veya biyolojik savaş maddelerine pestisit (tarım ilacı) denir (Vural, 2005).

Pestisitler ilk kez M. Ö. 1500'lü yıllarda papirüs üzerindeki haşereleri öldürmek için kullanılmıştır. İlk tarım ilacının Sümer'de 4500 yıl önce uygulanan kükürt tozu olduğu söylenmektedir (Altıkat vd. , 2009). Arsenik ve kükürt ilk kullanılan pestisitlerdir. Daha sonra bitki kökenli maddeler (nikotin) kullanılmaya başlanmıştır. 19. yy'dan itibaren krizantemden elde edilen pyrethrum (pireotu bitkisi) kullanılmaya başlanmıştır. ABD'de 1860'lı yıllara kadar patates böceğine karşı bakır ve arsenik bileşikleri ayrıca cıva ve kurşun metal bileşikleri de kullanılmıştır (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Tarım ürünlerinin verimliliğinin artırılması ve daha iyi bir ürün eldesi sağlamak amacıyla modern tarım tekniklerinin kullanımı artmıştır. Pestisitler de bitki koruma ürünleri içinde bulunan maddelerden biridir. Pestisitler, tarım ürünlerini hastalık yapan organizmalardan ve yabancı otların zararlarından korumak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Pestisit kullanımı arttıkça üretimde artış sağlanmıştır. Pestisitler, besin hammaddesi olarak kullanılan tarım ürünlerinde ve çevrede kalıntıya sebep olmaktadır. Kullanılan pestisitten kaynaklanan kalıntılar teknolojik işlemlerden geçirilerek belli bir seviyeye kadar azaltılabilmektedir. Fakat pestisit kalıntıları su, toprak, hava ve besinler üzerinde kalmaktadır. Bu durum insan sağlığını ve çevreyi çok ciddi bir şekilde olumsuz yönde etkilemektedir (Tiryaki, 2010; Ayaz vd. , 2008).

Pestisit uygulamalarında kullanılan maddenin kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli taşıyıcılarla su, hava ve toprağa ulaşarak önemli derecede çevre sorunlarına sebep olmaktadır (Şekil 1. 1). Kullanılan pestisitlerin bir kısmı buharlaşarak atmosferde çevre sorunlarına sebep olurken, bir kısmı da ışık etkisiyle oluşan kimyasal tepkime yollarıyla parçalanarak toksik maddelere dönüşmektedir. Toprak içerisinde depolanan toksik maddeler kimyasal ve

mikrobiyolojik etkileşimler sonucu parçalanmakta ve toprağı kirletmektedir. Bir bölümü de toprak yüzeyinden yağmur, sel ve kar sularıyla sürüklenerek nehir, göl ve yer altı sularını kirletmektedir (Bayram, 2011).



Şekil 1. 1: Pestisitlerin tabiattaki döngüsü ve insan vücuduna alınımı (Vermeire vd. , 2001).

1.1.1 Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler; hedef alınan canlı organizmaya, içerdiği aktif madde grubuna, fiziksel yapısına, formülasyonuna, kullanım tekniğine ve zehirlilik derecesine göre sınıflandırılmaktadır.

Sınıflandırma türleri arasında en fazla tercih edilen hedef alınan organizmaya ve yapısındaki aktif madde grubuna göre sınıflandırma çeşididir (Yılmaz, 2013).

Pestisitler hedef alınan organizmaya göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Kurutaş vd. ,2013).

- a) Akarisitler (akarları öldüren pestisitler)
- b) İnsektisitler (böcekleri öldüren pestisitler)
- c) Nemasitler (nematotları öldüren pestisitler)
- d) Rodentisitler (fare gibi kemirgen öldüren pestisitler)
- e) Herbisitler (yabancı otları öldüren pestisitler)

Pestisitler içerdiği aktif madde grubuna göre ise aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Anjum vd. , 2012)

- a) İnorganik maddeler
- b) Organik maddeler
 - i) Doğal organik maddeler
 - (1) Bitkisel maddeler
 - (2) Petrol yağları
 - ii) Sentetik organik maddeler
 - (1) Organik fosforlu maddeler
 - (2) Organik klorlu maddeler
 - (3) Diğer sentetik organik maddeler

1.2 Herbisitler Hakkında Genel Bilgi

Herbisitler dünyada yaygın olarak kullanılan pestisitlerden biridir ve sağlıklı tarım ürünü eldesi için kullanılmaktadır (Sarıgöl Kılıç vd. , 2018). Kültüre edilen (insanlar tarafından yetiştirilen) bitkilerin kullandığı ışığa, besin maddelerine ve suya ortak olan; üretim ve kalitenin düşmesine sebep olan yabancı otların öldürülmesi veya gelişiminin baskılanması için kullanılan kimyasal maddelere herbisit denir (Toros vd. , 2001).

Eski zamanlarda tuz, kül, maden eritme atıkları vb. gibi maddeler herbisit olarak kullanılmış olsa da ilk olarak Fransa'da 1896 yılında Bordo bulamacı ot mücadelesinde kullanılmıştır ve 1896-1908 yılları arasında kadar sodyum klorat, karbon bisülfid, sodyum arsenit, kalsiyum siyanamid, kainit ve sülfirik asit gibi non-selektif herbisitler geliştirilmiştir. 1930-1940 yılları arasında ise bor bileşikleri, tiyosiyanatlar, dinitrofenoller, amonyum sülfat ve belirli mineral tuzları seçici ya da seçici olamayan şekilde yabancı ot mücadelesi için geliştirilmiştir. 1941 yılında fenolik asetik asit türevi olan 2,4-diklorfenolik asetik asit (2,4-D) keşfedilmiştir (Varshney ve Sondhia, 2007).

Tarım arazilerinde istenmeyen yabancı otların öldürmesi ve kontrol altına alınmasında kullanılan herbisitler iki grupta incelenir. Selektif olan herbisitler tarımsal ürüne zarar vermeksizin yabancı ot üzerine etkili olanlar ve non-selektif olan herbisitler bütün vejetasyon üzerine etkili olanlar şeklinde sınıflandırılır. Selektif ve non-selektif herbisitler yabancı otların

yaprağına, tohumlarına, fidelerine ve toprağına uygulanabilir (Bayram, 2011).

Dünyada tarımsal mücadelede kullanılmak üzere üretilen tarım ilaçlarının miktarı artmaya başlamış ve yeni ilaçlar geliştirilmiştir. Böylelikle tarımsal mücadelede kullanılan ilaç çeşitliliğinin arttığı gözlemlenmiştir (Toros vd. , 2001).

1.2.1 Herbisitlerin Sınıflandırılması

Herbisitler bitki bünyesinde etkililik mekanizmasına, taşınma özelliğine, bitki dokusu içine giriş yerlerine, kullanım amaçlarına, uygulanma zamanlarına ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılabilir (Atmaca, 2010; Denek, 2010).

Bitki bünyesinde etkililik mekanizmasına göre: Fotosentezi engelleyen herbisitler (imidazol, karbamat, triazin v.b), solunumu engelleyen herbisitler (propanil, benzonitril, benzimidazol v. b), mitoz bölünmeyi engelleyen herbisitler (trifluralin, amidler, karbamatlar v.b) ve çimlenmeyi engelleyen herbisitler (anilinler, karbamatlar v.b) olarak sınıflandırılır.

Bitki bünyesinde taşınma özelliğine göre: Kontakt herbisitler (bitki ile temas ettiği bölgelerde etkili olup, başka bölgelere taşınmayan herbisitler) ve sistemik herbisitler (bitki ile temas ettiği bölgeden bitki dokusuna giriş yaparak diğer organlara taşınıp oralarda etki gösteren herbisitler) olarak sınıflandırılır.

Bitki dokusu içine giriş yerlerine göre: Toprak herbisitleri (toprak altı organlardan giriş yapan herbisitler), yaprak herbisitleri (toprak üstü organlardan giriş yapanlar herbisitler) olarak sınıflandırılır.

Kullanım amaçlarına göre: Total herbisitler (toprak üstü tüm bitkileri öldürmek için kullanılır), seçici“selektif” herbisitler (bitkilerin bir kısmına zarar vermeden diğerlerini öldürmek için kullanılır) olarak sınıflandırılır.

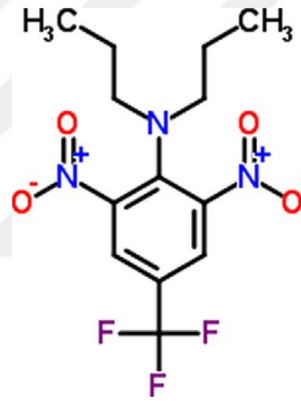
Uygulanma zamanlarına göre: Ekim öncesi, çıkış sonrası ve ekim sonrası-çıkış öncesi olarak sınıflandırılır.

Kimyasal yapılarına göre: Phenoxy grubu (2,4-D amin, aclonifen v.b), aliphatic grubu

(TCA, dalapon, glyphosphate v.b), dinitroanilin grubu (Trifluralin, pendimethalin v.b), nitril grubu (Bromoxynil, ioxynil v.b), amidler grubu (Propanil, acetochlor v.b), doymuş benzoik asitler grubu (Chloramben, 2. 3. 6-TBA Dicamba v.b), karbamatlar grubu (Thiobencarb, chloropham v.b), urasil grubu (Bromacil v.b), diazin grubu (Bentazone, hidrazide v.b), triazin grubu (Terbutryn, atrazine v.b), bipyridilium grubu (Diquat, paraquat v.b), üre bileşikleri (Linuron, fenuron v.b), diğer organik herbisit bileşikleri (Amitrol, DCPA v.b) ve inorganik herbisit bileşikleri (Sodyum Chlorat, boratlar, arsenikler v.b) olarak sınıflandırılır.

1.3 Trifluralin (TRF)

Trifluralin (2,6-dinitro-N, N-dipropil-4-trifluorometilanilin), dinitroanilin sınıfına giren bir herbisittir. TRF'nin genel yapısı Şekil 1. 2 ve genel özellikleri Tablo 1. 1'de verilmiştir.



Şekil 1. 2: TRF'nin genel yapısı.

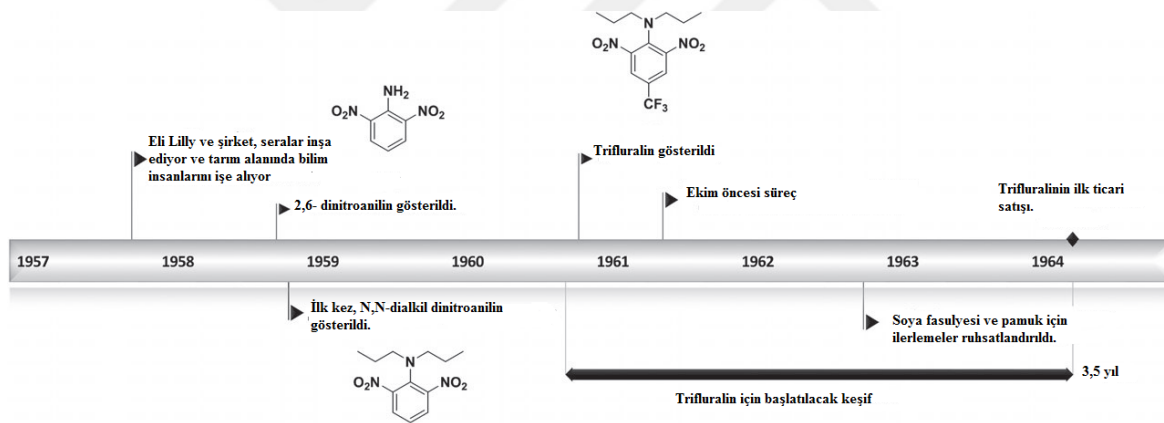
Tablo 1. 1: TRF maddesinin genel özellikleri (Anthony vd. , 1999).

Genel Adı:	Trifluralin
Kimyasal Adı (Iupac):	A,A,A- Trifloro- 2,6-Dinitro- N,N- Dipropyl-P-Toluidine
Moleküler formül:	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄
Moleküler Ağırlığı:	335,32
Erime Noktası:	46-47°C
Kaynama Noktası:	139-140°C
Teknik Maddenin Fiziksel Hali:	Sarı- turuncu kristal
Zehirlilik Sınıfı (Who):	3
CasNumber:	1582-09-8

Tablo 1.1: (devam ediyor).

Etki Şekli:	Çimlenen bitkinin hipokotil bölgesinden giriş yaparak etki eden selektif toprak herbisitidir.
Çözünürlüğü:	Aseton, ksilen ve aromatik nafta gibi organik çözücülerde çözünür
Uygulandığı Bitkiler	Trifluralin, kabuklu yemişler, sebzeler, tahıllar, pamuk, soya fasulyesi, ayçiçeği, yonca, şeker pancarı ve yer fıstığı gibi çeşitli bitkilerde, yıllık otları ve geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için kullanıldığı sonucuna varılmıştır.

Bilim insanları 1900'lü yıllarda pestisit kimyası alanı oluşturmuşlardır. Deneme yanılmaya dayalı bu süreçte; soya fasulyesi ve pamuk tarlalarına ekim öncesini toprağa dahil edilen ticari açıdan öneme sahip çeşitli ot ve geniş yapraklı yabancı otları seçici olarak kontrol eden bir molekül olan TRF'yi 1960 yılında keşfetmişlerdir (Şekil 1. 3) (B Epp vd. , 2018).



Şekil 1. 3: Trifluralinin keşfi ve gelişimi (B Epp vd. , 2018).

TRF; uçak, püskürtücü, merkezden sulama, damlatma ile sulama, tepeden damlatma ile sulama, granüler uygulama, elle dağıtma, sallayıcı ve gübre serpm makinesini içerisine alan zemin ve hava araçları tarafından uygulanabilmektedir. Uygulama zamanları, uygulama alanı ve hedef alınan organizmaya göre farklılık göstermektedir (Patterson, 2004).

TRF herbisiti 3. sınıf kanserojen grubuna giren, yabancı ot öldürücü bir zehirdir. EPA'nın verilerine göre TRF'nin 0,5 ppm'in üstünde olduğunda toksik etki gösterdiği gözlenmiştir (Aydınöğlü vd. , 2002).

Wallace ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmaya göre TRF'nin ratlarda organ sistemlerini etkilediği ve insanlarla da ilgili olup olmadığını belirlemek için de çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir (Wallace, 2014).

TRF üretimi ilk olarak Avustralya'da 1960 yıllarında tahıl markette gerçekleştirilmiştir. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'da bulunan verilere göre TRF, Türkiye'de 2007 yılı içerisinde 724. 420 litre tüketilmiş olup ve aynı yıl içerisinde Türkiye'de özellikle Ege ve Akdeniz bölgesinde çok fazla tüketilen bir herbisit çeşiti olmuştur. EPA'ya göre TRF; solunum, deri teması ve aynı maddeye maruz bırakılmış besinlerin tüketilmesi ile vücuda alındığı gözlenmiştir (Ebert vd. , 1992).

1.4 Aloe Vera

1.4.1 Aloe Vera'nın Tarihçesi

Aloe vera yüzyıllardan beri güzellik, tıp, sağlık ve cilt bakımı alanlarında kullanılmaktadır. *Aloe vera* Arabik kökenli bir kelime olup, "Alloeh" parlayan acı madde, "Vera" ise Latin kökenli olup "gerçek" anlamında kullanılmıştır. Yunan bilim insanları *Aloe vera* bitkisini "universal panacea" her derde deva ilaç olarak, Mısırlılar ise ölümsüzlük bitkisi olarak isimlendirmiştir (Surjushe vd. , 2008).

Mezopotamya'da M. Ö. 1750 yıllarında *Aloe vera* kil tabletleri ilaç olarak kullanılmıştır. M. Ö. 550'de Mısır kitapları *Aloe vera* uygulamasıyla cilt enfeksiyonlarının iyileşebileceğini belirtmiştir. M. S. 74'de Yunanlı doktor, De Materia Medica adlı bir kitap yazmıştır ve *Aloe vera*'nın yaraları tedavi edilebileceğini, cildin enfeksiyonlarını ve çatlamlarını iyileştirebileceğini, saç dökülmelerini azaltabileceğini belirtmiştir. M. S. 1200' lü yıllarda egzama tedavisi için kullanılmıştır (Tablo 1. 2) (Shelton ve ark, 1991). *Aloe vera*, 1800'lü yılların başında Birleşik Devletler'de laksatif (bağırsak yumuşatıcı) olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1930'ların ortalarında kronik ve şiddetli radyasyon dermatitlerinde uygulanmış ve başarılı olunmuştur (Lanka, 2018).

Tablo 1. 2: *Aloe vera*'nın tarihçesi (Shelton vd. , 1991).

M. Ö 1750	Mezopotamya'da kil tabletleri olarak tıbbi tedavide <i>Aloe vera</i> kullanıldı
M. Ö 550	Mısır kitapları <i>Aloe vera</i> uygulamasıyla cilt enfeksiyonlarının iyileşebileceğini belirtmiştir.
M. S 74	<i>Aloe vera</i> 'nın yaraları tedavi edilebileceğini, cildin enfeksiyonlarını ve çatlamları iyileştirebileceğini, saç dökülmelerini azaltabileceğini belirtmiştir.
M. S. 700	Egzama tedavisi için kullanılmıştır.
M. S 1200	Çoğu müshil ilacı olarak kullanılmıştır.
M. S. 1935	Kronik ve şiddetli radyasyon dermatitlerinde kullanılmıştır.

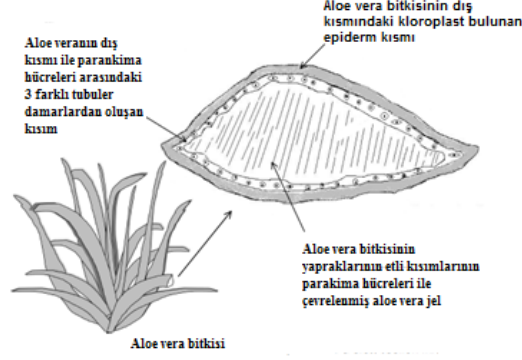
1.4.2 *Aloe Vera* Bitkisi

Aloe vera (L.) Burm. f. kaktüs değildir ama kaktüs gibi tropikal ve subtropikal yerlerde yetişen bitki iyi ekonomik potansiyele sahip doğal iyileştiricidir. 600'den fazla *Aloe* (Familiya Liliacea) türü vardır ve binlerce yıldır çoğu ülkede botanik ilaç olarak kullanılmaktadır (Mukherjee vd. , 2014).

Aloe vera'nın botanik adı *Aloe barbadensis miller'* dir. Asphodelaceae (Liliaceae) familyasına aittir ve çalı gibi veya ağaca benzeyen, çok yıllık, kurakçıl, sukulent, açık yeşil renkli bir bitkidir. Çoğunlukla kuru bölgelerde Afrika, Asya, Avrupa ve Amerika'da yetişmektedir. Hindistan'da Rajasthan, Andhra Pradesh, Gujarat, Maharashtra ve Tamil Nadu'da da bulunmaktadır (Surjushe vd. , 2008).

Aloe vera triangular (üçgensel), kenarları tırtıklı, etli yaprak olup, sarı boru şeklinde çiçek açar ve meyve kısmı çok sayıda tohum içermektedir. Her yaprak üç katmandan oluşur (Surjuste vd. , 2008; Türsen vd. , 2014). Şekil 1.4'de *Aloe vera*'nın katmanları gösterilmiştir. Bunlar;

1. İç kısım tabakasında şeffaf jel içerisinde %99 oranında su, geri kalanında ise glukomannan, aminoasit, yağ, stereol ve vitaminleri içerir.
2. Orta tabakada lateks acı sarı özü, antrakınon ve glikozidleri içermektedir.
3. Dış tabakada koruyucu fonksiyondadır, içerisinde 15-20 hücre bulunur. Karbonhidrat ile protein sentezi görevi bulunmaktadır. Kabuk kısmının içinde damarsal lifler bulunmaktadır. Bu lifler su ve nişasta gibi maddelerin taşınmasında görev alırlar.



Şekil 1. 4: *Aloe vera* bitkisi (Boundreau ve Beland, 2006).

1.4.3 *Aloe Vera*'nın Sistematik Yeri

Aloe vera'nın sistematik yeri Tablo 1. 3'te verilmiştir (Itrat vd. , 2013).

Tablo 1. 3: *Aloe vera*'nın sistematik yeri (Itrat vd. , 2013).

Alem	Plantae
Takım	Aspergales
Bölüm	Spermatophyta
Alt-Bölüm	Angiospermae
Sınıf	Monocotyledonea
Aile	Liliaceae
Cins	<i>Aloe</i>
Tür	<i>Barbandensis</i> Mill

1.4.4 *Aloe vera*'nın Morfolojik Özellikleri

Aloe vera çalı gibi veya ağaca benzeyen, kurakçıl, sukulent, açık yeşil renkli bir bitkidir (Şekil 1.5). Olgunlaştığında en fazla 1,5 kg ağırlığında ve bitki başına genellikle 12-16 büyük bazal yaprak üreten kalın lifli kökü olan bir yığın oluşturan çok yıllık bir bitkidir. Bitki yaklaşık 4 yaşında olgunluğa erişir ve yaklaşık 12 yıl yaşamaktadır. Kenarları dikenli ve iç bükey dik yayılımın dışında yaklaşık 30-60 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde ve 1,8 cm kalınlığındadır. Bitki sapı yapraklardan daha uzun, pullu ve dallara ayrılmıştır. Yapraklar, altında epidermis ve mezofil bulunan kalın kütikül ile kaplıdır. Daha sonra üst parankima ve alt parankima farklılaşır, rozet olgunlaştıkça birbirini takip eden yapraklar daha az beyazımsı lekeler ve açık yeşil renge sahiptir. Kokusu karakteristiktir. Tadı acı ve mide bulandırıcıdır (Itrat,2013; Ahlawat, 2011).



Şekil 1. 5: *Aloe Vera*.

1.5 *Aloe Vera* jel

Aloe vera jel, *Aloe vera* yaprağından elde edilen berrak, jel benzeri maddedir. *Aloe vera* yaprakları lateks ve jel olarak iki farklı bölüme sahip olan ve farklı kimyasal bileşenler içeren yapıya sahiptir. Lateks bölümü perisiklik hücrelerden oluşurken, jel kısmı parankima hücrelerinden oluşmuştur (Capasso vd., 1998).

1.5.1 *Aloe Vera* Jel'de Aktif Bulunan Bileşenler

Aloe vera bitkisinde yaklaşık olarak 75'e yakın aktif bileşenin olduğu bilinmektedir. Bu bileşenler vitaminler, enzimler, mineraller, şekerler, lignin, saponinler, salisalik asit ve aminoasitlerdir. Tablo 1. 4'de *Aloe vera*'nın aktif bileşenleri ve özellikleri gösterilmektedir (Lanka, 2018). *Aloe vera* jelin pH aralığı 4.4-4.7 arasındadır ve %99-90,4 su içermektedir (Boundreau vd., 2006).

Tablo 1. 4: *Aloe vera* jel bileşenleri (Lanka, 2018).

Aktif Bileşenler	Aktif Bileşenlerin <i>Aloe vera</i>'daki özellikleri
<i>Vitaminler</i>	Vitamin A (beta-karoten), C ve E, antioksidan içerir. Ayrıca vitamin B1, B2, B6 ve B12, folik asit ve kolin içerir. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötrleyerek vücudu korur.
<i>Enzimler</i>	Alkali fosfat, amilaz, oksidaz, bradykinaz, karboksipeptidaz, katalaz, selüloz, lipaz, peroksidaz, siklooksijenaz. Bradykinaz deride lokal olarak uygulandığı zaman fazla enflamasyonu azaltmaya yardımcı ederken, diğer enzimler ise şekerlerin, proteinlerin ve yağların yıkımına yardımcı olur.
<i>Mineraller</i>	Kalsiyum, selenyum, bakır, krom, magnezyum, potasyum, sodyum ve çinko içerir. Minerallerin bazıları antioksidanlar olarak hareketi ve farklı metabolik yollar içinde çeşitli enzim sisteminin asıl işlevi için gereklidir.

Tablo 1.4: (devam ediyor).

Şekerler	Monosakkaritler (glukoz ve fruktoz) ve polisakkaritlerdir (glikomannan ve polimannoz). En çok öne çıkan monosakkaritler mannoz-6-fosfattır ve en sık kullanılan polisakkarit glikomannoz olarak adlandırılır. Önemli bir glucomannan olan Acemannan bulunmuştur. Son zamanlarda bir glikoprotein anti-alerjik özelliklerle (alprogen ve yeni geliştirilen anti-enflamatuar bileşen olarak adlandırılır) C-glukosilkromon, <i>Aloe vera</i> jelden izole edildi.
Organik asitler	Sorbat, salisilik asit ve ürik asittir. Salisilik asit, anti-enflamatuar ve antibakteriyel özelliklere sahiptir.
Antrakinonlar	Aloin, barbaloin, izobarbaloin, aloetik asit, aloe-emodin, sinamik asitin esteri, resistanol, krizofanik asit ve emodin bileşenleridir. Laksatif olarak görevi vardır. Aloin ve emodin ağrı kesici, antibakteriyel ve antiviral olarak görevi vardır
Yağ asiti ve Steroidler	Kolesterol, kampesterol, β -sisosterol ve lupeol steroidlerini içermektedir Araşidonik asit ve γ -linoleik asit gibi yağ asitlerini içermektedir Tüm bunlar ayrıca anti-enflamatuar etki ve lupeol, antiseptik ve ağrı kesici özelliğe sahiptir.
Non-esansiyel aminoasitler	Histidin, arjinin, aspartik asit, prolin, glisin, tirozin, alanin, ve hidroksiprolin non-esansiyel aminoasitlerdir.
Esansiyel aminoasitler	Metiyoin, fenilalanin, izolesin, valin, treonin ve lizin esansiyel aminoasitlerdir.
Hormonlar	Oksin ve giberellin hormonlarıdır. Yara iyileşmesine yardım eder ve anti-enflamatuar etkiye sahiptir.
Diğerleri	Lignin, bir inert madde, topikal preparasyon içerdiğinden deri içindeki diğer bileşenlerin penetrative etkisini artırır. Saponinler, jelin %3 oranında sabunlu maddelerdir ve temizleme, antiseptik özelliğe sahiptir.

1.6 *Drosophila Melanogaster* ile İlgili Genel Bilgiler

Meyve sineği olarak da adlandırılan *Drosophila melanogaster* genetik laboratuvarlarında en çok tercih edilen model organizmalardan biridir. Genetik ve gelişimsel biyoloji alanları geliştikçe *D. Melanogaster* üzerinde çalışmalarda artmaya başlamıştır (Tyler, 2000). 1830 yılında *D. melanogaster*; Johann Wilhem Meigen tarafından tanıtılmış ve ilk defa 1910 yılında ise Thomas M. Morgan tarafından genetik çalışmalarda kullanılmıştır. Latince karşılığı “nem seven” anlamına gelmektedir (Allen, 1975; Olgun ve Yurtsever, 2003).

D. melanogaster, kullanım açısından birçok avantaja sahiptir (Priya, 2012). Bunlar:

1. Laboratuvar ortamında kültüre edilebilmeleri kolay ve ekonomiktir.

2. Boyutları küçük olduğundan morfolojik anestezi uygulandıktan sonra mikroskop altında fenotipik özellikleri görüntülemek kolaydır.
3. Kısa sürede üreyebilirler (Yaklaşık 25°C' de %40-60 bağıl nemde 10 gün)
4. Çok sayıda yavru döl verebilmektedir (Günde yaklaşık 100 yumurta ve ömür boyu yaklaşık 2000'den fazla).
5. Yaşam döngüleri kısadır.
6. Gelişimleri tam metamorfozlidir.
7. Sinek biyolojisinin birçok yönünü tanımlayan bu sinek için çeşitli genetik mutantlar bulunabilir. *D. melanogaster*'de genetik transformasyon teknikleri 1987'den beri mevcuttur.
8. Genetik olarak kontrol edilebilirler. Çeşitli morfolojik karakterlere ve mutant soylara sahiptir.
9. *D. melanogaster*'in insan ile birçok homolog geni vardır.
10. *D. melanogaster*'in tam genomu hakkındaki bilgiler 2000 yılında yayınlanmıştır. Genomu bir hayvan için nispeten küçüktür (İnsanların ve farelerin onda birinin altında).

1.6.1 *Drosophila Melanogaster*'in Sistematik Yeri

D. melanogaster, tam başkalaşım gösteren (Holometabol), diploid kromozomlu dört çift kromozom taşıyan bir canlıdır. *D. melanogaster*'in sistematik yeri Tablo 1. 5 'te gösterilmiştir (Özata, 2006).

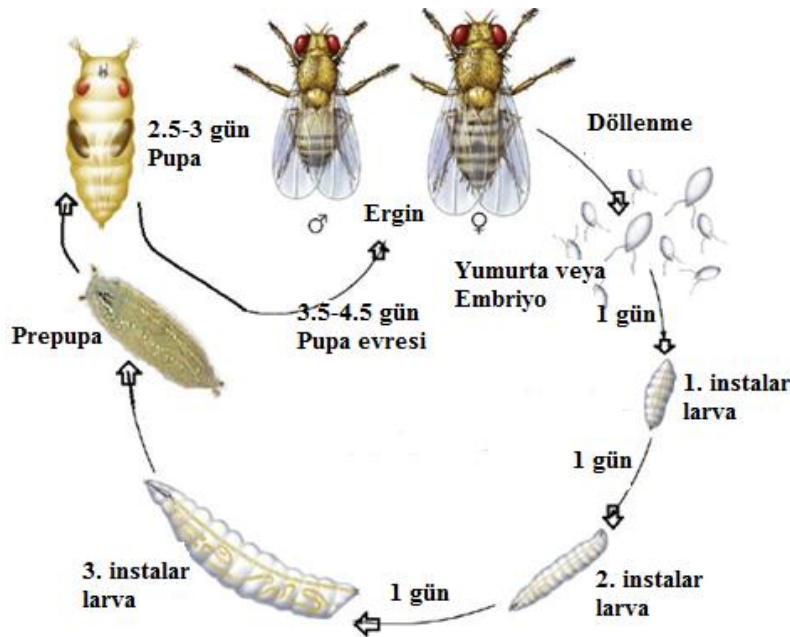
Tablo 1. 5: *Drosophila melanogaster*'in Sistematik Yeri.

Üst alem:	Ökaryotlar
Alem (Regnum):	Hayvanlar alemi (Animalia)
Şube (Phylum):	Eklem bacaklılar (Antrhopada)
Alt şube (Subphylum):	Mandibulata-Antennata
Sınıf (Classis):	Böcekler-Altı bacaklılar (Insecta- Hexapoda)
Alt sınıf (Subclassis):	Kanatlı böcekler (Pterygota)
Üst takım (Suordero):	Uzun kanatlılar (Mecopteroidea-Panorpoidea)
Takım (Ordo):	İki kanatlılar (Diptera)
Alt takım (Subordo):	Sinekler-Kısa antenliler (Brachycera)
Familya (Familia):	Sirke sinekleri-Meyve sinekleri (Drosophilidae)
Cins (Genus):	<i>Drosophila</i>
Tür (Species):	<i>Drosophila melanogaster</i>

1.6.2 *Drosophila Melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

D. melanogaster holometabolous bir böcektir yani ergin evreden önce larva ve pupa evrelerinden geçmektedir. Ergin bir sinek 10 haftadan fazla yaşayabilir. Bu süre zarfında çiftleşme gerçekleşir. Dişilerde döllenme içseldir. Sperm, dişi sineklerin vücudunda spermi kabul ettikleri odalarda ve ikili (paired) sperm keselerinde saklanır. Dişi sinekler oluştuktan sonraki dördüncü ve yedinci gün arasında yumurta üretiminin en yoğun olduğu noktaya ulaşırlar (Tyler, 2000).

Fertilizasyon ve zigot oluşumunu takip eden embriyonik gelişim, yumurta zarında meydana gelmektedir. Yumurta bir süre beslenir, büyür ve daha sonra larva üretilir. Yaklaşık 4 gün sonra pupaya dönüşmektedir. Pupadan ergin sineklere gelişimini sırasıyla tamamlamaktadır. Bu evrelerin süreleri sıcaklığa göre değişmektedir. Şekil 1.6'da gösterildiği gibi *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü gösterilmiştir. 20°C sıcaklıkta yumurta-larva periyodunun ortalama uzunluğu 8 gündür; 25°C'de bu periyot 5 güne düşmektedir. Pupa evresi 20°C sıcaklıkta yaklaşık 6,3 günken 25°C'de yaklaşık 4,2 gündür. Bu nedenle 25°C sıcaklıkta hayat döngülerini 10 günde tamamlayabilmektedirler ama 20°C sıcaklıkta 15 günü bulmaktadır. *D. melanogaster* kültürlerinin sıcaklığı ise 20°C veya 25°C'nin üzerindeki oda sıcaklığında olmalıdır (Parvathi, 2009).



Şekil 1. 6: *Drosophila melanogaster* yaşam döngüsü (Perveen, 2018).

1.6.2.1 Yumurta Evresi

D. melanogaster yumurtalarının boyu 0,5 mm uzunluğundadır. Yumurtaları oval şekilli ve koriyon ile kaplıdır. Anterodorsal yüzeyde uzanan bir çift filament, yumurtanın bırakıldığı yumuşak zemine batmasını engeller ve oksijen alımını sağlar. Beyaz renkli olan yumurtalar çıplak gözle görülebilir. Yaklaşık bir gün sonra yumurtadan larva oluşumu gerçekleşir (Olgun ve Yurtsever, 2003; Parvathi vd. , 2009).

1.6.2.2 Larva Evresi

Solucan gibi görünen larvalar yumurtadan çıktıktan sonra besiyeri içerisinde beslenerek gelişir ve kanallar açarlar. Larva bu evrede iki kez kütikula tabakasını atarak yenisiyle değiştirir. Bu olaya gömlek değiştirme denir. Larva bu periyodu üç evrede tamamlar ve buna instar evre denir.

1. Birincil Larval Evre/İnstar (L1): Yumurtadan çıkma ve ilk deri değiştirme (22-24 saat)
2. İkinci Larval Evre/ İnstar (L2): İkinci kez deri değiştirme (25 saat)
3. Üçüncü Larval Evre/ İnstar (L3): Pupa oluncaya kadar süren aşama (2 gün)

1.6.2.3 Pupa Evresi

Üçüncü instar evre sonunda larva bulunduğu kabın içerisinde kuru bir yeri seçerek tırmanır. Pupa ilk aşamalarında sarımsı ve beyaz renktedir ve bu renk gelişmeye devam ettikçe giderek koyulaşır. Pupa evresinde larva, imago (ergin böcek) olarak adlandırılan ergin sineğe dönüşümü gerçekleşir. Başkalaşım gerçekleşirken bazı larval organlar korunmasına rağmen larva yapılarının çoğu lizize uğrar (Tyler, 2000). Sarı-kahverengi bir renk alarak tırmandığı alanda pupalaşır. Pupa sabittir. Kılıfın içerisinde ergin bir sinek olana kadar gelişimini sürdürür. Kanat, göz, ayaklar kolaylıkla fark edilir. Pupa evresi 25°C'de 4 gün sürer. Bu evreden sonra pupalardan ergin sinekler oluşur (Olgun ve Yurtsever, 2003).

1.6.2.4 Ergin

Metamorfozunu tamamlayan sinekler pupa kılıfının anteriorunu delerek çıkar. Ergin sinekler ilk başta açık renklidir, yumuşaktır ve kanatları henüz açılmamıştır. Birkaç saat içerisinde

kararırlar ve ergin sinek görünümünü alırlar. Böylelikle aynı kültür içerisinde bulunan yaşlı sinekler ile ilk oluşan sinekleri ayırt etmek mümkündür. Ergin bireyler 25°C'de 40-60 gün yaşayabilirler. Dişi sinekler pupadan çıktıktan sonra yaklaşık 10 ila 12 saat çiftleşmezler. Çiftleşen dişiler sperm kabul keselerinde önemli miktarda spermi saklar ve yumurtlarını döller. Bu nedenle kontrollü bir çiftleşme sağlamak için daha önce çiftleşmemiş dişilerin kullanılması gerekir. Ergin bir sineğin vücudu baş, toraks ve abdomen olmak üzere üç bölgeden oluşur (Olgun ve Yurtsever, 2003; Parvathi vd. , 2009).

D. melanogaster'de dişi ve erkek sinekler arasında birtakım farklılıklar vardır. Şekil 1. 7'de belirtildiği gibi bu farklılıkları stereo mikroskop altında fiziksel görünüşlerine bakarak gözlemleyebiliriz.



Dişi

Erkek

Şekil 1. 7: Ergin dişi ve erkek *Drosophila melanogaster* (Bartın üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı).

Dişi bireyler genellikle erkek bireylerden daha büyüktür. Dişi sineklerin abdomenleri daha uzundur. Erkeklerin abdomenleri kısa ve yuvarlaktır. Dişi sineklerde abdomen, açık ve koyu renkte bantlar halinde uç kısma kadar giderken; erkeklerde son birkaç bant kaynaşarak, yoğun pigment birikiminden dolayı siyah görünür. Dişiler 7 abdomen segmentine sahipken erkek bireyler 5 abdomen segmentine sahiptir. Erkek bireylerin birinci çift bacaklarının tarsus segmenti (ayak bileği) üzerinde 10 adet kısa kalın kıldan oluşan eşey tarağı adı verilen bir yapı vardır. Eşey tarağı dişilerde yoktur (Parvathi vd. , 2009).

1.7 Tek Hücreli Jel Elektroforezi (SCGE/COMET)

Tek hücreli jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) ya da "Comet Assay" yönteminin temel prensibi hücrede meydana gelen çeşitli kimyasal ve fiziksel nedenlerin oluşturduğu genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini tespit etmek ve hücrelerin DNA'larında oluşan etkileri incelemektir (Dikilitaş ve Kocyiğit, 2010). Memeli DNA kırıklarını ölçmek, sonuçlarını analiz etmek amacıyla kullanılan hızlı, basit, görsel ve hassas bir tekniktir (McKelvey-Martin vd. , 1993). SCGE yönteminin kullanıldığı alanlar oldukça fazladır. Yöntem, DNA hasarının ve onarımının araştırılması, insan biyoizleme ve moleküler epidemiyolojisi, genetik bozuklukların teşhisi, genotoksinlerin çevresel kontaminasyonlarının izlenmesi ve yeni kimyasalların genotoksik açıdan değerlendirilmesinde kullanılır (Collins, 2004).

Tek hücreli jel elektroforezi fikri ilk olarak 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından ortaya atılmıştır (Rydber ve Johanson, 1978). Hücreler lam (slyt) üzerindeki agaroz jel içine gömülmüştür. DNA'nın kısmen çözülmesini sağlamak amacıyla hafif alkali şartlar altında liziz edilmiş ve membranların parçalanması, proteinlerin ayrılması amaçlandırılmıştır. Slaytlar nötralize edildikten sonra analiz yapılması için DNA'lar akridin turuncusu boya kullanılarak boyanmıştır. Tek sarmal DNA kırıklarının da kırmızı floresan (ışırma), çift sarmal DNA kırıklarında yeşil floresan oranına bakılarak DNA hasar oranı Fairbairn ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile belirlenmiştir (Fairbairn vd. , 1995).

Ostling ve Johanson (1984) tarafından nötral tekniğı geliştirerek mikrojel elektroferez yöntemi bulunmuştur. Hücreler, lam üzerinde bulunan agaroz jel içine gömülerek tuz ve deterjanın içersinde bulunduğu liziz çözeltisinde bekletilerek membranların parçalanması sağlanmıştır. Nötr koşullar altında elektroferez işleminin yapılmıştır ve DNA'ların katottan anoda doğru hareketi gerçekleştirilmiştir. Elektroferez sonrası ise çift iplikli DNA kırıkları ortaya çıkmıştır (Ostling ve Johanson, 1984).

Singh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada nötral teknik değıştirilerek alkali koşullar altında yapılmaya başlanmıştır. Alkali koşullarda (pH>13) tek sarmal DNA kırıkları ortaya çıkmıştır. Yöntemin eskiden bulunan tekniklere göre daha hassas ve duyarlıdır. (Singh vd. , 1988; Smolka vd. , 2004). Günümüzde kullanılan "SCGE" tekniğı Singh ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift iplik kırıklarının tamamının taranmasına olanak

sağlayan yöntemdir. Son yıllarda "SCGE" tekniği ile FISH (fluoresan in situ hibridizasyon) tekniği ile birleştirilmiştir (Dinçer ve Kankaya, 2010).

Comet analizi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç hareketine dayanmaktadır (Piperakis, 2009).

Tek hücreli jel elektroforezi tekniğinin avantajları; (Piperakis, 2009).

1. Hücre hatlarında uygulanabilir.
2. Birçok prokaryotik ve ökaryotik hücrede uygulanabilir.
3. Tek hücre seviyesinde hasarı belirlemektedir.
4. Son derece hassas bir yöntemdir (50–15. 000 mola / hücre).
5. Sonuçlar aynı günde elde edilir.
6. Hızlı, basit ve ucuzdur.
7. Noninvaziv (cerrahi işlem gerektirmeyen) tekniktir.
8. Taze veya donmuş doku örnekleri tercih edilir.
9. Örnek boyutu çok küçüktür (10,000 ila 50. 000 hücre arasında) (Piperakis, 2009).

1.7.1 Comet Analizi Türleri

1.7.1.1 Nötr Comet Analizi

Nötr comet analiz yönteminde, elektroforez pH 7–8'de nötr koşullar altında gerçekleştirilir. Tek iplikli kırılmalardan etkilenmeden çift sarmallı kırılmaların tespit edilmesini kolaylaştırmak için geliştirilmiş bir yöntemdir (Matsuyama vd. , 2009).

Agaroz jelde bulunan hücreler de oluşan hasarın tespitinde kullanılan bu yöntemle çift iplikli DNA parçasının hareketleri incelenir (Matsuyama vd. , 2009; Collins, 2004).

1.7.1.2 Alkali Comet Analizi

Alkali comet analiz yönteminde, pH>13 veya daha yüksek sıcaklıklarda güçlü alkali koşullar altında elektroforez uygulayarak, tek ve çift iplikli DNA bölünme yerleri, alkali-kararsız bölgeler, eksizyon onarım alanları ve çapraz bağlama bölgeleri dahil çeşitli DNA hasarlarını

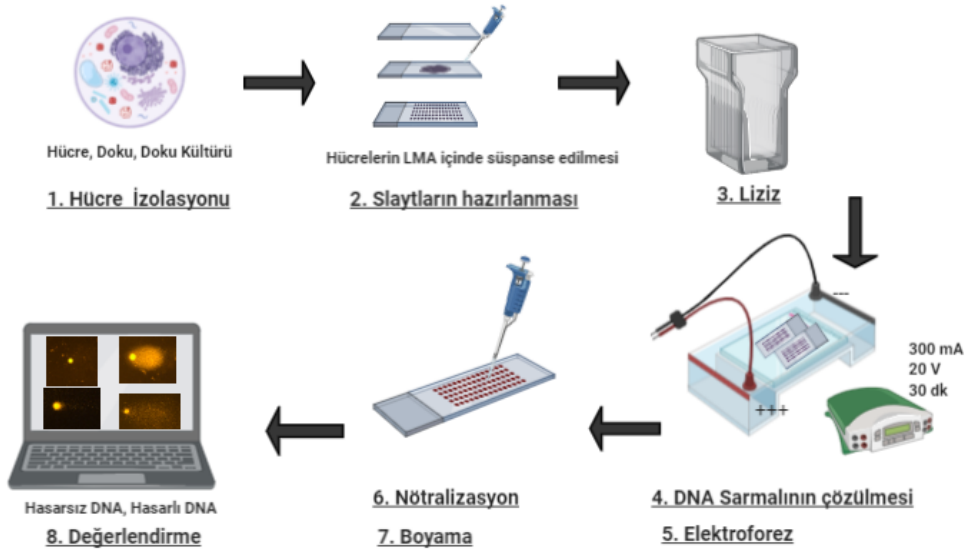
tespit etmek mümkündür (Matsuyama vd. , 2009).

Tablo 1. 6: Comet analizi türleri (Güner vd. , 2013).

Comet Tipi	Açıklama	Avantaj
Nötr Comet Analizi	Liziz ve elektroforez işlemleri pH 9. 5 az ortamda yapılır. DNA daha az belirgin bir kuyruk oluşturur. Alkali comet assay göre daha az duyarlı bir yöntemdir.	Daha az hassasiyet gerektiren durumlarda yararlıdır. Örneğin yoğun kirliliğin olduğu ya da arka planda farklı etkilerin bulunduğu çalışmalarda kullanılır.
Alkali Comet Analizi	Liziz işlemi daha yoğun bir şekilde uygulanır. Elektroforez alkali ortam koşullarında yapılır. pH>13, daha duyarlı bir yöntemdir.	Nötr comet assay metoduna göre daha net bir kuyruklu yıldız görüntüleri elde edilmektedir. Bir araştırmada kullanılan yaygın bir yöntemdir.

1.7.2 Tek Hücreli Jel Elektroforezi Basamakları

SCGE yönteminde yapılan işlemler laboratuvar şartlarına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Fakat teknik temel olarak 8 basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklar Şekil 1.8'de gösterildiği gibi hücre izolasyonu, slaytların hazırlanması, lizis, DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, boyama ve değerlendirmeden oluşmaktadır (Tice vd. , 2000).



Şekil 1. 8: Comet analiz basamakları (Fidan, 2010).

1.7.2.1 SCGE Yönteminde Hücrelerin Hazırlanması

Deneyisel çalışmada kullanılan hücresel materyalinin hazırlanması çalışmanın amacına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kullanılan materyal deneysel amaca uygun olarak çeşitli yöntemlerin uygulanmasıyla elde edilebilir.

SCGE yönteminde insan, hayvan, bitki hücreleri, kültüre edilmiş hücreler, tam kan örnekleri, kemik iliği, doku örnekleri ve sperm hücrelerinin materyal olarak kullanıldığı gözlenmiştir (Fairbairn vd. , 1995; Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.7.2.2 Slaytların Hazırlanması

Hücrelerin agaroz jele tutunmasını sağlamak için deneyden bir gün önce normal erime noktalı agaroz jel slaytlara baştan sona yayılarak ön kaplama işlemi yapılır. Slaytların kuruması için en az bir gün bekletilir. Deneyin yapılacağı gün ise düşük erime noktalı agaroz jel içinde hücreler karıştırılır. Bir gece önceden hazırlanan slaytların üzerine yayılır. Böylece iki jel tabakası arasında sandviç benzeri yapılar oluşturulur (Dinçer ve Kankaya, 2010).

Slaytları hazırlamada en önemli unsur uygulanan işlemler boyunca jelin bozulmadan kalabilmesini sağlamak ve mikroskop ile analizinde temiz, net bir görüntünün elde edilmesidir. Agaroz jelin konsantrasyonu ve jel içindeki hücrelerin konsantrasyonları iyi sonuçların ortaya çıkarılmasında çok önemlidir. Yüksek hücre yoğunluklarında özellikle DNA göçünün hızlı olduğu preparatlarda cometlerin üst üste gelmesine sebep olur. Yüksek agaroz konsantrasyonu ise DNA göç hızını ve diğer işlem basamaklarını etkilediği sonucuna varılmıştır (Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.7.2.3 Lizis

Slaytlar, agaroz jel donduktan sonra lizis çözeltisi (yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içerir) içerisinde bir saat boyunca bekletilir. Lizis işlemi sırasında membranlar parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaşarak serbest kalır. DNA, nonhiston proteinlerle birlikte yüksek süperkoil yapısında kalır (Tice, 2000; Dinçer ve Kankaya, 2010). Bu işlemden sonra DNA hasarının en az şekilde olması için geri kalan tüm adımların karanlık ortamda yapıldığı vurgulanmıştır (Vandghanooni ve Eskandani, 2011).

1.7.2.4 Alkali Ortamda DNA Sarmalının Çözülmesi

DNA çift sarmal yapısının açılması için hazırlanan slaytlar elektroforez işleminden önce yüksek alkali özellikte olan ($\text{pH} > 13$) elektroforez tamponu içerisinde inkübasyona bırakılır. Bu aşamada elektroforez tamponu içerisinde bulunan slaytlarda çift sarmal DNA ve zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar (Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.7.2.5 Elektroforez

DNA superkoil yapısının açılmasından sonra, alkali ortamda elektroforez işlemi uygulanarak comet oluşumu sağlanır. Elektrik akımı uygulandığı zaman DNA zincir kırıkları katotdan anoda doğru hareket eder ve kuyruklu yıldız görüntüsü verir. Hasarsız DNA ise çekirdekten çıkamaz ve kuyruk benzeri bir yapı oluşturmaz (Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.7.2.6 Nötralizasyon

Elektroforezden sonra jelin pH'sının nötralizasyonu için slaytlar bir tamponla ($\text{pH} 7,5$) üç defa yıkanır. Slaytların tekrarlı olarak yıkanması daha sonraki skorlama işleminde yararlı olabilir. Nötralizasyon sonrası slaytlar boyanarak cometler sayılabilir veya jeller kurutularak daha sonra incelemek üzere saklanabilir (Tice, 2000; Dinçer ve Kankaya, 2010).

1.7.2.7 Boyama

Cometin görüntülenmesi için kullanılan DNA spesifik boyalar ve mikroskopta seçilen uygun büyütme, uygulayıcının spesifik ihtiyaçlarına bağlıdır. Bu aşamada en çok tercih edilen bağlayıcı boyalar; DAPI, SYBR, etidyum bromürdür (Dinçer ve Kankaya, 2010; Azqueta, 2011).

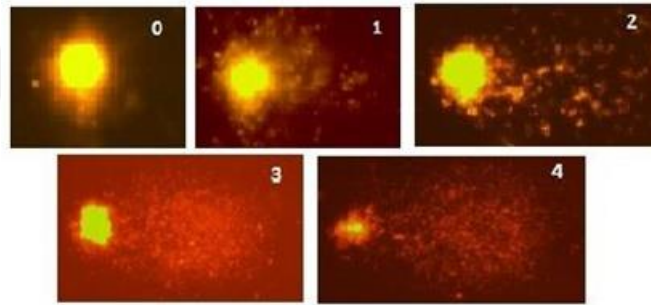
1.7.2.8 Değerlendirme

Ethidium bromür (EtBr) ile boyanan slaytlardan floresan mikroskop ile analiz edilerek DNA görüntüleri değerlendirilir. SCGE yönteminde sonuçların analizi için birçok değişik yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan parametrelerde ise en yaygın olanları kuyruklu hücrelerin yüzdesi, kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentidir. Teknolojik

imkanları sınırlı olan laboratuvarlarda hasarlı hücreler görsel sayma yöntemiyle değerlendirilmektedir (Fidan, 2010).

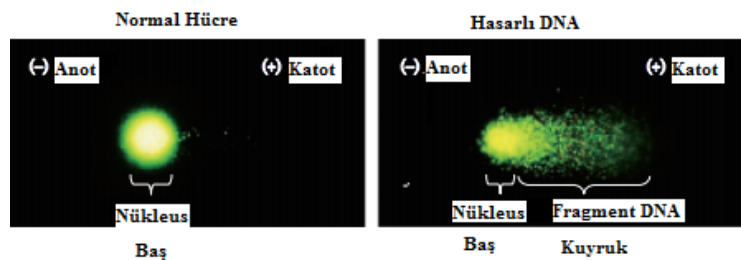
Hasarsız hücreler yuvarlak, kenarları daha az olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü vardır. Eğer DNA'da hasar oluşmaya başlamış ise göç uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırıklarına bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden DNA kırıklarının çekirdek dışına göçü nedeniyle düzensiz bir görünüm alır. Hasarın şiddetine göre DNA'nın baş kısmından kenara doğru uzama meydana gelmekte olup hasarın derecesi arttıkça hücreler kuyruklu yıldız şeklini alır (Fidan, 2010).

Hasarın derecesine göre DNA görüntüleri 0 ile 4 arasında sınıflandırılır. Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1 ile 4 arasında puan verilir ve sonuçlar değerlendirilir (Collins, 2004). Şekil 1.10'da gösterildiği gibi hasarlı ve hasarsız DNA'ların puanlandırılması verilmiştir.



Şekil 1. 9: Comet analiz jel görüntüsü (Zemheri-Navruz, 2019).

Bilgisayar sistemine sahip görüntü analiz sistemi ile hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreler belirlenecek şekilde tasarlanmıştır (Fairbain, 1995).



Şekil 1. 10: Cometin uç noktaları, % Kuyruk DNA=göç etmiş DNA'nın oranı ve Kuyruktaki DNA yüzdesi (Matsuyama vd. , 2009).

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETİ

EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) tarafından (2009) TRF'nin genotoksik etkileri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla araştırmıştır. TRF'nin zayıf klastojenik (kromozom yapısını değiştirebilen) ve aneujenik (kromozom sayısını değiştirebilen) etkileri indüklediği gözlemlenmiş fakat mikronükleus testinde sonucun doğruluğu kanıtlanamamıştır. TRF'nin ratlarda neoplastik değişiklikler ve karsinojenik etkiler oluşturduğu sonucuna varılmıştır (EFSA, 2009).

Kaya ve arkadaşları (2004) bentazon, molinat, tiobenkarb, trifluralinin mutajenik ve rekombinejanik etkilerini çalışmıştır. *D. melanogaster* üzerinde TRF'nin de içinde olduğu 4 farklı herbisit (bentazon, molinat, tiobenkarb, trifluralin) SMART testi ile genotoksik olduğu bildirilmiştir (Kaya vd., 2004).

TRF'nin farelerin kemik iliği ve insan kan hücrelerinde de genotoksik olduğu bulunmuştur (Bolognesi, 2003).

Kale ve arkadaşlarının (1995) *Drosophila* üzerinde yaptıkları çalışmada TRF'nin güçlü bir mutajen olduğu gözlenmiştir (Kale vd., 1995).

Pilinskaia (1987), TRF'nin genotoksik etkisini kromozom aberasyon tekniğini kullanılarak insan lenfosit ve fare kemik iliği hücrelerinde araştırmıştır ve genetik tehlike içeren miktardan fazla kullanımının düzenlenmesi gerektiği sonucuna ulaşmıştır (Pilinskai, 1987).

Könen ve Çavaş'ın (2008) yaptıkları bir çalışmada TRF'nin ticari formu Treflan'ın ekonomik öneme sahip bir balık türü olan *Oreochromis niloticus* üzerindeki genotoksik etkileri mikronükleus testi ve morfolojik nükleus düzensizlik analizini kullanarak araştırmış ve askorbik asit'in TRF ve Treflan ile oluşturulan genotoksiste üzerinde indirgeyici etkiye sahip olduğu bulmuştur (Könen ve Çavaş, 2008).

Nehez ve arkadaşları (1980) %26'lık TRF içeren Olitref herbisitinin farenin üreme hücrelerinde mutajenik etkilerini araştırmıştır. TRF'nin fare üreme hücrelerinde mutajen olduğunu göstermiştir (Nehez vd., 1980).

Sarıgöl-Kılıç ve Ündeğer-Bucurgat (2018) Pendimethalin ve TRF'nin yani karsinojenik potansiyel sınıfa ait yaygın olarak kullanılan dinitroanilin herbisitlerinin A549 hücre hattında apoptotik, anti-apoptotik potansiyelleri ve genotoksik etkileri üzerinde çalışmalar yapmıştır. TRF ve 100 µM pentimethalin maddelerine 24 saat maruz kalmak apoptozu baskılamış, kanser hücrelerinin büyümesine sebep olmuş ve gen ifadesini değiştirmiştir. İnsanlar üzerindeki etkilerinin azaltılması için besinlerde kullanılan miktarın üzerine çıkılmaması ve kalıntı sınırlarının üzerinde olmamasına dikkat edilmesi gerektiğini çalışmalarında ifade etmişlerdir (Sarıgöl Kılıç ve Ündeğer Bucurgat, 2018).

TRF ve tebuthiuron herbisitlerinin rat karaciğer mitokondrisinin üzerindeki etkileri araştırılmıştır. TRF'nin yüksek konsantrasyonda mitokondriyal solunumu etkileyebildiği ancak oksidatif strese neden olmadığı De Oliveira ve arkadaşları (2020) tarafından gösterilmiştir (De Oliveira vd., 2020).

Stanic (2007) tarafından *Aloe vera*'nın antikanserojen ve kemoprotektif etkileri, antibakteriyel ve antiviral aktivitesi, antiinflamatuvar ve immünomodülatör, antioksidan, hipoglisemik ve hipolipidemik, bağırsak emilimi üzerine etkisi yapılan çalışmalarla incelemiştir. *D. melanogaster* üzerinde *Aloe vera* jelinin antimutajenik etkisi açıklanmıştır. *D. melanogaster* etil metansülfonat (EMS) ile mutasyona uğratıldıktan sonra *Aloe vera* jeli ile muamele edilmiş ve genotoksisiteyi azalttığı gözlenmiştir (Stanic, 2007).

Chandrashekara ve Shakarad (2011) *D. melanogaster*'e resveratrol ve *Aloe vera* uygulanmış ve sineklerin ömür uzunluklarının arttığını bulmuştur (Chandrashekara ve Shakarad, 2011).

Hu ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada; iki ile dört yaş arasındaki *Aloe vera* bitkilerinin içerdiği bileşiklerden polisakkaritlerin ve flavonoidlerin, üç ve dört yaşındaki bitkilere göre daha yüksek seviyede bulduklarını tespit etmiş ve tüm *Aloe vera* ekstrelerinin önemli antioksidan aktivite gösterdiği belirlemiştir (Hu vd., 2003).

Saçan ve arkadaşları (2017) *Aloe vera* yaprak ekstraktı bazı enzim aktivitesi ve antioksidan

etkisi üzerine *in vitro* inhibe edici etkisini araştırmış ve *Aloe vera* ekstraktının doğal bir antioksidan kaynağı olduğu ortaya çıkarmıştır (Saçan vd., 2017).

Oluwatoyin Ayoola ve Ishola (2020), *Aloe vera*'nın *Oreochromis niloticus* üzerinde büyüme performansı ve genotoksik etkileri konusunda çalışmıştır. Farklı miktarlarda *Aloe vera* diyeti *Oreochromis niloticus*'lerin bulunduğu tank sistemine verilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlardaki besin ise 12 hafta boyunca vücut ağırlığının %5'i olarak ayarlanarak, 8 saat ile 16 saat uygulanmış ve gelişimleri takip edilmiştir. Böylelikle *Oreochromis niloticus* diyetine az miktarda *Aloe vera* eklenmesi ile *Oreochromis niloticus* retkenliğinin kontrol grubuna göre arttırdığı gözlenmiştir (Oluwatoyin Ayoola ve Ishola, 2020).

Kumar-Gupta ve arkadaşları (2020) Wistar ratlarında cartap (pestisit)ve malathion aracılı toksisitesi zerine *Aloe vera*'nın anti-enflamatuar ve antioksidatif potansiyalini incelemiştir. Bu araştırmaya göre *Aloe vera* bazlı ilaçların pestisit toksisitesine karşı etkisinin değerlendirilmediği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle de hedef olmayan hayvanların pestisit toksisitenin etkisine karşı koruma amaçlı *Aloe vera* bazlı deney tasarlamışlardır. Deneyin sonucunda *Aloe vera* yapraklarının sulu ekstraktının, cartap ve malathion toksisitesine karşı iyileştirici etkisinin gözlemlendiği görülmüştür (Kumar-Gupta vd., 2020).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Model Organizma

TRF'nin olası kötü etkilerine karşı *Aloe vera*'nın koruyucu etkisini belirlemek amacıyla yapılan toksikoloji çalışmamızda *D. Melanogaster* model organizması kullanılmıştır.

D. melanogaster kültürleri, laboratuvar koşullarında $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sabit sıcaklığa ayarlı havalandırmalı etüvde yetiştirilmiştir (Şekil 3. 1a). Kültür kaplarının büyüklüğü deneyin amacına göre seçilmiştir. Kültür kabının renksiz camdan olması, sineklerin gelişimlerinin kolay izlenebilmesi sebebiyle tercih edilmiştir (Şekil 3. b).



Şekil 3. 1: a) *D. melanogaster* kültürlerinin $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de etüvde yetiştirilmesi. b) *D. melanogaster*'lerin yetiştirildiği cam şişeler.

TRF ve *Aloe vera*'nın ömür uzunluğu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun

yıllardan beri kullanılan genetik olarak homozigot, mutant karakter taşımayan ve laboratuvar stoğu olan *D. melanogaster*'in Oregon-R yabancı soyu kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda olası etkilerini araştırdığımız trifluralin (2,6-Dinitro-*N,N*-dipropyl-4-trifluoromethylaniline, Cas No: 1582-09-8, Santa Cruz, USA) temin edilmiştir. *Aloe vera* ekstraktı eldesi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Ömür uzunluğu deneyinde agar agar (Sigma Aldric, USA), dietil eter (IsoLab, Germany), propiyonik asit (Merck, Germany), ortofosforik asit (Merck, Germany), ksilen (Sigma Aldric, USA) maddeleri kullanılmıştır.

Comet analizi deneyinde sodyum klorid (IsoLab, Germany), phosphate buffered saline (Multicell), etilendiamin tetraasetik asit (Sigma Aldric, Germany), sodyum hidroksit (IsoLab, Germany), trizma base (Sigma Aldric, USA), low melting agaroz (BioShop Canada Inc.), normal erime noktalı agaroz (Peqlab), triton-X (Sigma Aldric, USA), dimetil sülfoksit (Merck, Germany), etidyumbromür (Molekula) kimyasalları kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Devam eden deneysel çalışmalarda Tablo 3. 1'de markaları ile birlikte belirtilmiş olan çeşitli alet, cihaz ve laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

Tablo 3. 1: Kullanılan alet ve cihazlar.

Cihaz/Malzemeler	Markası
Otomatik pipet	Thermo Scientific
Floraslan Mikroskop	Zeiss
Saf su cihazı	Thermo Scientific Smart2Pure 6 UV
Otoklav	Nüve StreamArt
pH metre	HANNA InstrumentsHI 2211
Mikrodalga fırın	LG
Kuru hava sterilizatörü	Protect
İnkübatör	N-Biotek
No-frost buzdolabı	Bosch
Yarı analitik terazi	Kern PFB 300-3
Hassas terazi	Shimadzu AUW220D
Manyetik karıştırıcı	Dragonlab MSH-Pro
Besiyeri ve preparat hazırlamak için kullanılan laboratuvar malzemeleri	Cam şişe, baget, erlenmayer, beher, petri kabı, pamuk, jilet, kurutma kağıdı, lam, lamel

3.2 Metot

3.2.1 Besiyeri Ortamının ve İçeriğinin Hazırlanması

Laboratuvar stok kültürleri Standart *Drosophila* Besiyeri'nde (SDB) tutulmaktadır. Standart *Drosophila* Besiyeri hazırlamak için kullanılan malzemeler Tablo 3. 2 ve Tablo 3. 3'de verilmiştir. SDB hazırlanırken öncelikle mısır unu, toz şeker, maya ve agar tartıldı. Tartılan malzemeler behere döküldü ve üzerine 255 mL distile su ilave edildi ve cam baget ile iyice karıştırıldı. Hazırlanan karışım manyetik ısıtıcı üzerinde kaynayana ve kıvam alana kadar beklenildi. Besiyeri biraz soğumaya bırakıldı ve daha sonra içerisine küf oluşumunu engelleyecek olan asit karışımı ilave edildi. Hazırlanan SDB, sıcakken steril kültür şişelerine

döküldü. Kültür şişelerinin üzerine temiz kurutma kağıtları kapatılarak bir gün oda sıcaklığında soğumaları ve donmaları için bekletildi. Bir gün sonra katılaştıran besiyerleri hazırlanmış oldu (Eroğlu Doğan, 2008).

Tablo 3. 2: Standart besiyeri içeriği (Eroğlu Doğan, 2008).

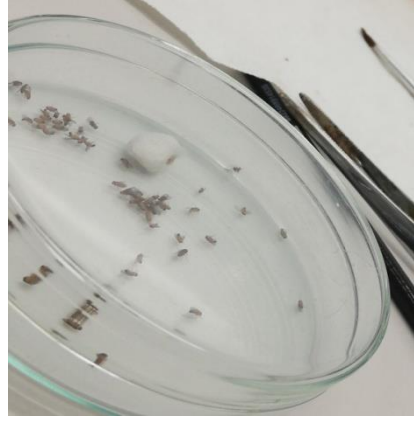
	Kullanılan Madde	Miktarı
Standart Besiyeri İçeriği	Mısır unu	26 g
	Şeker	23,5 g
	Agar Agar (Sigma, USA)	1,50 g
	Maya	1,75 g
	Distile su	255 mL
	Asit karışımı	1,5 mL

Tablo 3. 3: Asit karışımı içeriği (Eroğlu Doğan, 2008).

	Kullanılan Madde	Miktarı
Asit Karışımı	Ortofosforik asit	120 µL
	Propiyonik asit	1250 µL
	Distile su	130 µL

3.2.2 Eterizasyon (Bayıltma) Yöntemi

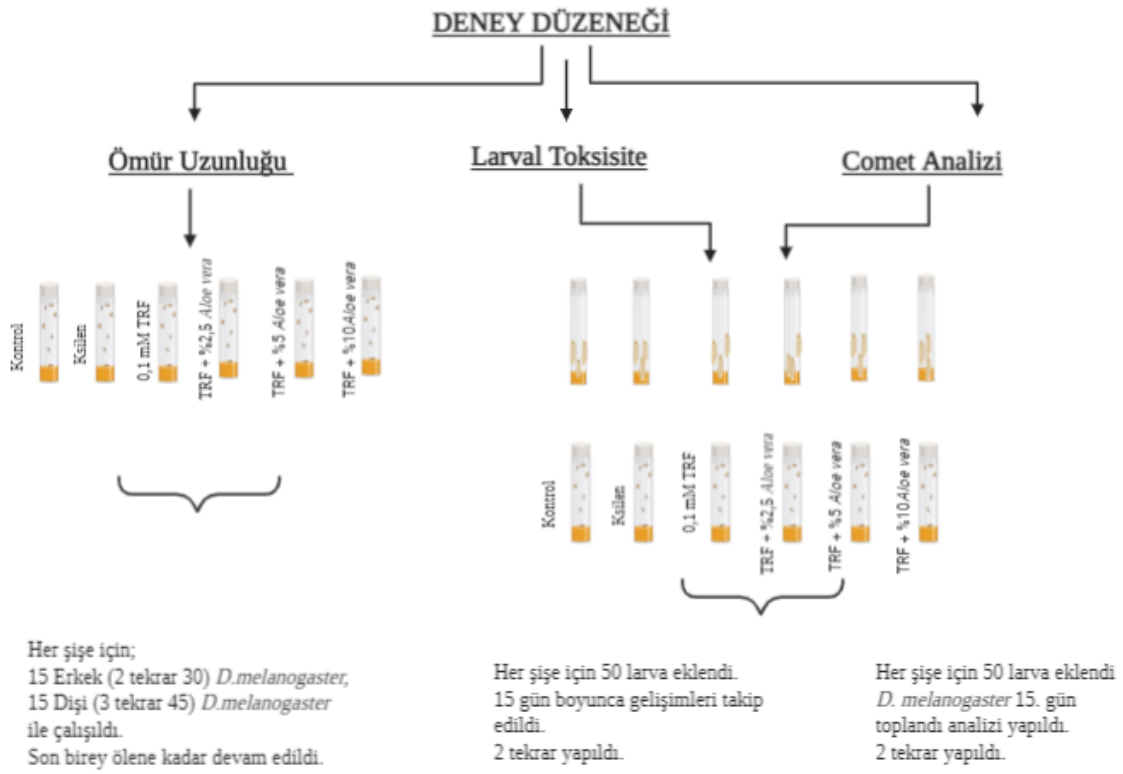
*D.melanogaster'*e ait ergin bireyler kemotropik (kimyasal maddelere/kokuya), pozitif fototropik (ışığa doğru) ve negatif geotropik (yerçekinin tersine) yönelim gösterdikleri için dietil eter kullanılarak bayıltma işlemi gerçekleştirildi. *D. melanogaster'*lerin huni yardımıyla temiz bir boş şişeye aktarımı sağlandı. Küçük bir parça pamuk etere batırıldı ve *D.melanogaster'*lerin olduğu şişeye yerleştirildi. Şişede bulunan sineklerin bu şekilde kısa süre içinde bayılma işlemi gerçekleşti (Şekil 3.2). Eterizasyon işlemi, stok kültürlerin yenilenmesi ve uygulama gruplarının oluşturulmasında kullanılmaktadır. Fakat sinekler uzun süre etere maruz bırakılmamalıdır (Eroğlu Doğan, 2008).



Şekil 3. 2: Eterizasyon işlemi.

3.2.3 Deney Düzenegi

Çalışmamızda yapılan deneyler Şekil 3.3'de ve deney grupları Tablo 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 3: Çalışma boyunca kullanılacak deney düzenegi.

Tablo 3. 4: Deney Grupları

Deney Grupları	
Grup 1	Kontrol (Negatif kontrol grubu)
Grup 2	Ksilen (Pozitif kontrol grubu)
Grup 3	0,1 mM TRF
Grup 4	TRF+ %2,5 <i>Aloe vera</i>
Grup 5	TRF+ %5 <i>Aloe vera</i>
Grup 6	TRF+ %10 <i>Aloe vera</i>

3.2.4 Ömür Uzunluğu Deneyi için Ön Kültürlerin Oluşturulması ve Ergin Bireylerin Toplanması

Ömür uzunluğu deneyinde *D. melanogaster*'in Oregon-R- yabancı soy hattına ait dişi ve erkek bireyler kullanıldı. Bu bireyler arasındaki çaprazlamalar için SDB hazırlandı. Kültür şişelerine dökülen SDB içerisine dişi ve erkek bireyler konularak çaprazlamalar başlatıldı. Hayat döngüsünü tamamlayan aynı yaşlı sinekler dişi ve erkek olarak ayrı ayrı toplandı. Her grup için 15 adet dişi ve erkek sinek toplanarak SDB içerisinde ayrı ayrı tutularak etüvde muhafaza edildi (Kızılet ve Uysal, 2012).

3.2.5 Ömür Uzunluğu ve Larval Toksikite Kullanılacak Olan Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Stok solüsyonlar hazırlanmadan önce TRF'nin hangi solventte çözüleceğine karar vermek amacıyla öncelikle çözücülerin *D. melanogaster*'ler üzerindeki etkileri incelendi. Aseton, ksilen ve metanol (US EPA, 1996) içeren SDB'ne 30 adet dişi ve erkek birey eklenildi. Aseton ve metanolde ölen ergin sinek sayısı ksilene göre fazla olduğu için TRF'nin çözücüsü olarak ksilen seçildi.

Kullanılacak maddenin dozunu belirlemek amacıyla *D. melanogaster*'ler üzerinde ön deneme çalışmaları yapılmıştır (Ersöz ve Çolak, 2018). Kültür şişeleri içerisine eklenecek olan besin miktarı, şişelerin büyüklüğüne göre 50 mL olarak belirlenildi. SDB içerisinde kullanılacak TRF madde miktarları Kaya ve arkadaşlarının makalesinden yola çıkarak 0,1 mM, 0,2 mM ve 0,5 mM olarak belirlenildi (Kaya vd., 2004) ve kültür şişelerine belirlenen miktarlarda TRF ilavesi gerçekleştirildi. Her kültür şişesi için stok kültürden 30 adet eşit sayıda dişi ve erkek birey eklenildi. Her gün ölen ve yaşayan birey sayısı not edildi. Denemeler sonucunda veriler

incelenerek canlı birey sayısına göre hangi dozu seçeceğimiz tespit edildi (Ersöz ve Çolak, 2018).

TRF ve *Aloe vera* bitki ekstraktının belirlenen doz seçiminde kullanılan miktarlar makaleler araştırılarak seçilmiştir. TRF'nin doz belirlenmesinde Kaya ve arkadaşlarının (2004) makalesi referans alındı ve ortalama toksik miktarı belirlendi. *Aloe vera* bitki ekstraktının ise Chandrashekara ve Shakarad (2011) ve YanMei (2011)'nin makaleleri referans alınmıştır.

Ömür uzunluğu ve larval toksisite deneylerinde kullanılmak üzere TRF öncelikle 10 mL Ksilen'de çözdürüldü ve 0,01 M'lık stok solüsyon hazırlandı (US EPA, 1996). Deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan stok çözeltilerinin uygulama konsantrasyonları SDB'ye ilave edildi.

Çalışmamızda kullanılacak olan *Aloe vera* ekstraktını elde etmek için öncelikle *Aloe vera* yaprağının jelinden toz elde edildi. Bunun için olgun, sağlıklı ve taze *Aloe vera* yaprakları toplandı. Toplanan *Aloe vera* yaprakları taze suda yıkandı ve daha sonra enine parçalara bölünerek kalın epidermis kısmı çıkarıldı. Yaprığın ortasında bulunan katı jel kısmı steril havan içine konularak homojenize etmek için dövüldü ve bulamaç haline getirildi (Şekil 3.4a). Bulamaç haline getirilen *Aloe vera* jeli etüvde 80°C'de 48 saat boyunca kuruması ve toz halini alması için bekletildi. Kuruyan jelin havandan ayrılma işlemi gerçekleştirildi ve miktarı ölçüldü. Daha sonra %95'lik ethanol içinde 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda ethanolde bekleyen içerikler whattman filtre kağıdından geçirildi. Miktar küçük olduğu için evaporatörde kurutma tercih edilmedi. Bu yüzden süzüntü kuruyana ve toz haline gelene kadar oda sıcaklığında buharlaşması için bekletildi (Şekil 3.4b). Toz haline gelen jelin miktarı 0,8g olarak ölçüldü. *Aloe vera* yaprağı jeli ekstraktı distile suda çözülerek stok solüsyon oluşturuldu ve istenilen konsantrasyonlara getirilerek besiyerine eklendi (Saritha vd., 2010). Deneyde kullanılacak olan 0,8 g'lık *Aloe vera* jeli ekstaktından %1000 mg'lık stok solüsyon hazırlandı. Deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan stok çözeltilerinin uygulama konsantrasyonları (%2,5, %5 ve %10) SDB'ye ilave edildi (Chandrashekara ve Shakarad, 2011; YanMei, 2011)



Şekil 3. 4: a) *Aloe vera* yaprağından çıkarılan jelin bulamaç hale getirilmiş hali. b) *Aloe vera* jelden elde edilen süzöntü (Bartın üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı).

3.2.6 Ömür Uzunluğu Deneyinde Ergin Bireylere TRF ve *Aloe Vera*'nın Uygulanması

TRF ve *Aloe vera*'nın ömür uzunluğu üzerine etkisi, *D.melanogaster*'in dişi (♀♀) ve erkek (♂♂) populasyonlarında ayrı ayrı çalışıldı. Bu amaçla aynı yaşlı bireyleri elde etmek için, taze besin ortamı içeren kültür şişelerinde çaprazlamalar yapılarak ön stoklar oluşturuldu. Pupadan çıkan aynı yaşlı (1- 3 günlük) çiftleşmemiş ♀♀ ve ♂♂ sineklerden, her bir grup için ortalama 15 birey toplandı. Toplanan bireyler boş kültür şişelerine konularak uygulamadan önce 2 saat aç bırakıldı. Daha sonra, bu bireyler farklı konsantrasyonlarda TRF ve *Aloe vera* içeren kültür şişelerine (Tablo 3.4) sinekler atılarak beslendi (Şekil 3.5). Uygulama boyunca ♀♀ ve ♂♂ bireyler deney şişelerine aktarıldı ve uygun sıcaklık kabinlerinde ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) tutuldu. Deney süresince besinler haftada bir kere tazelandı. Birey sayıları her uygulama günü başlangıcında ve sonunda kontrol edildi ve ölen bireyler kaydedilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Kontrol ve uygulama gruplarının tümünde, sayımlara ve uygulamaya en son birey ölene kadar devam edildi. Deneyler en az iki kez tekrar edildi (Kızılet ve Uysal, 2012).



Şekil 3. 5: Ömür uzunluğu deneyi için ayrılan dişi ve erkek bireyler(Bartın üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı).

3.2.7 Larval toksisite

Larval toksisite testi için oluşturduğumuz deney gruplarında 3. evre larva kullanıldı. Larvalar (72 ± 4 saat) SDB içeren kültür ortamında 10 ♂♂ ve 10 ♀♀ birey çaprazlanarak elde edildi. Sineklerin çifleşmesinden sonra 4. Günde 3. Evre larvalar oluşturuldu. Her deney grubu için şişe başı 50 adet larva eklendi (Şekil 3.6). Larvaların gelişimi günlük olarak kontrol edildi. Larva döneminden pupa dönemine pupa döneminden ergen döneme geçebilen bireyler günlük olarak izlendi. Ergin bireyler stereo mikroskop altında incelenerek ve bireyler fenotipik olarak incelendi. Deney iki kez tekrar edildi (Uysal ve Semerdöken, 2011).

3.2.8 COMET Hazırlıkları

3.2.8.1 COMET İçin Ön Kültürlerin Oluşturulması ve Ergin Bireylerin Toplanması

COMET analizinde kullanılacak olan *D.melonagaster*'in 15 gün boyunca hazırlanan TRF'ye ve *Aloe vera* ekstraktına maruz bırakıldı. Hazırlanan SDB ortamına TRF ve *Aloe vera* eklenerek kültür şişelerine döküldü. Hazırlanan besiyerine 50 adet larva eklendi ve 15 gün sonunda oluşan dişi ve ergin bireyler toplanarak -80 C° 'de saklandı.

3.2.8.2 COMET Solüsyonların Hazırlanması

Comet analizine başlamadan önce solüsyonların belirlenen miktarlarda ve pH'ta hazırlanması gerekmektedir. Bunun için elektroforez (Tablo 3.5), nötralizasyon (Tablo 3.6), liziz solüsyonu (Tablo 3.7), LMA ve NMA hazırlandı.

Elektroforez solüsyonunun hazırlanması:

Tamponu hazırlamak için Tablo 3.5'te verilen değerler sırasıyla hesaplandı ve hazırlandı.

Stok 1: 10 N (200 g) NaOH ile 500 mL distile su karıştırıldı.

Stok 2: 200 mM (14,89) EDTA ile 200 mL distile su ile karıştırıldı.

1. Stok çözeltilerden 1X'lik taze buffer hazırlandı.
2. Stok 1'den 30 mL NaOH ve Stok 2 çözeltisinden 5 mL EDTA alınarak bir mezüre konuldu.

3. Üzeri 1000 mL distile su ile tamamlandı ve karıştırıldı.
4. pH metre yardımıyla pH>13 olması için HCl damlatıldı.
5. Hazırlanan solüsyon 1 litrelik bir şişeye aktarıldı ve kullanılacağı zamana kadar +4 C°'de buzdolabında saklandı.

Tablo 3. 5: Elektroforez solüsyonlarının hazırlanması.

Konsantrasyon	Kimyasal Adı	Moleküler Ağırlığı	1 Litre
0,3 M	NaOH	39,9772 g/mol	30 mL (Stok 1)
0,001 M	EDTA	292,24 g/mol	5 mL (Stok 2)

pH>13 HCl ile ayarlanmalıdır.

Nötralizasyon solüsyonunun hazırlanması:

Tamponu hazırlamak için Tablo 3.6'da verilen değerler sırasıyla hesaplandı ve hazırlandı.

1. 24,25 g Trizma baz tartılarak bir behere alındı. (500 ml'ye göre)
2. Üzerine 400 mL distile su eklendi.
3. Manyetik karıştırıcıda bir süre karıştırıldı.
4. pH metre ile pH'ın 7.5 olması için HCl damlatıldı.
5. Solüsyon 500 mL'lik bir şişeye aktarıldı ve kullanılacağı zamana kadar +4 C°'de buzdolabında saklandı.

Tablo 3. 6: Nötralizasyon solüsyonlarının hazırlanması.

Konsantrasyon	Kimyasal Adı	Moleküler Ağırlığı	500 mL
0,4 M	Trizma baz	121,14 g/mol	24,25 g

pH= 7. 5 HCl ile ayarlanır.

Liziz solüsyonunun hazırlanması:

Tamponu hazırlamak için Tablo 3.7'de verilen değerler sırasıyla hesaplandı ve hazırlandı.

1. 146 g NaCl, 1,2 g Trizma baz, 37,2 g EDTA tartımı yapılarak üzerine 800 mL distile su eklendi.
2. Manyetik karıştırıcı da bir süre karıştırıldı.

3. pH metre ile pH=10 olması için NaOH damlatıldı.
4. Hazırlanan solüsyon bir şişeye aktarıldı ve kullanılacağı zamana kadar +4 C°'de buzdolabında saklandı.
5. %1'lik Triton-X ve %10'luk DMSO her kullanımda taze olarak eklendi.

Tablo 3. 7: Liziz solüsyonlarının hazırlanması.

Konsantrasyon	Kimyasal Adı	Moleküler Ağırlığı	1 Litre
2,5 M	NaCl	58,44 g/mol	146,1 g
0,1 M	EDTA	373,24 g/mol	37,2 g
0,01 M	Trizma baz	121,14 g/mol	1,2 g

pH=10 NaOH ile ayarlanır.

Low Melting Agaroz (LMA) Hazırlanması

1. Comet analizi için gerekli olan 0,025 g LMA ve 5 mL PBS bir behere alındı.
2. Mikrodalgada kaynatılarak hazırlandı (Dhawan et al. 2009).

Normal Erime Noktalı Agaroz Hazırlanması

1. Comet analizi için gerekli olan 1 g NMA ve 100 mL PBS bir behere alındı.
2. Mikrodalgada kaynatılarak hazırlandı.
(Dahawan et al. 2009).

3.2.8.3 COMET Analizinin *Drosophila melanogaster*'e Uygulanma Aşamaları

Çalışmamızda 15 gün boyunca TRF ve *Aloe vera* ekstraktı uygulanan sineklere comet analizi yapıldı.

1. Comet analizi için düşük erime sıcaklığına sahip %0,5'lik agaroz (LMA) mikrodalgada eritildi ve donmaması için 40°C'lik ısıtıcıda bekletildi.
2. Normal erime noktasına sahip %1'lik agaroz (NMA) hazırlandı ve lamlar kaplandı.
3. Sinek örnekleri (80 µl ~3 adet)100 µl HBSS (20 mM EDTA ve 10% DMSO içerir) Solusyonunda parçalanarak, %0,5'lik LMA'dan 100 µl alınarak karıştırıldı ve NMA ile kaplanmış lamın üzerine eklenerek donması beklendi. 4°C'de 5 dk beklendi

4. Hazırlanan preparatlar lizis çözeltilisinde (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris base, pH 10'a ayarlandı ve %1 Triton X-100, %10 DMSO taze eklenecek) 1 saat boyunca 4 °C'de bekletildi.
5. Preparatlar elektroforez tamponunda (10N NaOH, 200mM EDTA, pH> 13.0) 4 C° 15 dk bekletildi.
6. Alkalin elektroforez 24 V ve 300 mA 40 dakika süre ile uygulandı.
7. Preparatlar 0.4 M Tris tamponunda (pH 7.5) 5 dk nötralize edildi.
8. Daha sonra preparatlar 100 µl Red Safe (10 µl / ml) ile boyandı ve incelemek için floresan mikroskobu (Zeiss, Almanya) kullanıldı (Dhawan et al. 2009).
9. Elde edilen görüntüleri incelerken rastgele seçilmiş 100 (50–100) hücre 0 ile 4 arasındaki hasar kaydı yapıldı (0 hasarsız, 4 çok hasarlı) (Olive and Banáth 2006).

3.3 İstatistiksel Analiz

Çalışmada, dişi ve erkek ömür uzunluğu, larval toksisite ve comet analizi deneylerinden elde edilen verilerin değerlendirilmesi, DNA hasarı bulgularının değerlendirmesinde gruplar arası değerlendirme tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) (SPSS 20) ile ortalamalar arasındaki farkın önemliliklerini değerlendirmek için Duncan post-hoc testi uygulandı. İstatistiksel açıdan ortalamının önemi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmamızda TRF ve *Aloe vera*'nın olası toksik ve genotoksik etkilerini, *D. melonagaster* model organizmasının soyları kullanılarak ömür uzunluğu, larval toksisite ve COMET analizi ile araştırdık. Bu amaçla her üç test yöntemi için kontrol ve uygulama grupları içeren 3 farklı deney seti Tablo 3.4'te gösterildi.

4.1 Dozun Seçilmesi

Deneyde kullanılacak olan TRF maddesinin dozunu belirlemek için ön denemeler yapıldı ve bu denemeler sonucunda 0,2 mM ve 0,5 mM olarak belirlenen madde miktarında ergin sineklerin tamamen öldüğü, 0,1 mM belirlenen dozda ise sineklerin yaşamlarını devam ettirdiği gözlemlendi. Verilerin sonuçlarına göre 0,1 mM TRF dozuna karar verildi (Ersöz ve Çolak, 2018).

4.2 *In Vivo* Ömür Uzunluğu Testinde Elde Edilen Bulgular

Bu tez çalışmasında *D. melonagaster*'in ♀♀ ve ♂♂ populasyonları ayrı ayrı olmak üzere kontrol ve deney gruplarını içeren SDB'nde beslendi. Kontrol ve deney grupları için çalışma eş zamanlı başlatıldı ve deney gruplarında en son birey ölene kadar devam edildi. Aynı yaşlı çiftleşmemiş ♀♀ ve ♂♂ sineklerden her bir deney için toplanan ortalama 45 ve 30 *D. melonagaster* ayrı ayrı olmak üzere SDB bulunan kültür şişelerine 15'er tane konularak ayrıştırıldı. Elde edilen verilere göre dişi ve erkeklerin sineklerin kontrol ve deney grupları için ortalama ömür uzunlukları hesaplandı. Tablo 4.1'de gruplara ait maksimum ömür uzunluğu verileri, negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait veriler ile karşılaştırılarak istatistiksel analizler yapıldı ve sonuçlar $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı bulundu.

Yapılan deneyler sonucunda negatif kontrol grubunda maksimum ömür uzunluğu ♀♀ populasyonda 78 ve ♂♂ populasyonda 82 gün olarak belirlendi (Tablo 4.1). Negatif kontrol grubuna ait ortalama ömür uzunlukları ise ♀♀'de $72,6 \pm 2,50$ gün iken ♂♂'de ise 76 ± 3 gün olarak belirlendi. Pozitif kontrol grubunda ise maksimum ömür uzunluğu ♀♀ populasyonda 64 gün ve ♂♂ populasyonda 77 gündür. Pozitif kontrol grubuna ait ortalama ömür

uzunlukları ise ♀♀'de $60,3 \pm 2,45$ gün iken ♂♂'de ise $72 \pm 2,25$ gün olarak belirlendi (Tablo 4.1).

♀♀ populasyonunda sırasıyla 78 ve 64 gün olan negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait maksimum ömür uzunlukları TRF (0,1 mM) 'de 60 güne gerilerken; TRF + *Aloe vera* (0,1 mM + %,5, 0,1 mM + %5, 0,1 mM + %10) deney gruplarına sırasıyla 73, 75 ve 82 güne ilerledi. ♂♂ populasyonunda 82 ve 77 gün olan maksimum ömür uzunluğu aynı deney gruplarında sırasıyla TRF'de 77 günde ksilen ile aynı gündedir ve TRF + *Aloe vera*'da ise 94, 82 ve 92 güne ilerledi (Tablo 4. 1).

Farklı konsantrasyonlarda TRF ve TRF + *Aloe vera*'nın *D. melanogaster*'in erkek populasyonlarına ait ömür uzunlukları üzerine etkisi belirlendi. Çalışmamıza göre erkek bireylere ait ortalama ömür uzunluğu sonuçları birbiriyle ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığı zaman, en uzun ortalama ömür uzunluğu TRF + %10 *Aloe vera* deney grubunda $91,5 \pm 0,25$ en kısa ortalama ömür uzunluğu TRF deney grubunda $70 \pm 3,5$ gün olarak belirlendi.

D. melanogaster'in erkek ve dişi bireylerine ait ortalama ömür uzunluğu birbiriyle karşılaştırıldığı zaman, kontrol ve tüm deney gruplarında erkek bireylerin dişi bireylerden daha uzun ömürlü olduğu görülmüştür.

Tablo 4. 1: *D. melanogaster*'in dişi ve erkek populasyonlarına ait ortalama ömür uzunlukları (gün olarak) ve gruplar arası önem kontrolleri.

Deney grupları								
Deney grupları	♀				♂			
	Birey sayısı	Max ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü (sadece anlamlı farklar)	Birey sayısı	Max ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü (sadece anlamlı farklar)
K(1)	45	78	72,6±2,50		30	82	76±3	
Ksilen (2)	45	64	60,3±2,45	1-2** 1-3**	30	77	72±2,25	6-1** 4-2**
TRF (3)	45	60	58±0,57	5-2** 6-2**	30	77	70±3,5	5-2** 4-1*
TRF+ %2,5 Aloe vera (4)	45	73	68,6±2,09	4-3**	30	94	89,5±2,25	4-3**
TRF+ %5 Aloe vera (5)	45	75	71±1,87	5-3** 6-3**	30	82	80±1,00	6-3** 4-2*
TRF+ %10 Aloe vera(6)	45	82	75,6±2,46	4-2*	30	92	91,5±0,25	4-5* 6-5*

Max. : Maksimum, S. H. : Standart hata, **: Gruplar arasındaki fark p<0,001 düzeyinde önemlidir. *:Gruplar arasındaki fark p<0,05 düzeyinde önemlidir.

4.3 TRF ve *Aloe vera*'nın *D. melanogaster* larvalarında yaşama oranı

Larvadan Pupaya Geçiş Oranı

TRF ve TRF + *Aloe vera*'nın *D. melanogaster*'in yaşama oranı üzerine etkisi Tablo 4.2'de verilmiştir. Yapılan çalışmada TRF'nin belirlenen konsantrasyonunda larvanın yaşam oranının düştüğü gözlemlendi.

Kontrol grubuna göre TRF ve TRF + *Aloe vera* konsantrasyonlarını içeren tüm besinler 3. evreye ulaşan larva, pupa olma oranı azalmıştır. Negatif kontrol grubunda $86 \pm 1,00$ oranında 3. evre larva elde edilirken, pozitif kontrol grubunda $18 \pm 1,50$ 'a kadar azalmıştır. TRF + %5 *Aloe vera* konsantrasyonunda 3. evreye ulaşan larva oranı $69 \pm 2,25$ azalmıştır. TRF + %10 *Aloe vera* konsantrasyonunda ise 3. evreye ulaşan larva oranı 88 ± 0 artmıştır. TRF konsantrasyonunda 3. evreye ulaşan larva oranı $78 \pm 0,5$ ve TRF + %2,5 *Aloe vera* konsantrasyonunda $69 \pm 2,25$ azalmıştır (Tablo 4.2). Pozitif kontrol grubuna göre karşılaştırma yaparsak; ciddi oranda 3. evreye ulaşan larva oranı artmıştır.

Pupadan Ergine Geçiş Oranı

D. melanogaster'in kontrol grupları, TRF ve TRF + *Aloe vera* uygulanan grupları arasında pupadan ergine geçiş oranları bulundu ve istatistiksel olarak hesaplandı. Negatif kontrol grubunun %86'sı erginleşmişken, pozitif kontrol grubu %6, TRF deney grubunda %82, TRF + %2,5 *Aloe vera* deney grubunda %63, TRF + %5 *Aloe vera* deney grubunda %84 ve TRF + %10 *Aloe vera* deney grubunda ise %97 erginleşebilmiştir (Tablo 4.2).

Kontrol grubu ve diğer gruplar karşılaştırıldığında pupadan ergine geçiş oranlarında TRF, TRF + %2,5 *Aloe vera* ve TRF + %5 *Aloe vera*'da kısmi bir azalma söz konusudur. TRF + %10 *Aloe vera*'da ise kısmi bir artış gözlemlenmiştir.

Tablo 4. 2: TRF ve TRF + *Aloe vera*'nın *D. melanogaster* larvalarının yaşama oranı üzerine etkisi. Grup 1: Kontrol, Grup 2: Ksilen, Grup 3: TRF, Grup 4: TRF + %2,5 *Aloe vera*, Grup 5: TRF + %5 *Aloe vera*, Grup 6: TRF + %10 *Aloe vera*.

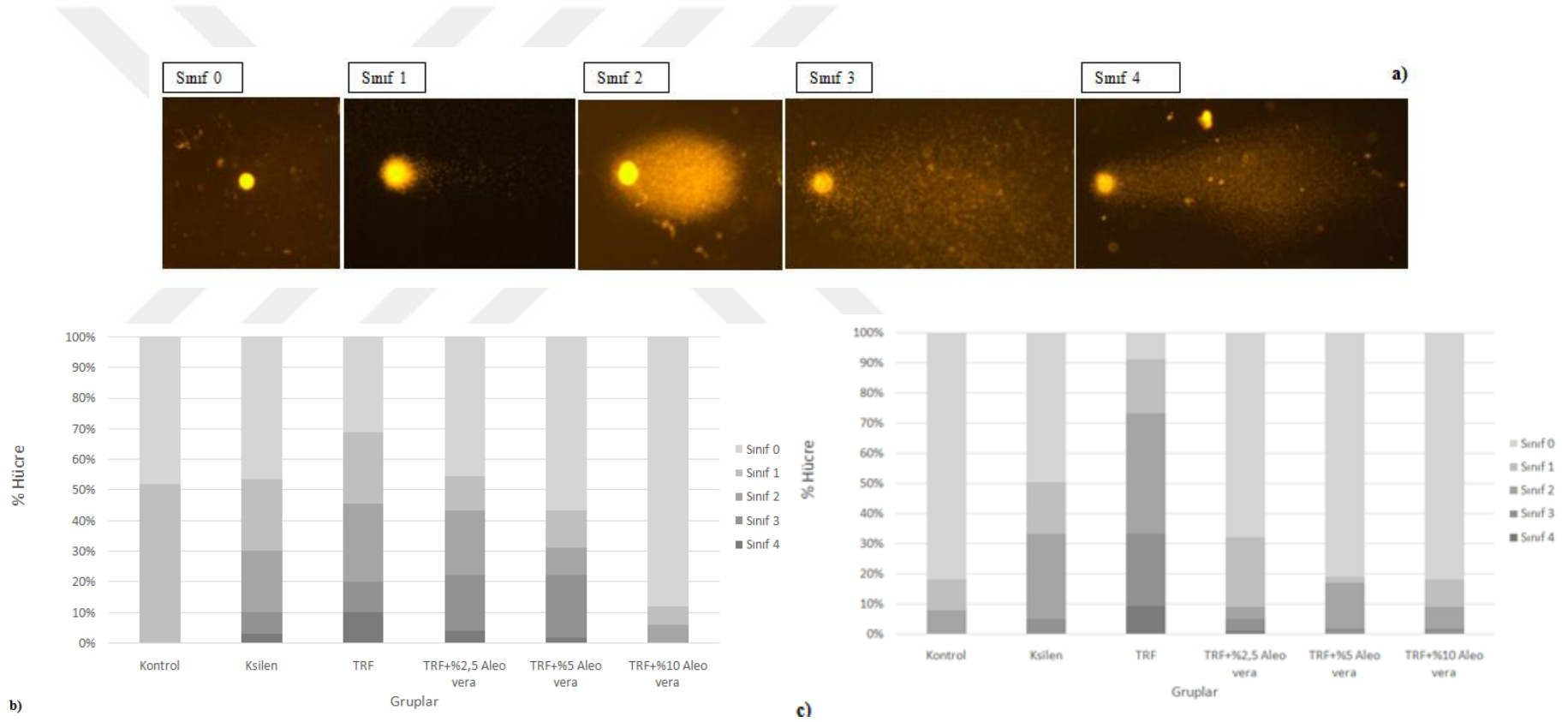
Deney grupları	Eklenen larva miktarı				3. evreye ulaşan larva oranı (%)	Pupa sayısı Ort.	Pupa olma oran Ort±SH	Ergin sayısı Ort	Ergin olma oranı Ort±SH
	1. Tekrar		2. Tekrar						
	<u>Oran</u>	<u>Ortalama</u>	<u>Oran</u>	<u>Ortalama</u>					
Grup 1	45/50	%90	41/50	%82	86±1	93,5	93,5±0,25	43	43±1
Grup 2**	24/50	%48	22/50	%44	18±1,50	9	9±1,50	3	3±0,50
Grup 3*	30/50	%60	39/50	%78	78±0,5	78,5	78,5±8,75	41	41±2,00
Grup 4*	50/50	%100	43/50	%86	69±2,25	87,5	87,5±5,25	31,5	31,5±6,25
Grup 5*	44/50	%88	44/50	%88	88±0	92	92±9,00	42	42±2,50
Grup 6*	40/50	%80	38/50	%76	93±1,75	99	99±2,00	48,5	48,5±2,75

** : Besiyeri hazırlama aşamasında %2 ksilenle, * : TRF %1 ksilenle hazırlanmıştır.

4.4 COMET Deney Sonuçlarının Analizi

Bu tez çalışmasında kullanılan TRF tek başına ve *Aloe vera* (%2,5, %5 ve %10) konsantrasyonları ile birlikte standart besiyerine eklendi ve 15 gün sonunda oluşan *D. melanogaster*'ler toplandı. *D. melanogaster* üzerindeki olası DNA hasarını incelemek için comet analizi yapıldı. Çalışmamızın sonucuna göre TRF'nin DNA hasarında artış meydana getirdiği ve buna karşılık *Aloe vera* ile uygulandığında etkilerin giderek azaldığı sonucuna varıldı. TRF'nin DNA hasarına yol açtığı olumsuz etkileri *Aloe vera* uygulamasıyla engellendiği belirlendi.

Şekil 4.1'de dişi ve erkek *D. melanogaster* için comet analiz sonuçları gösterildi. Comet analiz görüntülerini incelerken rastgele 100 hücre seçildi ve gözümüz ile 0'dan 4' kadar değer verildi. Bu değerler kendi aralarında gruplandırılarak grafikler çizildi. TRF'nin dişi ve erkek sineklerde DNA hasarında artışa sebep olduğu gözlemlenirken, TRF+ %2,5 *Aloe vera*, TRF + %5 *Aloe vera* ve TRF+ %10 *Aloe vera* konsantrasyonları arttıkça DNA'ya verdiği hasarın azaldığı görüldü.



Şekil 4. 1: a) DNA hasarını gösteren sınıflandırılmış comet görüntüsü. b-c) Yetişkin dişi ve erkek *D. melanogaster*'in TRF (0,1 mM) ve *Aloe vera*'nın (%2,5- %5 ve %10) farklı konsantrasyonlarına 15 gün boyunca maruz bırakılması sonucunda meydana gelen hasarın grafik ile gösterilmesi.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkiler yüzyıllardır sağlık ve tıp alanında tedavi amaçlı koruyucu ve iyileştirici olarak kullanılmıştır (Surjushe vd, 2008). *Aloe vera* bitkisinin antioksidan, antimitojenik, antioksidan, antikanserojenik, antiviral ve antigenotoksik özellikleri sahip olduğu bilinmektedir (Stanic, 2007). *Aloe vera*'nın doğal ve ekonomik olması, tedavi amaçlı kullanılması bitkiyi daha önemli hale getirmiştir. Ayrıca geniş bir kullanım alanına sahip *Aloe vera*'nin antigenotoksik aktivitesinin araştırılması insan sağlığı açısından önemli olduğu düşünülmektedir (Lanka, 2018; Mukherjee vd., 2014)

Pestisitler, doğal çevrede birçok canlı türü üzerinde toksik etkilere sebep olmaktadır. Pestisitlerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımının insan sağlığına ve çevreye birçok olumsuz etkisi vardır. Canlılar üzerinde ekotoksosite, genotoksosite, toksisite ve mutajeniteye sebep olurlar (Kaya vd., 2004; Bolognesi, 2003; Kale vd., 1995). TRF'de pestisit sınıfına giren kanserojen bir maddedir (Aydınoğlu vd., 2002).

Çalışmamızda kullandığımız model organizmanın türüne göre; hayatta kalma ve gelişim süresi, yumurta verimi, vücut büyüklüğü ve ömür uzunluğu gibi etmenler uygulanan maddelere göre farklılık gösterebilir. Ömür uzunluğu deneyi, uygulanan maddeye göre organizmanın yaşamının ne kadar süre devam ettiğini incelememizi ve bu verileri sayısal olarak değerlendirmemizi sağlar. Larval toksisite deneyinde kullandığımız bileşenlerin gelişim sürelerini nasıl etkilediğini incelenmesini sağlar.

Son yıllarda toksikoloji alanında farklı test yöntemi kullanılmaktadır. Gerekli malzemelerin temininin kolay ve maliyetinin ucuz olması, kullanılacak olan organizmanın kısa ömürlü olması, çok sayıda yavru vermesi ve kullanılan yöntemlere (larval toksisite, ömür uzunluğu ve comet analizi) uygulanabilir olması gibi özelliklere sahiptir. Comet analizi hızlı, ucuz, basit ve güvenilir olmakla beraber seçilen model organizma üzerinde uygulanabilme kolaylığı sağlar.

Laboratuvarda kolay kültüre edilebilmesi ve kısa sürede üreyebilmesinden dolayı toksisite ve genotoksosite çalışmalarında *D. melanogaster* tercih edildi. İnsanlarla homolog bir çok

geninin olması da tercih edilme nedenlerinin arasındadır (Priya, 2012).

Çalışmamızda *Drosophila melanogaster* larvalarını laboratuvarda ergin evreye kadar yetiştirmek için kullanılan yapay besine farklı miktarlarda ilave edilen TRF ve *Aloe vera*'nın sineğin yaşama, gelişimine, ergin ömür uzunluğuna etkisi ve DNA'sına verdiği hasar comet analizi ile araştırıldı.

Elde edilen sonuçlara göre *D. melanogaster*'in dişi bireylere ait ömür uzunluğu sonuçları birbiriyle ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığı zaman, en uzun ortalama ömür uzunluğu (TRF + %10 *Aloe vera*) deney grubunda $75,6 \pm 2,46$, en kısa ortalama ömür uzunluğu TRF deney grubunda $58 \pm 0,57$ gün olarak belirlendi. *D. melanogaster*'in erkek popülasyonlarına ait ömür uzunluğu çalışmasının sonuçlarına göre erkek bireylere ait ortalama ömür uzunluğu sonuçları birbiriyle ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığı zaman, en uzun ortalama ömür uzunluğu (TRF+ %10 *Aloe vera*) deney grubunda $91,5 \pm 0,25$, en kısa ortalama ömür uzunluğu TRF deney grubunda $70 \pm 3,5$ gün olarak belirlenmiştir. Dişi ve erkek *D. melanogaster* arasında ömür uzunluğu karşılaştırıldığında erkek ömür uzunluğun dişilere göre daha uzun olduğu görüldü.

D. melanogaster'e resveratrol ve *Aloe vera* uygulanmış ve sineklerin ömür uzunluklarının arttığını bulmuştur (Chandrashekara ve Shakarad, 2011). Bizim çalışmamızda ise TRF'ye karşı *Aloe vera* ekstraktı verilen deney grupları karşılaştırılmıştır. *Aloe vera* verilen deney gruplarında ömür uzunluğunun arttığı tespit edilmiştir.

TRF ve *Aloe vera* konsantrasyonlarını içeren besinlerle beslenen birinci evre larvaların diğer larval evrelerinde ve larva sonrası evrelerde yaşama ve gelişimi incelendi. Larvadan pupaya geçişte kontrol grubuna göre düşüş meydana gelirken, pupadan ergine geçişte; kontrol grubu ve diğer gruplar karşılaştırıldığında pupadan ergine geçiş oranlarında TRF, TRF + %2,5 *Aloe vera* ve TRF + %5 *Aloe vera*'dakı kısmi bir azalma söz konusudur. TRF + %10 *Aloe vera*'da ise kısmi bir artış gözlemlendi.

Aloe vera (L.) yaprak ekstraktının bazı enzim aktivitesi ve antioksidan aktivite üzerine *in vitro* inhibe edici etkisi araştırılmış ve *Aloe vera* ekstraktının doğal bir antioksidan özelliği olduğu ortaya çıkarılmıştır (Saçan vd. , 2017). *Aloe vera*'nın antioksidan özelliği TRF'nin etkisini kısmi olarak azaltmıştır. TRF ve *Aloe vera* gruplarını kendi aralarında

karşılaştırdığımızda TRF'nin larvadan pupaya geçişi $78,5 \pm 8,75$ iken TRF + *Aloe vera* (%2,5, %5, %10) konsantrasyonları sırasıyla $87,5 \pm 5,25$, $99 \pm 2,00$ ve $92 \pm 9,00$ artmıştır. Pupadan ergine geçişte ise TRF'nin $41 \pm 2,00$ iken TRF + *Aloe vera* (%2,5, %5, %10) konsantrasyonları sırasıyla $31,5 \pm 6,25$, $42 \pm 2,50$ ve $48,5 \pm 2,75$ olarak verilmiştir. TRF + %10 *Aloe vera*'da artış olmuştur.

Aloe vera ve Guava bitkisinin farmakolojik ve biyolojik aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. *Aloe vera* ve Guava bitkisi içerisinde çok sayıda önemli fitokimyasal bileşiğin olduğu gözlemlenmiştir. Yara iyileştirici şifalı bitkiler arasındadır, ayrıca iltihap, ağrı, ülser ve antihiperglisemik ajanların tedavisinde kullanılabilir. İnsan ve hayvan tedavilerinde uygulanabilmesi, terapötik faydalarından yararlanarak farmakodinamiği-kinetiği hakkında kapsamlı araştırma yapılması ve daha fazla araştırma için bileşiğin biyoaktivitesinin yanı sıra saflaştırılmış formlarının izole edilmesi *Aloe vera* ve Guava bitkileri için ihtiyaç duyulan çalışmalar arasındadır (Fatalo Falaro ve Tesfaye, 2020). Bizim çalışmamızda ise *D. melanogaster* kullanılarak genotoksik etkisi incelenmiştir.

Sürekli artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak amacıyla artan tarım ürünlerine karşılık giderek çeşitlenen ve yaygınlaşan pestisitlerin farklı kullanım amaçları vardır. Pestisitler gibi bütün kimyasal maddelerin etkileri canlıların yaşam evrelerine göre değişiklik gösterir. Yaşamın erken dönemlerinde oluşan etkileri belirlemek özellikle önemlidir. Pestisit veya diğer kimyasal maddeler orta ve uzun vadede olumsuzluklara neden olabilir, popülasyonların ya da türlerin kaybına yol açabilir.

Yapılan çalışmalara göre pestisitlerin toksik içerikleri nedeniyle özellikle mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Casida, 2009).

Tarım alanlarında çalışan insanlar üzerinde pestisitlerin toksik etkileri araştırılmış, renal ve hepatik toksisiteyi arttırdığı saptanmıştır (Brouwer vd. , 1991). Yapılan deneylerde TRF'nin mutajen olduğu gözlemlenmiştir.

TRF'nin genotoksisite, immünotoksisite ve üreme toksisitesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. *D. melanogaster* üzerinde TRF'nin de içinde olduğu 4 farklı herbisit (bentazon, molinat, tiobenkarb, trifluralin) SMART testi ile genotoksik olduğu bildirilmiştir (Kaya vd. , 2004).

Bizim çalışmamızda da Comet analizi yapılarak TRF'nin *D. melanogaster* üzerinde DNA hasarını arttırdığı gözlemlenmiştir. *Aloe vera* ile beraber kullanıldığında DNA hasarının azaldığı TRF'ye karşı koruyucu etkisi olduğu gözlemlendi.

Benzen, toluen ve ksilene (1,0-100 mM) maruz kalan *D. melanogaster*'de genotoksik etkilerin kuersetin ve kurkumin ile azaltılması üzerine çalışma Singh ve arkadaşları (2011) tarafından araştırılmıştır. Ksilenin, benzene kıyasla *D. melanogaster*'de daha az genotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Singh vd., 2011). Çalışmamızda yapılan ömür uzunluğu deneylerinde ksilen ve TRF gruplarında verilerin yakın olmasının sebepleri arasında ksileninde genotoksik etki göstermiş olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak *Aloe vera*'nın, TRF'nin yanında koruyucu olarak kullanılabilir ve TRF'nin zararlı etkilerini azaltabilir olduğu görülmekte ve *Aloe vera* jelinin insan sağlığı, canlılık için önemli bir rolü olduğu ve literatüre katkı sağladığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Allen, G. E. (1975). The introduction of *Drosophila* into the study of heredity and evolution: 1900-1910. 66:322-333.
- Altıkat, A. , Turan, T. ve Ekmekyapar Torun,F. (2009). Türkiye'de pestisit kullanımını ve çevreye olan etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, (2), 87-92.
- Anjum, R. , Rahman, M. , Masood, F. ve Malik, A. (2012). Bioremediation of pesticide from soil and waste water, Malik and Grohmann (eds) Environmental Protection Strategies for sustainable Development. *Springer Science, Business Media* ISBN 978-94-007-1590-5.
- Anthony, R. G. ve Hussey, P. J. (1999). Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton and the microtubule cytoskeleton. *Elsevier Science*. PII: S1360-1385 (99) 01378-3.
- Ayaz, A. ve Yurttagül, M. (2008). Besinlerdeki toksik öğeler II. 2. basım, Sağlık Bakanlığı Yayın: 727, Ankara, 37 s.
- Aydınöğlü, H. , Dursun, H. Y. ve Bayraktar L. (2002). “Bitki Koruma Ürünleri”, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, 155-365.
- Azqueta, A. ve Collins, A. R. (2011). The comet assay: A sensitive and quantitative method for analysis of DNA damage. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- B Epp, J. , R Schmitzer, P. ve D Crouse, G. (2018). Fifty years of herbicide research: comparing the discovery of trifluralin and haloxifen-methyl. *Pest Management Science*, 74:9-16.
- Bayram, D. (2011). Quızalofop-p-ethyl uygulanan *Helianthus annuus* L. Bitkisinde Salisilik asidin Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Malatya, 77+x s.
- Belge Kurutaş,E.ve Kılınç, M. (2003). Pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12 (3).
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 543:251-27.
- Boundreau, M. D. ve Beland, F. A. (2006). An Evaluation of the Biological and Toxicological Properties of *Aloe Barbadensis* (Miller), *Aloe Vera*. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 24:103–154.
- Brouwer, E. J. , Evelo, C. T. A. , Verplanke, A. J. W. , van Welie R. T. H. ve de Wolff, F. A. (1991). Biological effect monitoring of occupational exposure to 1,3-dichloropropene: effects on liver and renal function and on glutathione conjugation. *British Journal of Industrial Medicine*, 48:167-172.

- Capasso, F. , Borrelli, F. , Capasso, R. ve Di Carlo, G. (1998). Aloe and its therapeutic use. *Phytotherapy Research*, 12 (1): 124-127.
- Casida, J. E. (2009). Pest toxicology: The primary mechanisms of pesticide action. *Chemical Research Toxicology*, 22:609-619.
- Chandrashekara, K. T. ve Shakarad, M. N. (2011). *Aloe vera* or resveratrol supplementation in larval diet delays adult aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 66: 965-71.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26:3/249-261.
- De Oliveira, B. , Pereira, L. C. , Pazin, M. , Franco Bernarndes, M. F. ve Dorta, D. J. (2020). Do trifluralin and tebutiuron impair isolated rat liver mitochondria? *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Pandey, A.K. ve Parmar, D. (2009). Protocol for the single cell gel electrophoresis/ comet assay for rapid genotoxicity assessment. Developmental Toxicology Division Industrial Toxicology Research Centre Marg, Lucknow 226001U.P. India
- Dinçer, Y. ve Kankaya, S. (2010). Comet assay for determining of DNA damage: Review. *Türkiye Klinikleri Journal Medicine Science*, 30 (4): 1365-73.
- Dikilitaş, M. ve Koçyiğit, A. (2010). Canlılarda " tek hücreli jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (Teknik not): Comet analiz yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14 (2): 77-89.
- Ebert, E. , Leist, H. , Hack ve Ehling, G. (1992). Toxicology and Hazard Potential Of Trifluralin. *Food and Chemical Toxicology*, pp: 1031-1044.
- EFSA (European FoodSafety Authority) (2009). Peer review of thepesticide risk assessment of theactive substance trifluralin.
- Eroğlu Doğan, E. (2008). Bazı Flavonoidlerin *Drosophila Melanogaster*'de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Malatya, 115+ix s.
- Ersöz, Ç. ve Altun Çolak, D. (2018). Meyve sineği larvalarında SiO₂ nanopartiküllerine bağlı toksisitenin araştırılması. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11 (2), 255-262.
- Fairbairn, D. W. , Olive, P. L. ve O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339:37-59.
- Fatalo Falaro, T. ve Tesfaye, S. (2020). Review on pharmacological activities of herbal plants: *Aloe vera* and Guava. *Global Journal of Pharmacology*, 14 (2): 17-27.

- Fidan, A. F. (2008). DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi *Fen Bilimleri Dergisi*, 8 (1).
- Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.
- Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Ç. (1997). Çevre sağlığı temel kaynak dizisi. 1. basım, Ankara: TC Sağlık Bakanlığı, Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü yayını: No: 52, İlköz Matbaası, Ankara, 173s.
- Güner, U. ve Gökalp Muranlı, F. D. (2013). Balıklarda tek hücreli jel elektroforezi (comet assay). *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 3 (9): 103-114.
- Hu, Y. , Xu , J. ve Hu, Q. (2003). Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:7788-7791.
- Itrat, M. ve Zarnigar (2013). *Aloe vera*: A review of its clinical effectiveness. *International Research journal of Pharmacy*, 4 (8): 75-79.
- Kale, P. G. , Petty, B. T. , Jr. , Walker, S. , Ford, J. B. , Dehkordi, N. , Tarasia, S. , Tasié, B. O. , Kale, R. ve Sohni, Y. R. (1995). Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25:148-153.
- Kaya, B. , Marcos, R. , Yanikoğlu, A. ve Creus, A. (2004). Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research*, 557:53-62.
- Khan Perveen, F. (2008). Introduction to *Drosophila*. *Drosophila melanogaster*- Model for recent advances in genetics and therapeutics.
- Kızılet, H. ve Uysal, H. (2012). Ergin *Drosophila*'nın ömür uzunluğunda kronik zeralenon alımına bağlı toksisitesinin uyarılması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43 (1): 1-5.
- Könen, S. ve Çavaş, T. (2008). Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation treflan using the piscine micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49:434-438.
- Kumar Gupta, V. , Kumar, A. , De Lourdes Pereira, M. , Jamal Siddiqi, N. ve Sharma, B. (2020). Anti-inflammatory and antioxidative potential of *Aloe vera* on the cartap and malathion mediated toxicity in Wistar rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*,
- Lanka, S. (2018). A review on *aloe vera* the wonder medicinal plant. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 8 (5-s): 94-99.
- Matsuyama, R. , Ogata, K. , Kikamoto, S. ve Oota, M. (2009). Comet assay, a new in vivo

mutagenicity test- regulatory significance and scientific development.

- McKelvey Martin, V. J. , Green, M. H. L. , Schmezer, P. , Pool Zobel, B. L. , De Meo, M. P. ve Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288:47-63.
- Mukherjee, P. K. , Nema, N. K. , Maity, N. , Mukherjee, K. ve Harwansh, R. K. (2014). Phytochemical and Therapeutic Profile of *Aloe vera*. *Journal Of Natural Remedies*, Vol 14 (1).
- Nehez, M. , Paldy, A. , Selypes, A. , Körösfalvi, M. , Lorinczi, I. L. ve Berencsi, G. (1980). “The mutagenic effect of trifluralin-containing herbicide on mouse germ cells in vivo”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 4(3):263-6.
- Olgun, G. ve Yurtsever, S. (2003). Genetik Laboratuvar Kılavuzu. No: 56, Trakya Üniversitesi Matbaası, Edirne, 68 s.
- Olive P.L. & Banáth J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* | VOL.1 NO.1: 23-29.
- Oluwatoyin Ayoola, S. ve Oyinkansola Ishola, H. (2020). The growth performance and genotoxicity effect of dietary *Aloe vera* on *Oreochromis niloticus juveniles*. *Aceh Journal of Animal Science*, 5 (2): 92-97.
- Ostling, O. ve Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123:291-298.
- Özata, L. (2006). Bazı Tekstil Boyalarının *Drosophila melanogaster* Üzerinde Toksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Malatya, 87+x s.
- Parvathi, D. , Amritha, S. ve Paul S. FD. (2009). Wonder animal model for genetic studies -*Drosophila Melanogaster* –its life cycle and breeding methods – A review. *Sri Ramachandra Journal of Medicine*, Vol. II, Issue 2.
- Patterson, A. S. M. (2004). “Trifluralin analysis of risks to endangered and threatened pacific salmon and steelhead”, Ph. D. Environmental field branch office of pesticide programs.
- Pilinskaia, M. A. (1987). “Evaluation of the cytogenetic effect of the herbicide treflan and of a number of its metabolites on mammalian somatic cells”. *Tsitologia Genetica*, 21 (2):131-5,
- Piperakis, S. M. (2009). Comet assay: A brief history. *Cell Biology Toxicology*, 25:1-3.
- Priya, N. G. (2012). Section B. Chapter 2, Review of Literature. 91-92.
- Rydberg, B. ve Johanson, K. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *DNA Repair Mechanisms*, 465-468.

- Saçan, Ö. , Akev, N. ve Yanardağ, R. (2017). Invitro inhibitory effect of *Aloe vera* (L.) Burm. f. leaf extracts on activity of some enzymes and antioxidant activity. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 54:82-89.
- Sarıgöl Kılıç, Z. , Aydın, S. , Ündeğer Bucurgat, Ü. ve Başaran, N. (2018). In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. *Food and Chemical Toxicology*, 113:90-98.
- Sarıgöl Kılıç, Z. ve Ündeğer Bucurgat, Ü. (2018). The apoptotic and anti-apoptotic effects of pendimethalin and trifluralin on A549 cells in vitro. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 15(3):364-369.
- Shelton, R. M. , Maj, Usaf ve MC (1991). *Aloe vera*'s chemical and therapeutic properties. *International Journal of Dermatology*, Vol 30, No 10.
- Singh, N. P. , McCoy, M. T. , Tice, R. R. ve Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184-191.
- Singh Ahlawat, K. ve Singh Khatkar, B. (2011). Processing, food applications and safety of *aloe vera* products: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 48 (5): 525–533.
- Singh, M. P., Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A.K., Mudiam, M.K.R, Patel, D.K., Ravi Ram, K. ve Kar Chowdhuri D. (2011). Genotoxicity and apoptosis in *D. melanogaster* exposed to benzene, toluene and xylene: attenuation by quercetin and curcumin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253: 14-30.
- Smolka, B. ve Lukac, R. (2004). Segmentation of the comet assay images. International Conference Image Analysis and Recognition, Portekiz, pp:124-131.
- Stanic, S. (2007). Anti-genotoxic effect of *aloe vera gel* on the mutagenic action of ethylmethanesulfonate. *Archives of Biological Sciences*, 59:223-226.
- Surjushe, A. , Vasani, R. ve Saple D. G. (2008). *Aloe vera*: A short review. *Indian Journal of Dermatology*, 53(4): 163-166.
- Tice, R. R. , Agurell, E. , Anderson, D. , Burlinson, B. , Hartmann, A. , Kobayashi, H. , Miyamae, Y. , Rojas, E. , Ryu, J. C. ve Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.
- Tiryaki, O. , Canhilal, R. ve Horuz, S. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26 (2): 154-169.
- Türsen, B. ve Türsen, Ü. (2014). Dermatolojide *Aloe vera*. *Dermatoz*. 5 (4): 0-0.
- Toros S. , Maden S. ve Sözeri S. (2001). Tarımsal savaşım yöntem ve ilaçları. 4. basım, Ankara Üni. Ziraat Fakültesi yayınları, No:1520, Ankara, 417 s.

- Tyler, Mary S. (2000). Development of the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. Developmental Biology, A Guide for Experimental Study, Second Edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA. , ISBN 0-87893-843-5
- US EPA (United states environmental protect agency) (1996). Reregistration eligibility decision (red) trifluralin.
- Uysal, H. ve Semerdöken, S. (2011). Sentetik gısa boyalarının *Drosophila Melanogaster*'in Oregen -R soyunda larval toksisite ve ergin ömür uzunluğu üzerine etkilerinin belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (1): 71-87
- Vandghanooni, S. ve Eskandani, M. (2011). Comet assay: A method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. *BioImpacts*, 1(2):87-97.
- Varshney, J. G. ve Sondhia, S. (2007). Introduction to herbicides. Chapter in weed management (E Book), published by National Institute of Science, Communication & Information Resources (NISCAIR), CCIR, New Delhi 1-93 s.
- Vermeire, T. , McPhail, R. ve Waters, M. (2001). D. Organophosphorous pesticides in the environment. World Health Organization. IV. Meeting report of the International Workshop on Approaches to Integrated Risk Assessment: 1-18.
- Vural, N. (2005). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları: 73, Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, 659 s.
- Wallace,D.(2014). Trifluralin. *Encyclopedia of Toxicology*, 4: 846-848.
- YanMei, D. (2011). Effects of *aloe* on the lifespan and SOD activity of *Drosophila melanogaster*. *Medicinal Plant*, (2) 9: 22-24.
- Yılmaz, F. (2013). Etofenprox'un Genotoksik Etkilerinin Çin Hamsteri Ovaryum Hücrelerinde Mikronükleus ve Komet Testleri Kullanılarak Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji/Genel BiyolojiAnabilim Dalı, Bursa, 77 s.
- Zemheri Navruz, F. (2019). An optimized comet assay protocol for *Drosophila Meanogaster*. *Bartın University International Journal and Applied Sciences*, (2) 1: 73-76.

