

Bazı Kimyasal Maddelerin (*Azametifos, Diklorvos, Metil parathion, Aflatoksin B₁*) Mutajenik Etkisinin *Drosophila melanogaster*'de SMART Yöntemi ile Araştırılması

Selma EKEBAŞ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Şükran ÇAKIR

Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale-TÜRKİYE

Okan ERTUĞRUL

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Aykut KENCE

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 09.06.1999

Özet : Bu çalışmada Veteriner Hekimlikte ve tarımsal alanlarda kullanılan bazı kimyasalların (*Azametifos, Diklorvos, Metil parathion*) mutajenik etkileri Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırıldı. SMART yöntemi işaret genleri taşıyan heterozigot sinek kanatlarının hücre fenotipi üzerine kimyasalların etkisini gözlemek ilkesine dayanıyordu. Kullanılan kimyasalların letal dozları belirlendi. Toplam mutasyon ve mutasyon gözlenen kanat sayısı arasında pozitif bir korelasyon gözlemlendi. Ayrıca gözlenen mutasyonlar, kanat başına mutasyona uğramış hücrelerin oluşturduğu kümelerin sayısına ve mutasyon tiplerine göre sınıflandırıldı ve istatistiksel analizler yapıldı. Kullanılan kimyasalların genotoksik etkilerine göre *Diklorvos, Metil parathion* ve *Azametifos* şeklinde sıralandığı belirlendi. Bu çalışma, pestisidlerin insan ve çevre sağlığı için oluşturacağı zararlı etkilerden korunmak için, pestisid kullanımının elverdiği kadar az indirgenmesinin gerekliliğini ve eğer kullanım zorunlu ise pestisidlerin doğru kullanımının çok önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: *Drosophila melanogaster*, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, genetik toksikoloji

The Detection of Mutagenic Activity of Some Chemicals (*Azamethyphos, Dichlorvos, Methyl parathion, Aflatoxin B₁*) by SMART *Drosophila melanogaster*

Abstract : In this study mutagenic effects of some chemicals used in Veterinary Medicine and agricultural fields was investigated by Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). SMART test was to observe the chemical effects on wing phenotype of the trans- heterozygote flies carrying marker gene. Lethal doses of the chemicals used were determined. A positive correlation was observed between total mutation and the number of wings having mutations. In addition, the observed mutations were classified according to the size and the type of the mutations per wing. Chemicals used were ranked as *Dichlorvos, Methyl parathion, Azamethyphos* according to their genotoxic effects. The present study pointed out that the correct administration of pesticides has significant effect on human and environmental health which are under the threat of hazardous pesticide residues.

Key Words: *Drosophila melanogaster*, somatic mutation and recombination test, genetic toxicology

Giriş

Bazı kimyasal maddelerin mutajenik etkileri *Drosophila*'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile 15 yıldan beri araştırılmaktadır. *Drosophila* birçok özellikleri nedeniyle genetik çalışmalarda sıklıkla kullanılan ökaryotik bir organizmadır. Veteriner Hekimlikte ve tarımsal mücadelede çeşitli pestisidler yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğada kimyasal kirlenmeye

neden olan bu maddeler, canlılar arasındaki besin zincirleri ya da doğrudan kontaminasyon ile insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu kimyasal maddeler canlılarda metabolik aktivitenin bozulmasına, DNA molekülünde kırılma ve kopmalara neden olabilmektedir (1, 2, 3).

SMART tekniği çeşitli kimyasalların etkisine bırakılan mutant işaret genleri nedeniyle heterozigot fenotipe sahip larvalardan oluşan ergin sineklerin kanat hücrelerindeki

mutajenik etkinin fenotipde gözlenmesine dayanır. Fenotipik olarak gözlenen mutasyon tipleri mutasyona uğramış hücre sayılarına ve şekillerine göre S 1-2 (small single spot), S>2 (large spot), t (twin) şeklinde sınıflandırılmış olup bu oluşumların rekombinasyon, delesyon, ve nokta mutasyon gibi mitotik bölünme sonuçlarına bağlı olduğu belirtilmiştir. Uygulama açısından büyük kolaylıklar içeren bu teknikte *Drosophila*'nın göz, kanat gibi organları incelenerek kimyasalların genotoksik etkileri araştırılır (2, 4, 5). Kimyasal maddelerin genotoksik etkilerini belirlemede mikrobiyal testler de yapılmaktadır. Memelilerde kimyasalların mutajenik etkilerinin belirlenmesinde ise ya doku kültürleri yapılmakta ya da direkt olarak küçük deney hayvanları kullanılmaktadır. Ökaryotik bir canlı olan *Drosophila* ile elde edilen mutajenite test sonuçları, kimyasalların diğer ökaryotik canlıların metabolizmaları üzerinde yapabilecekleri değişiklikler hakkında önemli ipuçları verebilmektedir (1, 6, 7). Heterozigot bireylerde kimyasalların mutajenik etkilerinin gözlenmesiyle ortamda bulunan kimyasal kalıntılarının canlıları ne oranda etkileyebileceği belirlenebilmektedir (8).

Pestisid bileşikleri tüm canlılarda enzim metabolizmasını etkiler. Asetilkolini hidrolitik parçalanmaya uğratan Asetilkolinesteraz (Ak E) etkinliğinin engellenmesi, asetilkolinden meydana gelen zehirlenmeye sebep olur. Organik fosforlu ve karbomat türevi insektisidlerin bu tür bir etkiye neden oldukları bilinmektedir (9, 10, 11). Organik fosforlu pestisidlerden *Metil parathion*'u farklı şekilde uygulamalarına rağmen bu çalışmada olduğu gibi genotoksik etkisini gözlemleyen araştırmalar vardır (12, 13). Aynı testle yapılan çalışmalarda *Diethylnitrosamine* ve *Urethane*'in genotoksik etkileri ölçülerek mutajen bulunmuştur (14, 15). Ayrıca *Sumithion*' da bu yöntemle araştırılmış ve doza göre mutajenik etkinin artışı gözlenmiştir (16). Karbomatlı fungusid olan *Ziram* maddesi de bu yöntem ile denenmiş ve yine doza bağlı mutasyon artışı belirtilmiştir (17). *Bacillus thuringiensis*'den elde edilen ve böcek öldürücü ajan olarak kullanılan β -*Exotoxin*'in genotoksik etkisinin olmadığı bu testlerle tespit edilmiştir. Bu maddenin RNA sentezini uyardığı ve dişilerin bu doza daha dayanıklı olduğu açıklanmıştır (18). Yapılan çalışmada, Krom 3 ve Krom 4 ağır metallerinin genotoksik etkisi bu yöntemle araştırılmıştır. Kanat analizleri sonucunda mitotik rekombinasyona bağlı fenotipik farklılıklar gözlenmiştir (19).

Bu yöntemle sadece kimyasalların değil bazı baharat ve içeceklerin de genotoksik etkisi test edilmiştir. Örneğin Graf ve ark., (20) yaptıkları çalışmada İspanya orjinli farklı markalardan beş şarap, bir brandi, üç bitki çayı ve siyah çayın SMART yöntemi ile genotoksik etkisini araştırmışlardır. Sonuçta şaraplardan bir tanesinin genotoksik etkisinin olduğu bulunmuştur. Bitkisel orjinli içeceklerde bulunan *flavonoid* maddesinin genotoksik etki yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca yaygın içeceklerden olan kahvenin iki konsantrasyonunun mutajenik etkileri SMART yöntemi ile araştırılmış ve yüksek konsantrasyonlu kahve uygulamalarında kahve içinde bulunan *kafein*'in genotoksik etkisi gözlenmiştir (5, 21). Bu yöntem acı bakla, karabiber, kimyon, rezene çayı v.b. maddelerde uygulanarak genotoksiteleri araştırılmıştır. Acı baklanın aseton ile ekstrakte edilmesi ile elde edilen maddenin ergin *Drosophila*'larda genotoksik etkisinin fazla olduğu görülmüştür (22).

Bu çalışmanın amacı, insan hayatında dezenfektan, insektisid ve genel sağlık koruyucusu olarak kullanılan organik fosforlu pestisidlerden *Diklorvos* (*Dichlorvos*, *DDVP*), *Parathion metil* (*Parathion-methyl*), *Azametifos* (*Azamephos*) ve mikotoksin olan *Aflatoksin B₁*'in (bu madde, bilinen genotoksik etkisinin diğer kimyasalların oluşturacağı mutasyonlar ile karşılaştırılması amacıyla kullanılmıştır) genotoksik etkisinin Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon testi ile araştırmaktır.

Materyal ve Metot

***Drosophila* Mutant stokları;** Çalışmada *Drosophila*'nın iki mutant soyu, *mwh* ve *flr³* (*flr³/In(3LR) TM³ Bd*) soyları kullanılmıştır. Genotipik olarak homozigot çekinik durumda olan multiple wing hair (*mwh*) geninin 3. kromozom üzerindeki yeri 0.0'dır. Kanat hücrelerinde normalde tek hücreden tek kıl çıkması gerekirken birden fazla kıl çıkmasına neden olur. İkincisi flare (*flr*) işaret geninin 3. kromozomdaki yeri 39.0'dır. Fenotipte körelmiş kıl şeklinde görülür. İşaret geni *flr* homozigot olduğunda letal olup TM3 geni ile dengededir. Bu çalışmada *flr* soyu dominant Blade işaret geni taşımaktadır (23, 24).

Uygulama; Çalışmada, uygulama dozlarının belirlenebilmesi için genotoksik etkileri test edilen kimyasallardan *Azametifos* 4 saat 15ppm, *Diklorvos* 4 saat 5 ppm ve *Metil parathion* 4 saat 10 ppm değerlerinde letal etki

yaptığı gözlenip bu maddelerin uygulama doz ve süreleri Tablo 1'de verilmiştir. *Aflatoksin B₁* 'i çözmede kullanılan *DMSO* (*Di metil sülfoksit*) ve diğer kimyasalları çözmede kullanılan su ile kontrol deneyleri yapılmıştır.

Tablo 1. Kullanılan kimyasalların larvalara uygulanma şekli.

Kullanılan kimyasallar	Larva yaşı	Uyg. Süresi (saat)	Dozları
Azametifos (% 50)	72 saat	2-4	5-10-15 ppm
Diklorvos (%95)	72 saat	2-4	1,5-3-5 ppm
Metil-parathion (%80)	72 saat	2-4	2,5-5-7-10 ppm
Aflatoksin B1 (% 100)	72 saat	4	0,16 Mm

Mutant soylardan *mwh* virjin dişilerle, *flr³* erkeklerin çaprazlanmasıyla heterozigot larvalar elde edilmiştir. Test edilen kimyasal maddeler, larvalar 72 saatlik olduklarında Graf ve ark.'nın (4) yöntemine göre uygulanmıştır. Kimyasal uygulamadan sonra larvalar normal besi ortamına alınmıştır.

Kanat prepratlarının hazırlanması ve mikroskopik analizi; Ergin hale gelen sinekler blade ve normal kanat fenotipine göre ayırt edilmiştir. Normal fenotipli kanatlar mikroskop altında sinekten ayrılarak lam üzerine yerleştirilmiş ve Faurse solüsyonu ile kanat prepratları hazırlanmış daha sonra 400X büyütmede mikroskopik analizi yapılarak kanat başına mutasyona uğramış hücre sayısı ve çeşidi belirlenerek hücreler arasındaki ayırım gözlenmiştir (4). Mutasyonun oluşum şekline göre, mutasyona uğramış hücre kümesinde 1-2 hücre olduğunda küçük küme (S 1-2, small single spot), 3-4 hücre olduğunda büyük küme (S>2 large spot) olarak sınıflandırma yapılmıştır. Mutasyona uğramış hücre kümesinde *mwh* ve *flr* fenotipinin her ikisinin de birlikte gözlemlendiği kümeler ise t tipi (twin) şeklinde sınıflandırılmıştır. Mutasyona uğramış hücre kümeleri ve mutasyon tipleri sayılarak sonuçların istatistik analizleri χ^2 testi uygulanarak yapılmıştır.

Bulgular

Kimyasal maddelerin farklı süre ve dozlarda sinek kanatlarında oluşturdukları mutasyon tipleri ve canlı kalma oranı Tablo 2'de verilmiştir. *Azametifos*' un 4 saat

ve 10 ppm'lik doz uygulamasında larvaların canlı kalma oranı %32.3; 5 ppm doz uygulamasında %65.3 olarak saptanırken 2 saat 15 ppm'de canlı kalma oranı %13.3; 10 ppm'de %48.3 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Azametifos'un 2 saat ve 15 ppm'lik doz uygulamasında S 1-2 mutasyon tipinde görülen hücre kümesi kanat başına 0.15 olurken, S>2 mutasyon tipinde 0.1, t tipinde ise 0.03 olarak belirlenmiştir. Aynı sürede 10 ppm'lik uygulama sırasında kanat başına hücre kümesi S 1-2 mutasyon tipinde 0.28, S>2 tipinde 0.04 ve t mutasyon tipinde 0.02 olarak belirlenmiştir. Bu kimyasal maddenin 4 saat ve 10 ppm'lik doz uygulamalarında kanat başına S 1-2 tipi mutasyonun görüldüğü hücre kümeleri 0.97, S>2 tipi 0.15 ve t tipi 0.02 olurken, 5 ppm'lik doz uygulamasında kanat başına mutasyona uğramış hücre kümesi S 1-2 mutasyonunda 0.31, S>2 tipi 0.07; t tipinde 0.01 olarak belirlenmiştir. *Diklorvos*'un 4 saat 3 ppm'lik doz uygulanmasında larvaların canlı kalma oranı %43; 1.5 ppm'lik dozda %76.6 olarak saptanırken 2 saat 3 ppm'lik uygulamada %28.6; 5 ppm'lik uygulamada %50 olarak saptanmıştır (Tablo 2).

Metil parathion uygulamasında 4 saatlik sürede üç farklı doz uygulanmış ve 7 ppm'lik dozda larvaların canlı kalma oranı %40; 5 ppm'lik dozda % 46; 2.5 ppm'lik uygulamada %57 olarak belirlenmiştir. Bu kimyasal maddenin 2 saat ve 10 ppm'lik uygulamasında larvaların canlı kalma oranı %35.3 olarak saptanmıştır (Tablo 2). Kontrol olarak kullanılan 4 saatlik su uygulanmasında larvaların canlı kalma oranı %78 olurken, *DMSO*'da %2'lik dozda canlı kalma oranı %54 olarak saptanmıştır. *Aflatoksin B1*'in 4 saatlik 0.16mM doz uygulamasında ise larvaların canlı kalma oranı %49 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Diklorvos'un 4 saatlik uygulamasında 1,5 ppm'lik dozunda S 1-2 mutasyon tipinde oluşan mutasyon hücre kümesi 0.29, S>2 tipinde 0.02; t tipi mutasyon rastlanmazken; 3 ppm'lik uygulamasında S 1-2 mutasyon tipi hücre kümeleri kanat başına 0.63, S>2 tipi 0.05 ve t tipi 0 olarak belirlenmiştir. Bu kimyasal maddenin 2 saat 3 ppm'lik dozunda S 1-2 mutasyon tipi hücre kümesi kanat başına 0.29, S>2 mutasyon tipi 0.02 olup t mutasyon tipi gözlenmemiştir. Aynı kimyasal maddenin 5 ppm'lik uygulamalarında S 1-2 mutasyon tipi hücre kümesi kanat başına 0.29 oranında belirlenirken S>2 tipi 0.05 ve t tipi 0.01 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin farklı süre ve dozlarda sinek kanatlarında oluşturdukları mutasyon tipleri ve yüzdeleri.

Kimyasallar	Süre (saat)	Doz (pm)	Toplam Kanat sayısı	Mutasyon Tipleri									Toplam Mutasyon	Mutasyon gözlenen kanat sayısı	Ort. yaşam %
				S 1-2			S > 2			t					
				Kanat Başına Hücre Kümesi	Hücre Sayısı/ hücre kümesi	Hücre Sayısı	Kanat başına hücre kümesi	Hücre sayısı/ hücre kümesi	Hücre sayısı	Kanat başına hücre kümesi	Hücre sayısı/ hücre kümesi	Hücre sayısı			
Aflatoksin-B ₁	4	0.16 mM	100	0.47	1.21	0.57	0.08	3.00	0.24	0.05	2.20	0.11	60	44	49
DMSO	4	% 2	100	0.17	1.70	0.29	0.04	4.25	0.17	0.02	4.00	0.08	23	20	54
Su kontrol	4	Su	100	0.22	2.05	0.45	0.04	3.00	0.12	0.02	2.50	0.05	28	23	78
Azametifos	2	15	40	0.15	0.73	0.11	0.10	1.60	0.16	0.03	1.33	0.04	11	9	13.3
		10	100	0.28	1.14	0.32	0.04	5.75	0.23	0.02	5.50	0.11	34	27	48.3
	4	10	100	0.97	1.22	1.11	0.15	6.66	1.00	0.02	3.00	0.06	114	65	32.3
Diklorvos	4	5	100	0.31	1.29	0.40	0.07	6.57	0.46	0.01	5.00	0.05	39	28	65.3
		1.5	100	0.29	1.31	0.38	0.02	5.00	0.10	0	0	0	31	25	76.6
	3	100	0.63	1.14	0.72	0.05	5.80	0.29	0	0	0	68	44	43	
Metil parathion	2	3	100	0.29	1.31	0.38	0.02	4.00	0.08	0	0	0	31	21	28.6
		5	100	0.29	1.17	0.34	0.05	6.00	0.30	0.01	2.00	0.02	35	22	50
	4	7	100	0.53	1.18	0.63	0.02	4.00	0.08	0	0	0	55	34	40
2	5	100	0.57	1.19	0.68	0.09	6.66	0.60	0.02	10.00	0.20	68	40	46	
	2.5	100	0.44	1.11	0.49	0.04	6.25	0.25	0	0	0	48	37	57	
2	10	100	0.31	1.22	0.38	0.04	3.75	0.15	0.02	5.50	0.11	37	31	35.3	

S 1-2: Mutasyon hücre sayısı 1-2.

S >2: Mutasyon hücre sayısı >2.

t: İki fenotipin birlikte (*mwh+flr*) gözlenmesi.

Metil parathion'un 4 saatlik uygulamasında kanat başına S 1-2 mutasyon tipi hücre kümesi 7 ppm dozda 0.53, 5ppm'de 0.57, 2.5 ppm'de 0.44; S>2 mutasyon tipinde ise sırasıyla 0.02; 0.09; 0.04 olarak belirlenmiştir. t mutasyon tipi 2.5 ve 7 ppm'lik dozlarda gözlenmezken 5 ppm'lik dozda 0.02 oranında saptanmıştır. Kontrol olarak kullanılan suyun 4 saatlik uygulamasında kanat başına S 1-2 mutasyon tipi hücre kümesi 0.22; S>2 mutasyon tipi hücresi 0.04, t tipi hücre kümesi 0.02 oranında olmuştur. DMSO'nun 4 saatlik uygulamasında kanat başına mutasyona uğramış hücre kümesi farklı mutasyon tiplerinde yukarıdaki sıralamaya göre 0.17; 0.04; 0.02 şeklinde belirlenmiştir. *Aflatoksin B₁*'in 4 saatlik uygulamasında kanat başına S 1-2 mutasyon tipi hücre kümesi 0.47; S>2 mutasyon tipi hücre

kümesi 0.08 ve t mutasyon tipi hücre kümesi ise 0.05 olarak saptanmıştır (Tablo 2).

Kimyasal maddelerin yakın doz uygulamalarında iki farklı sürenin etkisinin istatistiki açıdan önemli olup olmadığı χ^2 testi ile belirlenip Tablo 3'de gösterilmiştir. *Azametifos*'un 10 ppm'lik doz uygulamasında 2 ve 4 saatlik sürelerde mutasyon gözlenen kanat sayısı açısından süreler arasındaki fark istatistiki olarak önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. *Azametifos* 4 saat 10 ppm dozunun uygulama sonuçlarında toplam mutasyon yönünden değerlendirilememesi nedeni, mutasyona uğrayan hücre kümelerinde, mutasyona uğramış hücre küme sayısının 114 olmasına bağlı olarak χ^2 testi uygulanmasına olanak vermemesinden kaynaklanmıştır. *Azametifos* 4 saat 10

Kimyasallar	Süre (saat)	Doz (ppm)	Toplam mutasyon%	Mutasyon gözlenen kanat sayısı%
<i>Azametifos</i>	2	10	34	27
<i>Azametifos</i>	4	10	114	65
χ^2 değeri**			••	29,07*
Diklorvos	2	3	31	21
Diklorvos	4	3	68	44
χ^2 değeri**			27,38*	12,06*
<i>Metil parathion</i>	2	10	37	31
	4	7	55	34
χ^2 değeri**			6,5*	0,21

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasalların yakın dozlarının süre ile ilişkisinin χ^2 testi ile karşılaştırılması.

* p < 0,05 önemli

•• *Azametifos* 4 saat 10 ppm analiz dışı bırakılmıştır.

** χ^2 Serbestlik derecesi 1'dir.

ppm dozu mutasyon gözlenen kanat sayısına göre önemli (p<0,05) bulunmuştur. *Diklorvos*'un 3 ppm'lik 2 ve 4 saat sürelerindeki uygulamalarında ise toplam mutasyon ve mutasyon gözlenen kanat sayısı açısından fark istatistik açıdan önemli (p<0,05) olarak belirlenmiştir.

Yukarıdakilere benzer bir karşılaştırma yapmak amacıyla *Metil parathion*'un 4 saat 7 ppm ve 2 saat 10 ppm'lik dozları birbirine yakın değerler olduğundan bir fikir vermesi açısından karşılaştırma yapılmış ve karşılaştırma sonucunda toplam mutasyon açısından fark istatistik açıdan önemli bulunurken (p<0,05), mutasyon

gözlenen kanat sayısı açısından fark istatistik olarak önemli bulunmamıştır (Tablo 3).

Araştırmada uygulanan kimyasal maddelerin çeşitli süre ve dozlarda oluşturdukları toplam mutasyon, mutasyon gözlenen kanat sayısı, kontrol grubu olarak kullanılan su ile χ^2 testi yapılarak istatistik açıdan aralarında fark olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. *Azametifos*'un 4 saat 5 ppm'lik uygulanması sonunda oluşan toplam mutasyon ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli (p<0,05) bulunmuştur (Tablo 4).

Kimyasallar	Süre saat	Doz (ppm)	Toplam mutasyon%	Mutasyon gözlenen kanat sayısı%
Su kontrol (100 kanat)	4		28	23
<i>Azametifos</i>	4	10	114••	65
χ^2 Değeri**			-	50,45*
<i>Azametifos</i>	4	5	39	28
χ^2 Değeri**			4,90*	0,90
Diklorvos	4	1,5	31	25
χ^2 Değeri**			0,67	0,15
Diklorvos	4	3	68	44
χ^2 Değeri**			47,71*	14,00*
<i>Metil parathion</i>	4	7	55	34
χ^2 Değeri**			23,50*	4,13*
<i>Metil parathion</i>	4	5	68	40
χ^2 Değeri**			47,71*	9,42*
<i>Metil parathion</i>	4	2,5	48	37
χ^2 Değeri**			13,80*	6,53*
DMSO %2	4		23	20
Aflatoksin 0,16mM	4		60	44
χ^2 Değeri**			28,19*	13,24*

Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasalların süre-doza ilişkisinin χ^2 testi ile anlamlılık düzeylerinin belirlenmesi (Kimyasallar kendi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır).

•• *Azametifos* 4 saat 10 ppm analiz dışı bırakılmıştır.

* p < 0,05 önemli

** χ^2 Serbestlik derecesi 1'dir.

Diklorvos'un 4 saatlik uygulanmasında 3 ppm'lik dozu ile kontrol grubu arasındaki fark hem toplam mutasyon hem de mutasyon görülen kanat sayısı açısından istatistik olarak önemli ($p < 0,05$) bulunurken, 1.5 ppm'lik uygulama arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 4).

Metil parathion'un 4 saat süreli tüm doz uygulamalarındaki kontrol grubu arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur (Tablo 4). Kimyasal uygulamalarda toplam mutasyon ve mutasyon gözlenen kanat sayısı arasında korelasyon 0,97 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu su ile karşılaştırılan diğer kimyasal maddelerin aksine, *Aflatoksin B₁* solüsyonu %2'lik DMSO ile hazırlandığı için, *Aflatoksin B₁*, DMSO ile yapılan uygulama sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bu iki maddenin oluşturduğu toplam mutasyon ve mutasyon gözlenen kanat sayısı açısından aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur (Tablo 4).

Tartışma ve Sonuç

Pestisid ve diğer kimyasalların ortamda bıraktıkları artıkların doğrudan ya da dolaylı olarak insan sağlığını etkilediği bilinir. Bu nedenle yaygın kullanılan kimyasallardan pestisidlerin genotoksik etkisi birçok bilim adamı tarafından araştırılmaktadır. Organik fosforlular grubuna giren pestisidlerin de hayvan ve bitkilerde az ya da çok birikici ve teratojenik etkisi vardır (2, 7, 11, 19). Bu grup kimyasal madde kalıntılarının engellenmesi biyolojik çevrenin korunması açısından önemlidir. Bu çalışmada kimyasal maddelerin, heterozigot 72 saatlik larvalarda, somatik hücre bölünmesini etkilemesi sonucu, ergin kanatlarında oluşan mutasyona uğramış hücrelerin farklı fenotipleri ayırt edilmiştir. Mutasyona uğramış hücre kümelerindeki ortalama hücre sayısı bulunarak mutasyonlar önceden belirtildiği gibi S 1-2, S>2 ve t olarak sınıflandırılmıştır.

Çalışmada, kimyasal maddelerin genotoksik etkileri sonucu meydana gelen ve kanat başına hücre sayısının hücre kümesine göre mutasyon oranları (Tablo 2) S 1-2 mutasyon tipi için 1.11-2.05, S>2 mutasyon tipi için 1.60-6.66 ve t mutasyon tipi için 0-10 arasında bulunmuştur. Kullanılan kimyasalların uygulanan bütün dozları ve kontrol gruplarında en sık rastlanan mutasyon tipi S 1-2 olarak gözlenmiştir. S 1-2 mutasyon tipi hücrelerin mutasyondan sonra daha az sayıda hücre bölünmesi geçirildiğini göstermektedir. Kimyasalların yaptıkları mutajenik

etkilerine göre sıralanmasında *Azametifos* 4 saat 10 ppm'de, *Diklorvos* 4 saat 3 ppm'de, *Metil parathion* 4 saat 5 ppm uygulamalarında S 1-2 kanat başına hücre kümesi açısından değerler yüksek bulunmuştur. İkiden fazla mutasyona uğramış hücre içeren S>2 tipi hücreler ise *Azametifos*'un 4 saat 10 ppm dozu ile *Diklorvos*'un 4 saat 3 ppm, 2 saat 5 ppm dozları ve *Metil parathion*'un 4 saat 7 ppm doz uygulamalarında yüksek bulunmuştur. Hem *mwh* hemde *flr³* fenotiplerinin aynı mutant hücre kümesinde görüldüğü t (twin) tipi mutasyon *Azametifos*, *Diklorvos*, *Metil parathion* için normal değerlerde bulunurken, *Aflatoksin B₁*'de yüksek bulunmuştur. Rekombinasyona bağlı olarak heterozigot bireyde farklı fenotip özelliklerinin bir araya gelme olasılığı düşüktür. t tipi mutasyonda ise her iki fenotip özelliğinin birlikte gözlenebilmesi yukarıdaki açıklamaya bağlı olarak diğer mutasyon tiplerine göre daha az sıklıkta olmaktadır.

Kimyasal uygulamalarda letal etkinin yüksek olması, mutajenik etkinin gözleneceği birey sayısını azalttığından mutajenik etkinin olduğundan daha düşük bulunmasına neden olabilmektedir. Örneğin bu çalışmada *Metil parathion*'un 7 ppm doz uygulamasında letalitenin yüksekliği nedeniyle mutasyon oranı 5 ppm doz uygulamasından daha düşük bulunmuştur (Tablo 2).

Toplam mutasyonla mutasyon gözlenen kanat sayısı arasındaki korelasyon katsayısı oldukça yüksek bir değere ve bire yakın 0.97 olarak hesaplanmıştır. Bu durum beklenen bir sonuçtur. Kimyasal maddelerin çeşitli süre ve dozlarda oluşturdukları toplam mutasyon ve mutasyon gözlenen kanat sayısına göre *Azametifos* 4 saat 5 ppm uygulamasında toplam mutasyonun, *Diklorvos* 4 saat 3 ppm uygulamasında toplam mutasyon ve mutasyon gözlenen kanat sayısının, *Metil parathion*'da ise 4 saat süreli tüm doz uygulamalarında toplam mutasyon ve mutasyon gözlenen kanat sayısının önemli olduğu belirlenmiştir. Yaşam yüzdelerine etkisi birbirlerine yakın olmasına rağmen DMSO'nun *Aflatoksin B₁*'e göre daha az mutasyon oluşturduğu gözlenmiş ve toplam mutasyon, mutasyon gözlenen kanat sayısı yönünden ikisi arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur. Bu çalışmada *Aflatoksin B₁*'in, Graf ve arkadaşlarının (4) belirttiği gibi, mutajenik etkisinin yüksek olduğu görülmüştür.

Genel olarak bu çalışmada kullanılan organik fosforlu pestisidlerin mutajenik etkileri, süre ve dozları göz önüne alınarak *Diklorvos*, *Metil parathion* ve *Azametifos* şeklinde sıralandırılmıştır. Kullanılan pestisidlerin genotoksik etki-

lerinin uygulanan süre ve dozla ilişkili olduğu tesbit edilmiştir. Pestisidlerin tümü fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle hedef alınından farklı ekosistemlerde de etkili olmakta, canlılar ve çevre üzerinde olumsuz etkiler

göstermektedir. Bu çalışma sonuçları, pestisidlerin Türkiye'de hedef zararlılara yönelik yaygın kullanımında insan ve çevre sağlığı için önemle göz önüne alınmasının gereğini vurgulamaktadır.

Kaynaklar

1. Würzler, E.F., Vogel, E.W.: In Vivo Mutagenicity Testing Using Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. pp.1-70. Plenum press 1986, New york and London.
2. Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A.J., Würzler, F.E.: Thirty compound tested in the *Drosophila* wing spot test. Mutation Research, 222, 359-373. 1989.
3. Bozcuk, A.N., Ünlü, H., İleri, N., Türet, M., Emecan, G., Özsoy, E.D.: Genetik dersi laboratuvar ders notları. Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü. 1995 Ankara.
4. Graf, U., Würzler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. AND Kale, P.G.: Somatic and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Environmental Mutagenesis 6:153-188, 1984.
5. Graf, U., Würzler, F.E.: Investigation of coffee in *Drosophila* Genotoxicity tests. Fd Chem. Toxic. Vol.24.No.8, pp.835-842, 1985.
6. Jenkins, B.J.: Genetic. Mutation and the gen concept. Vol:10, pp.:409-420. Houghton mifflin company, 1979. 2.edt. Boston.
7. Frolich, A., Würzler, F.E.: *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation Research, 234, pp.71-80. 1990.
8. Graf, U., Schaik, N.V.: Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research, 271, pp. 59-67. 1991.
9. Şanlı, Y., Kaya, S., Princi.İ., Yavuz, H., Baydan, E., Demet, Ö., Bilgili, A.: Pestisidler. Veteriner Klinik Toksikoloji. Bölüm 2, konu 13. s.187-328, 1995. Ankara.
10. Toros, S., Maden, S.: Tarımsal Savaşım Yöntem ve İlaçları. A.Ü. Ziraat fakültesi, Baskı ofset ünitesi, 89-98, 295-328. 1991, Ankara.
11. Öztürk, S.: Tarım İlaçları. Pestisidlerin sınıflandırılması, s.:57-60. Ak basımevi, 1997. Ankara.
12. Xamena, N., Velazquez, A., Batista-Alentorn, M., Creus, A.and Marcos, R.: Genotoxicity studies with four organophosphorus insecticides using the unstable white-zeste system of *Drosophila melanogaster*. Mutation Research. 204, pp.251- 256, 1988.
13. Valazquez, A., Xamena, N., Creus,A., Marcos, R.: Mutagenik Evaluation of the organophosphorus insecticides Methyl parathion and Triazophos in *Drosophila melanogaster*. Journal of Toxicology and Enviromental Health, 31.313-325, 1987.
14. Graf, U., Schaik, N.V.: Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research 271, pp. 59-67, 1992
15. Frolich, A., Würzler, F.E.: Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. Mutation Research 244, pp. 201-208, 1990
16. Tripathy, K.N., Patnaik, K.K.: Mutagenicity of sumithion tested in *Drosophila* somatic and germ cells. Mutation Research 260, pp. 225-231. 1991.
17. Tripathy, K.N., Majhi, B. and Das, C.C.: Genotoxicity of *Ziram* established through wing, eye and female germ-line mosaic assay and the sex-linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research 224, 161-169. 1989.
18. Marec, F., Matha, V.,Weiser, J.: Analysis of the Genotoxic Activity of *Bacillus thuringiensis* b-Exotoxin by Means of the *Drosophila* Wing Spot Test. Journal of Invertebrate Pathology 53, 347-353, 1989.
19. Graf, U.,Heo, O.S., Ramirez, O.O.: The genotoxicity of Chromium(VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 9690 due to mitotic recombination. Mutation Research, 266, 197-203, 1991.
20. Graf, U., Moraga, A.A., Castro, R., Carrillo, E.D.: Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. Fd Chem. Toxic. Vol. 32, No.5, pp:423-430. 1993.
21. Frei, H., Würzler, F.E.: Statitcal methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutation Research, 203, pp. 297-308. 1988.
22. Barakat, A.A., Fahmy, H.S.M., Kandil, M.A., Ebrahim, N.M.M.: Toxicity of the extracts of black-pepper, cumin, fennel, chamomille and lupin against *Drosophila melanogaster*, Indian Journal of Agricultural Sciences 55,2, pp.116-120, 1985.
23. Jones, R.N., Rickards, G.K.: Practical Genetics. *Drosophila* Genetics. Open University press, Milton Keynes, Philadelphia. Chapter 3, p. 48-83, 1990.
24. Sturtevant, A.M., Biehs, B., Marín, E., Bier, E.: The spalt gene links the A/P compartment boundry to a linear adult structure in the *Drosophila* wing. Development. 124, pp. 21,32. 1997.