

Alyssum virgatum Nyar. Su Ekstrelerinin Sitotoksik ve Antisitotoksik Özellikleri

Yasin EREN¹, Dilek AKYIL², İmren ÇALIK²

ÖZET: Bu çalışmada, *Brassicaceae* familyasına ait olan *Alyssum virgatum* Nyar. bitkisinin toprak üstü kısımlarının distile su ekstraktlarının (Av-eks) *Allium cepa* L. kök uçları üzerine antisitotoksik etkisi incelenmiştir. Av-eks'in farklı süre ve konsantrasyonlarının MMS (Metilmetansülfonat)'e karşı kök büyümesi, mitotik indeks ve anafaz-telofaz kromozom aberasyonları üzerine etkileri belirlenmiştir. *Allium* kök büyüme inhibisyonu testinde Av-eks'in 10 farklı konsantrasyonu (100 gL⁻¹, 50 gL⁻¹, 25 gL⁻¹, 12.5 gL⁻¹, 6.25 gL⁻¹, 3.2 gL⁻¹, 1.6 gL⁻¹, 0.8 gL⁻¹, 0.4 gL⁻¹ ve 0.2 gL⁻¹) soğan kök hücrelerine uygulanarak EC50 değeri belirlenmiştir. 0.8 gL⁻¹, 0.4 gL⁻¹ ve 0.2 gL⁻¹ konsantrasyonları hariç diğer Av-eks konsantrasyonları kök uzunluğunu önemli ölçüde azaltmıştır. Kök uzunluğunu yarıya indiren konsantrasyon olarak kabul edilen EC50 değeri yaklaşık olarak 1,6 gL⁻¹ olarak bulunmuştur. Antisitotoksisite testinde, distile su (negatif kontrol), MMS (pozitif kontrol) ve 10 ppm MMS içeren Av-eks'in farklı konsantrasyonları (0,5×EC50, EC50 ve 2×EC50) 24, 48 ve 72 saat süreyle kullanılmıştır. 10 ppm MMS içeren Av-eks karışımlarında, bitki ekstresindeki konsantrasyon artışına bağlı olarak mitotik indekste önemli bir yükselme gözlenmiştir. Kromozom aberasyon çalışmalarında ise anomali yüzdelerinin pozitif kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. İğ iplikleri bozulmalarının sebep olduğu kalgın kromozom aberasyonu, diğer anomalilerden daha fazla tespit edilmiştir. Sonuçlar Av-eks'in, *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde, MMS varlığında antisitotoksik ve antigenotoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Allium* test, *Alyssum virgatum*, antisitotoksisite, antigenotoksisite, *Brassicaceae*

Cytotoxic and Anticytotoxic Effects of *Alyssum virgatum* Nyar. Aqueous Extracts

ABSTRACT: In this study, anticytotoxic effects of distilled water extract of *Alyssum virgatum* Nyar. (*Brassicaceae* family) aerial parts (Av-ext) was determined on *Allium cepa* L. root meristematic cells. Effects of different concentrations and treatment periods of Av-ext on root growth, mitotic index and anaphase-telophase chromosomal aberrations, against MMS were determined. In *Allium* root growth inhibition test, EC50 value was determined by using 10 different concentrations of Av-ext (100 gL⁻¹, 50 gL⁻¹, 25 gL⁻¹, 12.5 gL⁻¹, 6.25 gL⁻¹, 3.2 gL⁻¹, 1.6 gL⁻¹, 0.8 gL⁻¹, 0.4 gL⁻¹ and 0.2 gL⁻¹). All of the Av-ext concentrations reduced the root length significantly, except 0.8 gL⁻¹, 0.4 gL⁻¹ and 0.2 gL⁻¹ doses. EC50 value that was accepted as reducing concentration of the root length about %50, was found about 1.6 gL⁻¹. In anticytotoxicity test, distilled water (negative control), MMS (positive control) and different concentration of Av-ext (0.5×EC50, EC50 and 2×EC50) including 10 ppm MMS were used for 24, 48 and 72 hours treatment period. In Av-ext mixtures including 10 ppm MMS, it was observed that mitotic index was increased significantly related to the rising concentrations of the plant extract. In chromosome aberration study, percentages of anomalies were decreased according to positive control group. Laggard chromosome aberrations caused by mitotic spindle disruptions were determined more than the other anomalies. The results indicated that Av-ext. has anticytotoxic and antigenotoxic activity on *A. cepa* root meristematic cells against MMS.

Keywords: *Allium* test, *Alyssum virgatum*, anticytotoxicity, antigenotoxicity, *Brassicaceae*

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Matematik ve Fen Bilgisi Eğitimi, Fen Bilgisi Eğitimi, Isparta, Türkiye

² Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Ve Genetik, Afyon, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Yasin EREN, ysnren@gmail.com

GİRİŞ

Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımları insanlık tarihinin ortaya çıkışına kadar uzanmaktadır. Dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de tıbbi bitkiler yüzyıllardır kullanılmaktadır. Ülkemiz zengin florasıyla çok sayıda tıbbi bitkiyi bünyesinde barındırmaktadır. Son yıllarda alternatif tıbbın önemli bir kısmını oluşturan bitki ekstraktları üzerine yapılan çalışmalara ilgi çok artmıştır (Eren, 2011).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verileri, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80’inin alternatif tıp yöntemlerini kullandıklarını ve 20.000 tıbbi bitkiden de terapi amaçlı yararlandığını ortaya koymuştur (Çelik ve Çelik, 2007). Bazı medikal bitkilerin aşırı terapötik avantajları olmasına rağmen medikal bitkilerin bazı içerikleri potansiyel olarak toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olabilmektedir. (Gadano et al., 2006). Bu nedenle, tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin de, konvansiyonel ilaçlarda olduğu gibi kalite, güvenlik ve etkinlik yönünden test edilmeleri ve standardizasyonlarının yapılması gerekmektedir (Simaan, 2009).

Kimyasallar ve bitkisel ekstraktların sitotoksik aktiviteleri *Allium cepa* (Fiskesjö, 1985; Eren, 2016), *Vicia faba* (Cotelle et al., 1999), *Arabidopsis thaliana* (Menke et al., 2001) ve *Hordeum vulgare* (Nicoloff and Kappas, 1987) gibi bitki sistemleri ile test edilebilmektedir. Soğan kök ucu hücreler testi, ucuz ve etkili olmasından dolayı bitki ekstraktları ve kimyasalların sitotoksik ve antisitotoksik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan önemli testlerden biridir (Fiskesjö, 1985; Almokhtar, 2016). *Allium* testinin, memeli test sistemleri ile benzer sonuçlar verdiği bildirilmektedir (El-Shabbaby et al., 2003). *Allium* test yüksek oranda hassastır ve diğer test sistemlerinde test edildiğinde zararlı olmadığı varsayılan birkaç bileşen için pozitif toksik etkiler verebilir (Fiskesjö, 1985).

Tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitlerin kullanımı, sentetik maddelerde görülen yan etkilerin bitkisel droglarda daha az görülmesi, içerisindeki farklı etken maddelerle birkaç etkiye birden sahip olan

bitkisel drogların, yalnızca belirli etkilere sahip olan sentetik bileşiklere göre daha etkili olması ve gelişmekte olan ülkelerin, ülkelerindeki bitkilerden yararlanarak ilaç sektöründe dışa bağımlı olmama isteklerinden dolayı artmıştır (Eren, 2011). Bitkiler aleminin tohumlu bitkiler bölümü, kapalı tohumluların alt bölümü ve iki çenekliler sınıfının *Brassicaceae* familyasına giren *Alyssum* L. cinsi Türkiye florasının büyük cinsleri arasında yer almakta ve 90 türle temsil edilmektedir. Bunlardan 54’ü endemiktir (Davis, 1988).

Türlerin yoğunluğu Doğu Akdeniz’de fazladır (Babaoğlu et al., 2004). Adıgüzel ve ark. (2002) da yaptıkları çalışmalarında *Alyssum* türlerin de birçoğunun Anadolu’da yetiştiği ve Ni belirleyicisi olabileceği vurgulanmıştır.

Nikel bulunduran bitkiler yüksek seviyede metal biriktirici (hiperakümülatör) olarak adlandırılmıştır. Bu terim serpentinlerde yetişen biriktirici olmayan türlerde olması beklenen en yüksek değerden 100 kat daha fazla bir derişimi temsil etmektedir. *Alyssum* türüne ait cinslerdeki Ni biriktirme oranı göz önüne alınarak 168 *Alyssum* türü incelenmiş ve 45 biriktirici tür belirlenmiştir (Brooks, 2000).

Türkiye florasının önemi ise neredeyse tüm *Alyssum* türlerinin ve yüksek seviyede metal biriktiren türlerin yarısından fazlasının Türkiye’de yer almasından kaynaklanmaktadır. Türkiye’nin *Alyssum* türlerinden yüksek seviyede metal biriktirenler *A. callichroum* Boiss.& Bal., *A. caricum* T.R. Dudley & Hub.-Mor., *A. cassium* Boiss., *A. cypricum* Nyar., *A. dubertretii* Gomb., *A. floribundum* Boiss. & Bal., *A. murale* Waldst & Kit. *subsp. murale*’ye ait iki varyete (var. *murale* ve var. *haradjianii* (Rech) T.R. Dudley, *A. pterocarpum* T.R. Dudley ve *A. samariferum* Boiss & Hausskn.’dur (Reeves ve Adıgüzel, 2008).

Bu çalışmada endemik bir bitki olan *Alyssum virgatum*’un toprak üstü kısımlarının distile su ekstraktlarının, antisitotoksik ve antijenotoksik aktiviteleri *Allium* test sistemi ile belirlenmeye çalışılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitki Ektresinin Hazırlanması

Alyssum virgatum bitkisi Uşak ilinin Murat Dağı yöresinde 29° 40' 50"- 29° 56' 38" doğu boylamları ile 38° 49' 54"- 38° 56' 02" kuzey enlemleri arasında toplandıktan sonra Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda taksonomik sınıflandırması Doç. Dr. Mustafa Kargıoğlu tarafından yapılmıştır. Oda şartlarında (22-25°C, %40-50 nem oranı) kurutulmuş bitkilerin toprak üstü kısımları toz haline getirilmiştir. Çözücü olarak bu çalışmada distile su kullanılmıştır. Distile su ekstraksiyonu Sofowora (1999)'ya göre yapılmıştır. 100 g kurutulmuş bitki 1 L distile su içinde bekletilmiş ve böylece stok bitki ekstraktı hazırlanmıştır.

Allium cepa L. Kök Ucu Testi

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak soğan (*Allium cepa*, 2n=16) kullanılmıştır. Kimyasal madde olarak da fuksin, potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$), glasiyal asetik asit, metanol kullanılmıştır. *Allium* testi, Fiskesjö (1985)'nin protokolünün modifiye edilmesiyle yapılmıştır.

EC₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi

Bitki ekstrelerinin antisitotoksik etkileri belirlenmeden önce kök büyümesini engelleyen dozlar belirlenmiştir. Bu amaçla 10 farklı konsantrasyon (100 gL⁻¹, 50 gL⁻¹, 25 gL⁻¹, 12.5 gL⁻¹, 6.25 gL⁻¹, 3.2 gL⁻¹, 1.6 gL⁻¹, 0.8 gL⁻¹, 0.4 gL⁻¹ ve 0.2 gL⁻¹) soğan kök hücrelerine uygulanmış ve EC₅₀ değeri belirlenmiştir. Ortalama kök uzunluğunu kontrole göre %50 azaltan konsantrasyon değeri, etkili konsantrasyon (EC₅₀) değeri olarak tanımlanmıştır.

Kromozom aberasyon testi

Mitotik indeks ve kromozom aberasyonları için her bir konsantrasyonun uygulama süreleri 24, 48 ve 72 saat olarak belirlenmiştir. Distile suda 24 saat süreyle bekletilen soğanlardan homojen uzunluk-taki köklere sahip soğanlar, bitki ekstresinin etkin konsantrasyonu (EC₅₀) + 10 ppm MMS (Methyl Methane Sulfonate), etkin konsantrasyonun yarısı (EC₅₀/2) + 10 ppm MMS ve etkin konsantrasyonun

iki katı (2×EC₅₀) + 10 ppm MMS, içeren tüplere 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır.

Preparatların hazırlanması

Testin bu aşaması Fiskesjö (1985)'ye göre gerçekleştirilmiş olup Her bir uygulama süresi sonunda soğan kök ucundan itibaren yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda kesilen materyaller Carnoy fiksatifine alınarak 24 saat 4 °C'de tespit edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra kökler kullanılıncaya kadar %70'lik alkol içerisinde buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kökler %70'lik alkol içerisinden çıkartıldıktan sonra 1N HCl içerisine alınarak 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda 7 dakika hidroliz edilmiştir. Hidroliz işleminden sonra kökler distile su içerisine alınarak 15 dakika bekletilmiştir. Kökler Feulgen boyası ile oda sıcaklığında bir saat boyanmıştır.

Mikroskobik çalışma

Mikroskobik analizler; mitotik indeks, anafaz ve telofazdaki kromozom aberasyonları ile diğer aberasyonların belirlenmesini içermektedir. Mitotik indeks hesaplamalarından sonra, preparatların incelenmesine yeniden başlanmış ve bu sefer kromozom aberasyonları, her uygulamada toplam 500 anafaz veya telofaz hücresi incelenerek belirlenmiştir

Verilerin istatistiksel analizleri

Elde edilen veriler, SPSS programında Oneway ANOVA Duncan çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve homojen gruplar belirlenmiştir. *Allium* test kök büyümesi inhibisyonu testi sonuçları Dunnett-t testiyle değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Allium Testine Ait Bulgular

Allium test, *Alyssum virgatum* türünün toprak üstü kısımlarının su ekstresi ile çalışılmıştır. *Allium* test ile kullanılan bitkinin su ekstrelerinin, mitotik safhalar üzerine etkisi ve oluşturdukları kromozom aberasyonları belirlenmeye çalışılmıştır.

Kök büyümesi inhibisyonu testi

Bu çalışma ile bitki ekstrelerinin hem kök büyümesi üzerine etkisi araştırılmış hem de sonraki aşamalar olan mitotik indeksin (MI) saptanması ve kromozom aberasyonlarının belirlenmesi denemelerinde kullanılacak olan konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir. 96 saat sonunda kontrol grubunun ortalama kök uzunluğunu (3,46 cm) yarıya düşüren yaklaşık

değer olan etkin konsantrasyon (EC_{50}) değeri 1.6 gL^{-1} olarak hesaplanmıştır. % mitotik indeks (% MI) ve % kromozom aberasyonlarını (% KA) belirlemek için, bitki ekstresinin EC_{50} (1.6 gL^{-1}), $EC_{50}/2$ (0.8 gL^{-1}) ve $EC_{50} \times 2$ (3.2 gL^{-1}) konsantrasyonları kullanılmıştır. Bitki ekstresinin farklı konsantrasyonlarından elde edilen kök uzunluğu ortalaması verileri Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. *Allium* testi kök büyümesi inhibisyonu testi sonuçları

| Test maddesi | Konsantrasyon (gL^{-1}) | Ortalama kök uzunluğu (cm) \pm SS |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|
| Kontrol (dH_2O) | - | 3,46 \pm 0,38 |
| <i>A. virgatum</i> Toprak üstü su ekstresi | 100 | 0,39 \pm 0,06* |
| | 50 | 0,51 \pm 0,07* |
| | 25 | 0,71 \pm 0,11* |
| | 12,5 | 0,91 \pm 0,13* |
| | 6,25 | 0,97 \pm 0,08* |
| | 3,2 | 1,1 \pm 0,14* |
| | 1,6 | 1,71 \pm 0,07* |
| | 0,8 | 2,12 \pm 0,1* |
| | 0,4 | 3,27 \pm 0,24 |
| | 0,2 | 3,51 \pm 0,12 |

* Ortalamalar arasındaki fark 0,05 seviyesinde önemli. (Dunnett-t test 2-yönlü), SS: Standart Sapma.

Kök büyüme inhibisyonu testi sonuçları düşük konsantrasyon değerlerinde bitki ekstresinin kök büyümesine katkı sağladığını fakat ekstrenin yüksek konsantrasyonlarının büyümei inhibe ettiğini göstermektedir.

Mitotik indeks (MI) üzerine etkileri

Allium test mitotik indeksi belirleme testinden elde edilen verilere göre *Av* ekstrelerinin 24 saat uygulamasının MMS’e göre, 10 ppm MMS içeren 0,8, 1,6 ve 3.2 gL^{-1} *Av-eks*’in mitotik aktiviteyi artırdığı görülmüştür. Mitotik faz safhalarına bakıldığında ise, *Av-eks*’in konsantrasyonunun artışına uyumlu olarak pozitif mutajen (MMS) varlığında profaz yüzdesini de artırdığı görülmüştür. 10 ppm MMS içeren 3.2 gL^{-1} *Av-eks* konsantrasyonunun profaz safhasını önemli düzeyde artırdığı görülmüştür. *Av* ekstrelerinin 72 saat uygulamasında ise 10 ppm MMS içeren her üç konsantrasyonda mitotik aktiviteyi artırmıştır. *Av-eks*’in 48 ve 72 saat uygulamalarında, 10 ppm MMS’e

karşı mitotik indeksteki değişiklik artış şeklinde gerçekleşmiş olup bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (Çizelge 2).

Kromozom aberasyon çalışmaları

Alyssum virgatum’un toprak üstü kısımlarının distile su ekstrelerinden elde edilen konsantrasyonların ve saat (24, 48 ve 72) uygulamalarının *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde neden olduğu bazı anafaz-telofaz kromozom anomalileri belirlenmiştir. İncelenen 500 hücrede ayrılmama, kalgın kromozom, anafaz köprüsü ve bozulmuş anafaz-telofaz anomalileri incelenmiştir. Fakat bazı konsantrasyonlarda, mitozun anafaz ve telofaz safhalarının oluşumunu engellediği için 500 hücreden daha az hücre sayılmıştır. Aynı zamanda anafaz-telofaz harici oluşan anomalilere de bakılmıştır. Bunlar ise 5000 hücre sayımı sırasında incelenmiş olup c-metafaz, poliploidi ve binükleer hücre oluşumlarıdır. Teste ait veriler Çizelge 3’de verilmiştir.

Çizelge 2. *Av-eks*'in mitotik indeks ve mitotik safhalar üzerine etkileri

| Konsantrasyon (g/L ⁻¹) | Sayılan Hücre | % MI ± SS | Mitotik Faz Safhaları (%) ± SS | | | |
|------------------------------------|---------------|-------------|--------------------------------|------------|-------------|-------------|
| | | | Profaz | Metafaz | Anafaz | Telofaz |
| Kontrol- 24 saat | 5366 | 85.13±4.13a | 82.5±3.77a | 0,9±0.28a | 1.35±0.18a | 0.51±0.18a |
| MMS (10ppm) | 5091 | 33.53±3.01b | 36.86±7.23b | 0.86±0.55a | 0.75±0.30b | 1.14±0.40b |
| 0.8+10ppm MMS | 5136 | 34.00±2.93b | 30.71±2.96c | 1.48±0.19b | 1.25±0.38ab | 0.57±0.14a |
| 1.6+10ppm MMS | 5132 | 34.12±2.24b | 31.62±2.43bc | 0.78±0.39a | 1.14±0.21ab | 0.98±0.39b |
| 3.2+10ppm MMS | 5234 | 37.16±1.28b | 35.40±1.47bc | 0.23±0.12c | 1.13±0.69ab | 0.40±0.25a |
| Kontrol- 48 saat | 5217 | 77.80±5.93a | 74.26±5.03a | 1.16±0.29a | 1.34±0.87a | 1.04±0.40ab |
| MMS (10ppm) | 5143 | 32.95±4.07c | 32.26±4.16c | 1.23±0.26a | 0.74±0.23ab | 0.72±0.40ab |
| 0.8+10ppm MMS | 5350 | 35.43±4.22c | 32.49±3.99c | 1.22±0.62a | 1.18±0.34ab | 0.54±0.35a |
| 1.6+10ppm MMS | 5197 | 36.25±1.84c | 34.11±5.79c | 0.48±0.22b | 1.02±0.13ab | 0.97±0.28ab |
| 3.2+10ppm MMS | 5277 | 45.83±2.63b | 43.44±2.73b | 0.38±0.28b | 0.93±0.39ab | 1.08±0.31b |
| Kontrol-72 saat | 5217 | 70.31±3.66a | 68.18±4.62a | 0.88±0.22a | 1.00±0.69a | 0.54±0.16a |
| MMS (10ppm) | 5083 | 30.69±5.05b | 28.80±2.67b | 1.06±0.24a | 1.49±0.33b | 0.53±0.23a |
| 0.8+10ppm MMS | 5151 | 36.95±2.02c | 34.24±1.85c | 0.85±0.35a | 1.16±0.24b | 0.71±0.31a |
| 1.6+10ppm MMS | 5525 | 44.64±3.62d | 42.81±3.64d | 0.77±0.25a | 1.07±0.21b | 0.60±0.13a |
| 3.2+10ppm MMS | 5269 | 46.8±1.63d | 45.12±1.99d | 0.25±0.13b | 1.13±0.41b | 0.31±0.16a |

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

Alyssum virgatum'un toprak üstü kısımlarının distile su ekstrelerinden elde edilen konsantrasyonların her üç saat uygulamasında da anafaz-telofaz anomali yüzdesinde MMS'e göre azalmalar görülmüştür.

Diğer anomali yüzdelere bakıldığında ise, MMS içeren *Av-eks*'in 72 saat 10 ppm MMS içeren 1.6 g/L⁻¹ ve 3.125 g/L⁻¹ konsantrasyonları hariç, anomali yüzdelere MMS'e göre azalttığı tespit edilmiştir (Çizelge 3).

Çalışmanın literatürle karşılaştırılması

Brassicaceae familyası üyelerinden pek çoğu metal biriktirme özelliğine sahiptir. Özellikle *Alyssum* cinsine ait pek çok türün nikel metalini biriktirmesi ve bazı türlerde bu oranın kuru yaprak ağırlığının %3'üne tırmanması bu alanda elde edilmiş önemli bulgulardandır (Kramer et al., 1996). Çalışmamızda *Alyssum virgatum* türünün *A. cepa* kök büyümesinde inhibisyon etkisi göstermesi nikel metalini biriktirmesinden kaynaklanabilir.

Çizelge 3. *Av-eks* kromozom aberasyonu sonuçları

| Konsantrasyon (g ^L ⁻¹) | Hücre Sayısı | Yapışıklık | Anafaz köprüsü | Kalgın kromozom | Bozulmuş anafaz-telofaz | Anafaz-Telofaz Anomalileri Toplamı (%± S.S) | Diğer Anomali Toplamı (%± S.S) |
|---|--------------|------------|----------------|-----------------|-------------------------|---|--------------------------------|
| Kontrol-24 | 480 | 0.80 | 0.20 | 42.20 | 4.60 | 49.30±8.50a | 0.14±0.39a |
| MMS | 500 | 5.60 | 1.20 | 50.20 | 6.20 | 63.20±4.76b | 0.66±0.05bc |
| 0.8+MMS | 500 | 0.40 | 1.00 | 40.60 | 5.40 | 47.40±8.79a | 0.00±0.00c |
| 1.6+MMS | 500 | 1.00 | 0.80 | 47.60 | 2.60 | 52.00±9.72a | 0.40±0.21ab |
| 3.2+MMS | 500 | 1.20 | 0.60 | 52.80 | 1.40 | 56.00±5.29ab | 0.56±0.38a |
| Kontrol- 48 | 500 | 4.00 | 2.40 | 32.00 | 7.60 | 46.00±3.74a | 0.04±0.09b |
| MMS | 474 | 1.98 | 4.73 | 44.93 | 4.43 | 66.07±9.09b | 0.40±0.23a |
| 0.8+MMS | 444 | 0.64 | 2.51 | 52.14 | - | 55.28±4.53ab | 0.04±0.05b |
| 1.6+MMS | 434 | - | - | 53.94 | 0.83 | 54.77±6.73ab | 0.08±0.02b |
| 3.2+MMS | 497 | 0.60 | 2.02 | 52.86 | - | 55.48±7.57ab | 0.00±0.00b |
| Kontrol- 72 | 497 | 8.83 | 2.22 | 38.22 | 6.45 | 55.72±3.18a | 0.06±0.09a |
| MMS | 480 | 5.55 | 8.80 | 56.65 | 5.25 | 76.25±2.49b | 0.10±0.08a |
| 0.8+MMS | 385 | 0.41 | 0.67 | 48.55 | 0.61 | 50.23±9.40a | 0.06±0.05a |
| 1.6+MMS | 463 | 0.25 | 2.20 | 50.22 | 1.49 | 54.17±3.76a | 0.60±0.33b |
| 3.2+MMS | 500 | 0.40 | 2.80 | 48.60 | 1.00 | 52.80±3.70a | 0.72±0.22b |

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

Reeves ve Adıgüzel (2004), Türkiye’de endemik olarak yetişen ve Ni hiperakümülatörü bitkilerden *Alyssum*’un bazı çeşitlerinde Ni derişimlerini belirlemiştir. Elde edilen sonuçlara göre g/kg olarak *Alyssum cassium* 5.59-20.00, *Alyssum callichroum* 0.033-10.9, *Alyssum huber-morathi* 1.22-13.5, *Alyssum masmenaeum* 5.48-24.3, *Alyssum pinifolium* 6.67-12.6 *Alyssum pterocarpum* 1.19-6.74 g Ni/kg bitki olduğu belirtilmiştir.

Erdoğan (2005), nikel stresinin fidelerin kök boyları üzerine etkisini incelemiş ve yapılan çalışmada, nikel dozu arttırıldıkça bitki kök boyu uzunluklarında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, kontrol grubunun kök uzunluğuna göre yaklaşık %88 oranında bir azalma belirlenmiştir. *Allium* testi çalışmasında kullandığımız *Alyssum virgatum* dozları, kontrol grubuna göre kök uzunluğunda azalma göstermiştir. Kök uzunlukları konsantrasyon artışına bağlı olarak

azalmıştır. Çalışmamızda kullandığımız en yüksek konsantrasyon olan 100 g^L⁻¹’den elde edilen kök uzunluğu değeri 0.39 cm olarak belirlenmiş ve bu da kontrol grubuna (3.46 cm) göre yaklaşık %88’lik bir azalma oluşturduğunu göstermektedir. Bu iki çalışma arasındaki paralellik kullandığımız bitki türünde de ağır metal (Ni) birikiminin olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışma sonucunda *Allium* test kök büyümesi inhibisyonu testi sonuçları Dunnett-t testine göre değerlendirilmiş olup 100 g^L⁻¹ konsantrasyonu dışında 0.8, 1.6, 3.2, 6.25, 12.5, 25, ve 50 g^L⁻¹ konsantrasyonlarında da kök büyüme inhibisyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Soğan kök uçlarındaki büyümenin kontrol grubuna göre %45’den daha fazla azalması, bitkiler üzerinde büyük bir olasılıkla subletal etkiye sahip toksik maddelerin varlığına işaret etmektedir (Hidalgo et al., 1989; Antonsiewicz, 1990). Bu bilgiye dayanarak, *Alyssum virgatum* ekstresinin

hazırlanan konsantrasyonlarından 1.6 gL^{-1} ve üzerindeki dozların, *A. cepa* kök uçlarına subletal etkisinin olduğu sonucuna ulaşılabilir. Kök büyümesinin inhibisyonu genellikle apikal meristematik aktivite ve farklılaşma sırasında hücrenin uzamasıyla (Fuskoni et al., 2006) ilgilidir.

Mitotik indeks artışıyla beraber profaz safhasında artış metafaz safhasında düşüş görülmektedir. Bal (1995), profaz yüzdesinin yüksek olmasını iş teşekkülünün engellenmesi veya ertelenmesinden kaynaklanabileceğini belirtmiştir. *Av* ekstresinin mitotik faz yüzdelerine etkisi incelendiğinde profaz yüzdesinin 48 ve 72 saat uygulamalarında MMS'e göre arttığı görülmüştür.

Alyssum L. taksonlarına (*A. foliosum* var. *megalocarpum*, *A. fulvescens* var. *fulvescens*, *A. simplex*, *A. murale* var. *murale*, *A. strigosum* subsp. *strigosum*, *A. corsicum*, *A. virgatum*, *A. cypricum*, *A. sibiricum*, *A. discolor*) ait metanol ekstraktlarının antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteleri ile fenolik kompozisyonu araştırılmıştır. HPLC ile tespit edilen fenolik bileşen miktarlarında hiperakümülatör türlerde sinamik asit türevleri tespit edilmiş olup *A. virgatum* ise hiperakümülatör taksonlar içinde biyolojik olarak en aktif takson olmuştur (Özay, 2015). Bu çalışmada da 1.6 ve 3.2 g/L konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösteren *A. virgatum* ekstraktı bir mutajen olan MMS'e karşı kullanıldığında mitoz aktivitesini artırıcı ve kromozom anomali yüzdesini azaltıcı etki göstermiştir.

Alyssum virgatum türü *Brassicaceae* (*Cruciferae*) familyası'na aittir. Bu familyaya ait bazı bitkiler geçmişte olduğu gibi günümüzde de besin olarak tüketilmektedir. Bu bitkilerin birçoğundan geleneksel tıpta da faydalanılmıştır (Çubukçu et al., 2002). *Cruciferae* bitkileri, çeşitli etken maddeleri içermelerinin yanında, özellikle indol-3-karbinol ve glukosinolat türevleri içerikleri bakımından, halen araştırmacıların dikkatini çekmeye devam etmektedirler.

Yapılan çalışmalarda Indol-3-karbinol'un antikarsinogenik maddelerden birisi olduğu belirtilmektedir (Almokhtar, 2016). Bu maddenin

meme ve prostat kanserinde ki tümör hücrelerinde etkili olduğu ve ayrıca serbest radikaller üzerinde tutma etkisi yaratarak antioksidan etki gösterdiği de yine bilimsel araştırmalarda saptanmıştır (Sarkar and Li, 2004). Genellikle, *Cruciferae* familyası bitkilerine özgü başka bir temel madde grubu da glukosinolatların antioksidan etkileri yapılan çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Klanakarın, 2006).

En fazla anomaliye *Av* ekstresinin 10 ppm MMS içeren 3.2 gL^{-1} dozunun 24 saat uygulamasında (56.00 ± 5.29), en az anomaliyi ise 10 ppm MMS içeren 0.8 gL^{-1} dozunun 24 saatlik uygulamasında (47.40 ± 8.79) rastlanılmıştır. Kalgın kromozom olayı tüm saat ve doz uygulamalarında en fazla görülen anomalidir. En fazla % 98.48 oranında 10 ppm MMS içeren 1.6 gL^{-1} dozunun 48 saatlik uygulamasında rastlanmıştır. Bu bozukluk *Av* ekstresinin mikrotübül oluşumunu etkilemesi sonucunda kaynaklanmış olabilir (Kumari et al., 2009).

Bir pozitif mutajen olan MMS'e karşı kullanılan *Av-eks*'in tüm konsantrasyon ve süre uygulamalarında kromozom anomali yüzdesinin düştüğü belirlenmiştir. Bu etki bitkinin içeriğinde bulunması muhtemel olan indol-3-karbinol ve glukosinolat türevlerinden kaynaklanabilir. Bu antigenotoksik aktivitenin nedeninin tam olarak belirlenebilmesi için bitkinin kimyasal içerik analizi yapılmalıdır.

Sonuç olarak, endemik olan *Alyssum virgatum* türünün distile su ekstresi çalışmada kullanılmış olup *Allium* test ile antimutajenite ve antisitotoksik etkileri araştırılmıştır. Yapılan *Allium* test sonucunda kök uzama oranını kontrole göre belirgin bir şekilde azalttığı görülmüştür.

Kullanılan doza bağlı olarak MMS varlığında mitotik indekste artış meydana getirerek antisitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu sonuçların *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi bu ekstrenin etkinliğinin daha iyi anlaşılabilmesi açısından yararlı olacaktır. Ayrıca bu bitkinin etken maddelerinin tespit edilmesi ile içerik analizi yapılmış olmakla birlikte aktivite gösteren kimyasalları belirlenmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel N, Reeves RD, 2002. A new nickel-accumulating species of *Alyssum* (Cruciferae) from western Turkey. *Edinburg Journal of Botany*, 59(2): 215-219.
- Almokhtar A, Adwasa Abeer A, Elkhoelyb Ahmed M, Kabele MN, Abdel-Rahmane A, Eissab A, 2016. Anti-cancer and cardioprotective effects of indol-3-carbinol in doxorubicin-treated mice. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(1): 36-43.
- Antonsiewicz D, 1990. Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Ledakrin. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 28: 79-96.
- Babaoğlu S, Açıık L, Çelebi A, Adıgüzel N, 2004. Türkiye'nin bazı *Alyssum* L.(Brassicaceae) türlerinin RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemleri ile molekül analizleri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 17(3): 25-33.
- Bal Ş, 1995. *Datura stramonium* L. ve *Ureginea maritima* L. özularının *Allium cepa* L. kök ucu mitozu üzerinde sitolojik etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Brooks RR, 2000. Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals; Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. Brooks, R.R., CAB International, Cambridge, 1-14, 15-53, 153-180
- Cotelle S, Masfaraud JF, Ferard JF, 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research*, 426: 167-171.
- Çelik E, Çelik GY, 2007. Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5: 1-6.
- Çubukçu B, Meriçli AH, Mat A, Sarıyar G, Sütlüpinar N, Meriçli F, 2002. Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı. İstanbul Üniv. Yayın no 4311, Eczacılık Fak. Yayın no 79.
- Davis PH, Mill RR, Tan K, 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands . *Edinburgh*, 10: 50-54.
- El-Shabbaby OA, 2003. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal Biology Science*, 6: 23-28.
- Erdoğan O, 2005. Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Fidelerinde Nikel Toksitesinin Humik Asit İle Azaltılması Üzerine Bir Araştırma Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.
- Eren Y, 2011. Bazı *Limonium* Türlerine ait Bitki Ekstrelerinin Mutajenik Etkilerinin Farklı Test Sistemleri ile Belirlenmesi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Eren Y, 2016. Mutagenic and cytotoxic activities of *Limonium globuliferum* methanol extracts. *Cytotechnology*, 68(2): 115-2124.
- Fiskesjö G, 1985. The *Allium* as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102: 99-102
- Fuskoni A, Repetto O, Bona E, Massa N, Gallo C, Dumas-Gaudot E, Berta G, 2006. Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environmental Experimental Botany*, 58: 253-260.
- Gadano AB, Gumi AA, Carballo MA, 2006. Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 246-251.
- Hidalgo A, Gonzales JA, Navas P, Garcia-Herdugo G, 1989. Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by probham and chlorprobham. *Cytobios*, 57: 7-17.
- Klanakaran S, 2006. Bioactive glucosinolates and antioxidant properties of broccoli seeds cultivated in Thailand. *Journal Science Technology*, 28(1): 55-61.
- Kramer U, Charnack JM, Baker AJM, 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379: 635-638.
- Kumari M, Mukherje A, Chandrasekaran N, 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 407: 5243-5246.
- Menke M, Chen I, Angelis KJ, Schubert I, 2001. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutation Research*, 493: 87-93.
- Nicoloff H, Kappas A, 1987. Binomial induced mitotic disturbances in *Hordeum vulgare*. *Mutation Research*, 38: 53-70.
- Özay C, 2015. Ege bölgesi'ndeki bazı *Alyssum* L. taksonlarının biyolojik aktivitelerinin incelenmesi ve aktif bileşenlerinin karakterizasyonu, Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- Reeves RD, Adıgüzel N, 2004. Rare plants and nickel accumulators from Turkish serpentine soils, with special reference to centaurea species. *Turkish Journal of Botany*, 28(1/2): 147-153.
- Reeves RD, Adıgüzel N, 2008. The nickel hyperaccumulating plants of the serpentines of Turkey and adjacent areas: a review with new data. *Turk Journal Biology*, 32: 143-153.
- Sarkar FH, Li Y, 2004. Indole-3-carbinol and prostate cancer. *Journal Nutrition*, 134: 3493-3498.
- Simaan JA, 2009. Herbal medicine, what physicians need to know. *Lebanese Medical Journal*, 57: 215-217.
- Sofowora A, 1999. *The state of medicinal plants research in Nigeria*, In: Proceeding of workshop held at Ile-Ife, Nigeria, 1-373