

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORGANOFOSFORLU PESTİSİTLERİN ARPA BİTKİSİ
(*Hordeum vulgare* L.) ve ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
ÜZERİNDEKİ *in vitro* GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
COMET TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Tuba AKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN

2.DANIŞMAN

Doç. Dr. Nagihan GÜLSOY

İSTANBUL 2012

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORGANOFOSFORLU PESTİSİTLERİN ARPA BİTKİSİ (*Hordeum vulgare*
L.) ve ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) ÜZERİNDEKİ *in vitro* GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN COMET TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Tuba AKAN

(520109006)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN

2.DANIŞMAN

Doç. Dr. Nagihan GÜLSOY

İSTANBUL 2012

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL ve ONAY BELGESİ

Tuba AKAN'ın ORGANOFOBOSFORLU PESTİSİTLERİN ARPA BİTKİSİ (*Hordeum vulgare* L.) ve ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) ÜZERİNDEKİ *in vitro* GENOTOKSİK ETKİLERİNİN COMET TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI başlıklı Lisansüstü tez çalışması, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25/06/2012 tarih ve 2012/15-05 sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak Kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN (Marmara Üniversitesi) 

1. Üye : Prof. Dr. Ahmet Zehir (Marmara Üniversitesi) 

2. Üye : Doç. Dr. Lutfiye Eryılmaz (İstanbul Üniversitesi) 

Tezin Savunulduğu Tarih : 06/07/2012

ONAY

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nuntarih ve sayılı kararı ile.....'ın Anabilim Dalı Programında Y.Lisans (MSc.) derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Meral ÜNAL

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmamın yürütülmesinde ilgi ve anlayışıyla hep yanımda olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan ve benden her türlü desteğini esirgemeyen birinci tez danışmanım, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN'a, tez çalışmam boyunca bana destek olan, çalışmalarım sırasında benden yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen, ikinci tez danışmanım, sayın hocam Doç. Dr. Nagihan GÜLSOY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ZEHİR'e, desteğiyle her zaman yanımda olan sayın hocam Arş. Gör. Dr. Işıl İSMAİLOĞLU'na ve Marmara Üniversitesi'ndeki tüm hocalarıma, istatistik çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen İstatistik bölümü hocalarımdan Prof Dr. Müjgan TEZ ve Öğr. Gör. Dr. Deniz İNAN'a, çalışmalarımın her aşamasında ilgi ve destekleri ile bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Melek ADİLOĞLU ÖZTÜRK ve Ezgi ÇABUK ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, tez çalışmalarım sırasında gösterdikleri ilgi ve anlayışlarıyla beni yüreklendiren sevgili aileme tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi, BAPKO, FEN-C-YLP-031210-0286 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Haziran, 2012

Tuba AKAN

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	vi
SEMBOLLER	vii
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER	ix
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	2
II.1. Pestisitler.....	2
II.3. <i>Hordeum vulgare</i> L.	11
II.4. <i>Danio rerio</i>	15
II.5. Genotoksisite ve izlenmesi.....	16
II.6. Comet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	19
BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI.....	30
III.1. <i>Hordeum vulgare</i> L.	30
III.2. <i>Danio rerio</i>	32
III.3. COMET TESTİ HAZIRLIKLARI.....	32
III.4. BİTKİ MATERYALİNİN YETİŞTİRİLMESİ VE PESTİSİT UYGULANMASI.....	36
III.5. BALIK MATERYALİNİN LABORATUVAR ORTAMINA ALIŞTIRILMASI ve PESTİSİT UYGULANMASI	39
III.5.1. Balıkların laboratuvar ortamına alıştırılması	39
III.6. BİTKİ ve BALIK ÖRNEKLERİNE COMET TEKNİĞİNİN UYGULANMASI.....	41
III.6.1. Cometlerin Değerlendirilmesi.....	44
BÖLÜM IV. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	49

IV.1. PESTİSİT UYGULAMASI	49
IV.1.1. <i>Hordeum vulgare</i> L. pestisit uygulanması	49
IV.1.2. <i>Danio rerio</i> pestisit uygulanması	52
IV.2. COMET TESTİNİN UYGULANMASI	53
IV.2.1. <i>Hordeum vulgare</i> L. comet testinin uygulanması ve sonuçları.....	53
IV.2.2. <i>Danio rerio</i> comet testinin uygulanması ve sonuçları.....	53
BÖLÜM V. SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ	75

ÖZET

ORGANOFOSFORLU PESTİSİTLERİN ARPA BİTKİSİ (*Hordeum vulgare* L.) ve ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) ÜZERİNDEKİ *in vitro* GENOTOKSİK ETKİLERİNİN COMET TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma farklı süre ve konsantrasyonlardaki chlorpyrifos (CPF) pestisitinin arpa bitkisi (*Hordeum vulgare* L.) ve zebra balığı (*Danio rerio*) üzerindeki genotoksik potansiyelinin belirlenmesi için gerçekleştirildi. İki haftalık arpa fideleri negatif kontrol (Hoagland solüsyonu), pozitif kontrol (% 0,1 H₂O₂ içeren Hoagland solüsyonu) ve farklı konsantrasyonlardaki CPF (5 ml/L, 10 ml/L, 20 ml/L ve 40 ml/L) uygulanmış gruplardan 6., 12. ve 18. saatlerin sonunda yaprak örnekleri alınarak comet testi (tek hücre jel elektroforezi) ile incelendi. Çalışmada kullanılan balıkların tümü birbirine yakın boy (ortalama total boyu 4,7±0,1 cm) ve ağırlıktaki (ortalama ağırlığı 0,72±0,1 g) bireylerden seçildi. Negatif kontrol (boş akvaryum suyu), pozitif kontrol (% 0,05 H₂O₂ içeren akvaryum suyunda 1 saat süreyle) ve farklı konsantrasyonlarda (10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L ve 60 µg/L) CPF uygulaması yapıldı. Her doza ait gruplardan 24., 48., 72. ve 96. saatlerde ve kontrol gruplarındaki balıklardan kan örnekleri alınarak comet testi ile incelendi.

Arpa bitkisinde CPF uygulaması sonucu açığa çıkan ve comet ile belirlenen DNA hasar seviyelerinin, tüm saat ve dozlarda pozitif kontrol grubuna göre oransal olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. En yüksek DNA hasar seviyesi 6. saatte 5ml/L CPF (% DNA kuyruk: 55, Olive kuyruk momenti: 0.36) uygulamasında belirlendi (p<0,001). 6., 12. ve 18. saat sonunda elde edilen comet verileri karşılaştırıldığında süre artımı ile birlikte tüm gruplarda belirlenen DNA hasar seviyesinde azalmanın olduğu tespit edilirken, 12. saatteki 40ml/L CPF uygulamasına ait DNA hasar seviyesinde (% DNA kuyruk: 47, Olive kuyruk momenti: 0.29) 6. saatle karşılaştırıldığında (% DNA kuyruk: 39, Olive kuyruk momenti: 0.23) anlamlı bir artış olduğu izlendi.

Zebra balıklarında CPF maruziyeti sonunda tespit edilen DNA hasar seviyelerinin % DNA kuyruk oranlarına bakıldığında tüm saat ve dozlarda negatif

kontrol grubuna göre oransal olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. En yüksek DNA hasar seviyesi (% DNA kuyruk: 68) 96. saatte 60 µg/L CPF uygulamasında belirlendi ($p<0,001$). Süre artımı ile birlikte 60 µg/L CPF uygulaması yapılan grup dışındaki tüm gruplarda belirlenen DNA hasar seviyesinde lineer olmayan anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Olive kuyruk momenti sonuçlarında ise uygulama grupları ile negatif kontrol grupları arasındaki ikili karşılaştırmalarda tüm gruplarda DNA hasar seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olduğu gözlenirken, en yüksek DNA hasar seviyesi (olive kuyruk momenti: 0.51) 96. saatte 60 µg/L CPF uygulamasında belirlendi ($p<0.001$)

Bu tez çalışmasında elde edilen comet testi bulguları CPF pestisinin DNA kırıklarına neden olarak hem bitkilerde hem de balıklarda genotoksik etkiye sahip bir kimyasal ajan olduğunu ve farklı doz ve sürelerde genotoksik ajanlara maruz kalan her iki organizmada da farklı seviyelerde genotoksik etkilerin ortaya çıkabileceği tespit edildi. Comet analizlerinden elde edilen bulguların söz konusu pestisitinin kullanımında uygun dozların belirlenmesinin yanı sıra ilaçlama ve hasat zamanının belirlenmesi çalışmalarına katkı sağlayacağı umut edilmektedir.

Haziran, 2012

Tuba AKAN

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *in vitro* GENOTOXIC EFFECTS OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) AND ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

This research was performed to determine the genotoxicity potential of Chlorpyrifos at different concentrations and exposure times in barley and zebrafish. The genotoxic effects of CPF were evaluated by comet assay.

The barley seedlings were treated with negative control (Hoagland's solution), positive control (Hoagland's solution with % 0,1 H₂O₂) and different concentrations (5ml/L, 10ml/L, 20ml/L and 40 ml/L) of CPF for 6, 12 and 18h. Zebrafishes were treated negative control (dechlorinated tap water), positive control (dechlorinated tap water % 0,05 H₂O₂) and four different concentration of CPF (10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L ve 60 µg/L) for 24, 48, 72 and 96h.

In barley seedlings, the highest single stranded DNA breaks were determined for (Tail DNA %: 55, Olive tail moment: 0.36) 6h of 5ml/L CPF dosage. During the exposure time, although the linear decrease in DNA damage has been observed in leaves of barley, the DNA damage was increased in 40ml/L CPF for 12h (Tail DNA %: 47, Olive tail moment: 0.29).

Treatment of zebrafish groups, the highest DNA damage (Tail DNA %: 68) for Tail DNA % in the 96h of 60 µg/L CPF. In our experiments, it was observed that CPF produced a concentration-dependent increase in DNA single-strand breaks in the form of comet induction and time-dependent decrease in the damage ($p < 0.001$). Olive tail moment results in the comparison between the treatment groups and negative control groups, no significant change in levels of DNA damage that was observed in all groups, the highest level of DNA damage (Olive tail moment: 0.51) 96h of 60 µg / L CPF ($p < 0.001$).

Our research findings clearly indicated that CPF has genotoxic effects in barley and zebrafish. Comet analysis of the findings, as well as the determination of pesticide spraying and harvesting time of use to determine appropriate doses contributed to the work.

SEMBOLLER

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
DAPI	: 4,6- diamid-ino-2-phenylindole
g	: Gram
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
kg	: Kilogram
L	: Litre
LC₅₀	: %50 lethal concentration - %50 öldürücü konsantrasyon
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: milimetre
mM	: Milimolar
MNU	: N-Methyl-N-Nitrosurea
V	: Volt
YOYO-1	: Benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer

KISALTMALAR

CAS	: Chemical Abstract Service - Kimyasal Özet Servisi
CPF	: Chlorpyrifos
dH₂O	: Distile su
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EMS	: Etil metan sulfonat
EPA	: Environmental Protection Agency - Çevre Koruma Örgütü
EtBr	: Etidyum bromür
FeEDTA	: Demir etilen diamin tetra asetik asit
HMA	: High melting agarose - Yüksek kaynama dereceli agar
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
LMA	: Low melting agarose - Düşük kaynama dereceli agar
MN	: Mikronukleus
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
PBS	: Fosfat tamponu
TKP	: Trikloroprinidol
Tris-HCl	: Tris hidroklorik asit
TSCA	: Toxic substances control act – Toksik maddelerin kullanımı kılavuzu
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organisation – Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

SAYFA NO

Şekil II.1. Pestisitlerin ekosistemdeki bozunma sürecini gösteren diyagram (Pierzynski ve ark., 1994).....	6
Şekil II.2. CPF içeren ticari bir insektisit (DURSBAN*4) etiketi.....	10
Şekil II.3. Dünyadaki arpa üretiminin ülkelere göre dağılımı.....	11
Şekil II.4. MN testini gösteren mikrogram.....	17
Şekil II.5. Kardeş kromatidler arası parça değişimini gösteren mikrogram.....	18
Şekil II.6. Ames testi.....	18
Şekil II.7. Comet testinin genel aşamaları.....	21
Şekil II.8. DNA hasarına uğramış hücrede baş ve kuyruk oluşumu.....	24
Şekil II.9. Comet testi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri.....	24
Şekil III.1. Arpa bitkisinin (<i>Hordeum vulgare</i> L.) sistematiğdeki yeri.....	30
Şekil III.2. Zebra balığının (<i>Danio rerio</i>) sistematiğdeki yeri.....	31
Şekil III.3. Bu tez çalışmasında bitki ve balıkta comet analizi için takip edilen aşamalar.....	34
Şekil III.4. Yüzey sterilizasyonu ve çimlenme.....	35
Şekil III.5. Arpa bitkisi ve Zebra balığına Comet testinin uygulanması.....	39
Şekil III.6. BAB Bs Comet Görüntü İşleme ve analiz yazılımı işlem yapılacak pencere ve data listesi.....	42
Şekil III.7. İlk adım olarak çalışılacak olan objektifin seçilmesi.....	43
Şekil III.8. Obje düzen menüsü ile artefaktların silinmesi.....	45
Şekil III.9. Comet ölçümünün yapılması.....	44
Şekil III.10. Ölçüm değerlerine göre verilerin klasöre eklenmesi.....	45
Şekil III.11. Data listesi ve tüm istatistik yapılması.....	46
Şekil IV.1. Arpa fidelerine CPF uygulanması sırasında pH'da meydana gelen değişimler.....	47

Şekil IV.2. Arpa fidelerine CPF uygulanması sırasında elektrik iletkenliğinde meydana gelen değişimler.....	48
Şekil IV.3. Arpa fidelerine farklı doz ve sürelerde CPF ve pozitif kontrol olarak % 0,1 H ₂ O ₂ uygulanması sonucunda yapraklarda meydana gelen değişimler.....	49
Şekil IV.4. Zebra balıklarına CPF uygulanması sırasında pH' da meydana gelen değişimler.....	50
Şekil IV.5. Zebra balıklarına CPF uygulanması sırasında elektrik iletkenliğinde meydana gelen değişimler.....	51
Şekil IV.6. Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde CPF maruziyeti sonucunda arpa bitkisi hücrelerinde meydana gelen DNA göçünün floresan mikroskop görüntüleri.....	52
Şekil IV.7. Arpa bitkisinde farklı konsantrasyon ve sürelerde CPF maruziyeti sonucu meydana gelen DNA hasarı oranları (% DNA Kuyruk)	54
Şekil IV.8. Arpa bitkisinde farklı konsantrasyon ve sürelerde CPF maruziyeti sonucu meydana gelen DNA hasarı oranları (Olive kuyruk momenti)....	54
Şekil IV.9. Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde CPF maruziyeti sonucunda zebra balığı kan hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının floresan mikroskopta tespiti.....	57
Şekil IV.10. Zebra balığında farklı konsantrasyon ve sürelerde CPF maruziyeti sonucu meydana gelen DNA hasarı (% DNA Kuyruk).....	59
Şekil IV.11. Zebra balığında farklı konsantrasyon ve sürelerde CPF maruziyeti sonucu meydana gelen DNA hasarı (Olive kuyruk momenti).....	60

TABLolar

SAYFA NO

Tablo II.1. Pestisitlerin farklı özellikleri baz alınarak yapılan sınıflandırması.....	4
Tablo II.2. CPF'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	10
Tablo II.3. Arpa zararlıları, bitkide meydana getirdiği hasarlar ve alınacak kimyasal önlemler.....	13
Tablo II.4. Comet Yöntemi ile Farklı pH'larda belirlenebilen DNA hasar tipleri.....	21
Tablo II.5. Comet görüntü analizi programları ile elde edilebilecek çeşitli parametreler.....	25
Tablo III.1. Çalışmada kullanılan Arpa çeşidi Çetin 2000'in genel özellikleri.....	30
Tablo III.2. Yüksek ve düşük kaynama dereceli agarozların içerik ve hazırlanışları.....	32
Tablo III.3. Comet testinde kullanılan solüsyonlar, içerikleri ve hazırlanışları.....	33
Tablo III.4. Hoagland çözeltisi bileşenleri ve katalog numaraları.....	36
Tablo. IV.1. Arpa bitkisinden elde edilen comet görüntülerinin analizi sonucu % DNA kuyruk ve olive kuyruk momenti verileri.....	53
Tablo. IV.2. Zebra balıklarından elde edilen comet görüntülerinin analizi sonucu % DNA kuyruk ve olive kuyruk momenti verileri.....	58

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Tarım ürünlerinin eldesinde maksimum verim ve kalitenin sağlanması için zararlılarla mücadelede aktif olarak pestisitler kullanılmaktadır. Ancak tarımda pestisitlerin uzun yıllar sürekli uygulanması, zararlıların bu ilaçlara karşı dirençlerinin artmasına neden olmakta, dolayısıyla giderek artan bir pestisit kullanımı söz konusu olmaktadır. Yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda da pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri toprak, su ve havada kalabilmektedirler. Özellikle toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde aşağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyuna ve diğer su kaynaklarına ulaşabilmektedirler. Özellikle önerilen dozların üzerindeki kullanımlarda gerek hedef organizma ve gerekse besin zincirinde yer alan diğer organizmalarda pestisit maruziyeti ortaya çıkmaktadır. Bu durumu irdelemek amacıyla bu tez çalışmasında arpa bitkisi (*Hordeum vulgare* L.) ve zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) iki model organizma olarak belirlenmiştir.

Arpa kapalı rastığı ve arpa açık rastığı gibi hastalık etmenleri ile böcekler gibi zararlılar, ülkemizde yaygın olarak tarımı yapılan arpanın üretim ve kalitesini olumsuz yönde etkileyen nedenler arasında başta gelmektedir. Özellikle hububat hortumlu böceği (*Pachytychius hordei* Brulle) ve ekin kambur böceği (*Zabrus* spp.) arpanın kardeşlenme döneminde yaprak, sap ve başaklarıyla beslenmesi sonucunda buralarda delikler meydana gelmekte ve bu da önemli miktarda ürün kaybına neden olmaktadır. Arpa tarımında bu zararlılar ile mücadelede ise organofosforlu bir pestisit olan chloropyrifos (CPF) yaygın olarak kullanılmaktadır.

CPF maruziyetinin arpa ve zebra balığı gibi iki farklı model organizma üzerinde oluşturduğu potansiyel genotoksik etkileri *in vitro* koşullarda belirlenmesi ve biyoizleme açısından değerlendirilmesi amaçlandı.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. Pestisitler

Pestisitler bitki veya diğer canlılara zarar veren küçük hayvan, böcek, bitki vb. gibi zararlıları öldürmek, etkisiz hale getirmek, ortamdaki uzaklaştırmak veya zararlı etkilerini azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Dünyada 620 aktif madde içeren 20.000 den fazla pestisit türünün kullanımı yapılmaktadır. TSCA (Toxic Substances Control Act- Toksik Maddelerin Kullanım Klavuzu)'nın kimyasal envanter listesinde pestisitler 80.000 den fazla kimyasal madde içermekte ve her yıl bunlara ortalama 2.000 adet eklenmektedir. Ziraî mücadelede ve bunun dışında kullanımları sonucu bu maddeler serbest kalarak çevre döngüsüne girmektedirler. Böylece hem insan sağlığı, hem de ekosistem için risk oluşturmakta ve canlılar bu maddelere hava, içme suyu, gıda ve toz vasıtasıyla maruz kalmaktadır (www.epa.gov/pesticides).

Türkiye'de tarım ilacı tüketimi ortalama 33.000 tondur. Bu miktarın % 47'sini insektisitler, % 24'ünü herbisitler, % 16'sını fungusitler , % 13' ünü de diğer gruplar oluşturmaktadır (Şekil II.1) (Turabi, 2007). Türkiye'de 2008 yılı sonu itibariyle 4100 adet ruhsatlı pestisit bulunmaktadır. Ancak Avrupa Birliği (AB) mevzuatı uyum çalışmaları kapsamında olumsuz özellikleri nedeniyle Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nca taze meyve sebze kalıntı sorununa yol açan 135 farklı tarım ilacının 75'i yasaklanmıştır. Söz konusu ilaçların üretim ve ithalatı, 1 Ocak 2009'dan itibaren durdurulmuştur. Geri kalan pestisitler de 2012 yılına kadar piyasadan çekilerek yerine çevreye zarar vermeyen organik yapıda yeni bitki koruma ürünlerine ruhsat verilmesi amaçlanmaktadır (www.kkgm.gov.tr). CPF ise ülkemizde hala tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan ruhsatlı bir pestisittir.

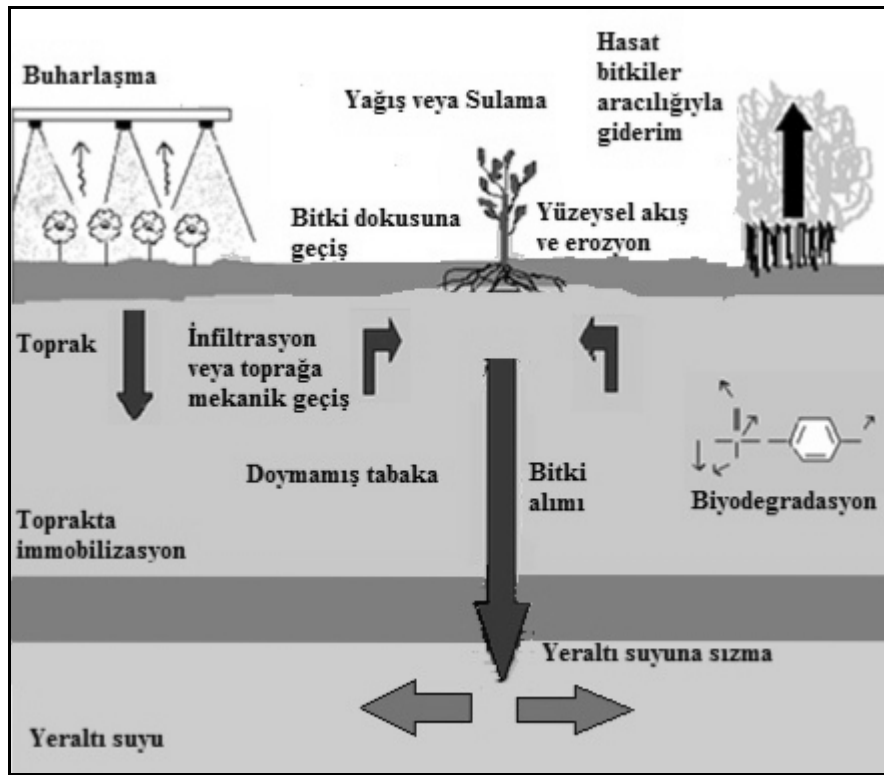
Türkiye’de hektara düşen pestisit miktarı, 1990’larda 400-500 g iken, 2006 yılında 705 g’a ulaşmıştır (Turabi, 2004; Delen, 2008). Bu değerler, Türkiye’nin AB ülkelerine göre oldukça az pestisit tükettiğini göstermektedir. Ancak, Türkiye’de oldukça heterojen bir pestisit kullanımı söz konusudur. 1998 yılında, en fazla kullanımın % 42.02 ile Akdeniz ve Ege Bölgesi’nde, en az ise % 4.8 ile Doğu Anadolu Bölgesinde olduğu bildirilmektedir. AB ülkeleriyle kıyaslandığında Türkiye’de hektar başına daha az pestisit kullanımı olmasına karşın, yoğun olarak kullanılan pestisitler çevre ve sağlık açısından en fazla risk taşıyan gruplardır (Durmuşoğlu, 2010). Tarımsal mücadelede kullanılan bu pestisitler farklı özellikleri baz alınarak farklı şekillerde ele alınabilirler (Tablo II. 1).

Tablo II.1. Pestisitlerin farklı özellikleri baz alınarak yapılan sınıflandırması. (* ile işaretlenenler çalışmada kullanılan CPF'in sınıflandırmadaki yerini göstermektedir.)

PESTİSİTLERİN SINIFLANDIRILMASI					
Formülasyon şekli	Etken madde	Fiziki hal	Etki şekli	Kullanım tekniği	Kullanım amaçlarına
1. Tozlar 2. Islanabilir tozlar 3. Emülsiyon konsantreler * 4. Solüsyon Konsantreler 5. Suda çözünebilir tozlar 6. Yazlık ve kışlık yağlar 7. Granüller 8. Peletler 9. Tabletler 10. Toz tohum ilaçları 11. Sıvı tohum ilaçları 12. Aerosoller 13. Zehirli yemler 14. Kapsül şekli verilmiş formülasyonlar 15. Akıcı konsantreler 16. Kuru akışkanlar	1. Organoklorlular 2. Organofosforlular * 3. Karbamatlar (Azotlu Bileşikler) 4. Dinitro bileşikleri 5. Sentetik pyretroidler	1. Katı formülasyonlar 2. Sıvı formülasyonlar * 3. Gaz halinde kullanılanlar (Siyan, CS ₂ , CH ₃ Br) 4. Yem halinde kullanılanlar (Sodyum arsenit, BHC+kepek).	1. Bitkide (Sistemikler, yarı sistemikler, sistemik olmayanlar) 2. Zararlıda (Mide zehiri, temas zehiri, solunum zehiri)*	1. Doğrudan kullanılan ilaçlar (Toz ilaçlar, ULV formülasyonları, granüller ve bazı nematositler), 2. Su veya organik çözücü ile seyreltilerek kullanılan ilaçlar *	1. İnsektisit * 2. Fungusit 3. Herbisit 4. Akarisit 5. Rodentisit 6. Nematosit 7. Molluskisit 8. Bakterisit 9. Afisit 10. Virisit

(Devlet Planlama Teşkilatı Raporu, 2001).

Pestisitlerin yavaş ve uzun bir süreçte devam eden ve adsorbsiyon, transfer ve ayrışma (mikrobiyolojik, kimyasal, foto ayrışma) şeklinde gelişebilen, hedef canlılara ulaşmasından önceki bozunmaları (biyodegradasyonları) istenmeyen bir durumdur (Şekil II.1). Bazen bu bozunma sonucunda ortaya çıkan toksik dönüşüm ürünlerinin organizmalar üzerinde, pestisit kendisine kıyasla daha zararlı etkiler oluşturması da söz konusu olabilir. Pestisit hedef organizma üzerinde istenilen süredeki etkisinin ardından parçalanma reaksiyonlarının gerçekleşmesiyle toksik olmayan zararsız forma dönüşmesi çevreye olan etkilerinin en aza indirgenmesi açısından önemlidir.



Şekil II.1. Pestisitlerin ekosistemdeki bozunma sürecini gösteren diyagram (Pierzynski ve ark., 1994).

Pestisitlerin ekosistemler üzerinde yarattığı riskleri en aza indirebilmek için amaca uygun pestisit kullanımı önemlidir. İdeal bir pestisit zararlıyı kontrol ederken hedef olmayan organizmalara zarar vermeyen, ekolojik olarak kabul edilebilir ürünlere dönüşebilen, yalnız uygulama alanında kalabilen, çevrede birikme potansiyeli olmayan ve kullanıcılar açısından güvenilir nitelikte olmalıdır (Devlet Planlama Teşkilatı Raporu, 2001). Ancak, günümüzde kullanılan hiçbir pestisit sözü edilen bu ideal niteliklerin tümüne sahip değildir. Ekosistemin sürekli değişmesi

sonucu, kullanılan pestisitler zamanla daha zararlı hale gelmekte ve çevre üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle de bazı pestisitlerin kullanımı sınırlandırılmakta ve hatta yasaklanmaktadır.

Yapılan araştırmalar sonucunda fizikokimyasal özellikleri nedeniyle kalıcı özelliğe sahip sentetik pestisitler çok sayıda balık ve kuş ölümlerine neden olduğundan, ülkemizde 1971 yılında Dieldrin; 1979 yılında Aldrin, Chlordane ve Heptaclor; 1985 yılında DDT ve BHC; 2007 yılında ise Endosülfan kullanımı tamamen yasaklanmıştır. Bazı pestisit türleri, hedef canlıların bağışıklık kazanması nedeniyle zamanla etkisini yitirmektedir. Bu da alternatif pestisit ürünlerinin geliştirilmesini şart kılmakta ve mevcut stokların atıl duruma düşmesine neden olmaktadır (Yıldız ve ark., 2005).

II.1.1. Chlorpyrifos (CPF)

CPF, tarım alanlarında böcek ve eklembacaklılarla mücadele amacıyla kullanılan geniş spektrumlu organofosforlu bir insektisittir (Hayes ve Laws, 1990; Schardein ve Scialli, 1999; Steenland ve ark., 2000). İlk kez 1937 yılında bir grup Alman kimyacı tarafından sentezlenen organofosforlu pestisitler, suda genellikle az, yağ ve organik çözücülerde ise daha iyi çözünürler. Suda hidrolize uğrayarak etkilerini kaybeden organofosforlu bileşikler, yağda iyi çözündükleri için bitkilerin meyve ve yapraklarına kolayca nüfuz edebilirler (Daş, 2004). Oldukça toksik özelliğe sahip olmalarından dolayı bu bileşikler ikinci dünya savaşında Naziler tarafından kimyasal silah olarak kullanılmış ve çok sayıda kişinin ölümüne neden olmuştur (Amdur ve ark., 1991).

Organofosforlu pestisitlerin yağda organoklorlu pestisitlere kıyasla daha düşük oranda birikimi nedeniyle böceklere karşı daha toksik ve kalıcılığı nispeten daha az olan bu bileşiklere yönelimi arttırmıştır. Sentezlenmelerinin kolay oluşu bu grubun büyümesi ve çeşitlenmesine de neden olmuştur.

CPF, doğada çeşitli çevresel etkenlere bağlı olarak farklı şekillerde bozunup TKP (Trichloropyrinol-trikloroprinidol), dietilfosfat, dietilfosforotionat ve CPF-okson metabolitlerine dönüşür. Toprakta, CPF güneş ışığı, kimyasal hidroliz ve mikroorganizmalar tarafından bozunur. CPF'in yarılanma ömrü, pH 7,4 ile 5,4 aralığındaki farklı toprak tiplerinde 11-114 gün arasında değişmekle birlikte organik madde içeriğinden fazla etkilenmez. Nemli topraklara uygulandığında, CPF'in buharlaşarak yarılanma ömrü 45-163 saattir, uygulamadan 36 saat sonra toprakta

kalan CPF miktarı % 62-89'dur. Diğer bir çalışma da, uygulamadan 30 gün sonra uygulanan CPF'in % 2,6-3'ünün kaldığı gözlemlenmiştir.

CPF'in sudaki çözünürlüğünün düşük ve kararlılığının nispeten yüksek olması nedeniyle toprak partiküllerine kuvvetli bir şekilde adsorbe olur. Bu nedenle yüzey ve yağmur sularında bulunma oranı düşüktür (Larson ve ark., 1995; Murray ve ark., 2001). CPF toprakta hareketsizdir fakat dönüşüm ürünlerinden biri olan TKP suda daha fazla çözündüğü için topraktaki hareketliliğini artırmaktadır. TKP'nin hareketli olması, CPF kullanımının yaygın olması sebebiyle endişe oluşturmaktadır (Bakiomoh ve ark., 1999).

Buharlaşıma sudaki muhtemel CPF kaybının başlıca yoludur. Havuz suyu için buharlaşma yarılanma ömrü 3,5 ile 20 gün arasında hesaplanmıştır. CPF'in fotoliz ile yarılanma ömrü yaz ortasında, 3-4 hafta olarak hesaplanmıştır (Racke, 1992). Ama CPF'in fotodegradasyonunun derin sularda, kış süresince, yada güneş ışığının nüfuz edemediği sularda önemli olmadığı düşünülmektedir. CPF'in suda hidroliz oranı sıcaklıkla artmaktadır, sıcaklıktaki her 10 derecelik düşüş, hidrolizi 2,5-3 kat azaltır. Ayrıca hidroliz oranı asidik ve nötral sularda sabitken, alkali sularda artar. CPF'in pH 7 ve sıcaklık 25°C'deki suda, yarılanma ömrü 35-78 gün olarak belirtilmiştir.

Sularda, CPF'in konsantrasyonu ve sürekliliği formülasyon tipine bağlı olarak değişir. Örneğin, açık sulara girdikten sonra, emülsiyon konsantreler ve ıslanabilir tozlar sudaki CPF konsantrasyonunu büyük ölçüde artırma eğilimindedirler. CPF su içerisinde çökelir veya askıdaki organik maddelere bağlanabilir bu da sudaki konsantrasyonlarının hızla düşmesine neden olur. Buna karşılık CPF granülleri ve salınımları kontrollü gerçekleşen formülasyonları sudaki pestisit konsantrasyonunda hızlı bir artışa neden olmaz ama ortaya çıkan konsantrasyon daha uzun süre devam eder. Düşük yoğunluk ve pH'ya bağlı olarak organofosforlu pestisitlerin toprak veya sucul çevrede kalma süresi ve dağılımı değişebilir ve buna bağlı alkali koşullar oluştuğunda hızla parçalanırlar. Hatta pH 7'nin üzerindeki her bir birimlik artış parçalanma hızını veya oranını yaklaşık on kat artırır (Kuter, 1994; Kaya, 2002).

CPF'in çok yönlü bir pestisit oluşu Amerika'da mısır tarımından, Japonya'da termit kontrolüne, Mısır'da pamuk üretiminden, İspanya'da turuncgil üretimine kadar geniş çaplı olarak kullanılmasına olanak vermiştir (Racke, 1992). CPF, ülkemizde 1999-2002 yılları arasında en yoğun kullanılan 5 insektisit arasında 2. sırada yer almıştır (Delen ve ark., 2005). CPF tarımsal alanlar dışında, çim alanlarda,

süs bitkileri için, çiftlik yapıları ve çiftlik hayvan zararlılarına karşı, ev, büro vs gibi yerlerde de yaygın olarak kullanılmaktadır (extoxnet.orst.edu). Bu yaygın kullanım nedeniyle CPF dönüşüm ürünleri çevrede kalabilmekte ve bu durum tüm ekosistemde tehlike oluşturmaktadır.

Tarımsal uygulamalarda, hedef olmayan organizmalara da etki ederek yaban hayatını olumsuz yönde etkileyebilir ve bitkilerin tozlaşmasında aktif rol oynayan bal arıları için oldukça zehirli olabilir. Uygulama yapılan alanlar otlatma için kullanılmamalı ve kimyasal uygulaması arıların aktif olarak polen veya nektar toplama zamanında yapılmamalıdır. CPF, marul gibi bazı bitkiler için toksiktir ve bu bitkiler üzerinde kalıntısı yaklaşık 10-14 gün bitki yüzeyinde sürer. Yapılan çalışmalar bu insektisit ve onun topraktaki metabolitlerinin bazı bitkilerde biriktiğini göstermektedir. Algal alanların saha uygulamaları sık sık takip edilmesine rağmen, tatlı su bitkileri üzerinde CPF toksisitesi hakkında yeterli bilgi mevcut değildir (Thomson, 1982).

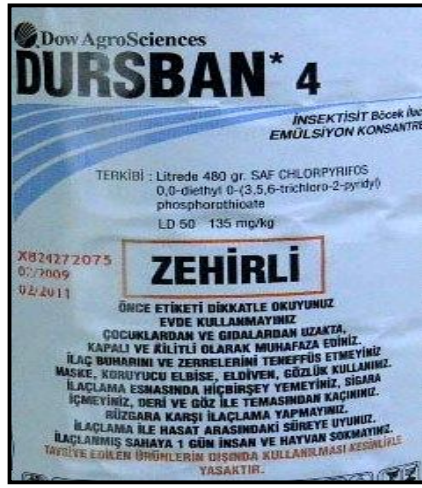
Sedimentlerden yavaş salınımı CPF kalıntı konsantrasyonunun açık sularda uzun süre korunmasını sağlayabilir. Yüksek akut toksisitesi ve çökelti içindeki kalıcılığı nedeniyle CPF deniz tabanında yaşayan organizmalar için bir tehlike oluşturabilir. CPF tatlı su balıkları, sucul omurgasızlar, nehir ve deniz organizmaları için oldukça toksiktir ve sucul organizmaların dokularında birikebilme yeteneğindedir. Akut toksisite testlerinde, çok düşük konsantrasyonlarda CPF uygulanan balıklarda kolinesteraz inhibisyonu gözlenmiştir. Dekar başına 0.0453g kadar düşük aktif madde içeren konsantrasyonlardaki uygulamalar balıklarda ve sucul omurgasızlarda ölüme neden olabilir. Balıklarda toksisitenin belirlenmesinde önemli bir parametre olan LC50 değeri deney hayvanlarının %50'sini öldüren konsantrasyondur. Balıklar üzerindeki toksisitesinin suyun sıcaklığı ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) için 3 farklı sıcaklıkta 96 saatlik LC50 değerleri 7.1µg/L ile 51µg/L arasında farklılık göstermektedir. Üreme periyodundaki *Pimephales promelas*'lara, 200 gün boyunca her 30 günde bir tekrarlanarak, 2,68µg/L CPF uygulandığında, ilk nesil yavrularda, önemli sayıda deformasyonun yanı sıra büyüme ve hayatta kalma sayısında da düşüş olmuştur.

Tüm organofosforlu pestisitler gibi CPF de böceklerde ve omurgalı hayvanlarda benzer metabolizmaya sahiptir. Başlıca metabolizma şekli esterleşme yoluyla oksidasyon ve hidrolizdir. Bütün organofosforlu bileşikler kolinesteraz etkili insektisitlerdir. En önemli özellikleri hedef enzim niteliğindeki asetilkolinesteraz

enzimi ile yapısal bütünleşmeye giderek enzimi inhibe etmeleridir. Bunlar kolinesteraz enziminin substratı olan asetilkolini taklit ederler. Kolinesterazın inhibe olmasıyla birlikte sinir birleşme noktalarında asetilkolin birikmekte ve sinaptik bölgeler felce uğratarak nörotoksik bir etki yaratmaktadır.

Son yıllarda CPF kullanımının giderek artması tarımla uğraşanlar, çevreciler ve toksikologlarda endişe uyandırmaktadır. Çünkü CPF hem insanlar hem de yabani hayat için çok toksik bir maddedir. Asetilkolinesteraz enzim aktivitesini geri dönüşümsüz inhibe ettiğinden memelilerin beyin hücrelerinin gelişimini engellenmekte ve insanların endokrin sistemini etkilemektedir (Jett ve ark., 1999; Lund ve ark., 2000; Jeanty ve ark., 2001). Bu pestisit kullanım alanının geniş olması özellikle hamile bayanlar ve çocuklar için büyük tehlike arz etmektedir (Lalah ve ark., 2003). CPF'in çocuklarda gelişme geriliği, davranış bozuklukları, hiperaktivite gibi hastalıklarla ilişkili olduğu belirtilmektedir. EPA, CPF kullanımının yasaklanması ve yerine alternatif zararsız ürünlerin kullanılması ile ilgili çalışmalar yapmaktadır (<http://www.epa.gov>). Öte yandan CPF'in yaygın olarak kullanımı sulak alanlarda da sorun yaratmaktadır, çünkü CPF balıklarda ve diğer su ürünlerinde ve bunların besin ağında birikme potansiyeline sahiptir.

CPF, EPA (Environmental Protection Agency-Çevre Koruma Örgütü) ve WHO (World Health Organisation-Dünya Sağlık Örgütü) tarafından yapılan toksisite sınıflandırmasında, orta derecede toksisite (sınıf II) sınıfına dahil edilmiştir. CPF içeren ürünlerin etiketlerinde uyarı işaretleri bulunma zorunluluğu vardır (extoxnet.orst.edu) (Şekil II.2). Tablo II.2'de CPF'in fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir.



Şekil II.2. CPF içeren ticari bir insektisit (Dursban*4) etiketi.

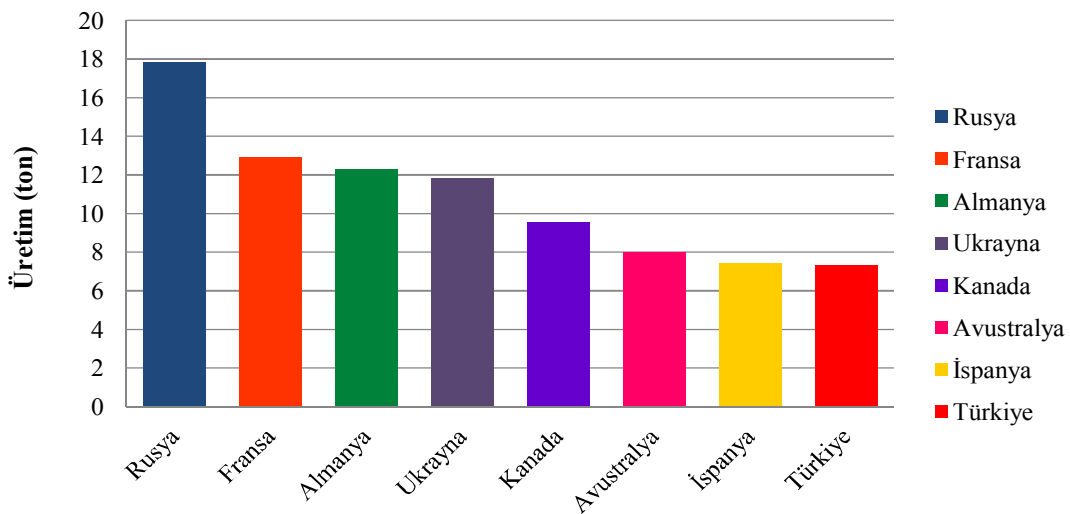
Tablo II.2. CPF'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Genel adı	Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-ethyl
Kimyasal adı	0-0-diethyl 0-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
Grubu	Organofosforlular
Molekül formülü	$C_9H_{11}Cl_3NO_3$ PS
Yapısal formülü	
Formülasyon tipleri	Toz, granül, ıslanabilir toz, sıvı, mikrokapsüllü
Ticari adı	Dursban, Agrosban, Korban, Lorsban, Priman, Terpan, Pyrinex, Empire, Piridane, Dowco 179, Paqant, Scout, Stipend
CAS (Chemical Abstract Service) numarası	2921-88-2
Moleküler ağırlığı (MW)	350,6 g/mol
Toksisite sınıfı	II
Arı/balık toksisitesi	Arı ve balıklara zehirlidir
Fiziksel görünüşü	Yumuşak merkaptan kokusunda beyaz kristal
Kaynama sıcaklığı	42-43,5 °C
Farklı çözücülerdeki çözünürlüğü	Su; 25°C'de 1,4 mg/L - 2 mg/L 35°C'de 1,34 mg/L Oktan; 790 g/kg Metanol; 430 g/kg Aseton; 6,5 g/kg Benzen; 6,3 g/kg Klorform; 450 g/kg
Kararlılığı	pH ve bakır iyonlarının varlığında hidroliz oranı artmaktadır

II.3. *Hordeum vulgare* L.

Tarih öncesi devirlerdeki en önemli kültür bitkilerinden biri olan arpa (*Hordeum vulgare* L.) halen ekonomik önemi olan bitkilerin başında gelmektedir (Temel ve ark., 2008). İnsanların en az 18.000–19.000 yıldan beri, önemli bir besin kaynağı olarak kullandıkları ve yabani arpa olarak da bilinen *Hordeum vulgare* L. *ssp. spontaneum* (K. Koch.) Thell., ilk defa Türkiye’de keşfedilmiş olan bir alt türdür (Badr ve ark., 2000; Saisho ve Purugganan, 2007; Pourkheirandish ve Komatsuda, 2009). Arpanın yaklaşık 10.500 yıl önce, bugünkü İsrail, Ürdün, Lübnan, Batı Suriye, Batı İran, Irak ile Türkiye’nin güneydoğusunu da içine alan ve “Verimli Hilal (Fertile Crescent)” olarak da isimlendirilen bölgede kültüre alındığı bilinmektedir (Badr ve ark., 2000; Salamini ve ark., 2002; Schulte ve ark., 2009). Orta Doğu’dan başlayarak, 2.000 yıl öncesinde Çin’e kadar, dünyanın farklı yerlerinde ıslahı yapılarak bugün tarımı yapılan arpa (*Hordeum vulgare ssp. vulgare* L.) elde edilmiştir. (Forster ve ark., 2000; Saisho ve Purugganan, 2007).

Dünyada, tahıllar arasında üretimde mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. sırada yer alan arpa, Türkiye’de buğdaydan sonra ikinci sıradadır. 2009’da dünya genelinde toplam üretimi 150.271.573 ton olup, Türkiye 7.300.000 ton üretim ile dünya ülkeleri arasında 8. sıradadır (Şekil II.3). Arpanın ekimi dünyada toplam 54.129.438 hektarlık alanda yapılmaktadır. Türkiye’de ise 2,9 milyon hektar ekim alanı ve 245 kg/da verim ile ülkemiz tarımı ve ekonomisi açısından da büyük bir öneme sahiptir (<http://faostat.fao.org/site>).



Şekil II.3. Dünyadaki arpa üretiminin ülkelere göre dağılımı (faostat.fao.org/site).

Arpa neolitik dönemden itibaren milyonlarca insan tarafından önemli bir besin kaynağı olarak tüketilmiş olsa da, bugün dünyada ekimi yapılan arpanın % 65'i hayvan yemi olarak, % 33'ü maltlık ve biyodizel üretiminde, ancak % 2'si ise insan besini olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Schulte, 2009). Ülkemizde ise tüketimin % 90'ı hayvan yemi olarak, kalan kısmı maltlık olarak bira sanayinde ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır.

Arpa tarih boyunca maruz kaldığı gerek ıslah çalışmaları gerekse doğal seleksiyonlar sonucunda, tarımsal üretimini kolaylaştıracak fenotipik özellikler kazanmıştır (Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007). Bu özelliklerin yanı sıra, çok soğuk ve sert iklimler, kuraklık, alkali ve tuzlu topraklar gibi stres koşullarına yüksek oranda uyum sağlayabilmesi ve erken olgunlaşması gibi özellikleri nedeniyle kutuplardan ekvatorial bölgelere kadar geniş bir alanda tarımı yapılabilmektedir (Schulte, 2009).

Dış kaynaklı stres etmenleri ise biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılır. Kuraklık, tuzluluk, yüksek veya düşük sıcaklık, ışık miktarının azlığı veya fazlalığı, gelişim için gerekli olan maddelerin yetersizliği, pestisitler ve ağır metaller abiyotik stres etmenleri; virüs, bakteri, mantar gibi patojenler, böcek gibi zararlılar ve diğer organizmalar biyotik stres etmenleri olarak sınıflandırılmaktadır (Comai ve Madlung, 2004). Arpada en önemli biyotik stres etmenleri; *Ustilago nigra* ve *U.hordei* (Rastık), *Prenophora graminea* (Çizgi yaprak lekesi), *Rhizoctonia*, *Fusarium* spp. (Kök çürüklüğü), gibi fungal kökenli hastalık etmenleri ve *Eurygaster* spp. (Süne), *Aelia* spp. (Kımıl), *Zabrus* spp. (Ekin kambur böceği), *Pachytychius hordei* (Hububat hortumlu böceği) gibi böceklerdir (www.ziraatcim.net). Bu bitkinin, üretimini olumsuz yönde etkileyen faktörler ve özellikle bunların zararlıları göz ardı edilmemelidir. Bu zararlılarla mücadelede en fazla tercih edileni, pestisitlerin kullanıldığı kimyasal mücadeledir. Çünkü kimyasal mücadele yüksek etkinliğe sahiptir, hızlı sonuç verir, bilinçli ve kontrollü kullanıldığında ekonomiktir ve ürünü toksin salgılayan organizmalardan da koruyabilir. Bu avantajlar, kimyasal mücadelenin günümüzde de bitki korumada en etkili silahlardan biri olmasının önemli nedenlerindendir. Arpa zararlıları ve mücadele yöntemleri Tablo II.3' de verilmiştir.

Tablo II.3. Arpa zararlıları, bitkide meydana getirdiği hasarlar ve alınacak kimyasal önlemler (Hububat hastalık ve zararlıları ile mücadele raporu, 2010).

Zararlı/ hastalık etmeni	Tanımı ve Yaşayışı	Zararlı Olduğu Bitkiler	Zararı	Kimyasal Önlemler
Süne (<i>Eurygaster</i> spp.)	• Yılda bir nesil verir. • İlkbaharda havalar ısınıp 15 °C ulaşınca tarlaya göç ederler.	• Buğday • Arpa • Çavdar • Triticale • Yulaf	• Kurtboğazı • Akbaşak	• Alphacypermethrin • Beta Cyfluthrin • Cypermethrin • Deltamethrin • Fenthion • Gamma Cyhalothrin • Lambda-Cyhalothrin • Zetacypermethrin
Kımlı (<i>Aelia</i> spp.)	• Yılda bir nesil verir. • İlkbaharda havalar sıcaklığı 20°C olduğunda tarlaya göç ederler, • Buğdayla beslenir, çiftleşir ve yumurta bırakır.	• Başta buğday olmak üzere, tüm buğdaygiller konukçularıdır.	• Kurtboğazı • Akbaşak	• Alphacypermethrin • Fenthion • Lambda-Cyhalothrin
Ekin Kambur Böceği (<i>Zabrus</i> spp.)	• 12-22 mm boyunda ve 5-8 mm eninde ve parlak siyah renklidir. • Zararlı yılda bir döl verir.	• Buğday • Arpa • Çavdar • Yulaf	• Sonbaharda ekin yapraklarını toprak içine çekerek yerler. • İlkbaharda yaprak ve sürgünleri yiyerek zararlı olurlar. • Verimin önemli ölçüde azalmasına neden olur. • Hasada yakın günlerde başak danelerini, ekimde ise toprak altındaki daneleri kemirerek zararlı olurlar.	• Benfuracarb • Chlorpyrifos Ethyl • Cyfluthrin • Deltamethrin • Endosulfan • Fenthion • Imidacloprid • Lambda-Cyhalothrin • Thiamethoxam
Hububat Hortumlu Böceği (<i>Pachytychius hordei</i> Brulle)	• 3-4 mm boyunda ve kahverengi renkte olup üzeri krem renğinde pullarla kaplıdır. Baş, uzamış ve hortum biçimini almıştır.	• Buğday • Arpa • Çavdar • Yulaf	• Hububatın kardeşlenme döneminde yaprak, sap ve başaklarla beslenerek delikler oluşturur. • Önemli miktarda ürün kaybına neden olmaktadır.	• Alphacypermethrin • Beta Cyfluthrin • Chlorpyrifos Ethyl • Deltamethrin • Lambda-Cyhalothrin

Tablo II.3'ün devamı.

Arpa yarı açık rastığı (<i>Ustilago nigra</i>)	• Bu hastalığa yakalanan bitkilerin başakları siyah renkte toz yığını şeklinde görülür.	• Arpa	• Siyah rastıkta denen bu hastalık tarlada bitkilerin çiçeklenme döneminde görülmeye başlar. • Tanelerin üstü başlangıçta gri renkli bir zar ile kaplıdır ve başak üzerindeki kılçıklar da yerlerini korumaktadır • Sarı ve tam olum döneminde ise zar patlamakta, kılçıklar dökülmekte, sporlar çevreye dağılmaktadır. Sonuçta bitkide sadece başak eksenini kalmaktadır.	• Carboxin • Diniconazole • Flutriafol • Mancozeb • Tebuconazole • Triademenol • Triticonazole
Arpa kapalı rastığı (<i>Ustilago hordei</i>)	• Bu hastalığa yakalanmış başaklar, sarı olum ve tam olum dönemlerinde siyahımtırak-gri renkte görülürler	• Arpa	• Hastalıklı başaklar çoğu kez kısmen veya tamamen bayrak yaprağı kını içinde kalırlar. • Hasat ve harman sırasında parçalanan başaklardan dağılan sporlar sağlam tanelere bulaşırlar ve onlara siyah bir görünüm vererek kaliteyi de düşürürler.	• Carboxin • Diniconazole • Flutriafol • Mancozeb • Tebuconazole • Triademenol • Triticonazole
Arpa çizgi yaprak lekesi (<i>Prenophora graminea</i>)	• Fide döneminde yeni gelişen sarı çizgiler oluşur. Bu çizgiler tüm yaprak boyunca ilerler ve yaprakta nekrotik lekeler oluşur.	• Arpa	• Enfekteli bitkilerin gelişimi geriler. • Başaklanma zamanı başaklar çıkış yapmayabilir. Çıkış taneler cılız ve buruşuk, rengi kahverengiye dönmüş, ya da kılçıkları kıvrık şekilde görülür.	• Tebuconazole
Kök ve kök boğazı çürüklüğü (<i>Fusarium spp.</i> , <i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Pseudocercospora</i>)	• Buğday ve arpada kök ve kök boğazı yanıklığına neden olmaktadır.	• Arpa • Buğday	• Bitki gelişme döneminin ortasında bitkiler ve kardeşlerinde veya fide döneminde sararma ve ölüm meydana gelir. • Hastalıklı bitkilerin başakları bükülür. Bazı bitkilerde tane oluşmaz.	• Carboxin • Thiram • Prothionazole • Tebuconazole

II.4. *Danio rerio*

Zebra balığı, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) Cyprinidae familyasına ait tropikal bir türdür. Ana vatanı Güneydoğu Himalaya olan zebra balıkları yaygın olarak Pakistan ve Hindistan'da bulunmaktadır (Mayden ve ark., 2007). Çoğunlukla kanallar, hendekler, göletler, dereler, durgun su kütleleri ve pirinç tarlalarında yaşarlar (Spence ve ark., 2008).

Zebra balığı adını vücudunun yanlarında tek tip, yatay ve kuyruk yüzgecinin sonuna kadar uzanan 5 adet mavi çizgiden alır. Ağızları yukarı doğru yönelmiş, vücut şekli fuziform ve yanlardan basıktır. Erkek balıklarda mavi çizgiler arasında altın rengi çizgiler bulunur. Dişiler erkeklere göre daha iri ve altın çizgiler yerine gümüş çizgilere sahiptirler. Ergin dişilerde anal yüzgecin hemen önünde, küçük bir genital papilla mevcuttur. Genellikle 4 cm'ye kadar büyürler, fakat 6,4 cm'ye kadar büyüyenleri de vardır. Ortalama ömürleri 2-3 yıl olmasına rağmen ideal koşullarda 5 yıl kadar da yaşayabilirler (Spence ve ark., 2008). Zebra balıkları için optimum sıcaklık 22-28 °C ve optimum pH 6,5-7,5 aralığındadır.

Zebra balığının üreme periyodu yaklaşık 3-4 aydır. Dişiler 2-3 gün aralıklarla yumurtlama yeteneğindedirler. Fakat ovulasyonun olması ve yumurtlamanın meydana gelmesi için aynı ortamda bir erkek bulunmalıdır. Döllenen yumurta anında şeffaflaşır ve gelişimleri hızlı bir şekilde ilerler. Embriyo gelişimi için ideal sıcaklık 28,5 °C'dir. Tüm ana organların taslakları döllenmenin 36. saatinde ortaya çıkar. Yumurtadan çıkış, embriyonun iç koşulları ve dış sıcaklığa bağlı olarak döllenmeden 48-72 saat sonra meydana gelir ve bu evrede larva 3,5 mm uzunluğundadır. Yumurtadan çıktıktan birkaç gün sonra larvalar henüz vitellus kesesi tükenmeden dışarıdan yem almaya başlarlar. Döllenmeden 30 gün sonra yaklaşık 1 cm uzunluğa ulaşan juvenil balıklarda ergin bireyin sahip olacağı yüzgeçler şekillenir ve pigmentasyon gelişir. 90 günlük ergin birey yaklaşık 2 cm uzunluğundadır ve üreme fonksiyonuna sahiptir (Westerfield, 1995; Spence ve ark., 2008).

Zebra balıkları omnivordurlar. Zooplankton, fitoplankton, böcekler ve böcek larvaları ile beslenirler. Tercih ettikleri besin kaynaklarına kolayca ulaşamadıklarında farklı besinlerle de beslenebilme yeteneğine sahiptirler (Spence ve ark., 2008).

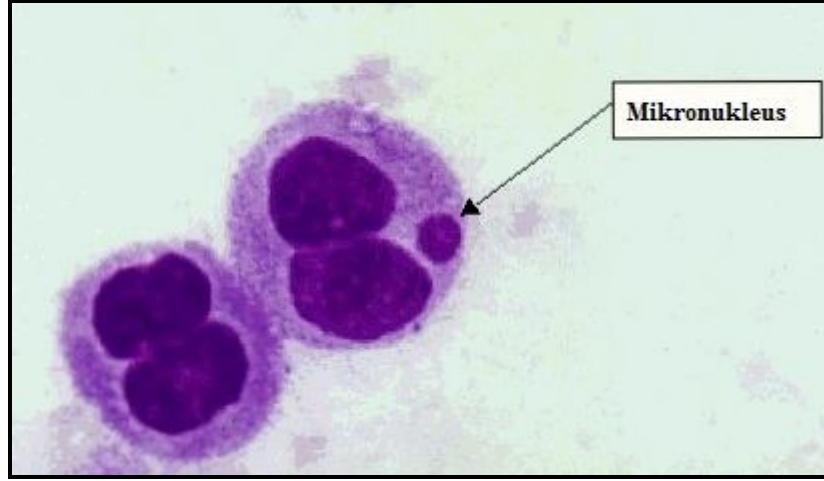
Uygun koşullar altında bakımının kolay olması, çok sayıda yumurta vermesi ve yumurtalarının şeffaf olması bu balığın toksikoloji, gelişim biyolojisi, onkoloji, teratoloji, embriyoloji, genetik, nörobiyoloji, çevre bilimleri ve kök hücre gibi pek çok çalışmada model organizma olarak kullanılmasını sağlar (Fabacher, 2000; Nagel, 2002).

II.5. Genotoksisite ve izlenmesi

Genotoksisite kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanların genetik materyalde hasar yaratabilme özelliği olarak tanımlanabilir. Bu hasarları; hücre yapısı veya fonksiyonunda hasar oluşturan, normal kromozom davranışlarını bozan ve DNA molekülünde genetik bilginin değişmesi anlamında mutasyonlara neden olan hasarlar olarak sınıflandırmak mümkündür. Çevresel etkenler (UV, radyasyon) ve endüstriyel kimyasallar genotoksik potansiyele sahip etmenlerdir. Bu etmenlerin ekosistemde oluşturdukları etkilerin izlenmesinde ve araştırılmasında içerisinde bitkiler ve balıklarında yer aldığı çeşitli organizmalar kullanılmaktadır.

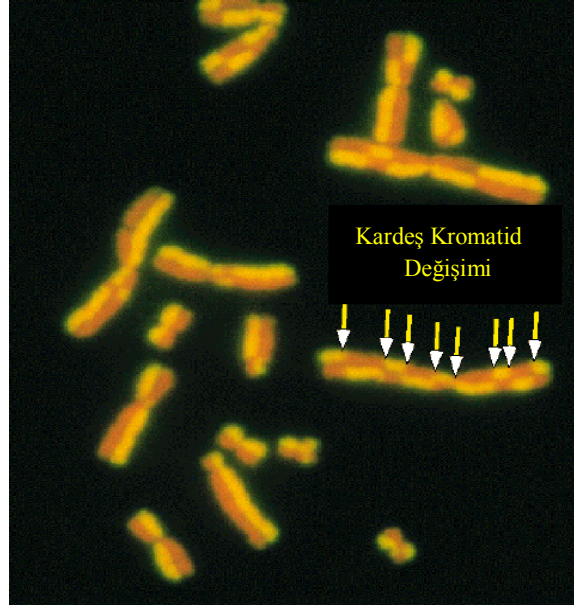
Genotoksik ajanların canlılar üzerinde oluşturdukları etkilerin belirlenmesinde kromozomal değişimler, gen mutasyonları ve DNA hasarları gibi parametreler kullanılmaktadır. Kromozomal değişimlerin tespitinde Mikronukleus testi (MN) ve Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) tekniklerinden sıklıkla yararlanılmaktadır.

MN'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında çok düşük oranlarda kendiliğinden ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan ve interfazda kolayca görülebilen yapılardır. Ayrıca sentromer bölünme hatalarından veya iğ ipliği fonksiyon bozukluğu sonucunda anafaz sırasında geri kalan bir kromozomdan oluştuğu da bildirilmiştir (Fenech ve Morley, 1985). MN analizi için mutajen maruziyetine uğramış hücrelere iğ ipliği oluşumunu engelleyen bir ajan, örneğin sitokalsin-B uygulanarak hücrelerin sitoplazma bölünmeleri engellenir. Bu şekilde 2 yavru çekirdeğin birlikte bulunduğu hücreler ve bu hücrelerin sitoplazmaları içinde yer alan mikronukleuslar mikroskopta incelenip skorlanır ve frekansları değerlendirilir (Şekil II.4).



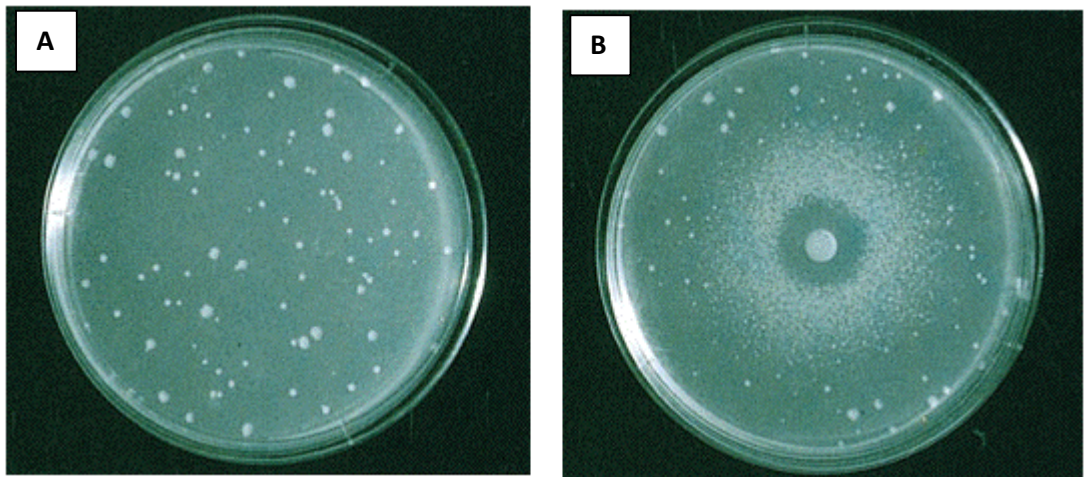
Şekil II.4. MN testini gösteren mikograf (www.crios.be/genotoxicitytests).

Kromozomal değişimlerin tespitinde kullanılan diğer bir yöntem ise KKD frekansıdır. Doğal olarak da sıklıkla oluşabilen KKD, bir kromozomun iki kardeş kromatidinin özdeş lokusları arasında karşılıklı olarak genetik materyalin değişimi esasına dayanmasına rağmen oluşum mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (Hagmar ve ark., 2001; Baltacı ve Zeyneloğlu, 2004). Ancak son yıllarda yapılmış olan çalışmalar kardeş kromatid değişiminin hücre döngüsünün sentez fazındaki DNA replikasyonu aşamasında, hasarlı DNA'nın homolog rekombinasyon ile onarılması esnasında oluştuğu düşünülmektedir (Sonoda ve ark., 1999). Kardeş kromatidler arasındaki parça değişimleri ışık mikroskobu altında metafaz plaklarında kolaylıkla tespit edilebilir ve sayılabilir. KKD frekansı, sayılan kardeş kromatid değişimi sayısının incelenen kromozom sayısına bölünmesiyle elde edilir ve frekanstaki artış mutajenik etkinin varlığını gösterir (Barch, 1991) (Şekil II.5).



Şekil II.5. Kardeş kromatidler arası parça değişimini gösteren mikrogram.

Bruce Ames (1970) tarafından geliştirilen gen mutasyonlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir teknik olan Ames testi hızlı bir geri mutasyon testidir (Lorenzo ve Ames, 1970). Ames test sisteminde *in vitro* mutasyonlar ile elde edilen histidin sentezini yapamayan bir dizi *Salmonella* mutant suşları kullanılmaktadır. Histidin bulunmayan ortamlarda bu bakterilerin üremesi, dolayısı ile de koloni oluşumu gerçekleşemez. Histidin genindeki mutasyon bölgesinde veya bu genin yakınındaki bir bölgede oluşan yeni bir mutasyonla bu genin fonksiyonu düzeltilebilir ve hücreler histidin olmayan ortamda üreyebilirler (Mortelmans ve Zeiger, 2000) (Şekil II.6).



Şekil II.6. Ames testi. (A) Histidin içermeyen ortamda üreyebilen az sayıda koloni. (B) histidin geni geri mutasyona uğramış bakterilerin oluşturduğu çok sayıda koloni (www.mun.ca/biology/scarr/Ames_Test_1.html).

DNA hasarlarının tespiti ise hızlı, kolay, hassas ve tekrarlanabilen güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi nedeniyle comet testinin kullanımı son yıllarda ön plana çıkmıştır (Collins ve ark., 1997; Gichner ve Plewa 1998).

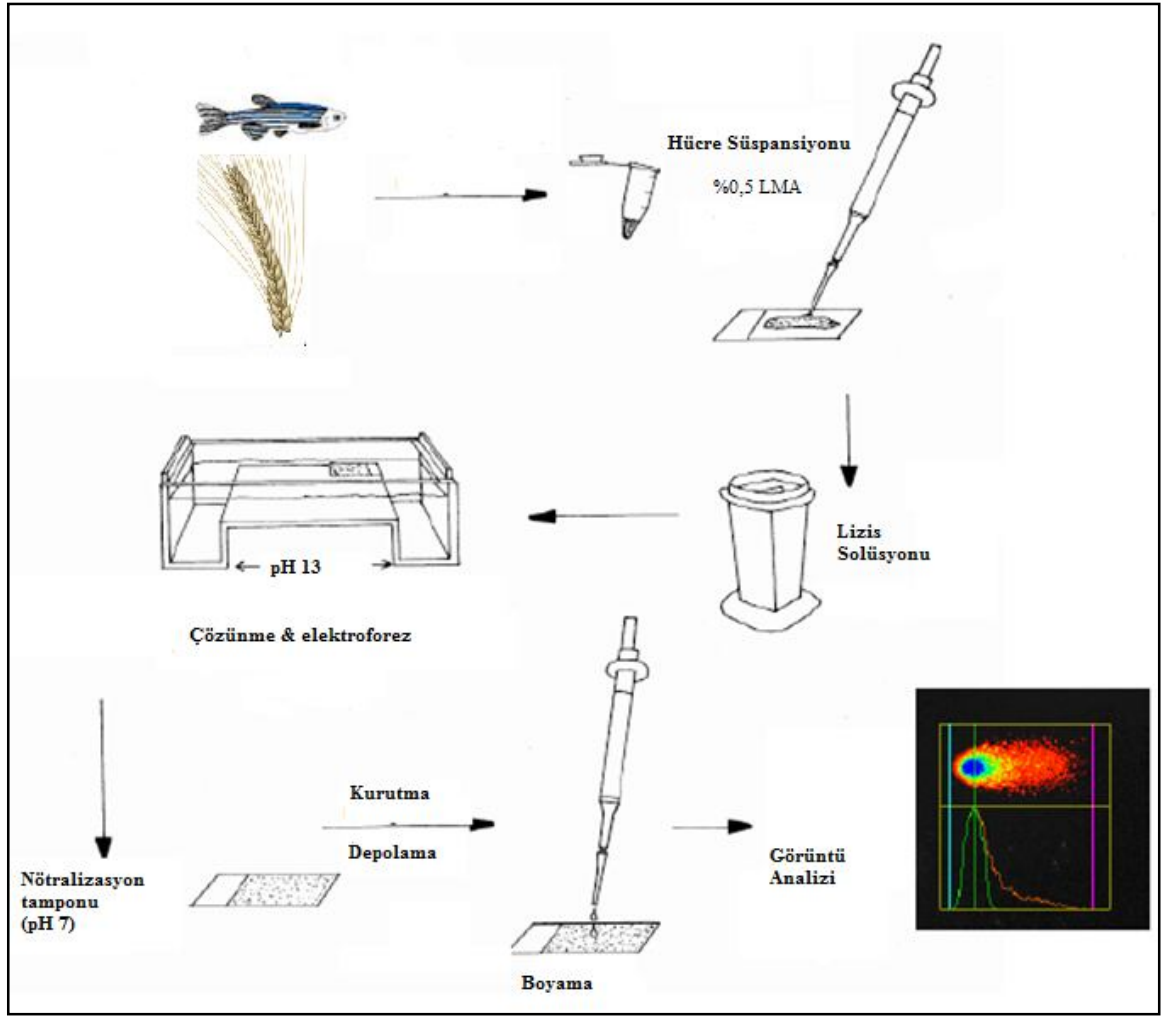
II.6. Comet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Doğada canlılar yaşamları süresince pek çok biyotik ve abiyotik stres etmeniyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu stres etmenleriyle mücadelede çeşitli kimyasallar ve özellikle pestisitler, kullanım kolaylıkları ve etkilerinin kısa sürede ortaya çıkması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedirler. Artan bu pestisit kullanımına bağlı olarak hem hedef organizma hem de hedef olmayan farklı canlılar üzerinde fizyolojik, biyokimyasal, morfolojik ve moleküler olarak tespit edilebilen farklı toksik etkiler oluşabilmektedir (Gichner ve ark., 2009). DNA hasarı ve varsa hasar derecesinin belirlenmesi genotoksik etkilerin ortaya konması açısından önemlidir. Şimdiye kadar DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili çok sayıda teknik kullanılmış bunların birçoğunun pahalı ve uzun çalışma süresi gerektirmesi ve kimi zaman da birçok laboratuvar veya üniversitenin sahip olmadığı radyoaktif çalışmaları içermesi ve hatta çalışma sonunda beklenen başarının elde edilememesi bu alanda çalışma yapılmasını güçleştirmiştir (Tice ve ark., 2000; Gichner ve ark., 2009). Ancak, son yıllarda tıp ve biyoloji alanlarında yukarıda belirtilen sorunlara cevap verebilecek “Comet Testi” veya “Tek Hücre Jel Elektroforezi” adında giderek daha fazla kabul gören yeni bir moleküler test sistemi geliştirilmiştir. Günümüzde comet testinin, yaşlanma, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyoloji gibi pek çok alanda uygulamaları vardır (Martin ve ark., 1993).

Comet testinin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini, tek tek hücrelerin nükleuslarını inceleyerek tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen nükleus içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fiks edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Genotoksik ajanların etkisiyle DNA’da tek veya çift zincir kırıkları oluşabilir ve buna bağlı olarak ortaya çıkan farklı ağırlıklık ve elektrik yüküne sahip DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. Elektroforez sonunda etidyum bromür gibi DNA’ya özgü boyalar kullanılır ve hasarın derecesine göre dairesel formdan kuyruklu yıldıza benzer forma kadar değişen derecelerde ortaya çıkan DNA görüntüleri floresan mikroskop altında

incelenir. Elde edilen görüntülerin “kuyruklu yıldız”a benzemesi nedeniyle bu yönteme İngilizcede bu anlama gelen “Comet” adı verilmiştir. Daha düşük düzeyde seyreden DNA hasarlarının tespitinde YOYO-1 (benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer), DAPI (4,6- diamid-ino-2-phenylindole) gibi hassas fakat oldukça pahalı olan boyalar kullanılmasına rağmen Gichner ve ark. (2006) daha ucuz olan etidyum bromürün etkinliğinin bahsedilen diğer boyalardan farklı olmadığını rapor etmişlerdir (Angelis ve ark., 2000).

İlk kez Östling ve Johansson (1984) nötral koşullarda lizis ve elektroforez aşamalarının ardından akrinin oranj ile boyadıkları numuneleri floresan mikroskop altında incelemişler ve nötral comet testinin temellerini oluşturmuşlardır. Ancak DNA çift iplik kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek iplik kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Ayrıca nötral şartlarda proteinler DNA sarmalından tam olarak da uzaklaştırılamamaktadır. Oysaki DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift ipliğinden çok, DNA tek ipliğinde hasar meydana getirmektedir. Bu nedenle, 1988 yılında Singh ve ark. (1988) tarafından alkali şartlar altında ($pH > 13$), DNA tek sarmal kırıklarının tespitine izin veren comet testi geliştirilmiştir. Kullanılan daha güçlü alkali lizis koşulları büyük oranda (% 95) proteinleri DNA'dan uzaklaştırmaktadır. Alkali elektroforez uygulaması ile alkali bölgelerin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde belirlenmesi sağlanmıştır (Singh ve ark., 1988; Tice ve ark., 1990). Singh ve ark. (1988)'in comet testi protokolu bugün dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldur (Şekil II.7). Comet testinin, tablo II.4.' de belirtilen ve farklı pH'lar için geliştirilen, N/N (Nötr çözünme/Nötr elektroforez), A/N (Alkali çözünme/Nötr elektroforez) ve A/A (Alkali çözünme/Alkali elektroforez, pH 13) gibi versiyonları da kullanılmaktadır. (Gichner ve Plewa, 1998; Lin ve ark., 2007).



Şekil II.7. Comet testinin genel aşamaları.

Tablo II.4. Comet Yöntemi ile farklı pH'larda belirlenebilen DNA hasar tipleri.

N/N pH: 7-8	A/N pH: 10-12	A/A pH> 13
Çift Sarmal Kırıkları	Çift Sarmal Kırıkları	Çift Sarmal Kırıkları
Çapraz Bağlar	Tek Sarmal Kırıkları	Tek Sarmal Kırıkları
	Eksizyon Onarım Bölgeleri	Eksizyon Onarım Bölgeleri
	Çapraz Bağlar	Çapraz Bağlar
		Alkali Ortamda Ortaya Çıkan Hasarlar

Lamların hazırlanması: Lamların hazırlanmasında uniform ve stabil bir jel hazırlayarak içinde bulunan hücrelerin deney aşamasının sonuna kadar bozulmadan tutabilmek ve örneklerin arka plan görüntüsüne etki edebilecek faktörlerin ortadan kaldırılması oldukça önemlidir. Jel stabilitesini arttırmak amacı ile rodajlı lamlar

kullanılmakla birlikte (Tatli ve ark. 2008), ticari olarak bu amaca uygun lam ve lameller de kullanıma sunulmuştur (Trevigen Inc., 2000). Çalışmada kullanılacak lamalar en az bir gün süre ile ethanol içinde tutulduktan sonra etüvde kurutularak kullanıma hazır hale getirilmelidir. Lamalar üzerine 50 °C’de distile su içerisinde çözünmüş % 0.65 lik yüksek erime noktalı (HMA) agarozdan 100 µL kadar pipetle bırakılır ve hemen üzeri lamel ile kapatılarak tabakalandırılır. Jelin çabuk donması için lamalar buzdolabında 5 dakika kadar bekletilir (Kocyigit ve ark., 2005; Gichner ve ark., 2009). Bu aşamada lamalar, agaroz-kaplı lamalar olarak adlandırılırlar ve nemlendirilmiş kutularda elektroforez işlemlerine kadar uzunca bir süre saklanabilirler. İkinci tabaka ise % 0.65 lik düşük erime noktalı (LMA) agaroz ve yeni izole edilmiş hücre süspansiyonu karışımından oluşur. Hücre süspansiyonu yine distile su içerisinde 40 °C’ de LMA agaroz ile 1/8 oranında ya bir mikrosantrifuj tüpü içinde ya da bir lam üzerinde pipet yardımı ile karıştırılır ve yaklaşık 100 µl lik karışım 1. tabaka üzerine yayılır ve hemen lamel ile kapatılır. Lamalar daha sonra buzdolabında 5 dakika kadar bırakılır ve lameller bunun ardından kaldırılır (Gichner ve ark., 2004). Lamalar bu noktada bir sonraki aşama için hazır sayılır. Aslında son yıllara kadar yapılan birçok çalışmada 3. tabaka olarak, 100 µl erimiş % 0.65’lik LMA agaroz ikinci tabaka üzerinde oluşan boşlukları doldurmak için kullanılmaktaydı, fakat, son yıllarda Kocyigit ve ark. (2005), Gichner ve ark. (2008a,b) gibi bazı araştırmacılar en üst tabakanın çok gerekli olmadığını rapor etmişlerdir. DNA hasarı çalışırken hemen hemen bütün aşamaların sarı ya da loş ışık altında devam etmesi ve çalışmaların bazı aşamalarının 4 °C’de yapılması alınacak sonuçların güvenilirliği açısından çok önemlidir.

DNA’nın çözülmesi, elektroforezi ve nötralizasyonu: Bu aşamada sarmal yapıda olan DNA’nın çözülüp gevşemesini sağlamak amacıyla lamalar tampon çözelti içeren elektroforez tankına yerleştirilir ve inkubasyon için bir süre bekletilir. Eğer bu aşamalar alkali bir pH ortamında gerçekleştirilirse çift ve tek bağlardaki kırıklar belirlenmekte, eğer pH değerleri hem çözülme hem de elektroforez aşamalarında 13 den daha büyük ise çift ve tek bağlardaki kırıkların yanı sıra çapraz bağlardaki hasarlar ile baz hasarları da belirlenebilmektedir. Toksisite çalışmaları için Comet protokolünün alkali versiyonu hem çözülme hem de elektroforez aşamalarında uygulanmaktadır (Gichner ve ark., 2009; Dikilitas ve ark., 2009). Elektroforez

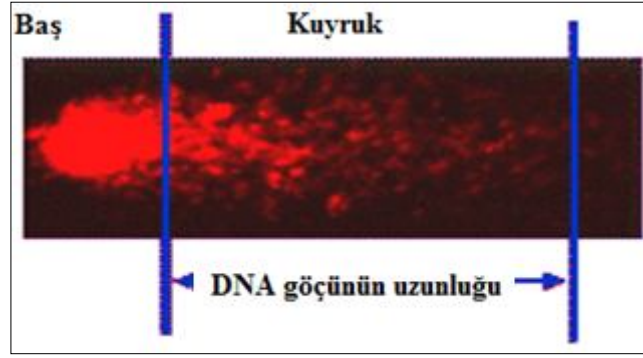
süresince örnekler arasındaki oluşabilecek varyasyonların önüne geçilmesi amacıyla sıcaklığın sabit tutulması oldukça önemlidir (Gichner ve ark., 2008b).

Lamlar, elektroforezi takiben oluşan alkali ortamı nötrleştirmek ve mikroskop altında net görüntü alınmasını sağlamak için 0,4 M Tris-HCl (pH 7,5) ile oda sıcaklığında yıkanır (Gichner ve ark., 2008b; Rank ve ark., 2009).

Boyama: Nötralizasyon aşamasından sonra, lamlar 100 µl etidyum bromür (20µg/ml) ile boyanır ve en fazla 6 saat içinde analiz edilmesi gerekir. Eğer vakit hemen analiz yapılamayacaksa preparatlar, 10-15 dakika soğuk su içinde tutulmalı takiben %100 lük etanol içinde dehidrasyonun ardından kurumaya bırakılan lamlar uygun koşullarda birkaç ay kadar saklanabilmektedir (Kocyigit ve ark., 2005; Gichner ve ark., 2008a,b).

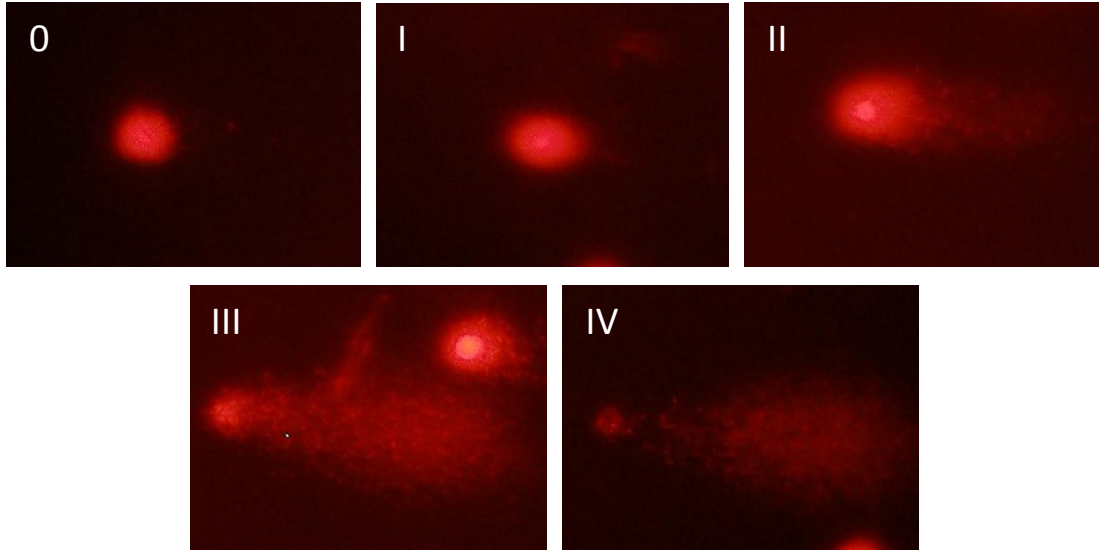
Comet testinin farklı yöntemlerle uygulanması, elde edilen sonuçları da etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lizis solüsyonu içeriği (tuz konsantrasyonu ve pH) ve uygulama süresi, metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle comet çalışılan laboratuvarlarda tekniğin optimize edilmesi önemli bir adımdır (Hartmann ve ark., 2003).

Comet görüntülerinin değerlendirilmesi: Comet testinde hasarsız hücreler (nükleus) yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası daha parlak bir ışık saçarlar. Bu hücreler DNA göçü olmayan (NM-nonmigration) hücreler olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün başlaması ile düzensiz kenarlı bir hal alır (low migration-LM). Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (comet) şeklini alırlar (Şekil II.8). Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama şeklinde ortaya çıkan cometin kuyruk uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir. DNA göçü hem DNA'nın büyüklüğüne hem de DNA'daki kırık sayısına bağlıdır. Kuyruk uzunluğu hasara bağlı olarak artar ancak elektroforez koşullarına bağlı olarak maksimuma ulaşır. Düşük hasar seviyelerinde DNA'da göçten çok yayılma görülürken, kırık sayısının artmasıyla DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde (apoptotik) baş ve kuyruk tamamen ayrılmıştır (Fairbain ve ark., 1995).



Şekil II.8. DNA hasarına uğramış hücrede baş ve kuyruk oluşumu.

Comet testi ile DNA hasarlarını değerlendirmek ve tayinini yapmak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde en kolay olanı, mikrometrik oküler aracılığıyla hasar derecelerine göre cometleri göz ile saymak ve gruplandırmaktır (Olive ve ark., 1990; Kocyigit ve ark., 2005). Gözle görüntü analizinde göç etmiş hücreler, sıklıkla kuyruk uzunluklarına göre sınıflandırılarak ayırt edilebilmektedir (Şekil II.9).



Şekil II.9. Comet testi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. 0-hasarsız DNA; I-çok az hasarlanmış DNA; II-az hasarlanmış DNA; III-hasarlanmış DNA; IV- tümüyle hasarlanmış DNA (Dikilitaş ve Kocyigit, 2009).

Belli bir bölgedeki DNA miktarının, o bölgedeki floresans yoğunluğu ile doğru orantılı olması özelliğinden yararlanılarak, dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Görüntü analiz sistemleri ile hasar görmüş hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk

uzunluğu ve kuyruk momenti gibi çeşitli comet parametreleri ölçülebilmektedir. Kuyruk momenti; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranının çarpımı olarak tanımlanmaktadır. Bunlar arasında kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık kullanılan parametrelerdir (Tice ve ark., 2000; Hartmann ve ark., 2003) (Tablo II.5).

Tablo II.5. Comet görüntü analizi programları ile elde edilebilecek çeşitli parametreler (Dhawan Anderson, 2009).

Head DNA	Comet başındaki DNA miktarı
Tail DNA	Comet Kuyruğundaki DNA miktarı
% head DNA	Comet başındaki DNA yüzdesi
% tail DNA	Comet kuyruğundaki DNA yüzdesi
Head radius	Comet başının yarıçapı
Tail length	Baş alanının sağ sınırından kuyruk sonuna kadar ölçülen uzunluk
Comet length	Baş alanının sol sınırından kuyruk sonuna kadar ölçülen uzunluk
Head CoG	Baştaki DNA'nın ağırlık merkezi
Tail CoG	Kuyruktaki DNA'nın ağırlık merkezi
Tail moment	% kuyruk DNA x kuyruk length
Olive tail moment	% kuyruk DNA x (kuyruk CoG–head CoG)

Comet testi funguslar, algler, teorik olarak tüm yüksek bitkiler, deniz canlıları, böcekler, omurgalı hayvanlar ve insanlar üzerinde çok rahat uygulanabilen onları hem çevre sağlığı açısından izlemede hem de hedef organizmaların savunma potansiyelleri ve gelecekteki sağlık durumları hakkında bilgi vermede kullanılan önemli bir metottur (Gichner ve Plewa 1998; Angelis ve ark., 2000; Menke ve ark. 2001; Dhawan ve ark., 2009). Son yıllarda genotoksik ajanların bitki kökü ve yapraklarındaki etkilerinin takibiyle yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Hemen hemen tüm bitkiler comet testi için kullanılabilir olmasına rağmen hem kolay temin edilmesi hem de yetiştirme ve hücre izolasyonu kolaylığı bakımından, patates (*Solanum tuberosum*), tütün (*Nicotiana tabacum*), soya fasülyesi (*Vicia faba*), soğan (*Allium cepa*) ve *Arabidopsis thaliana* üzerindeki çalışmalar literatürde daha fazla yer almıştır (Gichner ve ark., 2006; Mancini ve ark., 2006; Lin ve ark., 2008).

Comet tekniği kullanılarak farklı canlı grupları üzerinde çeşitli maddelerin genotoksik etkilerini incelemek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Bitkilerde yapılan çalışmalardan bazıları şöyledir: Gichner ve Plewa (1998) *Nicotiana tabacum* bitkilerini 1-8 mM etil metan sülfonat (EMS) ile muamele ettikten sonra, en yüksek EMS konsantrasyonuna maruz bırakılan bitkilerde en fazla DNA hasarı bulunduğunu tespit etmişlerdir. Menke ve ark. (2000) *Vicia faba*'nın kök ucu nükleusları N-Metil-N-nitrosoüre (MNU) genotoksik etkili ajan kullanarak, üç farklı comet tekniği protokolü (nötr/nötr, alkali/nötr, alkali/alkali) ile karşılaştırmalı olarak incelemişler ve bu protokollerden farklı doz-cevap eğrileri elde etmişlerdir. Gichner (2003) öncül mutajen o-fenilenidamin (o-PDA) ile muamele edilmiş CAT1AS transgenik hatlardan elde edilen tütün köklerinde SP1'dekinden daha yüksek düzeyde DNA hasarı olduğunu görmüştür. Maluszyńska ve Juchimiuk (2005) *Crepis capillaris*'e mutajen uygulamasıyla DNA'da hasar meydana getirerek bunları tespit etmek için Comet analizi, kardeş kromatid değişimi ve FISH yöntemlerini kullanmışlardır. Zhang ve ark. (2006) mikorhizal bir mantar olan *Glomus mossea*'nın *Vicia faba* üzerinde yaşamasının etkileri ve tarla toprağına kontamine olmuş ağır metallerce (Cu, Zn, Pb, Cd) tetiklenen toksisite miktarlarını araştırmışlar ve mikorhizalı bitkilerde DNA hasarının yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Gichner ve ark. (2008) ise EMS, Cd² ve γ -ışınları ile muamele ettikleri *Solanum tuberosum* L. bitkisinde indüklenmiş DNA hasarının artışıını ortaya çıkarmak için alkali koşullar altında Comet analizi yapmışlar ve en iyi doz-cevap eğrisinin alkali comet tekniği ile tespit edildiğini göstermişlerdir.

Balıklarda yapılan çalışmalardan bazıları ise şu şekilde özetlenebilir: Beninca ve ark. (2012), Camacho ve Santa Marta gölünden topladıkları *Geophagus brasiliensis* bireylerinden kan ve böbrek doku örnekleri alarak comet testi ve mikronükleus testi; kas doku örnekleri alarak ise asetil kolinesteraz aktivitesi ve histopatolojik incelemeler yapmışlardır. Bu çalışmada Camacho ve Santa Marta göllerinin potansiyel genotoksik maddelerce kirlendiği görülmüş ve kirleticilerin daha fazla kontrol edilmesi gerektiği ortaya konmuştur. Mohanty ve ark. (2011), *Labeo rohita* yavrularına farklı konsantrasyonlarda (0,001, 0,002 ve 0,01 ppm) ve farklı zamanlarda (24, 48, 72 ve 96 saat) organofosforlu bir pestisit olan Phorate uygulamışlar, ortaya çıkan genotoksik etkileri hem dokuya özgü olarak ve hemde balıktaki DNA onarım yanıtını değerlendirmek amacıyla 3 farklı doku sistemi kullanarak incelemişlerdir. Sonuçlar Phorate'ın potansiyel bir ajan olduğunu, comet

testinin DNA hasar ve onarımı analizlerinde kullanılabilirliğini ve çok hücreli hayvanlarda kirleticilere yanıtın genellikle dokulara özgü olarak gerçekleştiğini göstermiştir. Morin ve ark. (2011), iki günlük *Oryzias latipes* hücrelerini *in vitro* koşullarda model genotoksik ajanlara (hidrojen peroksit, kadminyum ve fluorathane) maruz bırakmış ve sonuçları comet testi ile incelenmişlerdir. Veriler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücrelerin DNA hasarlarında artış tespit edilmiştir. Bu çalışmada, embriyo aşamasındaki medeka hücrelerinin DNA üzerinde hasar yarattığı bilinen ajanlara yanıt verdiği ve comet testinin bu hasarları tespitinde kullanılabilir bir test sistemi olduğu gösterilmiştir. Sponchiado ve ark. (2011), *Oreochromis niloticus* bireylerini farklı doz ve sürelerde 17 β -estradiol'e maruz bırakarak ortaya çıkan genotoksik hasarı mikronükleus testi, nükleer anormalliklerin değerlendirilmesi ve comet testi ile incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre 17 β -estradiol'ün genotoksik potansiyeli süreye bağlı olarak farklılık göstermiştir. Çalışma ile 17 β -estradiol hem akut hemde kronik maruziyetlerde klastojenik kimyasal kirletici olarak kabul edilmesi gerektiği gösterilmiş, mikronükleus, nükleer anormallikler ve comet testlerinin bir arada kullanılmasıyla litre başına 1 nanogramlık 17 β -estradiol'un genotoksik etkilerinin tespitinde uygun ve yararlı olduğu tespit edilmiştir. Ghisi ve ark. (2011), çalışmalarında da fipronil insektisitine 60 gün süreyle maruz kalan *Rhamdia quelen* bireyleri kullanarak ortaya çıkan genotoksik hasarı comet, MN ve nükleer morfolojik anormallik testi ile incelemişlerdir. Sadece fipronilin en yüksek konsantrasyonunda eritrositlerde DNA hasarı gözlenirken, bu konsantrasyonların hiç biri solungaç hücrelerinde DNA hasarı oluşturmak için yeterli olmamıştır. Bu sonuçlar *R. quelen*'in biyoindikatör olarak kullanılan diğer balıklardan daha az hassas olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar kullanılan dozlar için seçilen testlerin *R. quelen*'deki DNA hasarının tespiti için yeterli olmayabileceğini söylemiş ve testlerin farklı konsantrasyonlarla tekrar uygulanmasını önermişlerdir. Ahmed ve ark. (2011), çalışmalarında comet tekniği kullanılarak kurşun klorür ile kirlenmiş sularda yaşayan *Anabas testudineus* balık türü üzerindeki DNA hasarını incelemişlerdir. En büyük DNA hasarı karaciğerde gözlenirken bunu sırasıyla böbrek ve solungaç dokuları izlemiştir. Pereira ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada *Liza aurata* örneklerini mevsimsel olarak civa ile kontamine olmuş Laranjo havzası ve kontaminasyonun olmadığı bilinen referans bölgeden (S.Jancinto) toplamışlar ve balıklardan alınan kan örneklerini comet testi ve apoptotik hücre sıklığı analiz yöntemleriyle inceleyerek cıvanın ortaya çıkarttığı genotoksik hasarı incelemişlerdir.

Elde edilen sonuçlar Laranjo havzasındaki balıklarda ölçülen DNA hasarının referans bölgedeki balıklardan daha fazla olduğunu ve DNA hasarının mevsimlere bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Bu çalışmayla *L.aurata* türü ve comet tekniğinin civa toksisitesinin incelenmesinde hassas ve uygun olduğu tespit edilmiştir. Çavaş ve Könen (2008) Domoic asid'in *Oreochromis niloticus* üzerindeki etkilerini, mikronukleus testi ve comet tekniği uygulayarak incelemişler ve sahip olduğunu genotoksik potansiyeli göstermişlerdir. Ali ve Kumar (2008) Monocrotophos pestisitinin *Channa punctatus* türü üzerindeki genotoksik etkilerini izlemiş ve çalışmayla balıklarda solungaç hücrelerinin, lenfosit ve böbrek hücrelerinden daha hassas olduğunu ve çevre biyomonitoring çalışmalarında balıkların model organizmalar olduğunu göstermişlerdir. Bony ve ark. (2008) üzüm bağlarında kullanılan pestisitlerin alan çalışmaları ve mesocosm koşullarındaki genotoksitelerini inceleyerek, çalışmanın sonunda bağ tedavisinde kullanılan pestisitlerden özellikle Diuron ve Azoxystrobinlerin, alan ve laboratuvar çalışmalarında gerçekçi çevresel pestisit konsantrasyonlarının genotoksik bir tehdit unsuru olduğunu gözlemlemişlerdir. Ventura ve ark. (2008) kırsal sucul ortamlarda geniş kullanıma sahip olan Atrazine herbisidiyle yaptıkları analizlerde, bu herbisitinin uygulandığı topraklara yakın su kaynaklarına karışabilmesiyle sucul ekosistemi olumsuz olarak etkileyebileceği sonucunu bulmuşlardır.

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

Bu tez çalışmasında zirai mücadelede pestisit olarak kullanılan CPF'in bitkilerdeki genotoksik etkilerini incelemek amacıyla *Hordeum vulgare* L. balıklardaki etkiler için ise *Danio rerio* H. materyal olarak kullanıldı.

III.1. Chlorpyrifos

Bu çalışmada kullanılan ve litrede 480 g saf Chlorpyrifos-etil içeren Dursban pestisiti ticari olarak temin edildi. Arpa bitkisi için ekin kambur böceği ve hububat hortumlu böceği ile mücadelede kullanılan dozlar ve bunların alt ve üst dozları tercih edilerek sıvı besin ortamında bitkiye uygulandı. Zebra balığı için ise ilgili literatür eşliğinde CPF'in doğada karşılaşılan dozu ve bu dozun alt dozlarında pestisit uygulaması akvaryum suyunda gerçekleştirildi.

III.1. *Hordeum vulgare* L.

Bu tez çalışmasında CPF'in genotoksik etkilerini incelemek amacıyla Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nün tescil ettirdiği arpa bitkisi (*Hordeum vulgare* L.) Çetin 2000 çeşidi kullanıldı. Altı sıralı yemlik arpa çeşidi olan Çetin 2000'nin arpa ekim alanlarındaki payı % 0.6'dır ve yaklaşık 57000 ton üretim ile ülke ekonomisine yılda 15 milyon TL katkıda bulunmaktadır. Çetin 2000 çeşidinin genel özellikleri ve arpa bitkisinin sistematikteki yeri Şekil III.1.'de ve Tablo III.1.'de verildi.



Alem : Plantae
Şube : Angiospermae
Sınıf : Monocotyledoneae
Takım : Poales
Familiya : Graminea
Alt : Pooideae
familiya
Cins : Hordeum
Tür : *Hordeum vulgare* L.

Şekil III.1. Arpa bitkisi (*Hordeum vulgare* L.) nin sistematikteki yeri.

Tablo III.1. Çalışmada kullanılan Arpa çeşidi Çetin 2000'in genel özellikleri.

Genel özellikleri	
Sıra sayısı	Altı sıralı
Kılçık	Kılçıklı
Başak tipi	Geniş ve uzun başaklı
Dane rengi	Beyaz
Yaprak tipi	Geniş ve koyu yapraklı
Boy (cm)	95-110
Yatma	Dayanıklı
Kardeşlenme kapasitesi	Yüksek
Verim özellikleri	Destek sulu koşullarda 600-750 kg/da
Bintane ağırlığı (g)	38-40 g
Protein oranı	% 11-13
Hastalık ve zararlı durumu	Arpa yaprak lekesi, Arpa çizgili yaprak lekesi ve Kar küfü hastalıklarına dayanıklıdır.

III.2. *Danio rerio*

Bu tez çalışmasında CPF'in pestisitinin genotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla *Danio rerio* kullanıldı. Zebra balığının sistematikteki yeri Şekil III.2'de verildi.

Alem	Animalia
Şube	Chordata
Sınıf	Actinopterygii
Takım	Cypriniformes
Familya	Cyprinidae
Cins	<i>Danio</i>
Tür	<i>Danio rerio</i>



Şekil III.2. Zebra balığının (*Danio rerio*) sistematikteki yeri.

III.3. COMET TESTİ HAZIRLIKLARI

Bu tez çalışmasında CPF'in *in vitro* genotoksik etkileri comet testi ile incelendi. Comet testinde yer alan adımların ilkinin kullanılacak lamaların hazırlığı (Tablo III.2) oluşturur.

Tablo III.2. Yüksek ve düşük kaynama dereceli agarozların içerik ve hazırlanışları.

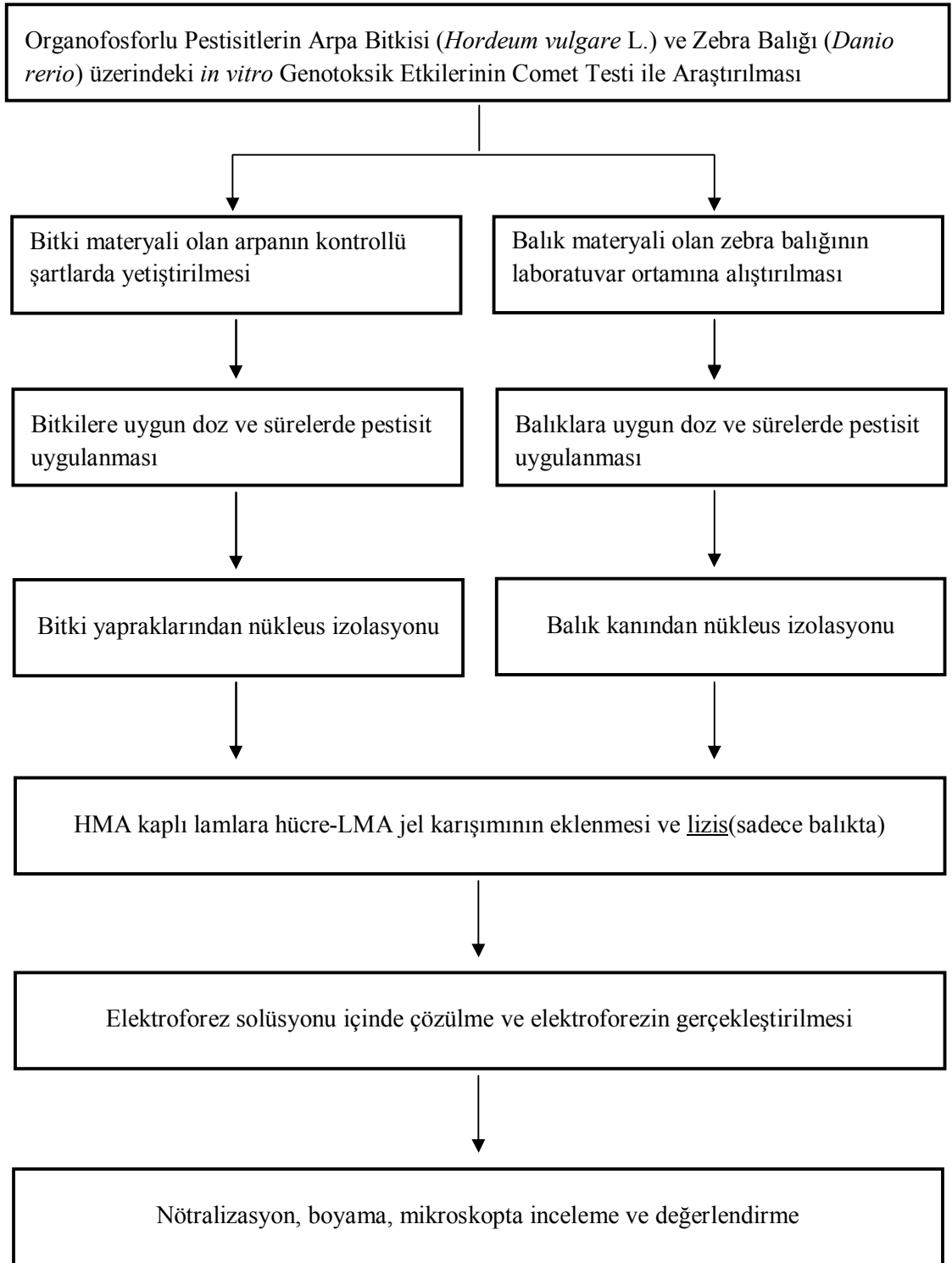
	İçerik	Hazırlanışı
Yüksek kaynama dereceli agaroz (HMA)	0,65 g HMA 100 ml distile su (dH ₂ O)	0,65 g HMA 100 ml dH ₂ O içerisinde mikrodalga fırında çözülür. Lamların kaplanması için kullanılır.
Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA)	0,65 g LMA 100 ml Fosfat tamponu (PBS)	0,65 g LMA 100 ml PBS içerisinde mikrodalga fırında çözülür. Hazırlandıktan sonra kullanıma kadar 37 °C’ de bekletilir.

Comet testinin diğer adımlarında kullanılan diğer solüsyonlar ve içerikleri ise Tablo III.3.’de verildi.

Tablo III.3. Comet testinde kullanılan solüsyonlar, içerikleri ve hazırlanışları.

		İçerik (1000 ml)	Katalog no	Hazırlanışı
Lizis çözeltisi	Stok	2,5M NaCl 146,1 g 100mM EDTA 37,2 g 10 mM Tris baz 1,2 g	S7653-1KG E5134-500G T5941-500G	İçerik 700 ml dH ₂ O ile karıştırılır. 10 M'lık NaOH ile çözeltinin pH'sı 10 yapılır ve distile su ile 890 ml'ye tamamlanır. +4°C'de kullanılmaya kadar saklanır.
	Çalışma Çözeltisi	890 ml lizis stok solüsyonu 100 ml Dimetilsülfoksit(DMSO) 10 ml Triton-X	K40377143 945 A4975,0100	İçerik karıştırılır, oluşan köpüğün giderilmesi için en az yarım saat buzdolabında bekletilir. Her deneyden önce taze hazırlanır.
Nötralizasyon çözeltisi	Çalışma Çözeltisi	0,4 M Tris-HCl 63,04g	T1378-500G	0,4 M Tris-HCl 63,04g ve az miktarda dH ₂ O ile çözülür. Ardından 10M'lık NaOH ile pH 7,5 ayarlanır ve dH ₂ O ile 1000 ml' ye tamamlanır.
Elektroforez çözeltisi	Stok	10N NaOH 200mM EDTA	B612662 619	400g NaOH 1000ml dH ₂ O ile çözülür. 14,89 g EDTA 200 ml dH ₂ O ile çözülür.
	Çalışma Çözeltisi	30 ml 10M NaOH (stok) 5 ml 200 mM EDTA (stok)		İçerik alınarak 1000 ml dH ₂ O ile hazırlanır. Her deneyden önce taze olarak hazırlanır.
Boyama çözeltisi	Stok (10 X)	200 mg EtBr 1000 ml distile su	E5134-500G	200 mg EtBr 1000 ml distile su içerisinde çözülür. Çözelti şişesi + 4 ° C' de karanlıkta saklanır.
	Çalışma Çözeltisi	200 ml stok EtBr çözeltisi 800 ml distile su		Mikrosantrifüj tüpü içerisinde, 200 ml stok EtBr çözeltisi, 800 ml distile suya eklenerek Vorteks ile karıştırılır.

Bu tez çalışmasında izlenecek çalışma programı Şekil III.3.'de özetlenmiştir.



Şekil III.3. Bu tez çalışmasında bitki ve balıkta comet analizi için takip edilen aşamalar.

III.4. BİTKİ MATERYALİNİN HAZIRLANMASI VE PESTİSİT UYGULANMASI

III.4.1.Yüzey Sterilizasyonu

Bitki materyalinin yetiştirilmesine ilk olarak tohumların seçimiyle başlandı. Bunun için tohumlardan birbirlerine yakın boyutlarda ve morfolojik olarak düzgün olanları seçilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirildi (Şekil. III. 4).



Şekil.III.4. Yüzey sterilizasyonu ve çimlenme.

Sterilizasyon için ilk olarak tohumlar % 70'lik alkol ile çalkalanıp 3 kez steril distile su ile yıkandıktan sonra %10'luk ticari çamaşır suyunda (sodyum hipoklorit) 15 dakika bekletilerek 7 kez steril distile su ile yıkandı (Şekil.III.4.A). Bu aşamalardan geçirilen tohumlar, steril petriler (14 cm) içindeki filtre kağıtlarına yerleştirilerek alüminyum folyo ile sarıldı ve 24 saat süreyle karanlıkta bekletildi. Çimlenme süresince iklimlendirme odasında 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık ve 24°C fotoperiyot koşullarında tutulan örneklerin (Şekil.III.4.B ve C) daha sonra çimlenme yüzdeleri hesaplandı.

III.4.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Çimlenerek 5-6 cm boyutuna ulaşan örnekler pestisit uygulaması amacıyla kullanılmak üzere gerekli makro ve mikro besin elementlerini içeren Hoagland solüsyonunda (Hoagland ve Arnon, 1950) iki hafta süreyle tutuldular. Beklenen süre sonunda yaprak boyları yaklaşık 20 cm'ye ulaşan fideler Comet testi için materyal olarak kullanıldılar.

Pestisit uygulamalarında kullanılan Hoagland besin çözeltisi, makro element, mikro element ve demir etilen diamin tetra asetik asit (FeEDTA) solüsyonlarının bir karışımı olarak 10 X konsantrasyonunda hazırlandı (Tablo III. 4).

Tablo III.4. Hoagland çözeltisi bileşenleri ve katalog numaraları

	Bileşen	Miktar (g)	Katalog no
Makro Besin Elementleri	K ₂ SO ₄	15.7 g	1051511000
	KH ₂ PO ₄	2.7 g	1048715000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	24.0 g	1058822500
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	47.23 g	1021210500
	KCl	0.0746 g	1049371000
Mikro Besin Elementleri	H ₃ BO ₃	0.124 g	1001605000
	MnSO ₄	0.066 g	1059991000
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.100 g	1027871000
	NH ₄ Mo	0.048 g	A1343-100G
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1553 g	Z0635-500G
Stok FeEDTA		36.5 g	E6760-500G
İyonların Hoagland çözeltisi içindeki son konsantrasyonları: Ca ⁺² (2 mM), Mn ⁺² (10 ⁻⁶ M), Bo (10 ⁻⁶ M), (NO ₃) ⁻¹ (4 mM), Cu ⁺² (2.10 ⁻⁷ M), Mg ⁺² (1 mM), NH ₄ (10 ⁻⁸ M), K ⁺¹ (2 mM), Zn ⁺² (10 ⁻⁶ M), P ⁺ (0.2 mM), Fe ⁺² (10 ⁻⁴ M)			

Stok makro çözeltisi (10X/L):Tablo III.4.'de verilen kimyasal maddeler sırası ile saf suda çözülerek son hacmi 2 litreye tamamlanan stok makro çözeltisi oda sıcaklığında saklandı.

Stok mikro çözeltisi (1X/L):Tablo III.4.'deki bileşenler 1 litre saf suda çözülerek stok mikro besin çözeltisi hazırlandı. Bu stoğun 50 ml'si, hazırlanan her 10 X/ 10litre makro stok solüsyonuna ilave edilerek Hoagland çalışma solüsyonu kullanıma hazır hale getirildi.

Stok FeEDTA çözeltisi (1000X/L): 36.5 g FeEDTA 1 litre saf suda çözülerek hazırlandı. Kullanım öncesi 1 X/1 litre Hoagland çözeltisine 1 ml stok FeEDTA'dan ilave edildi.

Hoagland çalışma çözeltisinin hazırlanması: Çalışma çözeltisi olarak 1 litre Hoagland çözeltisi hazırlamak için stok makro çözeltisi (10x/litre) 0.5 X oranında sulandırılıp 500 ml alındı. Üzerine stok mikro çözeltisinden 5 ml ve 1 ml stok FeEDTA karıştırılarak distile su ile 1 litreye tamamlandı.

III.4.3. Arpa fidelerine pestisit uygulanması

İki haftalık arpa fidelerine zirai mücadelede arpa zararlıları hububat hortumlu böceği ve ekin kambur böceğine karşı önerilen dozlar ile bu dozların altındaki ve üzerindeki değerleri ifade eden 5 ml/L, 10 ml/L, 20 ml/L ve 40 ml/ L şeklinde CPF uygulaması yapıldı. Çalışmamızın başında CPF uygulamaları için akut toksisite süreleri olarak literatürde belirtilen 24., 48., 72. ve 96. saatlerde dozlara bağlı bir inceleme yapılması planladı. Fakat yaptığımız ön denemelerde arpa bitkisinin hiçbir dozunda belirtilen saatlerde genotoksik hasar tespit edilemedi. Yapılan literatür incelemesi sonucunda Jovtchev ve ark. (2001) arpa da comet uygulamaları için özellikle yaprak dokusu için 18 saat, kök dokusu için 2 saati önermişlerdir. Bu nedenle daha kısa süreli uygulamalar yapılmak üzere süreler 6, 12 ve 18 saat olarak ilgili literatür ışığında yeniden düzenlendi.

Pestisit uygulaması, plastik 15 ml'lik santrifüj tüpleri içerisine bitkileri yetiştirmede kullanılan Hoagland solüsyonu ve uygun miktardaki pestisit koyularak gerçekleştirildi. Buna ek olarak negatif ve pozitif kontrol grupları oluşturuldu. Her grup için 5 tohumdan elde edilen uygun büyüklükteki bitkiler kullanıldı. Uygulama yapılan bitkilerden 6., 12. ve 18. saatlerde 0,4 g yaprak örnekleri alındı. Tüm doz ve saatler için ayrı ayrı alınan yaprak örneklerinden izole edilen nükleuslar Comet testi ile incelendi.

III.4.4. Arpa fidelerine negatif ve pozitif kontrol uygulaması

Negatif kontrol olarak Hoagland çözeltisinde yetiştirilen sağlıklı arpa fidelerinden alınan yaprak örnekleri, pozitif kontrol olarak ise genotoksik bir ajan olan % 0,1 'lik H₂O₂ içeren Hoagland solüsyonunda bekletilen (18 saat) fidelere ait yaprak örnekleri kullanıldı.

III.5. BALIK MATERYALİNİN LABORATUVAR ORTAMINA ALIŞTIRILMASI ve PESTİSİT UYGULANMASI

III.5.1. Balıkların laboratuvar ortamına alıştırılması

Ticari olarak satılan Zebra balıkları, pestisit uygulamasından bir hafta önce temin edilerek laboratuvar koşullarına alıştırılması sağlandı. Zebra balıkları daha önceden dekloronize edilmiş ve karbon filtreden geçirilmiş şehir suyu kullanılarak hazırlanan akvaryumlara (100 L) koyuldu. Akvaryum sıcaklığı 24°C ve pH'ı 7,5 olarak ayarlandı. Balıklar günde 1 kez pul yem ile beslendi ve 14 saat aydınlık / 10 saat karanlık fotoperiyodu uygulandı. Deney başlamadan 1 gün önce ve deney süresince balıkları besleme işlemi durduruldu. Tüm deney süresinde suya ait fiziksel ve kimyasal ölçümler gerçekleştirildi.

III.5.2. Balıklara pestisit uygulanması

Laboratuvara alıştırılan zebra balıklarına pestisit uygulaması için 10 litrelik cam akvaryumlarda doz başına 10 balık olacak şekilde akvaryum koşulları sağlandı. Çalışmada kullanılan balıkların tümü birbirine yakın boy ve ağırlıktaki bireylerden seçildi. Uygulama yapılan zebra balıklarının total boyu $4,7 \pm 0,1$ cm ve ortalama ağırlığı $0,72 \pm 0,1$ g. olarak ölçüldü.

Balıklara uygulanan CPF dozu literatür ışığında doğada karşılaşılan dozlar baz alınarak yapılan çeşitli denemeler sonucunda 10µg/L, 20µg/L, 40 µg/L ve 60µg/L olarak belirlendi (Tilton ve ark., 2011). Pestisit uygulaması için 10 lt akvaryum suyuna uygun miktardaki pestisit karıştırılarak balıklarda meydana gelen davranış değişiklikleri izlendi ve her doza ait gruplardan 24., 48., 72. ve 96. saatlerde heparinize şırınga ile kan örnekleri alınarak Comet testi ile incelendi.

III.5.3. Balıklarda negatif ve pozitif kontrol gruplarının oluşturulması

Negatif kontrol olarak sağlıklı zebra balıklarından heparinize şırınga ile alınan kan örnekleri incelendi. Pozitif kontrol amaçlı olarak ise genotoksik olduğu bilinen H₂O₂ tercih edildi. Balıklar, % 0,05 olacak şekilde H₂O₂ eklenen akvaryum suyunda 1 saat boyunca bekletildi ve heparinize şırınga ile kanları alınarak incelendi. Uygulanan H₂O₂ dozu ve saati önceki denemeler sonucunda elde edildi.

III.6. BİTKİ ve BALIK ÖRNEKLERİNE COMET TEKNİĞİNİN UYGULANMASI

Bu çalışmada Chlorpyrifos pestisiti uygulanan arpa bitkileri yaprak dokuları ve Zebra balığı kanından izole edilen hücreler kullanılarak comet testi ile Chlorpyrifos pestisitinin genotoksik etkileri incelendi (Şekil III.5). Çalışmada kullanılan protokol Çavaş ve Könen (2007)' den değiştirilerek uygulandı.



Şekil III.5.A₁ - A₂ : Arpa örneği ve yapraklardan nukleus izolasyonu.

Her doz ve saat için 6 mm'lik steril soğuk petriler içerisine 0,4g arpa yaprağı ve 400 μ L soğuk Tris tampon çözeltisi konuldu, keskin jiletler yardımıyla yapraklar parçalandı. İşlem loş ışıkta ve buzda gerçekleştirildi. Elde edilen süspansiyon mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 10 dakika buzda bekletilerek hücrelerin çökmesi sağlandı.

Şekil III.5.B₁ - B₂ : Balık örneği ve kan alınmasını takiben nukleus izolasyonu.

Her doz ve saat için 10 μ L kan örneği alınarak 1000 μ L PBS içerisinde çözüldü, elde edilen hücre süspansiyonu 10 dakika buz içerisinde bekletilerek hücrelerin çökmesi sağlandı.

Şekil III.5.' in devamı.



Şekil III.5. C : Hücre süspansiyonu ile LMA'nın karıştırılması.

Bu hücre süspansiyonundan; bitkide, dip kısmına yakın olacak şekilde 200 µl alınarak, eşit hacimdeki sıvı LMA (%0,65), balıkta ise, yine dip kısmına yakın olacak şekilde 60 µl alınarak, 200 µl sıvı LMA (%0,65) ile pipetasyon yapılarak iyice karıştırılır.



Şekil III.5. D : HMA kaplı lamlara hücre süspansiyonu yayılması.

Oluşan karışımdan, bitkide 100 µl, balıkta 75 µl alınarak, mikropipet ve lamel yardımıyla, daha önceden HMA (%0,65) ile kaplanmış lamlar üzerine yayıldı ve lamel ile kaptıldı. Lamlar LMA'nın donması amacıyla 10 dakika +4°C'de bekletildikten sonra dikkatlice lamelleri kaldırıldı.



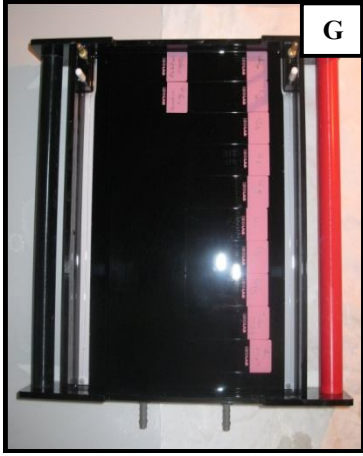
Şekil III.5. E : Lizis aşaması.

Lamelleri kaldırılan lamlar, lizis solüsyonuna alınır. Lizis işleminde amaç, hücre zarlarının ve ortamdaki kalıntıların uzaklaşmasını sağlamaktır. Bitkide, yapraklardan hücre izolasyonu sırasında, yapraklar jilet yardımıyla kesildiğinden lizis işlemine ihtiyaç duyulmamaktadır.



Şekil III.5. F : DNA sarmalının çözülmesi
Lizis sonrası DNA sarmalının çözünmesinin gerçekleşmesi için 20 dakika şale içerisinde soğuk elektroforez çalışma solüsyonunda bekletildi.

Şekil III.5.' in devamı.



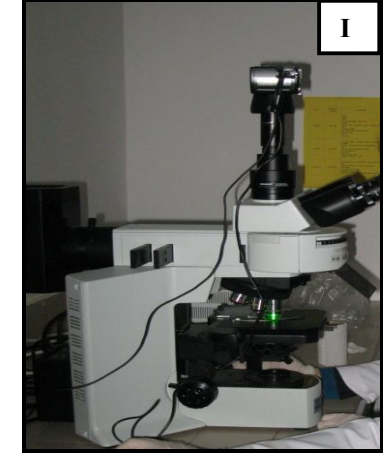
Şekil III.5. G : Elektroforez aşaması.

Çözünme işleminin ardından lamalar, elektroforez tankına (SCIE PLAS-Comet-02) alınarak, 30 dakika 15V 300 mA'de elektroforez gerçekleştirildi.



Şekil III.5. H : Nötralizasyon aşaması.

Soğuk Tris tampon solüsyonu içerisinde, 5'er dakika, 3 kez değiştirilerek nötralizasyon işlemi gerçekleştirildi.



Şekil III.5. I : Preparatların boyanması ve comet görüntülerin elde edilmesi.

Bu işlem sonrasında her preparat floresan renk vermesi için 80 µl etidyum bromid çalışma çözeltisi damlatılarak lamelle kapatıldı ve iyice boyanması için bir kaç dakika bekletilerek floresan mikroskop (Olympus BX51) altında incelendi.

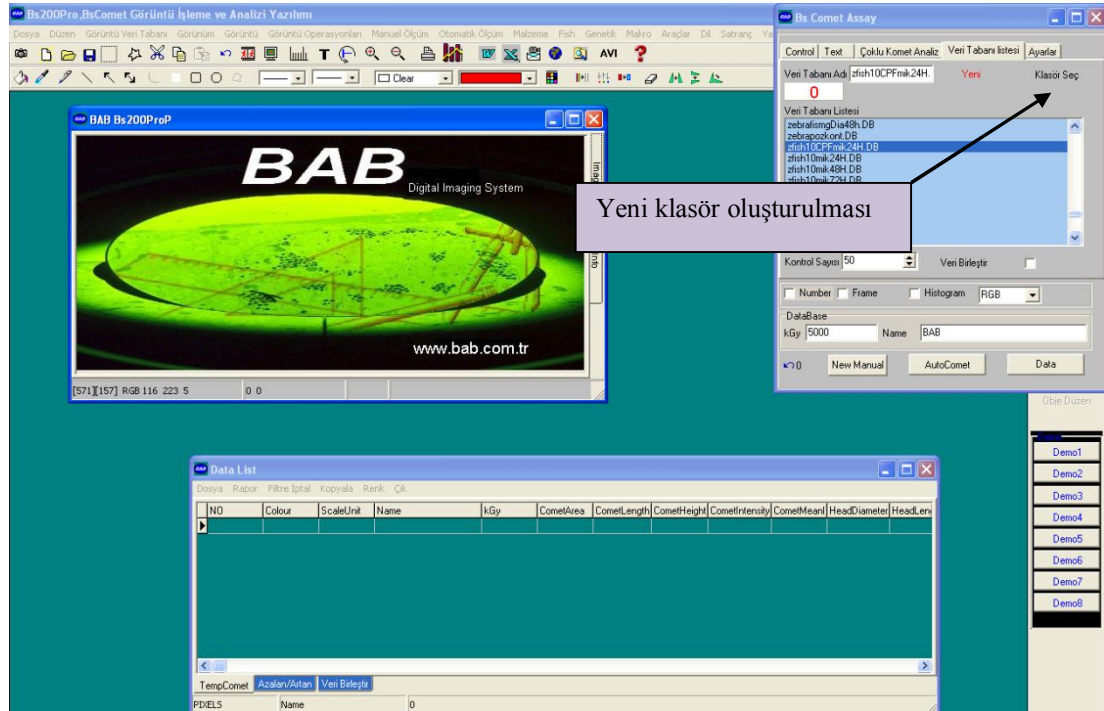
Şekil.III.5. Arpa bitkisi ve Zebra balığına Comet testinin uygulanması.

III.6.1. Comet Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Comet testi prokolüne göre boyanan lamalar floresan mikroskop altında incelenerek hasarlı ya da hasarsız nükleus resimleri elde edildi. Her doz ve saat için 2 preparat hazırlanarak toplam 50 hücre sayıldı. Floresan mikroskopta resimleri çekilen hücreler Comet analizi için BAB Bs Comet Görüntü İşleme ve analiz yazılımı yardımıyla aşağıdaki basamaklar izlenerek incelendi.

1. Yeni klasör oluşturulması

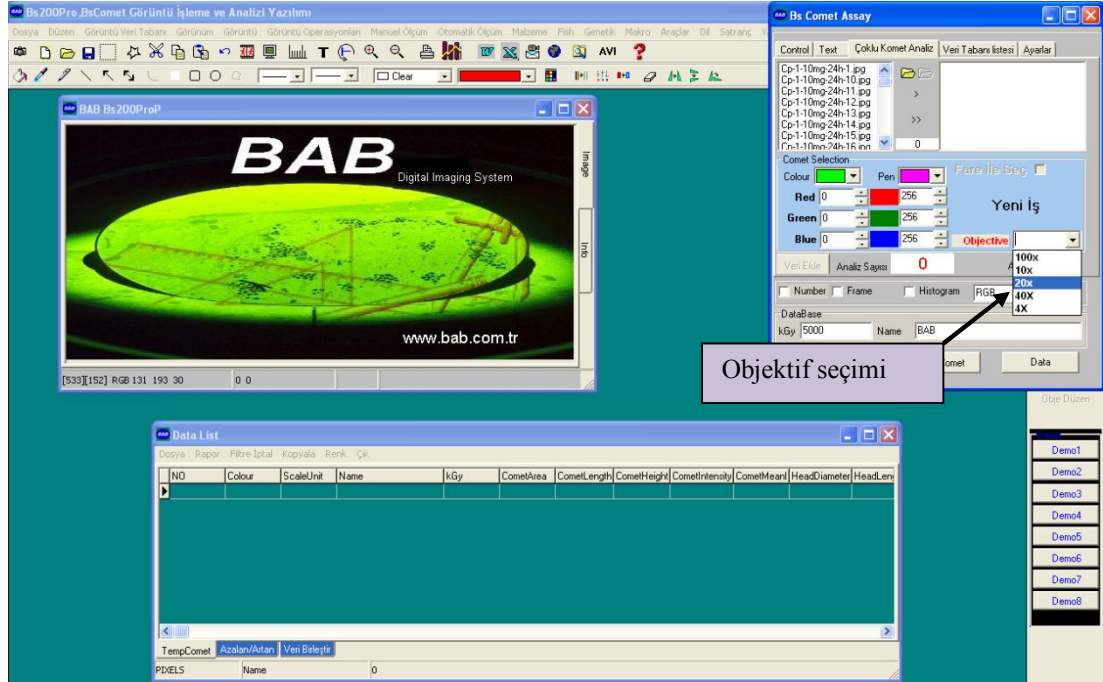
Program, işlem yapılacak pencere ve Data listesi olarak açılmaktadır (Şekil III.6). Öncelikle veritabanı listesi oluşturulmak üzere yeni bir klasör oluşturulur. Oluşturulan bu klasör seçildiğinde elde edilen ölçümlerin verileri bu dosya içerisinde depolanır.



Şekil III.6. BAB Bs Comet Görüntü işleme ve analiz yazılımı işlem yapılacak pencere ve data listesi.

2. Objektif seçimi

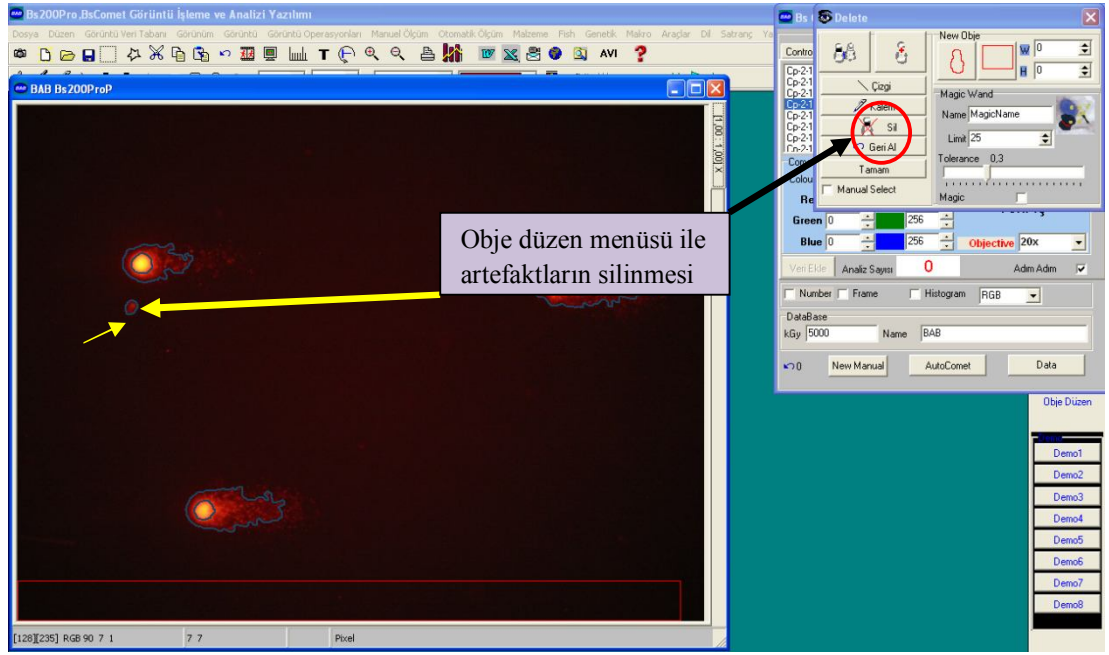
Analiz işlemi için “Çoklu Comet analizi” penceresi kullanılmaktadır. İlk adım olarak objektif seçimi yapılır (20X, 40X gibi). Daha sonra bilgisayarda kayıtlı olan dosyadan görüntüler çağrılır ve içlerinden analizi yapılacak olanlar seçilir (Şekil III.7).



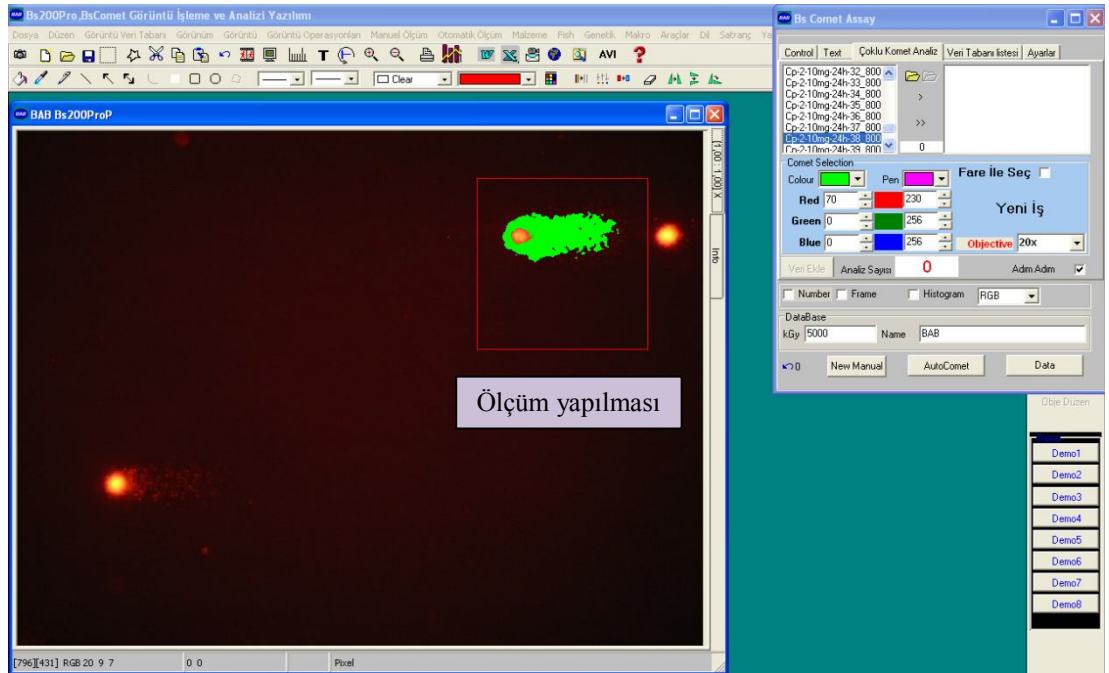
Şekil III.7. İlk adım olarak çalışılacak olan objektifin seçilmesi.

3. Comet ölçümlerinin yapılması

Analizi yapılacak görüntünün üzerine fare ile tıklanarak görüntü işlem yapılmak üzere ekrana çağrılır. Görüntü üzerinde açılan kare incelenecek olan hücrelerin üzerine getirilir. Hücrelerin baş ve kuyruk çerçeveleri renk ayarı kısmı ile belirlenir. Yapılan bu ince ayarın ardından hücrelerin çevrelerinde bulunan artefaktların silinmesi ve birbirine yapışık hücrelerin birbirinden ayrılması için “Obje düzen” menüsü kullanılır (Şekil III.8). Böylece analiz edilecek olan hücre tek ve çevresindeki kirliliklerden arındırılmış hale getirilir. Fare ile ölçümü yapılacak olan hücre üzerinde sağ tıklanarak ölçüm yapılır (Şekil III.9).



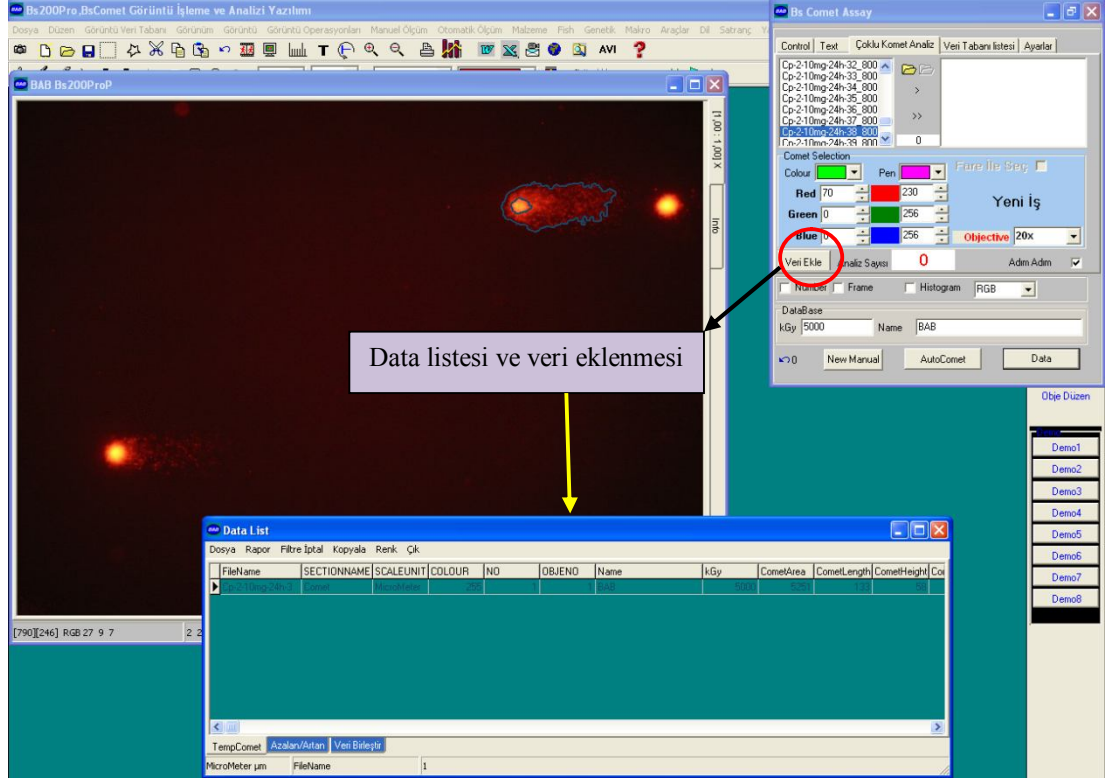
Şekil III.8. Objekt düzen menüsü ile artefaktların silinmesi.



Şekil III.9. Comet ölçümünün yapılması.

4. Data listesi ve veri eklenmesi

Analizi yapılan görüntüdeki hücrelerin ölçüm değerleri “Veri ekle” sekmesi ile daha önceden seçtiğimiz dosya içerisine data olarak eklenir (Şekil.III.10).



Şekil III.10. Ölçüm değerlerine göre verilerin klasöre eklenmesi.

5. Verilerin istatistiğinin yapılması

Data listesi üzerinde mevcut olan parametrelerden (Comet uzunluğu, Comet alanı, Kuyruk momenti, Kuyruk uzunluğu gibi) herhangi birine sağ tıklanıp “Tüm istatistik” seçilerek analizin bütün parametrelerinin istatistiksel verileri elde edilir (Şekil III.11).

zfish10mik24H.DB

Dosya Rapor Filtre İptal Kopyala Renk Çık

File Name	SECTIONNAME	SCALEUNIT	COLOUR	NO	OBJ END	gK	gY	Name	kGy	CometArea	CometLength	CometHeight	CometIntensity	CometMean	HeadCircle	HeadDiameter
zfish10mik24H.1	Comet	mm	Red	1	1	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.2	Comet	mm	Red	2	2	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.3	Comet	mm	Red	3	3	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.4	Comet	mm	Red	4	4	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.5	Comet	mm	Red	5	5	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.6	Comet	mm	Red	6	6	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.7	Comet	mm	Red	7	7	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.8	Comet	mm	Red	8	8	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.9	Comet	mm	Red	9	9	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.10	Comet	mm	Red	10	10	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.11	Comet	mm	Red	11	11	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.12	Comet	mm	Red	12	12	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.13	Comet	mm	Red	13	13	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.14	Comet	mm	Red	14	14	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.15	Comet	mm	Red	15	15	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.16	Comet	mm	Red	16	16	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.17	Comet	mm	Red	17	17	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.18	Comet	mm	Red	18	18	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.19	Comet	mm	Red	19	19	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.20	Comet	mm	Red	20	20	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.21	Comet	mm	Red	21	21	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.22	Comet	mm	Red	22	22	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.23	Comet	mm	Red	23	23	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.24	Comet	mm	Red	24	24	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.25	Comet	mm	Red	25	25	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.26	Comet	mm	Red	26	26	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.27	Comet	mm	Red	27	27	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.28	Comet	mm	Red	28	28	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.29	Comet	mm	Red	29	29	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.30	Comet	mm	Red	30	30	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.31	Comet	mm	Red	31	31	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.32	Comet	mm	Red	32	32	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.33	Comet	mm	Red	33	33	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.34	Comet	mm	Red	34	34	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.35	Comet	mm	Red	35	35	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.36	Comet	mm	Red	36	36	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.37	Comet	mm	Red	37	37	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.38	Comet	mm	Red	38	38	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.39	Comet	mm	Red	39	39	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.40	Comet	mm	Red	40	40	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.41	Comet	mm	Red	41	41	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.42	Comet	mm	Red	42	42	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.43	Comet	mm	Red	43	43	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.44	Comet	mm	Red	44	44	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.45	Comet	mm	Red	45	45	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.46	Comet	mm	Red	46	46	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.47	Comet	mm	Red	47	47	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.48	Comet	mm	Red	48	48	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.49	Comet	mm	Red	49	49	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
zfish10mik24H.50	Comet	mm	Red	50	50	100.00	100.00	Comet	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

zfish10mik24H Azdır/Açtır Yenile

PD/ELS Name 50

Şekil III.11. Data listesi ve tüm istatistik yapılması.

BÖLÜM IV

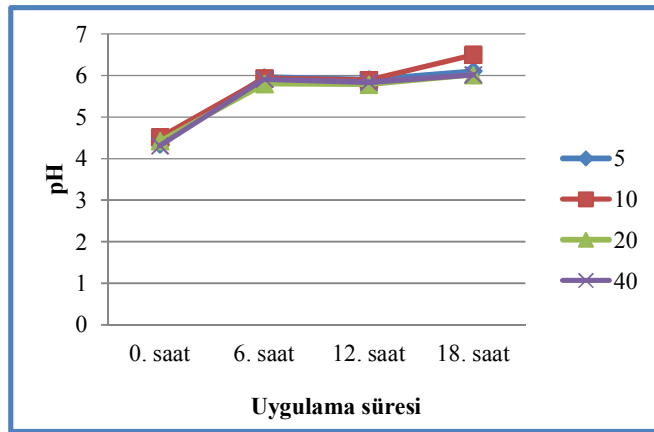
SONUÇLAR ve TARTIŞMA

IV.1. PESTİSİT UYGULAMASI

IV.1.1. Bitkilere (*Hordeum vulgare* L.) Chlorpyrifos (CPF) uygulanması

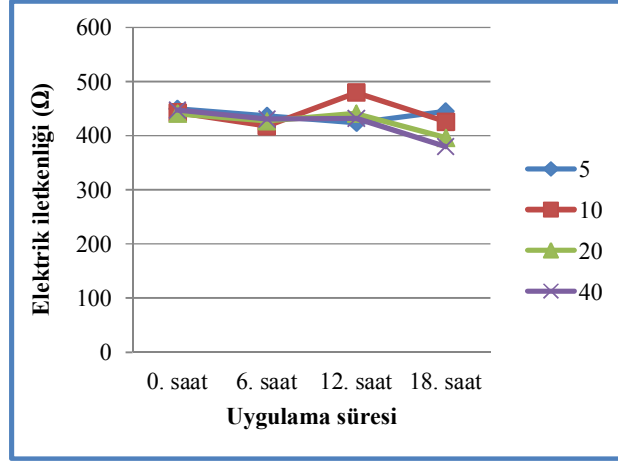
Bu çalışmada; farklı konsantrasyonlardaki CPF (5 ml/L, 10 ml/L, 20 ml/L ve 40 ml/L), negatif kontrol (CPF 0, Hoagland solüsyonu) ve pozitif kontrol (% 0.1 H₂O₂ içeren Hoagland solüsyonu) ile birlikte iki haftalık arpa fidelerine uygulandı.

Uygun fotoperiyotta (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) ve oda sıcaklığında gerçekleştirilen tüm CPF dozlarına ait örneklemeler 6., 12. ve 18. saatlerde gerçekleştirildi. CPF, yüksek alkali koşullarda hızlı bir şekilde bozunarak etkisini yitirdiğinden, uygulamalar süresince besiyerlerinin pH, sıcaklık ve elektrik iletkenlikleri kontrol edildi ve tüm parametrelerde önemli bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi (Şekil IV.1). Kuter (1994) ve Kaya (2002) tarafından bildirilen CPF'in hidroliz oranının asidik ve nötral sularda sabit olduğu yönündeki bilgi bu çalışmanın sonucu ile uyumlu olduğu görüldü.



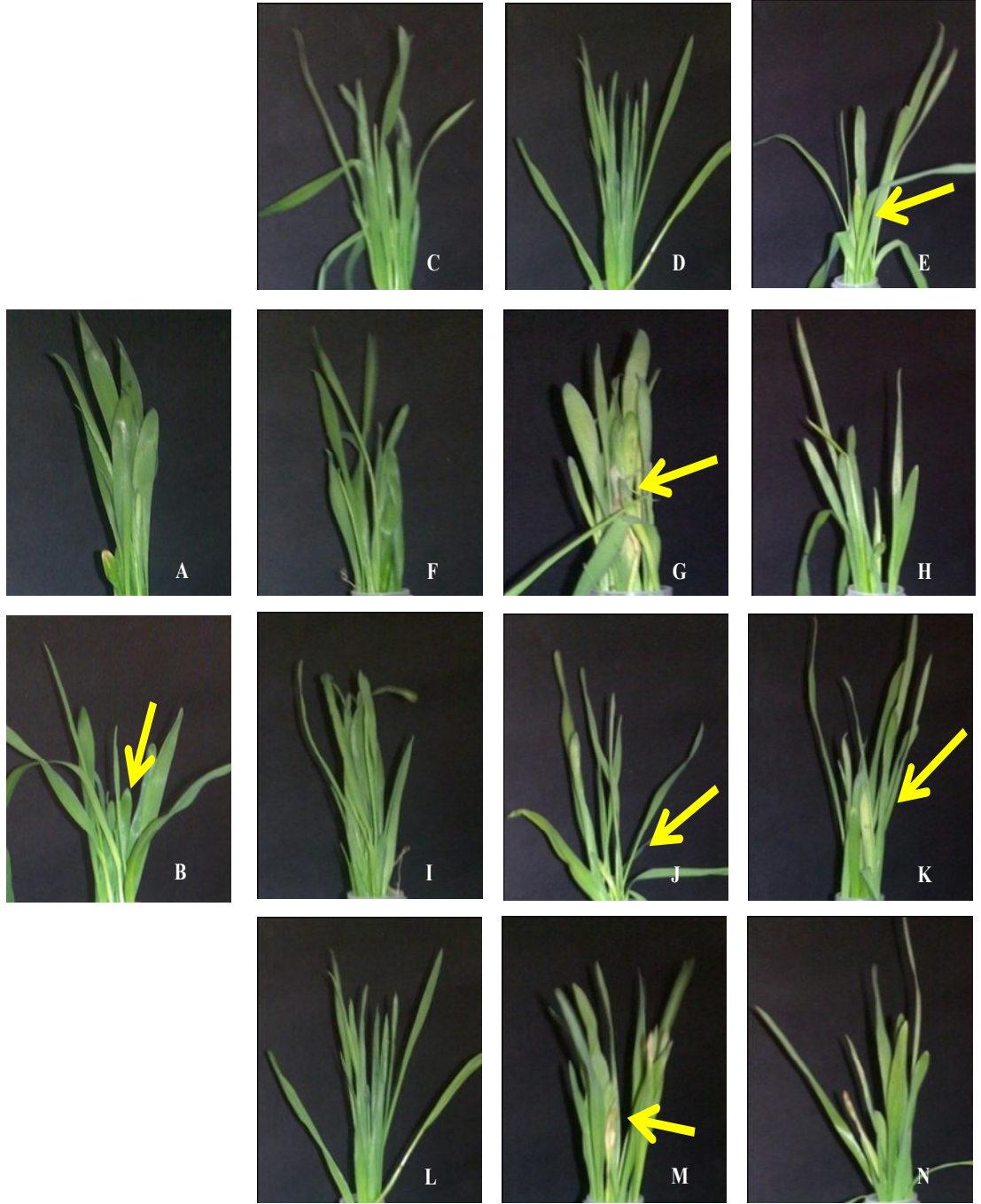
Şekil IV.1. Arpa fidelerine CPF uygulanması sırasında pH' da meydana gelen değişimler.

Aynı şekilde sıcaklık artışına bağlı CPF'in bozunmasını engellemek amacıyla sabit sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmamızda elektriksel iletkenlikte de belirli bir değişikliğin olmaması CPF'in bozunmaya uğramadığını göstermektedir (Şekil IV.2).



Şekil IV.2. Arpa fidelerine CPF uygulanması sırasında elektrik iletkenliğinde meydana gelen değişimler.

Genotoksik ajanlara maruz kalmış organizmalarda bazı biyolojik süreçler olumsuz etkilenir. Büyümenin durması protein ve nükleik asit içeriklerinde artma veya azalma, önemli enzimlerin inhibe olması, pigment içeriğindeki değişim, DNA'da hasar veya mutasyonların oluşması genotoksik ajanların etkisiyle bitkilerde oluşabilecek bazı önemli biyolojik cevaplardır (Cenkci ve ark., 2010). Deney süresince farklı dozlardaki CPF ve % 0,1 lik H_2O_2 (pozitif kontrol) uygulamalarına bağlı olarak yaprak dokularında kısmi sararmalar morfolojik olarak gözlemlendi (Şekil IV.3).



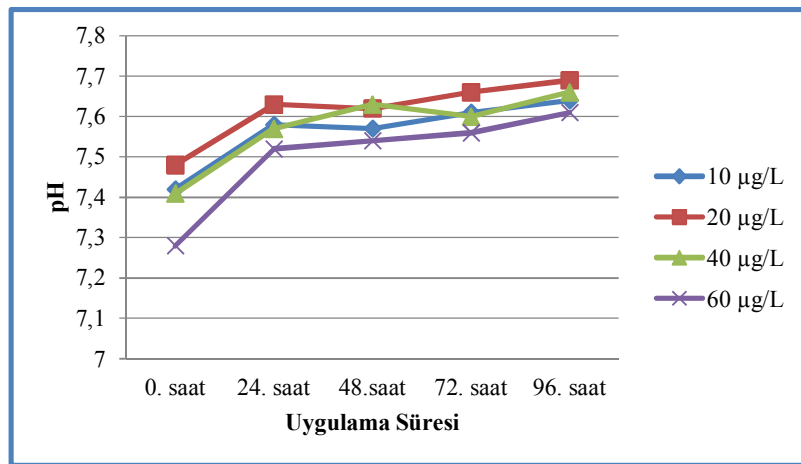
Şekil IV.3. Arpa fidelerine farklı doz ve sürelerde CPF ve pozitif kontrol olarak % 0.1 H₂O₂ uygulanması sonucunda yapraklarda meydana gelen sararmalar. **A:**Negatif kontrol **B:** Pozitif kontrol **C:** 5 ml/L CPF 6. sa **D:** 5 ml/L CPF 12. sa **E:** 5 ml/L CPF 18. sa **F:** 10 ml/L CPF 6. sa **G:** 10 ml/L CPF 12. sa **H:** 10 ml/L CPF 18. sa **I:** 20 ml/L CPF 6. sa **J:**20 ml/L CPF 12. sa **K:** 20 ml/L CPF 18. sa **L:** 40 ml/L CPF 6. sa **M:**40 ml/L CPF 12. sa **N:** 40 ml/L CPF 18. sa

IV.1.2. Balıklara (*Danio rerio*) Chlorpyrifos (CPF) uygulanması

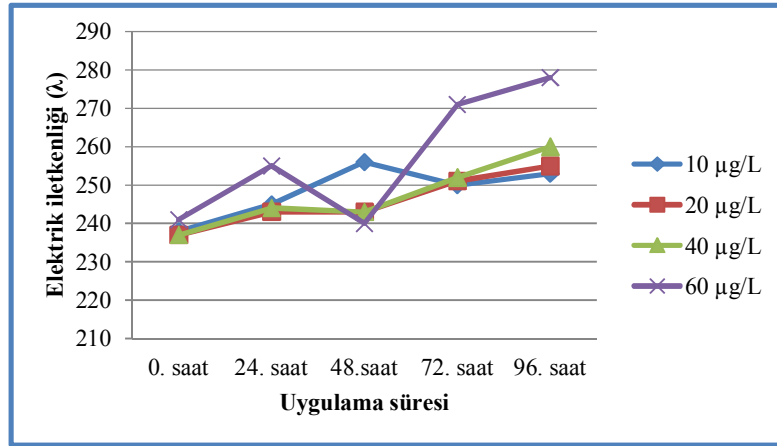
Çalışmada kullanılan balıkların tümü birbirine yakın boy (ortalama total boyu $4,7 \pm 0,1$ cm) ve ağırlıktaki (ortalama ağırlığı $0,72 \pm 0,1$ g) bireylerden seçildi, negatif kontrol (CPF 0 akvaryum suyu), pozitif kontrol (% 0,5 H_2O_2 içeren akvaryum suyunda 1 saat süreyle) ve farklı konsantrasyonlarda CPF (10 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$, 40 $\mu\text{g/L}$ ve 60 $\mu\text{g/L}$) Zebra balıklarına uygun fotoperiyot ve sabit sıcaklık (18°C) koşullarında uygulandı (n=5). Her doza ait gruplardan 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki ve kontrol gruplarındaki balıklardan kan örnekleri alınarak comet testi ile incelendi.

Pestisit uygulaması boyunca balıklarda meydana gelen davranış değişiklikleri izlendi. Tilton ve arkadaşları (2011) zebra balıklarıyla yaptıkları bir çalışmada nörotoksik oldukları bilinen bakır klorür, CPF ve her ikisinin karışımını kullanarak yüzme davranışlarını incelemiş ve en yüksek CPF dozunda (0,6 μM) zebra balıklarının aktif yüzme oranlarında azalma gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada da yüksek dozda pestisit uygulaması yapılan gruplarda (40 $\mu\text{g/L}$ ve 60 $\mu\text{g/L}$) yüzme ve davranış bozuklukları (dibe çökme) gözlemlendi.

Pestisit uygulamasından sonra ve deney süresince her gün akvaryum sularının pH ve elektrik iletkenlikleri ölçüldü ve bitki uygulamasında olduğu gibi önemli bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. Zebra balıklarındaki bu sonuçlar, Kuter (1994) ve Kaya (2002) tarafından bildirilen asidik ve nötral sularda CPF'in hidroliz oranının değişmediği yönündeki bilgiyi destekler nitelikte bulundu (Şekil.IV.4 ve Şekil.IV.5).



Şekil IV.4. Zebra balıklarına CPF uygulanması sırasında pH' da meydana gelen değişimler.

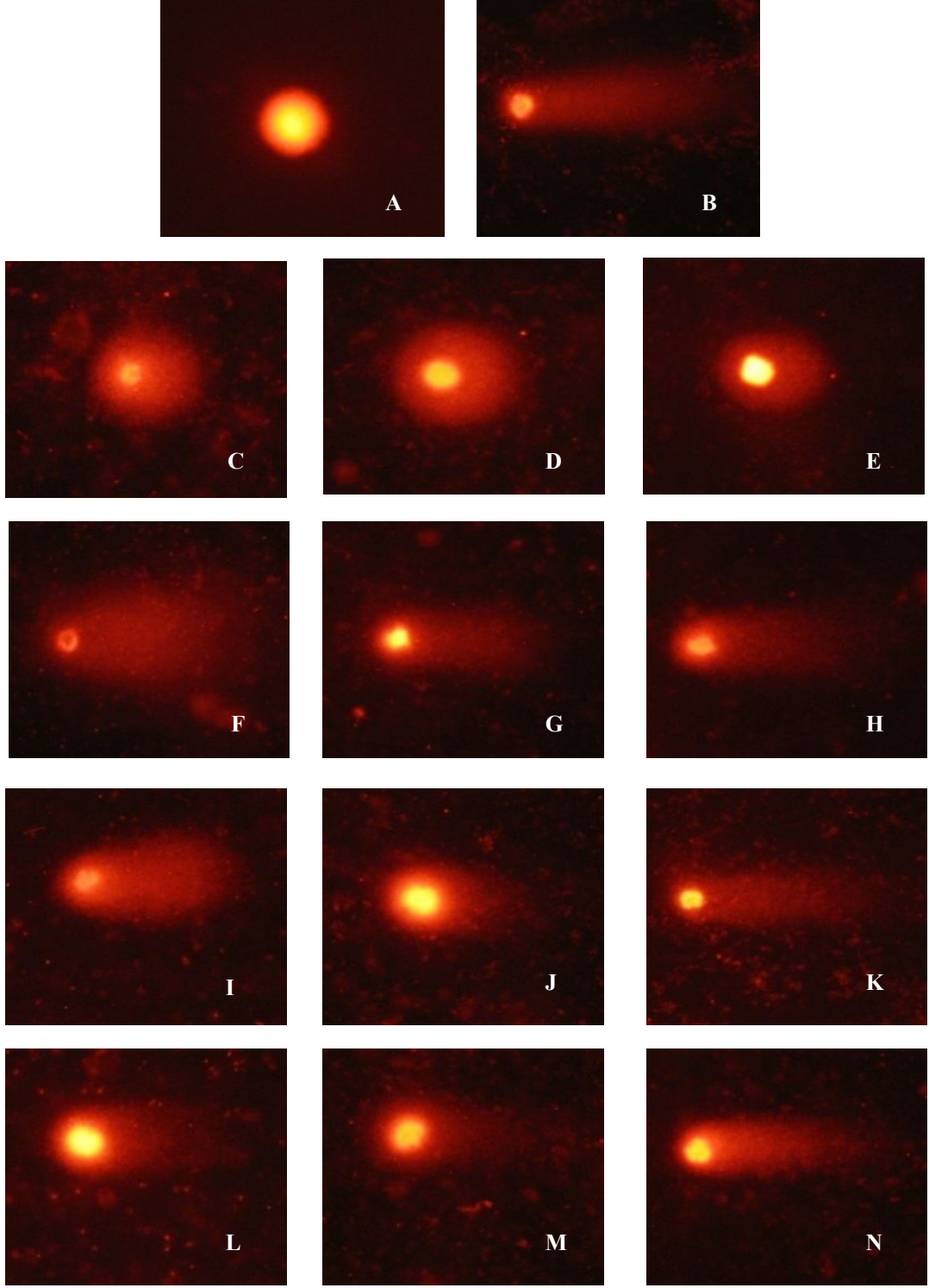


Şekil IV.5. Zebra balıklarına CPF uygulanması sırasında elektrik iletkenliğinde meydana gelen değişimler.

IV.2. COMET TESTİNİN UYGULANMASI

IV.2.1. CPF uygulanmış *Hordeum vulgare* L. örneklerinde genotoksik hasarın comet testi ile analizi

Arpa fidelerine ait pozitif, negatif kontroller ile 6., 12. ve 18. saatlerdeki uygulama gruplarında (5 ml/L, 10 ml/L, 20 ml/L ve 40 ml/L), genotoksik hasara bağlı oluşan ve nükleus dışına göç etmiş DNA profilini yansıtan comet oluşumları floresan boyama ile gösterildi. Elde edilen comet görüntüleri incelendiğinde pozitif kontrol grubunda (Şekil IV.6 B) negatif kontrolle karşılaştırıldığında (Şekil IV.6 A) belirgin kuyruk yapısı izlendi. Farklı dozlarda CPF uygulama gruplarında doza ve zamana bağlı olarak gelişen genotoksik hasarın gözle de izlenebildiği tüm sonuçlara ait görsel comet skorları Şekil IV.6 C-N'da verildi. Elde edilen görüntüler BAB BsPro200 bilgisayar programı yardımıyla analiz edilerek sonuçlar genotoksisite çalışmalarında iyi bir korelasyon sağlayan % DNA kuyruk ve olive kuyruk momenti parametrelerine göre değerlendirildi.



Şekil IV.6. Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde CPF maruziyeti sonucunda arpa bitkisi hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının floresan mikroskop görüntüleri.

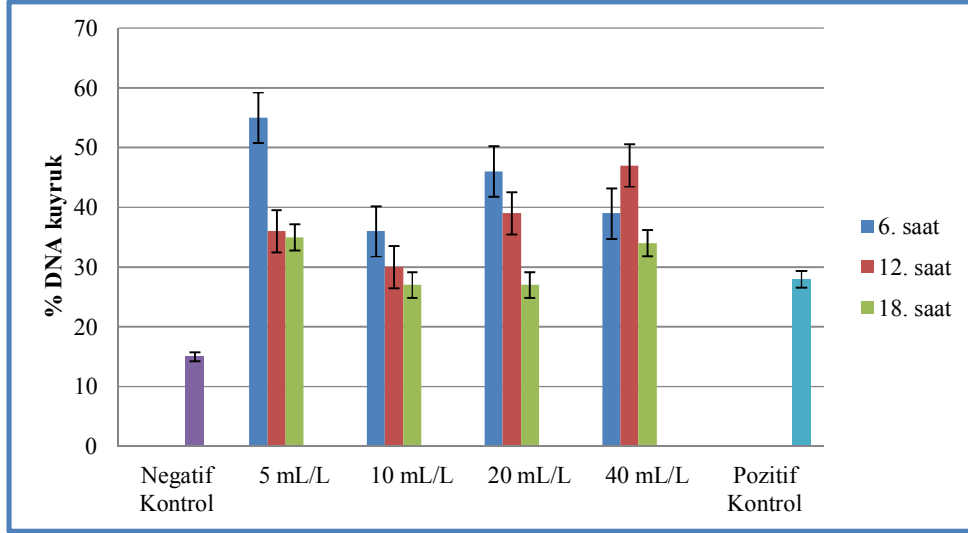
A:Negatif kontrol **B:** Pozitif kontrol **C:** 5 ml/L CPF 6. sa **D:** 5 ml/L CPF 12. sa
E: 5 ml/L CPF 18. Sa **F:** 10 ml/L CPF 6. sa **G:** 10 ml/L CPF 12. sa **H:** 10 ml/L CPF
18. sa **I:** 20 ml/L CPF 6. Sa **J:**20 ml/L CPF 12. sa **K:** 20 ml/L CPF 18. sa **L:** 40 ml/L

CPF maruziyetine bağı gelişen ve comet testi ile belirlenen DNA hasar seviyelerinin, tüm saat ve dozlarda pozitif kontrol grubuna göre oransal olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. Buna göre en yüksek DNA hasar seviyesi (%DNA kuyruk: 55, Olive kuyruk momenti: 0.36) 6. saatte 5ml/L CPF uygulanmış arpa örneklerinde belirlendi ($p<0,001$). Uygulama süresine bağı olarak 40ml/L CPF uygulaması dışındaki tüm gruplarda belirlenen DNA hasar seviyesinde azalmanın olduğu tespit edilidi. 40ml/L CPF uygulamasında ise 12. saatteki DNA hasar seviyesi (%DNA kuyruk: 47, Olive kuyruk momenti: 0.29) 6. saatle karşılaştırıldığında (%DNA kuyruk: 39, Olive kuyruk momenti: 0.23) anlamlı bir artış olduğu izlendi (Tablo IV.1).

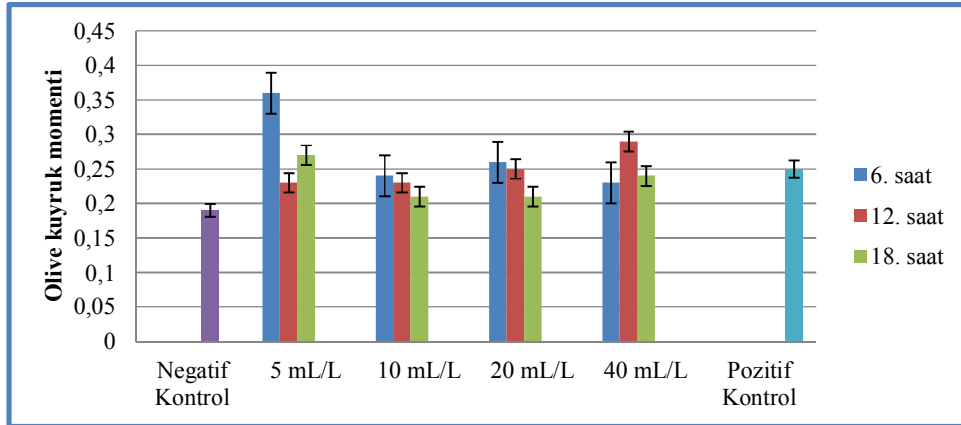
Tablo. IV.1. Arpa bitkisinden elde edilen comet görüntülerinin analizi sonucu % DNA kuyruk ve olive kuyruk momenti verileri.

Doz	Süre	%DNA kuyruk	Olive kuyruk momenti
Negatif kontrol		15	0.19
Pozitif kontrol	18. saat	28	0.25
5 ml/L	6. saat	55	0.36
	12. saat	36	0.23
	18. saat	35	0.27
10 ml/L	6. saat	36	0.24
	12. saat	30	0.23
	18. saat	27	0.21
20 ml/L	6. saat	46	0.29
	12. saat	39	0.25
	18. saat	27	0.21
40 ml/L	6. saat	39	0.23
	12. saat	47	0.29
	18. saat	34	0.24

Uygulama grupları ile negatif kontrol grubu arasındaki ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve tüm gruplarda DNA hasarının CPF uygulaması ile önemli seviyede ($p < 0.001$) teşvik edildiği belirlendi. (Şekil IV.7 ve IV.8).



Şekil IV.7. Arpa bitkisinde farklı konsantrasyon ve sürelerde CPF maruziyeti sonucu meydana gelen DNA hasarı oranları (% DNA Kuyruk).



Şekil IV.8. Arpa bitkisinde farklı konsantrasyon ve sürelerde CPF maruziyeti sonucu meydana gelen DNA hasarı oranları (Olive kuyruk momenti) .

Georgieva ve Stoilov (2008), arpa kök uçlarına farklı dozlarda bleomisin uygulayarak, comet tekniği ile tek ve çift iplik kırıklarını incelemişler ve tüm dozlarda doza bağlı bir artış gösteren DNA hasarını tespit etmişlerdir. Uygulamadan 15 dk sonra oluşan hasarda bir azalma tespit etmiş, 1. saatin sonunda ise sonra oluşan hasarın % 50'sinin tamir edildiğini gözlemlemişlerdir. Kullanılan en yüksek bleomisin dozunda daha belirgin bir tamir mekanizmasının etkili olduğunu izlemişlerdir. Bu tez çalışmasında, 18. saat sonunda en yüksek DNA hasarını 5 ml/L CPF (% DNA kuyruk: 35, Olive kuyruk moment: 0.27) dozunda gözlemledik. Elde ettiğimiz bu veri artan dozda tamir mekanizmasının daha belirgin olduğu yönündeki bilgiyi destekler niteliktedir.

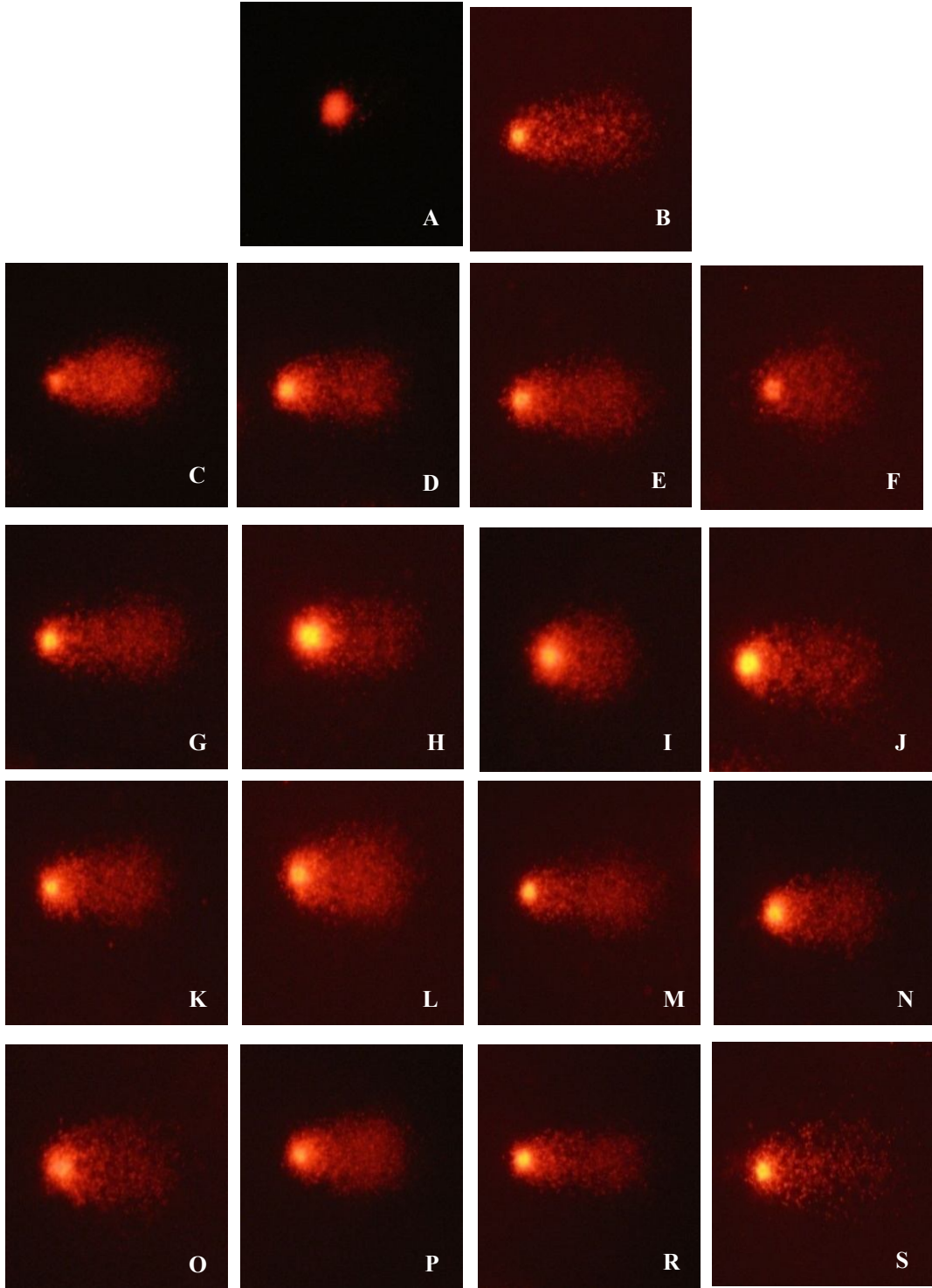
Armalyte ve Zukas (2002), arpa kök meristem nükleuslarına 3000 J/m² ve 6000 J/m² dozlarında UV uygulayarak oluşan DNA hasarı ve tamir mekanizmasını comet tekniğiyle inceleyerek, artan UV dozuna bağlı olarak oluşan nükleus fragmentlerinde artış tespit etmişlerdir. UV maruziyeti sonrasında süspansiyonları oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra 2. ve 8. saat sonunda tekrar comet testi uygulanmış ve her UV dozunda oluşan DNA hasarında azalma görülmüştür. 8. saat sonunda daha yüksek bir tamir oranı ile karşılaşmışlar ve tamir mekanizmasında nükleotid ve baz eksizyon mekanizmasının rol aldığını öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçlarında da CPF uygulaması sonrası oluşan DNA hasarına ait en düşük % DNA kuyruk verileri tüm dozların 18. saatinde elde edilmiştir.

Jovtchev ve arkadaşları (2001), alkilleyici bir ajan olan MNU ile arpa bitkisini muamele etmişler, yaprak ve kök ucu nükleuslarında ortaya çıkan DNA hasarını comet testi ile incelemiş ve doza bağlı bir artış gözlemlemişlerdir. Kök ucu nükleuslarında 6. saatten, yaprak nükleuslarında ise 18. saatten itibaren DNA göç miktarında önemli bir düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise arpa fidelerine CPF uygulaması sonucu yaprak nükleuslarında 6. saat sonrasında DNA hasarında önemli derecede bir düşüş tespit edildi.

Yapılan literatür tarama çalışmaları sonucunda organofosforlu pestisitlerin genotoksik etkilerinin comet tekniği ile incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece Bozdağ (2009) tarafından, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisi üzerinde, farklı dozlarda, 2,4 -D (2,4 -0) ve Dicamba okisinik herbisitleri kullanılarak yapılan çalışmada ise DNA hasarının doza bağlı olarak arttığını gösterilmiştir. Bizim uygulamalarımızda da 5 ml/L CPF konsantrasyonu dışındaki tüm dozlarda, artan konsantrasyona bağlı olarak DNA hasar seviyesinde önemli bir artış gözlemlendi.

IV.2.2. *Danio rerio* comet testinin uygulanması ve sonuçları

Zebra balıklarına ait pozitif, negatif kontroller ile 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki uygulama gruplarında (10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L ve 60 µg/L), nükleus dışına göç etmiş DNA profilini yansıtan comet oluşumu floresan boyama ile gösterildi. Pozitif kontrol ve uygulama gruplarından (Şekil IV.9 c-s) elde edilen comet görüntüleri negatif kontrolle (Şekil IV.9 A) karşılaştırıldığında kuyruk oluşumunun belirgin bir şekilde arttığı görüldü. Comet görüntüleri bilgisayar programı kullanılarak analiz edildi ve DNA hasar seviyeleri % DNA kuyruk ve olive kuyruk momenti olarak sunuldu.



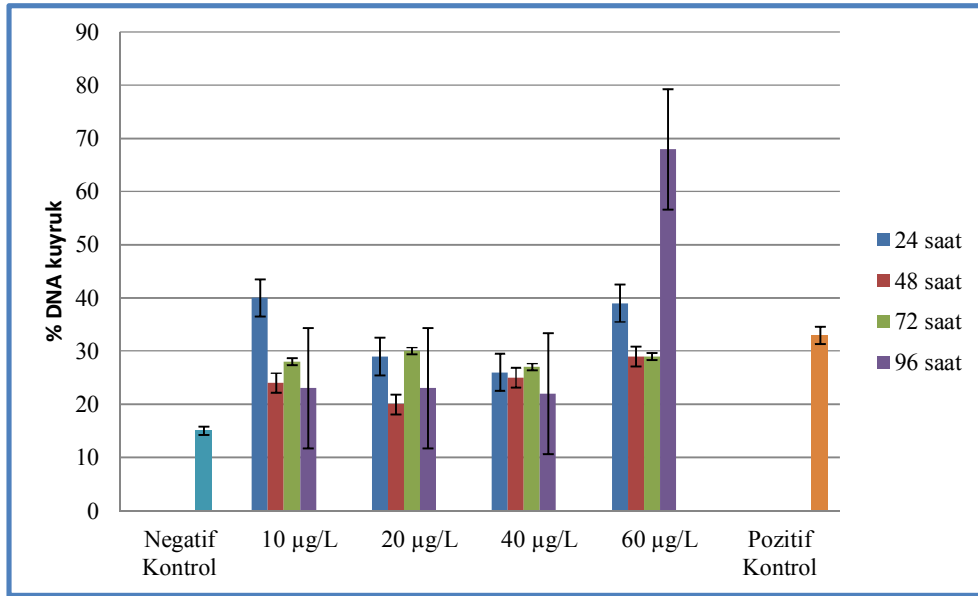
Şekil IV.9. Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde CPF maruziyeti sonucunda zebra balığı kan hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının floresan mikroskopta tespit edilmesi. **A:**Negatif kontrol **B:** Pozitif kontrol **C:** 10 µg/L CPF 24. sa **D:** 10 µg/L CPF 48. sa **E:** 10 µg/L CPF 72. sa **F:** 10 µg/L CPF 96. sa **G:** 20 µg/L CPF 24. sa **H:** 20 µg/L CPF 48. sa **I:** 20 µg/L CPF 72. sa **J:** 20 µg/L CPF 96. sa **K:** 40 µg/L CPF 24. sa **L:** 40 µg/L CPF 48. sa **M:** 40 µg/L CPF 72. sa **N:** 40 µg/L CPF 96. sa **O:** 60 µg/L CPF 24. sa **P:** 60 µg/L CPF 48. sa **R:** 60 µg/L CPF 72. sa **S:** 60 µg/L CPF 96. sa.

% DNA kuyruk sonuçlarına bakıldığında, CPF maruziyeti sonrasında uygulama gruplarında gelişen DNA hasar seviyelerinin, tüm saat ve dozlarda negatif kontrol grubuna göre oransal olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. Buna göre en yüksek DNA hasar seviyesi (% DNA kuyruk: 68) 96. saatte 60 µg/L CPF uygulamasında belirlendi ($p<0,001$). Süre artımı ile birlikte 60 µg/L CPF uygulaması yapılan grup dışındaki tüm gruplarda belirlenen DNA hasar seviyesinde lineer olmayan anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi ($p<0,001$) (Şekil IV.9). Olive kuyruk momenti sonuçlarında ise uygulama grupları ile negatif kontrol grupları arasındaki ikili karşılaştırmalarda tüm gruplarda DNA hasar seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olduğu gözlemlendi. En yüksek DNA hasar seviyesi (olive kuyruk momenti: 0.51) 96. saatte 60 µg/L CPF uygulamasında belirlendi ($p<0,001$)

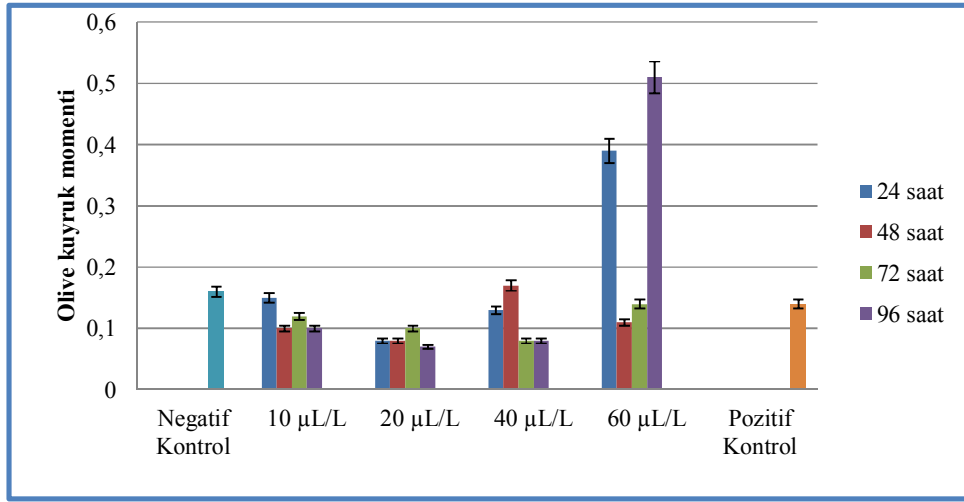
Tablo. IV.2. Zebra balıklarından elde edilen comet görüntülerinin analizi sonucu % DNA kuyruk ve olive kuyruk momenti verileri.

Doz	Süre	%DNA kuyruk	Olive kuyruk momenti
Negatif kontrol		15	0.16
Pozitif kontrol	1. saat	33	0.14
10 µg/L	24. saat	40	0.15
	48. saat	24	0.1
	72. saat	28	0.12
	96. saat	23	0.1
20 µg/L	24. saat	29	0.08
	48. saat	20	0.08
	72. saat	30	0.1
	96. saat	23	0.07
40 µg/L	24. saat	26	0.13
	48. saat	25	0.17
	72. saat	27	0.08
	96. saat	22	0.08
60 µg/L	24. saat	39	0.39
	48. saat	29	0.11
	72. saat	29	0.14
	96. saat	68	0.51

Cavalcante ve ark. (2008) dünya genelinde tarımda yaygın olarak kullanılan Glyphosate herbisitini kullanarak, *Prochilodus lineatus*'un eritrosit ve solungaç hücreleri üzerindeki genotoksik etkilerini, mikronukleus ve comet teknikleri ile inceleyerek solungaç hücrelerinde DNA hasarının daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Çavaş ve ark. (2007) ise aynı herbisitini *Carassius auratus* üzerindeki etkilerini incelemişler ve çalışmanın sonucunda Glyphosate herbisitinin hedef olmayan sucul organizmalarda da DNA hasarı meydana getirdiğini bildirmişleridir. Bu çalışmada da zebra balığına yapılan CPF uygulamaları sonucu, uygulama grupları ile negatif kontrol grubu arasında Mann-Whitney U testi kullanılarak ikili karşılaştırmalar yapıldı ve tüm gruplarda DNA hasarında negatif kontrole göre anlamlı bir artış ($p < 0.001$) görüldü (Şekil IV.10 ve IV.11).



Şekil IV.10. Zebra balığında farklı konsantrasyon ve sürelerde CPF maruziyeti sonucu meydana gelen DNA hasarı (% DNA Kuyruk).



Şekil IV.11. Zebra balığında farklı konsantrasyon ve sürelerde CPF maruziyeti sonucu meydana gelen DNA hasarı (Olive kuyruk momenti).

Ali ve ark. (2008) CPF maruziyeti sonunda *Channa punctatus* türüne ait bireylerde ortaya çıkan genotoksik etkileri MN ve comet testi ile incelemişler ve oluşan DNA hasar seviyelerinde 5. günden sonra lineer olmayan bir düşüş gözlemlemişlerdir. CPF'in DNA fosforilasyonuna neden olarak DNA hasarına neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. DNA hasarındaki zamana bağlı ortaya çıkan bu düşüş hasarlı DNA'nın onarılması, çok fazla hasar görmüş hücrelerin kaybı veya her iki mekanizmanın birlikte kullanılmasına bağlı olarak gerçekleşmiş olabileceği şeklinde açıklamışlardır. Ayrıca maruziyet süresi ve DNA hasarı arasındaki ters ilişki DNA hasarının oluşumunda rol oynayan enzimatik işlemlerin zarar görmesiyle de açıklanabilir. Bu çalışmada da benzer şekilde 96. saat 60 µg/L CPF dışındaki tüm gruplarda lineer olmayan bir azalma görüldü.

Pavlica ve ark. (2011), 2005 ve 2006 yıllarında ilkbahar ve sonbaharda kirlenmiş Sava nehri üzerindeki 3 farklı bölgedeki Avrupa kefalı (*Squalius cephalus* L.) bireylerinden aldıkları kan örneklerini alkali comet ve mikronükleus testi ile incelemişlerdir. Kirli bölgelerin genotoksik etkilerinin biyolojik olarak incelenmesinde comet testinin mikronükleus testinden daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu gözlemişlerdir. Çalışmanın sonunda biyoizleme çalışmalarında DNA hasarını farklı açılardan gösteren comet testi ve MN testinin birlikte kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir. Ternjej ve ark. (2010), aliminyum ile kontamine olmuş Njivice gölünde yaşayan *Gambusia holbrooki* örneklerinden alınan kan hücrelerini

comet testi ile DNA hasarını belirlemek amacıyla incelemişlerdir. Elde edilen veriler Njivice gölünde yaşayan balıkların DNAlarında hasar meydana geldiğini göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları alkali comet testinin su kirleticilerinin potansiyel genotoksik etkilerinin tespiti için değerli bir metot olduğunu göstermektedir. Ali ve Kumar (2008), Monocrotophos pesitidinin *Channa punctatus* türü üzerindeki genotoksik etkilerini inceledikleri çalışmada balıklarda solungaç hücrelerinin, lenfosit ve böbrek hücrelerinden daha hassas olduğunu ve çevre biyomonitöring çalışmalarında balıkların model organizmalar olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada zebra balığı eritrositleri kullanarak elde ettiğimiz comet sonuçlarıyla genotoksisitenin incelenmesinde balıkların model organizma olarak kullanılabileceğini göstermiş olduk.

Bony ve ark. (2008) bağcılıkta kullanılan pestisitlerin alan çalışmaları ve mesocosm koşullarındaki genotoksisitelerini inceleyerek, çalışmanın sonunda üzüm bağlarının tedavisinde kullanılan pestisitlerden özellikle Diuron ve Azoxystrobinlerin alan ve laboratuvar çalışmalarında gerçekçi çevresel pestisit konsantrasyonlarının genotoksik bir tehdit unsuru olduğunu gözlemlemiştir. Ventura ve ark. (2007) kırsal sucul ortamlarda geniş kullanıma sahip olan Atrazine herbisiti ile yaptıkları analizlerde, bu herbisitinin uygulandığı topraklara yakın su kaynaklarına karışabilmesiyle sucul ekosistemi olumsuz olarak etkileyebileceği sonucunu bulmuşlardır. Bu çalışmada balıklara uygulanan CPF dozu literatür ışığında doğada karşılaşılan dozlar (60 µg/L) baz alınarak belirlendi (Tilton ve ark., 2011). Balık kan hücrelerinin comet görüntü analizleri CPF'in doğada karşılaşılan dozlarından daha düşük konsantrasyonlarda bile DNA hasarına neden olduğunu ve bu kirleticilerin uygulanmasında daha kontrollü olunması gerektiğini gösterdi.

BÖLÜM V

SON DEĞERLENDİRMELER VE ÖNERİLER

Pestisitler tarım ürünlerinin verimini ve kalitesini arttırmak amacıyla kullanımları her geçen gün giderek artan kimyasal maddelerdir. Kullanımlarının giderek artması ile hem insan sağlığı hem de ekosistem için risk oluşturmaktadırlar. Türkiye’de Avrupa Birliği (AB) mevzuatı uyum çalışmaları kapsamında olumsuz özellikleri nedeniyle Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nca taze meyve sebze kalıntı sorununa yol açan 135 farklı tarım ilacının 75’i yasaklanmıştır. Söz konusu ilaçların üretim ve ithalatı, 1 Ocak 2009’dan itibaren durdurulmuştur (www.kkgm.gov.tr).

Bilinçsizce yapılan ve tekniğine uygun olmayan pestisit uygulamaları sonucunda pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri toprak, su ve havada kalabilmektedir. Toprağa ve bitkiye pestisit uygulanmasından sonra toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde aşağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyu ve diğer su kaynaklarına ulaşabilirler. Çeşitli şekillerde taşınan pestisitler, bu sularda yaşayan balık ve diğer su organizmalarının ölmesine ve bu sulara maruz kalan bitki ve diğer canlılarda toksisiteye neden olmaktadır. Bu şekilde pestisit ile kontamine olmuş suların içimi, balık gibi sucul organizmaların ve bitkilerin besin olarak tüketimi ile besin zincirinin en üst basamağında yer alan insan da etkilenmektedir. Özellikle önerilen dozlarının üzerindeki kullanımlarda pestisit, hedef olmayan organizmaları kontamine etmekte ve canlı organizmalarda genotoksik etkilere neden olmaktadır. Her toksik bileşiğin kendine has bir toksisite mekanizması vardır ve bu durum balıklar ve diğer organizmalarda genom bütünlüğünün yavaş yavaş bozulmasına sebep olmaktadır. Sürekli olarak kirleticilere maruz kalmak DNA zincir kırıklarında artışlara neden olur, ki balık hücrelerinde DNA tamir kapasitesi diğer türlere oranla daha düşüktür. DNA hasarındaki çeşitlilikler, genetik hassasiyetteki farklılık, DNA tamir mekanizmasının işlevselliği, alkali-label miktarı, metabolik aktivite, antioksidan konsantrasyonu ve diğer faktörlere bağlı olarak bireyler arasında değişkenlik göstermektedir (Ternjej ve ark., 2010).

Bu çalışmada kullanılan ve toksik olduğu bilinen CPF ülkemizde hala tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan ruhsatlı bir pestisittir ve zirai mücadelede arpa zararlılarından hububat hortumlu böceği ve ekin kambur böceğine karşı kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmada ülkemiz ve dünya tarımında önemli bir paya sahip olan arpa bitkisi ve sucul alanlarda toksisite araştırmalarında model organizma olarak sıklıkla kullanılan zebra balığı seçildi ve CPF'un bu organizmalar üzerindeki *in vitro* genotoksik etkileri incelendi. Genotoksitenin tespitinde ise genotoksik potansiyele sahip etmenlerin doğrudan veya dolaylı olarak etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan comet testi tercih edildi.

Comet testi ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirme yapılabilmekle birlikte, Comet görüntü analiz programlarını kullanmak suretiyle kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi ile ilgili parametreler belirlenebilir (Collins, 2003). Comet görüntü analiz programları kullanılarak kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi veya sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz-yanıt ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir (Moller 2006 a, b; Olive 1999). Bu bilgiler doğrultusunda comet analizlerinden elde edilen bulgularla söz konusu pestisit kullanımında uygun dozların ve ilaçlama zamanının belirlenmesi çalışmalarına katkı sağlaması düşünülmektedir. Bu çalışma sonucunda elde edilen pestisit uygulamasından sonra zamana bağlı olarak DNA hasarında tespit edilen azalma bilgisi, pestisit uygulamasından sonra hasat döneminin iyi belirlenmesiyle kullanılan pestisitlerin neden olduğu zararlı etkilerin azaltılabileceğini göstermektedir.

Comet testi, tek veya çift iplik DNA kırıklarının ayrı ayrı görülebilmesi, ucuz olması ve düşük bir bütçe ile yürütülebilmesi ile verilerin hızlı ve etkili bir biçimde elde edilebilmesi nedeniyle biyomonitoring çalışmalarında kullanılabilir bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında elde edilen alkali comet testi bulguları CPF pestisinin tek iplik DNA kırıklarına neden olarak hem bitkilerde hem de balıklarda genotoksik etkiye sahip bir kimyasal ajan olduğunu gösterdi. Ayrıca çalışma ile farklı doz ve sürelerde genotoksik ajanlara maruz kalan her iki organizmada da farklı seviyelerde genotoksik etkilerin ortaya çıkabileceği değerlendirildi. Bu sonuçlara göre CPF'in biyomonitoring olarak izlenmesi gerekli bir pestisit olduğu ve comet testinin bu amaçla kullanılabileceği belirlendi.

Uzun vadeli genotoksisite çalışmaları organizmaların DNA onarım yeteneği ve diğer koruyucu mekanizmalar hakkında fikir edinmek için önemli bir yaklaşım olabilir. Uygulama süresi ve DNA hasarı arasındaki ters ilişki toksisiteye neden olan kirleticilerin DNA hasarı oluşumundaki enzimatik süreçleri bölmesi ile açıklanabilir (D. Ali ve ark., 2009). Arpa bitkisi ve zebra balığına CPF uygulaması sonucu elde edilen bulgular DNA hasarı ile uygulama süresi arasında ters bir ilişki olduğunu gösterdi. Bu nedenle uzun vadeli bir çalışma ile DNA hasarının tamiri, koruyucu mekanizmalar ve enzimatik süreçlerin incelenmesinin de gerekli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Gichner'in (2003), köklerle karşılaştırıldığında yaprak hücreleri nükleer DNA'yı daha iyi koruyan gelişmiş bir antioksidan sistemine sahiptir bilgisine de dayanarak CPF uygulaması sonunda yaprak nükleusları ile birlikte kök ucu nükleuslarının da incelenmesi şeklinde düzenlenecek olan bir çalışmada DNA hasarındaki azalma daha erken saatlerde tespit edilebilir. Bu çalışmanın da ileride yapılacak benzer çalışmalara katkı sağlayacağı umut edilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ahmed, M.K.; Parvin, E.; Arif, M.; Islam, M.M.; Akter, M.S.; Khan, M.S.: "Genetic damage induced by lead chloride in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch)", *Environ. Monit. Assess.*, 182(1-4): **(2011)** 197-204.
- [2] Ali, D.; Kumar, S.: "Long-term genotoxic effects of monocrotophos in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis", *Science of Total Environment*, 405, **(2008)** 345-350.
- [3] Amdur, M.O.; Doull, J.; Klassen, CD.: "The basic science of poisons". *Casarett and Doull's Toxicology*, Pergamon Press, New York 1033 **(1991)**.
- [4] Angelis, K.J.; McGuffie, M.; Menke, M.; Schubert, I.: "Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the Comet assay", *Environ. Mol. Mutagen.*, 36: **(2000)** 146-50.
- [5] Bakimoh, S.B; Maimait, r.; McGrowin A.E.: "Supercritical fluid extraction of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol from garden compost", *Journal of Chromatog.*, 862, **(1999)** 105-112.
- [6] Armalyte, J.; Zukas, K.: "Evaluation of UVC-induced DNA damage by SCGE assay and its repair in barley", *Biologija*, 3: **(2002)** 57-59.
- [7] Badr, A.; Müller, K.; Schäfer-Pregl, R.; El Rabey, H; Effgen, S.; Ibrahim, H.H.; Pozzi, C.; Rohde, W.; Salamini, F.: "On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*)", *Molecular Biology and Evolution* 17 (4): **(2000)** 499-510.
- [8] Baltaci V, Zeyneloglu H.B.: "Increased frequency of sister-chromatid exchange and altered alkaline comet assay scores in superovulation cycles for unexplained infertility", *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 15;113(1): **(2004)** 73-7.
- [9] Barch, J.M.: "The act cytogenetic laboratory manual", *Chromosome stains*, Second edition. Raven Press, Ltd., America, New York. **(1991)**.

- [10] Beninca, C.; Ramsdorf, W.; Vicari, T.; Ribeiro, C.; Almeida, M.; Assis, H.; Cestari, M.: “Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in estuarine lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil”, *Environ. Monit. Assess.*, 184(4): **(2012)** 2045-2056.
- [11] Bony, S.; Gillet, C.; Bouchez, A.; Margoum, C.; Devaux, A.: “Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys”, *Aquatic Toxicology*, 89, **(2008)** 197-203.
- [12] Bozdağ A.: “2,4-D ve Dikamba Herbisitlerinin Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Fide Köklerindeki Genotoksik Etkilerinin RAPD ve Comet Assaylerle Belirlenmesi”, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **(2009)**.
- [13] Calvalcante, D.G.; Martinez, C.B.; Sofia, S.H.: “Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*”, *Mutation Research*, 625, **(2008)** 41-46.
- [14] Cenkci, S.; Cigerci, İ.H.; Yıldız, M.; Özay, C.; Bozdağ, A.; Terzi, H.: “Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L.”, *Environmental and Experimental Botany*, 67, **(2010)** 467-473.
- [15] Collins, A.R.: “Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods”, *Free Radical Biology & Medicine*, 34: **(2003)** 1089- 1099.
- [16] Collins, A.R.; Dobson, V.L.; Dusinska, M.; Kennedy, G.; Stetina, R.: “The comet assay: what can it really tell us?”, *Mutation Research*, 375 **(1997)** 183–193.
- [17] Comai, L.; Madlung, A.: “The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure”, *Annals of Botany*, 94 (4), **(2004)** 481-495.
- [18] Çavaş, T.; Könen, S.: “Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay”, *Mutagenesis*, 22, 4, **(2007)** 263-268.
- [19] Çavaş, T.; Könen, S.: “*In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the

micronucleus test and the comet assay”, *Aquatic Toxicology*, 90, (2008) 154-159.

- [20] Daş, Y. K.: “Türkiye’de üretilen ballarda bazı organik fosforlu ve sentetik piretroid insektisid kalıntılarının incelenmesi”, *Doktora Tezi*, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (2004).
- [21] Delen, N.; Durmuşoğlu, E.; Güncan, A.; Güngör, N.; Turgut, G.; Burçak, A.: “Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları”, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre*, (2005) 1-21.
- [22] Dhawan, A.; Bajpayee, M.; Parmar, D.: “Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models” *Cell Biol Toxicol.* (2009) 25:5-32.
- [23] Dikilitas, M.; Kocyigit, A.: “Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile dna hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi”, *Harran Üni. Ziraat Fak. Dergisi*, 14(2): (2010) 77-89.
- [24] Dikilitas, M.; Kocyigit, A.; Yigit, F.: “A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi”, *African Journal of Biotechnology*, 8 (14): (2009) 3118-3127.
- [25] Durmuşoğlu, E.; Tiryaki, O.; Canhilal, R.: “Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları”, *VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, Bildiriler Kitabı 2: (2010) 589-607, 2010.
- [26] Fabacher, D.L.; Little, E.E.: “Diversity of fish, early observations and descriptions, fish in experimentation”, Editor, OSTRANDER. G.K., *The laboratory fish*, Academic Press, (2000) 678.
- [27] Fairbairn, D.W.; Olive, P.L.; O’Neill, K.L.: “The Comet Assay a Comprehensive Review”, *Mutation Research*, (339): (1995) 37-59.
- [28] Fenech, M.; Morley, A. A.: “Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay”, *Cytobios*, 43: (1985) 233-46.
- [29] Forster, B.P.; Ellis, R.P.; Thomas., W.T.B.; Newton, A.C.; Tuberosa, R.; This, D.; El-Enein, R.A.; Bahri, M.H; Ben Salem, M.: “The Development and Application of Molecular Markers for Abiotic Stress Tolerance In Barley”, *Journal of Experimental Botany*, 51 (342): (2000) 19-27.

- [30] Georgieva, M.; Stoilov, L.: “Assessment of DNA strand breaks induced by bleomycin in barley by the comet assay”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: **(2008)** 381-387.
- [31] Ghisi, N.; Ramsdorf, W.; Ferraro, M.; Almeida, M.; Ribeiro, C.; Cestari, M.: “Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil”, *Environ. Monit. Assess.*, 180 (1-4): **(2011)** 589-599.
- [32] Gichner, T.: “DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco cellular and acellular Comet assays”, *Mutation Research* 535, **(2003)** 187-193.
- [33] Gichner, T.; Mukherjee, A.; Veleminsky, J.: “DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and Dnase-I”, *Mutation Research*, 605: **(2006)** 17-21.
- [34] Gichner, T.; Patkova, Z.; Szakova, J.; Demnerova, K.: “Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombinations in tobacco leaves”, *Mutation Research*, 559: **(2004)** 49-57.
- [35] Gichner, T.; Patkova, Z.; Szakova, J.; Znidar, I.; Mukherjee, A.: “DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulfonate and γ -rays”, *Environmental and Experimental Botany*, 62: **(2008b)** 113-119.
- [36] Gichner, T.; Plewa, M.J.: “Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants” *Mutation Research*, 401: **(1998)** 143-152.
- [37] Gichner, T.; Znidar, I.; Szakova, J.: “Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants”, *Mutation Research*, 652: **(2008a)** 186-190.
- [38] Gichner, T.; Znider, I.; Wagner, E.D.; Plewa, M.: “The use of higher plants in the comet assay”, *The Comet Assay in Toxicology*, Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson. Royal Society of Chemistry, p: **(2009)** 98- 119.
- [39] Hagmar, L.; Strömberg, U.; Tinnerberg, H.; Mikoczy, Z.: “The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis”, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 204: **(2001)** 43-7.

- [40]Hartmann, A.; Agurell, E.; Beevers, C.; Brendler-Schwaab, S.; Burlinson, B.; Clay, P.; Collins, A.; Smith, A.; Speit, G.; Thybaud, V.; Tice, R.R.: “Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay”, *Mutagenesis*, 18, **(2003)** 45–51.
- [41]Hayes, W.J.; Laws, E.R.: “Handbook of Pesticide Toxicology Vol. 3, Classes of Pesticides” *Academic Pres, Inc.*, NY. **(1990)**.
- [42]Hoagland, D.R.; Arnon, D.I: “The water culture method for growing plants without soil”, *California Agricultural Experimental Staion*, **(1950)** 347.
- [43]Jeanty, G.; Ghommidh, C.; Marty, J.L.: “Automated detection of chlorpyrifos and its metabolites by a continuous flow system enzyme sensor”, *Analyt. Chim. Acta.*, 432: **(2001)** 119-128.
- [44]Jett, D.A.; Navoa, R.V.; Lyons, Jr M.A.: “Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetyl cholinestrase activity in vitro”, *Toxicol Lett.*, 105: **(1999)** 223-22.
- [45]Jovtchev, G.; Menke, M.; Schubert, I.: “The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley”, *Mutation Research*, 493: **(2001)** 95-100.
- [46]Kaya, S.: “Pestisidler, Gıda kirliligi, Kimyasal ve biyolojik silahlar”,*Veteriner Hekimliginde Toksikoloji*; Baskı 2, Medisan Yayınevi, Ankara. Ed.: S. Kaya, İ. Pirinçci, A. Bilgili, **(2002)** 385-536, 777-842, 869-902.
- [47]Kocyigit, A.; Keles, H.; Selek, S.; Guzel, S.; Celik, H.; Erel, O.: “Increased DNA damage and oxidative stress in patients with *Cutaneousleishmaniasis*”, *Mutation Research*, 585: **(2005)** 71-78.
- [48]Kuter, Ü.: “Sütlerde bazı organikfosforlu pestisitlerin ve bunların süt mamullerine geçiş oranlarının belirlenmesi üzerine bir araştırma”,*Doktora Tezi*, İzmir Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **(1994)**.
- [49]Lalah, J.O.; Ondieki, D.; Wandiga, S.O.; Jumba, I.O.: “Dissipation, distribution and uptake of ¹⁴C-Chlorpyrifos in a model tropical seawater/sediment/fish ecosystem”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: **(2003)** 883-890.

- [50] Larson, S.J.; Capel P.D.; Goolsby, D.A.; Zaugg, S.D.; Sandstrom, M.W.: “Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi River basin”, *Chemosphere*, 31: **(1995)** 3306-3321.
- [51] Lin, A.; Zhang, X.; Chen, M.; Cao, Q.: “Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation”, *Journal of Environmental Science*, 19: **(2007)** 596-602.
- [52] Lin, A.; Zhang, X.; Zhu, Y.G.; Zhao, F.J.: “Arsenate-induced toxicity: effects on antioxidative enzymes and DNA damage in *Vicia faba*”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (2): **(2008)** 413-419.
- [53] Lorenzo, F.; Ames, B.N.: “Histidine regulation in *Salmonella typhimurium*”, *The Jour. of Bio. Chem.*, Vol: 245 no: 7, **(1970)** 1710-1716.
- [54] Lund, S.A.; Fulton, M.H.; Key, P.B.: “The sensivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetyl cholinesterase inhibition”, *Aquat Toxicol.* 48: **(2000)** 127-134.
- [55] Maluszynska, J.; Juchimiuk, J.: “Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays”, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 56, **(2005)** 177-184.
- [56] Mancini, A.; Buschini, A.; Restivo, F.M.; Rossi, C.; Poli, P.: “Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants”, *Plant Science* 170: **(2006)** 845-852.
- [57] Martin, V.J.; Green, M.H.L.; Schmezer, P.; Zobel, B.L.; De Meo, M.P.; Collins, A.: “The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay)”, A European Review, *Mutation Research*, 288: **(1993)** 47-63.
- [58] Mayden, R. L.; Tang, K. L.; Conway, K. W.; Freyhof, J.; Chamberlain, S.; Haskins, M.; Schneider, L.; Sudkamp, M.; Wood, R. M.; Agnew, M.; Bufalino, A.; Sulaiman, Z.; Miya, M.; Saitoh, K.; He, S.: "Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species". *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 308B (5): **(2007)** 642–654.
- [59] Menke, M.; Chen, I.P.; Angelis K.J.; Schubert, I.: “DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the Comet assay after treatment with different classes of genotoxins”, *Mutat. Res.*, 493, **(2001)** 87.

- [60] Menke, M.; Meister, A.; Schubert, I.: “N-Methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage detected by the comet assay in *Vicia faba* nuclei during all interphase stages is not restricted to chromatid aberration hot spots”, *Mutagenesis* 15, 6, **(2000)** 503-506
- [61] Mohanty, G.; Mohanty, J.; Noyak, A.K.; Mohanty, S.; Dutta, S.K.: “Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide”, *Ecotoxicology* 20: **(2011)** 283–292.
- [62] Moller, P.: “The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures”, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98, **(2006a)** 336-45.
- [63] Moller, P.: “Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA”, *Mutat Res.*, 612, **(2006b)** 84-104.
- [64] Morin, B.; Filatreau, J.; Vicquelin, L.; Barjhoux, I.; Guinel, S.; Lerey-Forget, J.; Cachot, J.: “Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399: **(2011)** 2235–2242.
- [65] Mortelmans, K.; Zeiger, E.: “The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay”, *Mutation Research*, 455: **(2000)** 29-60.
- [66] Murray, R.T.; Von Stein, C.; Kennedy I.R.; Sanchez-Bayo, F.: “Stability of chlorpyrifos for termicidal control in six Australian soils” *J.Agric. Food Chem.*, 49: **(2001)** 2844-2847
- [67] Nagel, R.: “The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology”, *ALTEX: Alternatives to Animal Experiments*, 19, **(2002)** 38-48.
- [68] Olive, P.L.; Banath J.P.; Durand, R.E.: “Heterogeneity in radiationinduced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay”, *Radiat. Res.*, 122, **(1990)** 86–94.
- [69] Östling, O.; Johanson, K.J.: “Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 123: **(1984)** 291-298.
- [70] Pavlica, M.; Stambuk, A.; Malovic, L.; Mladinic, M.; Klobucar, G.: “DNA integrity of chub erythrocytes (*Squalius cephalus* L.) as an

- indicator of pollution-related genotoxicity in the River Sava”, *Environ. Monit. Assess.*, 177: **(2011)** 85–94.
- [71] Pereria, C.; Guilherme, S.; Barroso, C.; Verschaeve, L.; Pacheco, M.; Mendo, S.: “Evaluation of DNA damage induced by environmental exposure to mercury in *Liza aurata* using the Comet Assay”, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58: **(2010)** 112–122.
- [72] Pourkheirandish, M.; Komatsuda, T.: “The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective”, *Annals of Botany*, 100 **(2007)** 999-1008.
- [73] Racke, K. D.: “The environmental fate of chlorpyrifos”, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 131: **(1992)** 1-151, 5-52.
- [74] Rank, J.; Syberg, K.; Jensen, K.: “Comet assay on tetraploid yeast cells”, *Mutation Research* 673: **(2009)** 53-58.
- [75] Saisho, D.; Purugganan, M.D.: “Molecular Phylogeography of Domesticated Barley Traces Expansion of Agriculture in the Old World”, *Genetics*, 177, **(2007)** 1765-1776.
- [76] Salamini, F.; Özkan, H.; Brandolini, A.; Schäfer-Pregl, R.; Martin, W.: “Genetics and Geography of Wild Cereal Domestication in the Near East”, *Nature Reviews Genetics*, 3, **(2002)** 429-441.
- [77] Schardein, J.L.; Scialli, A.R.: “The legislation of toxicologic safety factors: the Food Quality Protection Act with Chlorpyrifos As a Test Case” *Reproductive Toxicology*, 13(1): **(1999)** 1-14.
- [78] Schulte, D.; Close, T.J.; Graner, A.; Langridge, P.; Matsumoto, T.; Muehlbauer, G.; Sato, K.; Schulman, A.H.; Waugh, R.; Wise, R.P.; Stein, N.: “The International Barley Sequencing Consortium—At the Treshold of Efficient Access to the Barley Genome”, *Plant Physiology*, 149 **(2009)** 142- 147.
- [79] Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L.: “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, *Experimental Cell Research*, 175: **(1988)** 184-91.
- [80] Sonoda, E.; Sasoki, M.S.; Morrison, C.; Iwai, Y.Y.; Takata, M.; Takeda, S.: “Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells”, *Mol. Cell. Biol.* vol.19 no.7 **(1999)** 5166-5169.

- [81] Spence, R.; Gerlach, G.; Lawrence, C.; Smith, C.: "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*". *Biological Reviews* 83 (1): **(2008)** 13–34.
- [82] Sponchiado, G.; Reynaldo, E.; Andrade, A.; Vasconcelos, E.; Adam, M.; Oliveira, C.: "Genotoxic effects in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to nanograms-per-liter concentration of 17 β -Estradiol (E₂): An assessment using micronucleus test and comet assay", *Water Air Soil Pollut.*, 218: **(2011)** 353–360.
- [83] Steenland, K.; Dick, R.B.; Howell, R.: "Neurologic function among termiticide applicators exposed to chlorpyrifos" *Environmental Health Perspectives*, 108(4): **(2000)** 293-300.
- [84] Tatli, M.M.; Minnet, C.; Kocyigit, A.; Karadag, A.: "Phototherapy increases DNA damage in lymphocytes of hyperbilirubinemic neonates", *Mutation Research*, 654 (1): **(2008)** 93-95.
- [85] Temel, A.; Kartal, G.; Gözükrırmızı, N.: "Genetic and Epigenetic Variations in Barley Calli Cultures", *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 22 (4), **(2008)** 911-914.
- [86] Ternjej, I.; Mihaljevic, Z.; Stankovic, I.; Kerovec, M.; Sipos, L.; Zeljezic, D.; Kopjar, N.: "Estimation of DNA integrity in blood cells of Eastern Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting an aluminium-polluted water environment: an alkaline comet assay study", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 59: **(2010)** 182–193.
- [87] Thomson, W.T.: "Insecticides, acaricides and ovicides", *Agricultural Chemicals, Book I. Fresno*, CA: Thomson Publications **(1982)**.
- [88] Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.: "The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing", *Environmental Molecular Mutagenesis* 35: **(2000)** 206-21.
- [89] Tice, R.R.; Andrews, P.W.; Singh, N.P.: "The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair", *Basic Life Sci.*, **(1990)**, 53, 291–301.
- [90] Tilton, F.A.; Bammler, T.K.; Gallagher, E.P.: "Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or

chlorpyrifos separately, as mixtures”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 153 (2011) 9–16.

- [91] Trevigen Inc. 2000. TREVIGEN™ Instructions for Comet Assay™.
- [92] Turabi, M.S.: “Türkiye Cumhuriyeti’nde tarımsal ilaç, teşçil ve ruhsat sistemi. Tarımsal ilaçlar ve Organik Tarım Konferansı”, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Lefkoşa, KKTC, 9 Haziran 2004.
- [93] Turabi, M.S.: “Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması. Tarım İlaçları Kongre ve Sergisi”, TMMOB Zir. Müh Odası ve TMMOB Kimya Müh Odası, Bildiriler Kitabı, 50-61, 25-26 Ekim 2007.
- [94] Ventura, B.C.; Angelis, D.F.; Marin-Morales, M.A.: “Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay”, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90, (2008) 42-51.
- [95] Westerfield, M., , *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene (1995).
- [96] Yıldız, M.; Gürkan, M.O.; Turgut, C.; Kaya Ü.; Ünal, G.: “Tarımsal savaşta kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları” VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, 3–7 Ocak 2005.
- [97] Zhang, X.H.; Lin, A.J.; Chen, B.D.; Wang, Y.S.; Smith, S.E.; Smith, F.A.: “Effects of *Glomus mosseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*”, *J. Environ. Sci. (China)*, (2006) 18-4.
- [98] <http://extoxnet.orst.edu/pips/chlorpyr.htm> (09.05.2012)
- [99] http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm (11.04.2012)
- [100] <http://www.epa.gov/pesticides/> (20.05.2011)
- [101] <http://www.kkgm.gov.tr/> (20.05.2011)
- [102] http://www.mun.ca/biology/scarr/Ames_Test_1.html (11.04.2012)
- [103] <http://faostat3.fao.org/home/index.html#> (10.12.2012)

ÖZGEÇMİŞ

20 Temmuz 1987 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlk öğrenimimi 1993-2001 yılları arasında Celalettin Gözüsulu İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Lise öğrenimimi 2004 yılında Mensucat Santral Lisesinde birincilikle tamamladıktan sonra, 2005 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım ve 2009 yılında mezun oldum. Aynı yıl Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Programında yüksek lisans eğitimime başladım.

BİLİMSEL ÇALIŞMA:

O. Mutlu, T. Akan, M. Adiloglu and N. Gulsoy. Genotoxic and cytotoxic potential of Aluminium oxide (Al_2O_3) nanoparticles on periferal blood cells of fish. INRS Occupational Health Research Conference 2011. Nancy, France

T. Akan, M. Adiloglu, N. Gülsoy, Y. Aydın. The Evaluation of the Genotoxicity via Chlorpyrifos-Ethyl in Barley by Comet Assay. Plant Genomics European Meeting 2011. Istanbul, Turkey

M. Adiloglu, T. Akan, N. Gülsoy, Y. Aydın. Measurement of DNA Damage Induced by Endosulfan in Wheat Leaves Using the Alkaline Comet Assay. Plant Genomics European Meeting 2011. Istanbul, Turkey.

T. Akan, M. Adiloglu, Y. Aydın, N. Gülsoy. The Evaluation of the Genotoxicity via Chlorpyrifos-Ethyl in Zebrafish by Comet Assay. 9th The Comet Assay. International Comet Assay Workshop 2011. Kuşadası, Turkey.

M. Adiloglu, T. Akan, Y. Aydın, N. Gülsoy. In vivo Genotoxicity Evalution of Endosulfan on Fish *Carassius auratus* Using the Comet Assay. 9th The Comet Assay. International Comet Assay Workshop 2011. Kuşadası, Turkey.