

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***MELANOGRYLLUS DESERTUS* (PALLAS, 1771)
(ORTHOPTERA: GRYLLIDAE) HEMOSİTLERİ
ÜZERİNE
2,4-D (DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT)'NİN
ETKİLERİ**

Hüseyin Deniz ÖNER

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gürsel ERGEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.04.00

Sunuş Tarihi : 29.06.2010

Bornova-İZMİR

2010

Hüseyin Deniz ÖNER tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*Melanogryllus desertus* (Pallas, 1771) (Orthoptera: Gryllidae) Hemositleri Üzerine 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit)’nin Etkileri ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29.06.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

| | | |
|---------------------|--------------------------------------|-------|
| Jüri Başkanı | : Prof.Dr. Gürsel ERGEN | |
| Raportör Üye | : Yrd.Doç.Dr. Hatice KARAKİŞİ | |
| Üye | : Yrd.Doç.Dr. Olga SAK | |

ÖZET***MELANOGRYLLUS DESERTUS* (PALLAS, 1771) (ORTHOPTERA: GRYLLIDAE) HEMOSİTLERİ ÜZERİNE 2,4-D (DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT)'NİN ETKİLERİ**

ÖNER, Hüseyin Deniz

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gürsel ERGEN
Haziran 2010, 33 sayfa

Bu çalışmada, yabancı otlarla mücadelede çok yaygın olarak kullanılan 2,4-D herbisitinin, laboratuvar koşullarında (sıcaklık: 28±2 °C; bağıl nem:%45-50; fotoperiyot: 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık) kültürü yapılan ergin *Melanogryllus desertus* örneklerinin kan hücreleri üzerine sayısal ve histolojik etkileri incelendi.

Bu amaçla, *M. desertus* ile yapılan bütün deneylerde, 2,4-D üç farklı konsantrasyonda (1000, 2500, 5000 ppm) ergin bireylere besin içinde verildi. 2,4-D uygulamasını takiben 4, 8 ve 24 saat sonra hemolenf örnekleri alınıp hemositometre ile toplam hemosit sayıları belirlendi ve yayma preparat yapıldı.

Yapılan çalışmada 2,4-D uygulaması toplam hemosit sayılarında konsantrasyonla doğru orantılı olarak artışa neden oldu. Toplam hemosit sayılarında görülen bu artışın 2,4-D uygulamasının 8. saatinde en fazla iken, 24. saatte, 4. saat seviyesine indiği saptandı. 2,4-D uygulanan çekirgelerin ışık mikroskobu ile incelenen preparatlarında, hemosit membranlarında tomurcuklanmalar meydana geldiği ve sitoplazmada büyük vakuollerin oluştuğu, hücre membranı bütünlüğünün kaybolduğu, sitoplazmik içeriğin hücre dışına dağıldığı ve lizise benzer hücre bozulmaları gözlemlendi. Hemositlerde meydana gelen bu değişiklikler konsantrasyon ve uygulama zamanına bağlı olarak arttı.

Sonuç olarak, ışık mikroskobu ile yapılan histolojik incelemelerde 2,4-D'nin hemositlerde morfolojik hasara, toplam hemosit sayısında ve bozulmuş hemosit sayısında artışa neden olduğu gözlemlendi.

Anahtar sözcükler: Herbisit, 2,4-D, *Melanogryllus desertus*, hemosit

ABSTRACT**EFFECTS OF 2,4-D (2,4-DICHLOROPHENONOXYACETIC ACID)
ON *MELANOGRYLLUS DESERTUS* (PALLAS, 1771)
(ORTHOPTERA: GRYLLIDAE) HEMOCYTES**

ÖNER, Hüseyin Deniz

MSc in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gürsel ERGEN

June 2010, 33 pages

In this study, quantitative and histological effects of 2,4-D herbicide, which is commonly used for weed control, on the *M. desertus* hemocytes has been studied. Adult *Melanogryllus desertus* were cultured in laboratory conditions (temperature: $28\pm 2^{\circ}\text{C}$; relative humidity: %45-50, photoperiod: 16 h light / 8 h dark).

For this aim, in all experiments adult *M. desertus* were exposed to three different concentration (1000, 2500, 5000 ppm) of 2,4-D which is mixed with the diet. Hemolymph samples were taken after 4, 8 and 24 hours of 2,4-D exposure. Total hemocyte count determined by hemocytometer and smear preparation of hemocytes has been made.

2,4-D caused concentration dependant increase in the total hemocyte count. The most increasing ratio in the hemocyte count was obtained at 8 hour of 2,4-D exposure but total hemocyte count declined at 24 hour of exposure to the 4 hour level. 2,4-D exposure also has caused concentration dependant degenerative changes in the hemocytes according to light microscope observations. Cell surface blebbing, large vacuole formation in the cytoplasm, deformation of the cell membrane integrity and cell degeneration like lysis have been observed depending on the concentration and exposure time of 2,4-D.

It was found that 2,4-D caused histological damages, increased total hemocyte count and degenerate hemocyte count in *M. desertus* hemocytes according to light microscope observations.

Keywords: Herbicide, 2,4-D, *Melanogryllus desertus*, hemocyte

TEŞEKKÜR

Çalışma konumun belirlenmesinde, tezimin her aőamasında değerli bilgilerini ve desteğini benden esirgemeyen danıőman Hocam ve Zooloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gürsel ERGEN'e en içten teőekkürlerimi sunarım. Fotoğrafların çekim aőamasındaki yardımları sebebiyle Sayın Prof. Dr. Melih Ertan ÇINAR'a, desteklerinden dolayı Zooloji Anabilim Dalı çalıőanlarına ve arkadaşlarıma, benim bugünlere gelmemi sağlayan ve her zaman yanımda olan aileme teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vii |
| TEŞEKKÜR | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xiii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xiv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xv |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1.2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (2,4-D) | 3 |
| 1.1.1 2,4-D'nin Çeşitli Canlılar Üzerine Etkisi | 4 |
| 1.2 Böcek Kan Hücreleri (Hemositler) | 8 |
| 2.MATERYAL VE METOT | 10 |
| 2.1 Böceklerin Yetiştirilmesi | 10 |
| 2.2 Deneyde Kullanılan Herbisit | 10 |
| 2.3 Ön Denemeler | 11 |
| 2.4 Deneysel Prosedür | 11 |
| 2.5 Toplam Hemosit Sayısının Belirlenmesi | 12 |
| 2.6 Hemositlerin Boyanması | 12 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.7 Mikroskopik İnceleme | 12 |
| 2.8 İstatistiksel Analiz..... | 13 |
| 3. BULGULAR..... | 14 |
| 3.1 Ön Denemeler | 14 |
| 3.2 Histolojik Bulgular..... | 14 |
| 3.2.1 Hemolenf Hücreleri..... | 14 |
| 3.3 İstatistiksel Değerlendirme | 18 |
| 3.3.1 2,4-D'nin Ergin <i>M. desertus</i> Toplam Hemosit Sayılarına Etkisi..... | 18 |
| 3.3.2 2,4-D'nin Ergin <i>M. desertus</i> Hemositlerine Etkisi | 21 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ | 24 |
| 4.1 2,4-D'nin Ergin <i>M. desertus</i> Toplam Hemosit Sayılarına Etkisi..... | 24 |
| 4.2 2,4-D'nin Ergin <i>M. desertus</i> Hemositlerine Etkisi | 26 |
| KAYNAKLAR | 28 |
| ÖZGEÇMİŞ | 33 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 1.1 2,4-D ve Dimetilamin tuzunun moleküler yapısı | 3 |
| 2.1 <i>M. desertus</i> dişi ve erkek bireyleri..... | 10 |
| 3.1 <i>M. desertus</i> 'da hemositlerin genel görünümü | 14 |
| 3.2 <i>M. desertus</i> 'da hemosit membranlarında tomurcuklanmalar | 15 |
| 3.3 <i>M. desertus</i> 'da hemosit sitoplazmasında vakuol oluşumu | 16 |
| 3.4 <i>M. desertus</i> 'da hemosit membranlarında dalgalanmalar | 16 |
| 3.5 <i>M. desertus</i> 'da hemosit sitoplazmik içeriğin hücre dışına dağılması..... | 17 |
| 3.6 <i>M. desertus</i> 'da hemosit lizisi | 17 |
| 3.7 2,4-D konsantrasyonu, zaman ve eşeye bağlı olarak ergin <i>M. desertus</i> <i>toplum</i> hemosit sayılarındaki değişimler | 18 |
| 3.8 2,4-D konsantrasyonu, zaman ve eşeye bağlı olarak ergin <i>M. desertus</i> bozunmuş hemosit sayılarındaki değişimler | 21 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 1.1 Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi..... | 2 |
| 1.2 Türkiye’de en yoğun kullanılan herbisitler..... | 2 |
| 3.1 2,4-D konsantrasyonu, zaman ve eşeye bağlı olarak ergin <i>M. desertus</i> toplam hemosit sayılarının Çok Yönlü Varyans Analizi..... | 19 |
| 3.2 2,4-D uygulamasına bağlı olarak toplam hemosit sayılarının eşeye göre çoklu karşılaştırma çizelgesi | 19 |
| 3.3 Konsantrasyon gruplarına göre toplam hemosit sayılarının çoklu karşılaştırma çizelgesi | 20 |
| 3.4 Uygulama zamanına göre toplam hemosit sayılarının çoklu karşılaştırma çizelgesi | 20 |
| 3.5 2,4-D konsantrasyonu, zaman ve eşeye bağlı olarak ergin <i>M. desertus</i> bozulmuş hemosit sayılarının çok yönlü varyans Analizi..... | 22 |
| 3.6 Konsantrasyon gruplarına göre bozulmuş hücre sayılarının çoklu karşılaştırma çizelgesi | 22 |
| 3.7 Uygulama zamanına göre bozulmuş hemosit sayılarının çoklu karşılaştırma çizelgesi | 23 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a.e/L: Asit eşdeğeri/L

a.i/cm²: Aktif madde/ cm²

2,4-D: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit.

Df: Serbestlik derecesi.

DMA: Dimetilamin.

EPA (Environmental Protection Agency): Çevre Koruma Ajansı.

K.O: Kareler Ortalaması.

K.T: Kareler Toplamı.

LC₅₀: test hayvanlarının % 50'sini öldürmek için gerekli konsantrasyon.

LD₅₀: test hayvanlarının % 50'sini öldürmek için gerekli doz.

LOAEC (Lowest Observed Adverse Effect Level): en düşük etkinin görüldüğü doz.

NOAEL (No Observable Effect Level): Hiçbir etkinin görülmediği doz.

NOEC (No Observed Effect Concentration): Hiçbir etkinin görülmediği konsantrasyon.

O.F: Ortalama Fark.

OPP (Office of Pesticide Programs): Pestisit Programları Ofisi.

P: Önem Derecesi.

ppm (Parts Per Million): Milyonda bir birime verilen isim.

SD: Standart Sapma.

SH: Standart Hata.

U.S EPA (U.S. Enviromental Protection Agency): Amerika Birleşik Devletleri
Çevre Koruma Ajansı.

USDA (U.S. Department of Agriculture): Amerika Birleşik Devletleri Tarım
Bakanlığı.

1. GİRİŞ

Sanayi devriminden sonra tarımda makineleşme ve suni gübre kullanımının yaygınlaşması ile birlikte birim alandan daha fazla ürün elde edilmeye başlanmıştır. Daha fazla ürün elde etmek için yapılan hem geleneksel hem de yoğun tarım uygulamaları zamanla toprağın besleme gücünü ve bitkilerin zararlılara karşı dayanıklılığını azaltmıştır. Ürünlerin ortaya çıkan zararlılardan, hastalıklardan ve yabancı otlardan korunması için tarımsal ilaçların kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Pestisit olarak adlandırılan bu tarımsal ilaçlar zamanla zararlılarla mücadelenin vazgeçilmez aracı olmuştur. Pestisitler tarımsal üretimde verimliliğin azalmasına neden olan böcekler, kemirgenler, kuşlar, istenmeyen bitkiler (yabani otlar), küfler ve mantarlar, bakteri ve virüsler gibi zararlıları öldürmek veya kontrol altına almak amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir. Pestisitler tarımsal uygulamalar dışında evler, park ve bahçeler, oyun alanları gibi farklı alanlarda da zararlılarla mücadelede yoğun olarak kullanılmaktadır. Amerikan federal pestisit ürünleri veri tabanında halen aktif olarak kayıtlı 20.000 farklı pestisit ürünü vardır. Pestisit ürünlerde kullanılan kimyasal maddelerin sayısı (pestisit aktif maddesi, bu maddelerin dönüşüm ürünleri, yardımcı kimyasallar ve çözücülerle birlikte) 6400 civarındadır (Kaplan, 2009).

Zararlıların çeşidine göre bitkilere birçok farklı pestisit uygulanır. Genel olarak pestisitler etkiledikleri canlı grubuna göre herbisitler, insektisitler ve fungusitler olmak üzere üçe ayrılırlar. Bunlar doğal maddelerden izole edilebilecekleri gibi ticari olarak da sentez edilebilirler. Çevre sağlığı açısından pestisitlerin yapılarında bulunan etken madde önemlidir. Çünkü canlılarda akut veya kronik etki eden ve onların ölümüne neden olan pestisit yapısındaki etken maddedir (Sak, 2004). Zehirli kimyasal maddeler olan pestisitlerin akut zehirlenme, kanser, doğum kusurları, kısırlık, sinir sistemi bozuklukları ve başka pek çok zararlı etkisi olduğu gösterilmiştir (Kaplan, 2009).

Ülkemizde ise pestisit tüketimi gelişmiş ülkelere göre oldukça düşüktür fakat yoğun tarım yapan Akdeniz ve Ege gibi bölgelerin tüketimi Türkiye ortalamasının çok üzerindedir. Türkiye’de yoğun tüketilen pestisitler (Çizelge 1.1) çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır (Delen ve ark., 2005). Çizelge 1.2’de görüldüğü gibi hem herbisitler içinde hem de tüm pestisitler içinde

ülkemizde en yoğun tüketilen etkili maddelerden biri 2,4-D(diklorofenoksiasetik asit)'dir.

Çizelge 1.1 Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi (kg veya l)* (Delen ve ark., 2005).

| Pesitist Grupları | 1979 | 1987 | 1994 | 1996 | 2002 |
|-----------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| İnsektisitler | 2.287.658 | 3.303.446 | 2.064.991 | 3.027.380 | 2.250.898 |
| Akarsitler | 203.107 | 240.360 | 192.279 | 223.857 | 296.809 |
| Yağlar | 1.594.526 | 2.147.106 | 2.147.106 | 2.871.160 | 2.428.238 |
| Fumigant ve Nemasitler | 315.665 | 322.227 | 530.738 | 1.076.661 | 1.559.489 |
| Rodentisit ve Mollusisitler | 5.600 | 2.124 | 2.509 | 3.268 | 1.794 |
| Fungisitler | 1.537.315 | 2.611.960 | 2.201.406 | 2.951.191 | 1.964.292 |
| Herbisitler | 2.451.997 | 3.495.044 | 3.902.588 | 3.643.971 | 3.697.397 |
| TOPLAM | 8.395.848 | 12.112.267 | 10.871.792 | 13.797.488 | 12.198.917 |

* göz taşı ve toz kükürt dahil değildir.

Çizelge 1.2 1999-2002 yıllarında Türkiye’de en yoğun kullanılan herbisitler ve herbisit tüketimindeki payları (Delen ve ark., 2005).

| Herbisit | Yıllara göre herbisit tüketimindeki paylar (%) | | | |
|--------------------------|--|-------|-------|-------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 |
| 2,4-D | 45,28 | 44,34 | 47,49 | 33,62 |
| Trifluralin | 27,02 | 27,86 | 20,21 | 24,60 |
| Molinate | 7,10 | 6,44 | 3,69 | 3,50 |
| Propanil | 4,54 | 3,62 | - | - |
| Glyhposate isopropylamin | 4,10 | 6,94 | 9,08 | 7,57 |
| Chloridazon | - | - | 5,38 | - |
| Metalochor | - | - | - | 5,10 |
| TOPLAM | 88,04 | 89,20 | 85,85 | 74,39 |

- ilk beş herbisit arasında değildir.

Kültür alanında hasat edilmesi amaçlanan bitki dışında kalan, faydadan çok zarar veren bitkilerin tamamı yabancı ot kavramı içine girmektedir. Herbisitler yabancı otlarla mücadelede kullanılan kimyasallardır. Herbisitler, tarımda istenmeyen yabancı otları kısa sürede öldürmeleri yanında, olumsuz etkilerini besin zinciri yoluyla çeşitli canlılar ve insana kadar da taşırlar. Bu kimyasallardan etkilenen diğer bir canlı grubu da hiç şüphesiz doğada bitkilerle yakından ilişkili olan böceklerdir. Bitki hormonlarının özellikle bitkilerle beslenen böcek türlerinin bıraktıkları yumurta sayısını, gelişmelerini etkilediği ve eşey oranını etkileme, glikojen seviyesinde düşüşe neden olma, kromozom bozukluklarının artması gibi

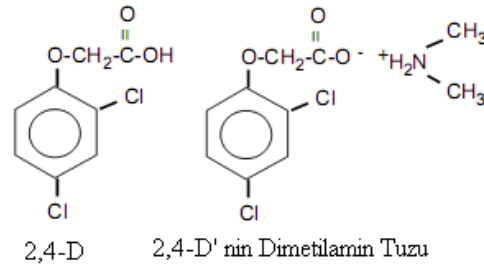
etkileri de bu alanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kaya ve Yanıkoğlu, 1999).

2,4-D seçici bir herbisit olup genellikle evlerde, bahçelerde, golf sahalarında, parklarda, tarımda ve ormancılıkta kullanılır. 2,4-D kısmen kalıcı bir kimyasal olup yarılanma ömrü 20 ile 200 gün arasındadır. 2,4-D sadece geniş yapraklı otları hedef almayıp; hedefi olmayan türlerde de düşük gelişim oranına, üreme problemlerine, davranış değişikliklerine ya da ölüme neden olabilir (Gabarant and Philbert, 2002).

Bu çalışmanın amacı, zirai mücadele yöntemleri içinde yabancı otlarla mücadelede kullanılan bir herbisit olan 2,4-D nin, kara çekirge olarak da tanınan *Melanogryllus desertus* (Pallas, 1771)'un homositlerine olan etkilerini sayısal ve histolojik olarak ortaya koymaktır.

1.1 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (2,4-D)

2,4-D, fenoksi ailesinin geniş olarak kullanılan bir üyesidir (Şekil 1.1). Seçici bir herbisit olup, geniş yapraklı bitkilerde yüksek toksisiteye neden olur. Ticari herbisit ürünlerinde üç tuz (dimetilamin, tiriizopropanolamin ve izopropilamin) ve iki ester formu (izooktil ester ve butoksietil ester) çoğunlukla, asit formu ise daha seyrek olarak kullanılır (Munro, 1992).



Şekil 1.1 2,4-D ve Dimetilamin tuzunun moleküler yapısı (Journal of Pesticide Reform, 1999)

2,4-D, birçok bitki büyüme ve gelişim sürecini kontrol eden oksin olarak adlandırılan bitki hormonlarını taklit eder. Oksin konsantrasyonları bitki büyümesi sırasında zaman zaman değişir. Ancak 2,4-D'ye maruz kalmış bitkilerde bu konsantrasyon yüksek düzeydedir çünkü 2,4-D oksinlere göre daha kararlı ve kalıcıdır. Bunun sonucu olarak 2,4-D nükleik asit ve protein sentezini

uyararak normal olmayan büyümeye neden olur. Bitki ölümü, bitkinin taşıma sisteminin (ksilem ve floem) kendi büyümesi ile çöküp tıkanması ile gerçekleşir (Journal of Pesticide Reform, 1999).

1.1.1 2,4-D'nin Çeşitli Canlılar Üzerine Etkileri

1941'de sentezlenen ve 1944'de ABD'de piyasaya sürülen 2,4-D, 1950'den bu yana tüm dünyada üretilmektedir. 1970'lerin sonunda ve 1980'lerin başında, Hodgkin hastalığı (HD) ve yumuşak doku sarkoması (STS) ile 2,4-D arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmüştür. Bu raporları, herbisitlere maruz kalan tarım işçilerinde ve Vietnam gazilerinde görülen lenfoma ve sarkomalar ile ilgili çalışmalar izlemiştir. 2,4-D'nin yüksek dozlarının deney hayvanlarına verilmesi sonucu anoreksiya, diyare, kilo kaybı, ağız ve yutakta ülserleşmeler, karaciğer, böbrek ve merkezi sinir sisteminde hasarlar oluşmuştur. Ayrıca bazı türlerde miyotoni (kas koordinasyonsuzluğu ve sertlik) gelişir ve miyelin kılıfının hasar görmesiyle birlikte omurgada eğrilikler belirir (USDA, 2006).

Suwalsky et al. (1996), 2,4-D'nin eritrosit membranının çift tabaka fosfolipid yapısını bozduğunu, aynı zamanda eritrositlerdeki morfolojik değişimlerin, membran iskeletindeki spesifik oksidatif dönüşümlerin sonucu olabileceğini belirtmişlerdir.

Bradberry et al. (2000) yaptıkları çalışmada, 2,4-D ve diğer klorofenoksi herbisitlerin toksisite mekanizmalarının insanlar ve memeliler üzerinde hücre membranlarının yapı ve fonksiyonunu bozduğunu, hücresel metabolizmaya katıldığını, hücre membranları ve metabolizma değişimi üzerindeki etkilerinin bir sonucu olarak oksidatif fosforilizasyon reaksiyonlarını bozduğunu belirtmişlerdir.

Hücresel metabolizmayı bozmasından başka, Bradberry et al. (2000), 2,4-D gibi klorofenoksi asitlerin yapısal olarak asetik asite benzer olduğunu ve asetil Co-A analogları oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Asetil Co-A oluşumu glukoz metabolizması, kolesterol, steroid hormon ve asetilkolin üretimini içeren temel metabolik yollar için gereklidir. Bu yolların bozulması memelilerde yapılan kolesterol profillerinde değişimler, miyotoni, kalp ritim bozukluğu, kas seğirmesi, immünotoksikolojik ve nörotoksikolojik çalışmalarını da içeren 2,4-D ile ilişkili toksik etkilerin gözlemlendiği birçok çalışma ile bağlantılıdır.

Son zamanlarda sitotoksitenin moleküler mekanizmalarını araştıran birçok alışma 2,4-D'nin apoptozisi uyardığını göstermiştir. Örneğin Kaioumova et al. (2001 a; 2001 b) yaptıkları araştırmalarda, 2,4-D'nin dimetilamin (DMA) tuzunun direkt olarak mitokondrilere etki ederek apoptozise neden olduğunu ve insan lenfositlerini öldürdüğünü göstermişlerdir. Benzer şekilde De Moliner et al. (2002), 2,4-D asidinin ilk olarak mitokondrilere zarar vererek, farelerde beyincik granüler tabaka hücrelerinde apoptozisi arttırabileceğini göstermişlerdir.

Duchnowicz et al. (2003), 2,4-D'nin belli fosfolipidlere bağlanabileceğini ve membranın fiziksel etkileşimini bozarak lipidlerin peroksidasyonunu arttırabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar aynı çalışmada 2,4-D'nin lipid peroksidasyonundan başka, yağ asitlerinin 16. karbon atomuna etki ederek membran akışkanlığını ve insan eritrositlerinde hemolizisi arttırdığını da göstermişlerdir.

Mevcut çalışmalara dayanarak, laboratuvar hayvanları 2,4-D ile akut oral doza maruz kaldıklarında gözlenen etkiler, ataksi (kasların koordinasyon bozukluğu), miyotoni (bir kasın tonik spazmı) ve uzuv kuvvetinin azalmasıdır (U.S EPA/OPP, 2005).

Wistar Albino erkek sıçanlarda 2,4-D'nin testis dokusu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, herbisit dozuna bağlı olarak testis dokusunda histopatolojik hasarların (seminifer tübüllerde atrofi, spermatogenik hücre sırasında bozulma ve testis hasarları) olduğu saptanmıştır (zdaş ve ark., 2006).

Köpek ve rodentlerde, 2,4-D'ye maruz kalma vücut ağırlığının azalmasına, besin tüketiminin düşmesine ve karaciğer ile böbreklerde bazı bozukluklara neden olmuştur. Bu araştırmalara göre farelerde 2,4-D'nin olumsuz etkileri olarak, tiroid fonksiyonunun azalması, kan parametrelerinin değişimi, trigliserit, kolesterol ve glukoz değerlerinin azalması, gonad doku ağırlığının azalması, adipoz dokuda ve karaciğerde mikroskobik lezyonlar gözlenmiştir (USDA, 2006).

Poecilia reticulata'da 2,4-D'nin medulla spinalis üzerine etkilerin araştırıldığı çalışmada, herbisit konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak omurilikte nöronal kayıplar, hücre içi dem, Nissl granüllerinde bozulmalar gözlenmiştir (Yalçınkaya, 2006).

Sıçanlarda 2,4-D'nin ovaryum dokusu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise doz artışına bağlı olarak foliküller yapılar ve oositler üzerinde dejeneratif etkiler saptanmıştır (Biçer ve ark., 2008).

Bazı karasal omurgasızlarda ve böceklerde, çoğu herbisitte olduğu gibi 2,4-D toksisitesi üzerine az bilgi bulunmaktadır. Herbisitlerin böcekler ve diğer omurgasızlar için zararsız olduğu varsayımından hareketle, başta böcekler olmak üzere, karasal omurgasızlarda 2,4-D'nin toksisitesine ilişkin çok az sayıda araştırma ve bilgi bulunmaktadır (USDA, 2006).

Gall and Dogger (1967), buğday yaprak arısı larvalarının 2,4-D'ye duyarlı iken, erginler ve yumurtalar üzerindeki etkisinin az olduğunu göstermişlerdir.

Hoy (1985) çalışmasında, 0,34 mg a.i/cm² 2,4-D'ye (butoksietanol ester) maruz kalan ergin *Scytanotus simplex* (kırkayak) ölüm oranının, herbisite maruz kalmamış gruplara göre çok daha fazla olduğunu, en yüksek ölüm oranının (%45) 2,4-D ile doğrudan temas ve herbisite maruz kalmış bitkilerin tüketimi ile gerçekleştiğini, hatta çok daha düşük bir dozda da (0,034 mg a.i/cm²) ölümlerin gözlemlendiğini belirtmiştir.

Coccinellid (Uğur böceği) larvalarında, 2,4-D dimetilamin tuzu (DMA) uygulamasını takiben ölüm oranları bütün yaş gruplarında 4 katına çıkmış ve pupalaşma süresi artmıştır (Adams et al., 1986, USDA'dan 2006).

Su piresi (*Daphnia magna*) ile yapılan 21 günlük çalışmada 2,4-D asit formunun NOAEC (etki göstermeyen konsantrasyon) ve LOAEC (en düşük etki konsantrasyonu) değerleri sırası ile 79 mg/L ve 151mg/L olarak saptanmıştır (Ward and Boeri, 1991). DMA tuzu ile yapılan çalışmada ise 21 günlük LC₅₀ değeri 75,7 mg/L olarak belirlenmiştir (Ward, 1991, USDA'dan 2006).

Spodoptera eridania'da (Lepidoptera) 2,4-D sitokrom P₄₅₀'yi uyararak insektisit toksisitesinde sinerjik etkilere neden olup, carbaryl ve permethrin toksisitesini de düşürmüştür (Kao et al. 1995).

Bal arıları için 2,4-D zehirsiz olarak sınıflandırılmıştır. 2,4-D'nin DMA ve 2-etilhekzil ester formu ile yapılan iki çalışmada (Palmer and Krueger, 1997), 100

ug/arı dozunda hiçbir ölüm ve yan etki belirlenememiş olup, değerin yaklaşık olarak 1075 mg/kg vücut ağırlığı dozuna karşılık geldiği bildirilmiştir.

Özkan ve Yanıkoğlu (1999), parazitik hymenopter olan *Pimpla turionellae* ile yaptıkları çalışmada 2,4-D'nin 50 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda kontrol gruplarına göre yumurta açılımını önemli derecede düşürdüğünü; erginlerin besinine karıştırılarak uygulanan 2,4-D'nin 300 ppm'lik konsantrasyonunun ise yaşam süresini ve konağa yumurta bırakımını azalttığını belirlemişlerdir.

Kaya ve Yanıkoğlu (1999), ana kuşak ve F1 kuşaklarında uygulanan 2,4-D'nin 300 ppm'lik derişiminin *D. melanogaster*'in F1 kuşaklarında pup olma süresini ve pup evresini geciktirip, ergin birey çıkış sayısını azalttığını, diğer etkili bir derişim olan 100 ppm'in ise F3 kuşaklarında pup evresini kısalttığını göstermişlerdir.

Martinez et al. (2001), 2,4-D ve bir herbisit olan picloram'ın *Canthar cyanellus* (bok böceği)'un üreme sistemini bozduğunu belirtmişlerdir.

2,4-D asit formu için sucul omurgasızlardaki LC₅₀ değerleri 25 mg/L'den (su piresi), 1389mg/L (kerevit) kadar çeşitlilik gösterir. Sucul omurgasızlardaki bu yüksek değişkenlik 2,4-D'nin ester formunun LC₅₀ değerinde daha da belirgin olarak ortaya çıkar. [0,092mg a.e/L (*Palaemonetes pugio*)- 66mg a.e/L (*Gammarus fasciatus*)] (USDA, 2006).

Karasal omurgasızlar için alınan NOAEC değeri, arılar için kontakt toksisite değeri olan 1075 mg/kg vücut ağırlığıdır. Ancak literatürde parazitik arıların 2,4-D'nin daha düşük dozlarına duyarlı olduğu belirtilmiştir (USDA, 2006).

Toksikolojik çalışmaların çoğunda çeşitli kimyasalların (insektisitler, ağır metaller v.b.) böcek hemolenfinde meydana getirdiği kimyasal değişiklikler ele alınmasına rağmen, çevresel faktörlerin böcek hemositleri üzerindeki etkileri konusunda yapılan çalışmalar oldukça azdır.

Insektisit olan chlordan'ın sublethal dozlarına maruz bırakılan *Periplaneta americana* bireylerinde toplam hemosit sayısının ve farklı hemosit sayılarının (plazmatosit, granülosit, koagulosit ve sferül hücre) arttığı gözlenmiştir (Gupta and Sutherland, 1967; Gupta'dan 1985).

Sistemik fungusitin (bayleton), *Beauveria bassiana* ile infekte edilmiş ipek böceğinde toplam hemosit sayıları ve hemosit biyokimsal değişimlerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, fungusit uygulaması sonucu ipek böceğinde toplam hemosit sayısının ve protein miktarının arttığı, toplam karbonhidrat ve lipid miktarlarının azaldığı gözlenmiştir (Balavenkatasubbaiah et al., 2002).

Büyük tatlı su karidesi, *Macrobrachium rosenbergii*'de sekiz ayrı phthalate esterinin hemositlerde apoptozis ve nekroz ile hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (Sung et al., 2003).

Cypermethrinin *Pimpla turionellae* larvalarında hemositler üzerine sitotoksik etkisinin incelendiği araştırmada insektisit uygulamasının doza bağlı olarak mitotik aktivitede azalmaya apoptotik hücre sayısında ise artmaya neden olduğu gösterilmiştir (Uçkan ve Sak, 2010).

1.2. Böcek Kan Hücreleri (Hemositler)

Böcek hemolenfi hemosöl veya vücut boşluğunu dolduran ekstrasellüler dolaşım sıvısı olarak tanımlanır. Böcek vücudunda sadece hemolenf içerisinde serbestçe dolaşabilen ya da hemolenfi çeviren dokulara yapışan aynı zamanda hemosit adı da verilen kan hücrelerinin çeşitleri farklı kaynaklara göre değişkenlik gösterir (Demirsoy, 2003).

Böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmalara karşı genellikle kan hücrelerinin oluşturduğu ve hücrelessiz olarak bilinen iki temel aktif bağışıklık sistemi vardır. Bunlar bazen hücrelessel ve humoral (antibakteriyal protein) bağışıklık olarak da adlandırılır. Humoral bağışıklık; hemolenfin pıhtılaşması veya melanizasyonunu düzenleyen kompleks enzimatik olayları ve antimikrobiyal peptidlerin sentezini içermektedir. Hemositler tarafından gerçekleştirilen hücrelessel bağışıklık tepkileri ise fagositoz, enkapsülasyon ve nodül oluşumu gibi savunma mekanizmalarını içerir. Böcek hemositleri tip, morfoloji ve sayı olarak türden türe değişiklik gösterir (Gupta, 1985). Böceklerde çeşitli araştırmacılar tarafından tanımlanan 55 farklı hemosit tipini Gupta (1985), ultrastrüktürel yapılarını dikkate alarak 7 ana tipe toplamıştır. Bunlar; Prohemosit, Plazmatosit, Granülosit, Sferül hücreler, Adipohemosit, Önositoit ve Koagülositlerdir.

Prohemositler küçük, yuvarlak, oval veya elips şeklinde hücrelerdir. Çekirdek hücrenin merkezinde ve oldukça büyük olup neredeyse hücrenin tamamını doldurmaktadır. Plazmatositler, şekilleri bakımından hemositler içinde en çok değişiklik gösteren hücrelerdir. Plazmatositler yuvarlak, oval, yıldız veya mekik şeklinde olabilirler. Granülositler, sitoplazmalarında bulunan çok sayıdaki granülden dolayı oldukça kolay tanınırlar. Granülositler genellikle yuvarlak ve oval şeklinde hücrelerdir. Sferül hücrelerin sayıları diğer hücrelere göre daha azdır. Bunlar yuvarlak ya da oval hücrelerdir. Sferül hücreler, içlerindeki küresel yapıları (sferüller) ile tanınırlar. Koagulositler genellikle küresel, şeffaf, kırılğan ve kararsız hücrelerdir. Plazma membranında genellikle sitoplazmik uzantılar bulunmaz. Adipohemositler küresel veya oval şekillidir. Sitoplazma granüler olup karakteristik olarak, boyutları değişken yağ damlacıkları içerir. Önositoidler, hemositler içinde en büyük hücrelerdir ve genellikle yuvarlak, armut şeklinde, oval gibi değişik şekillerde görülmektedirler. Bunların kenarları düzgün olup, tanınmaları da oldukça kolaydır (Gupta, 1985).

Hemositler ilk olarak embriyogenez esnasında baş ve dorsal mezodermden gelişirler. Böceklerde hemositlerin üretimi ya mezodermden türevlenen hematopoetik organlardaki kök hücrelerin bölünmesi yoluyla veya dolaşımdaki hemositlerin bölünmeye devam etmesiyle sürdürülür. Günümüzde hemositlerin oluşumu ve farklılaşması hakkında farklı teoriler olsa da genel kanı, prohemositlerin hematopoetik organlarda ilk olarak plazmatositlere farklılaştığı, diğer hemosit tiplerinin ise dolaşıma salındıktan sonra farklılaştığı ve dolaşımdaki hemosit popülasyonlarının hücre farklılaşmalarından sonra devam eden hücre bölünmeleri ile sağlandığı şeklindedir (Strand, 2008).

Hemositlerin çok sayıda fonksiyonda rol oynaması bunların çevresel faktörlere karşı diğer hücrelere göre daha duyarlı hale getirmektedir. Çevresel kirlenmeye neden olan değişik maddelerin omurgasız canlılardaki hemositler ve diğer doku hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran pek çok çalışma olmakla beraber, herbisite maruz kalan böceklerin hemositlerinde meydana gelecek sitolojik değişiklikler çok iyi bilinmemektedir. Bu nedenle bu yüksek lisans tezinde bir herbisit olan 2,4-D'nin *M. desertus* hemositlerine olası sitolojik etkileri ışık mikroskobu ile ilk kez araştırılarak, bu alandaki boşluğun doldurulmasına katkı yapılmaya çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Böceklerin Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan *M. desertus* ergin erkek ve dişi fertleri (Şekil 2.1) ilkbaharda doğadan (Tekirdağ / Çorlu) toplanarak $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, %45-50 bağıl nem ve uzun gün (16 saat ışık, 8 saat karanlık) fotoperiyodundaki laboratuvarında, 39x28x28cm boyutlarındaki plastik kaplarda kültüre alındı. Çekirgeler kanatlı yemi (Yemta) ile beslendi, su gereksinimleri ise ağzı pamukla tamponlanmış su dolu cam tüplerin, yumurtlama kabı olarak kullanılan ve dibinde ıslak pamuk bulunan küçük kapakların üzerine ters konularak sağlandı. Her gün gözlenen kaplardan yumurtaların bırakıldığı nemli pamuklar alınarak, yumurtaların gelişmesi takip edildi. İlk nimflerin 10-12 gün içerisinde ortaya çıktığı, deri değişimleri ile ayırt edilen dokuz nimfal evre sonrasında çekirgelerin ergin hale geldiği gözlemlendi.



Şekil 2.1 *M. desertus* dişi (D) ve erkek (E) bireyleri

2.2 Deneyde Kullanılan Herbisit

Deneylerde 2,4-D'nin ticari formülasyonlarından biri olan Koruma Weed Killer D (Koruma Tarım A.Ş.) kullanılmıştır. Bu kimyasal buğday, mısır ve pirinç gibi tahıl ürünlerinde geniş yapraklı tek yıllık yabancı otları kontrol etmek

için kullanılır. Büyüme düzenleyici madde olarak da bilinen bu madde yüksek dozlarda kullanıldığında herbisit etkisi gösterir.

2.3 Ön Denemeler

M. desertus'da 2,4-D'ye bağlı olarak hemositlerdeki değişimi gözlemleyebilmek için uygulama konsantrasyonu belirleme ön çalışmaları yapıldı. Bu amaçla beş gün süreyle ergin çekirgelere besin içinde 2,4-D'nin herbisit derişimi olan 100 ppm'den başlanarak sırasıyla 500, 1000, 2500, 5000, 7500 ve 10000 ppm'lik konsantrasyonlar uygulandı. Her bir konsantrasyon için 2 dişi ve 2 erkek olmak üzere 4 adet ergin çekirge kullanıldı. Ön denemeler üç kez tekrarlandı.

2.4 Deneysel Prosedür

Ön denemeler sonucunda *M. desertus* ergin birey hemositleri üzerine 2,4-D'nin etkisi düşük (1000 ppm), orta (2500 ppm) ve yüksek (5000 ppm) olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çalışıldı.

Koruma Weed Killer D, emülsiyon halindeki ticari preparatında 1 litrede 500 gr 2,4-D içermektedir. Bu emülsiyondan 1ml alıp 99 ml distile su ile sulandırıldığında bu karışımın 1 ml'sinde 5 mg 2,4-D etken maddesi bulunan 5000 ppm'lik yüksek uygulama konsantrasyonu elde edildi. 5000 ppm'lik bu karışımdan 20 ve 50 ml alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandığında sırasıyla 1000 ppm ve 2500 ppm'lik düşük ve orta uygulama konsantrasyonları elde edildi. Hazırlanmış olan uygulama konsantrasyonları belli gramajdaki ($\approx 5,5$ gr) besine (Yemta) emdirilip bir gün boyunca kuruması beklendi. Hazırlanan besinler 1 litrelik cam kavanozlara (yarıçap=4.5cm, yükseklik=18cm) kondu ve içlerine 2,4-D uygulanmış besin yediğinden emin olmak için stok kültürden alınıp 48 saat aç bırakılan 2 adet ergin *M. desertus* (bir dişi ve bir erkek) bırakıldı. Kavanozların ağzı hava sirkülasyonunu önlemeyecek şekilde kapatıldı. Toplam hemosit sayılarının belirlendiği deneylerde 1000, 2500 ve 5000 ppm'lik her uygulama konsantrasyonunda; 4, 8 ve 24 saatlik uygulama zamanlarının ve bu uygulama zamanlarının kontrol gruplarının her biri için 1 dişi ve 1 erkek olmak üzere 2 adet, toplamda ise 12 ergin çekirge kullanıldı. 2,4-D uygulamasını takiben 4, 8 ve 24 saat sonra hemolenf alınıp toplam hemosit sayıları belirlendi. Yayma preparat

yapılması içinde aynı şekilde deney grupları oluşturuldu. Deneyler her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için üç tekrarlı olarak yapıldı.

2.5 Toplam Hemosit Sayısının Belirlenmesi

Toplam hemosit sayılarının belirlenebilmesi için ergin çekirgeler toraks-abdomen birleşim kısmından ince uçlu iğneyle delindi ve 5 µl hemolenf mikropipet tüp yardımıyla alındı. Elde edilen 5 µl hemolenf, içerisinde 25 µl Woodring tuz solüsyonu (9.1g NaCl, 0,52g KCl, 1.2g CaCl₂•2H₂O, 0.82g MgCl₂•6H₂O) bulunan epondorf tüplerine aktarıldı. 1/6 oranında seyreltilmiş hücre süspansiyonu mikropipet yardımıyla birkaç kez çekip bırakılmak suretiyle karıştırıldı. Hücre süspansiyonundan uygun miktarda çekilerek 0.1 mm derinliğe sahip Neubauer hemositometresine (Weber, England) yüklendi. Deney gruplarımızda hemositometre lamının orta kısmında bulunan 25 orta büyüklükte kareye ayrılmış ve her bir orta karenin de 16 küçük kareye bölündüğü 1mm²'lik büyük karenin tamamı sayılarak toplam hemosit sayıları belirlendi. Mililitredeki toplam hemosit sayılarının hesaplanması için:

Hücre sayısı / ml = Büyük karede saydığımız hücre sayısı **X** Seyreltme katsayısı **X** 10⁴ formülünden yararlanıldı.

2.6 Hemositlerin Boyanması

Alınan hemolenf örnekleri yayma preparat yöntemi ile hazırlanıp, Giemsa boyama tekniği ile boyandı. Bunun için, hemositlerin lama yapışması için lam üzerine yayılan hemolenfin havada iyice kurumaması sağlandı. Daha sonra şaledaki metanol içinde 5 dakika süre ile tespit edildi. Tespitten sonra kurutulmuş lamlar hazırlanan %10'luk Giemsa çözeltisi [6 ml Giemsa (Merck) + 54 ml tampon çözelti (2,44 g Na₂HPO₄•2H₂O, 2,77g KH₂PO₄), pH 6.8] içinde 12 dakika süre ile boyandı. Boyama işlemi sonunda preparatlar hemen saf su ile yıkandı ve kuruduktan sonra entellan (Merck) ile kapatıldı.

2.7 Mikroskopik İnceleme

2,4-D uygulamasına bağlı olarak hemositlerde meydana gelen değişiklikler araştırıldı. Bunun için her bir deney serisinin tüm tekrarlarında, her preparatta 200 hücre olmak üzere dişi ve erkek birey için birer preparat incelendi. Hücre

membranında ve bütünlüğünde meydana gelen şekil değişiklikleri, bozulmuş hücre olarak kabul edildi. Her preparattaki 200 hücrede bozulmuş hücre sayıları belirlendi ve istatistikleri yapıldı.

2.8 İstatistiksel Analiz

Deney sonuçlarında elde edilen ortalamalar varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı. Ortalamalar arası farkın önem kontrolünde Tukey_{HSD} Testi kullanıldı. Veri analizinde SPSS (Versiyon 14) istatistik programı kullanıldı. Uygulanan tüm istatistiksel analizler %95 güven aralığında ($P \leq 0,05$) yapıldı ve değerlendirildi.

3. BULGULAR

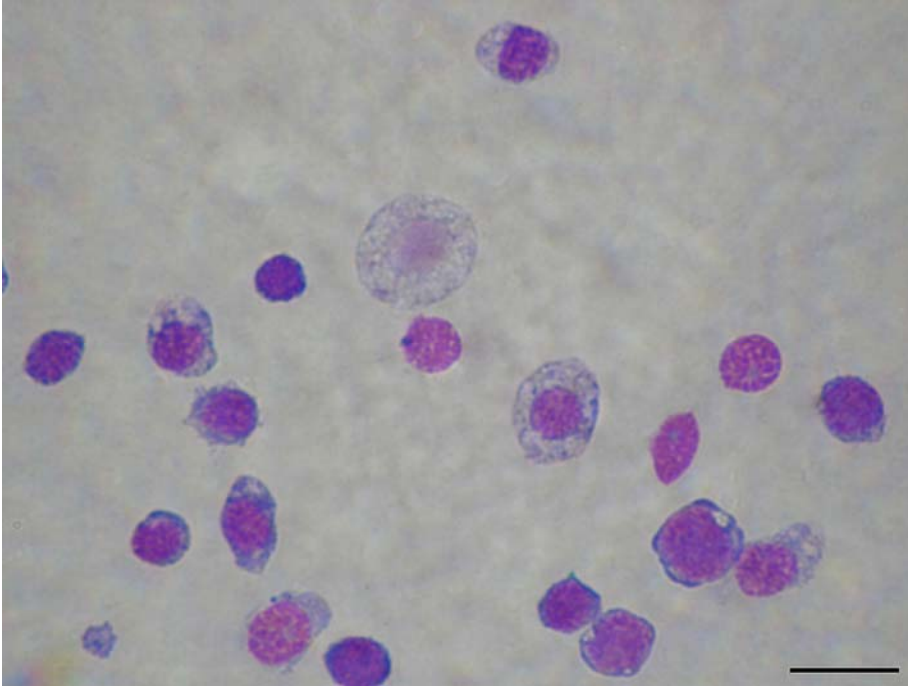
3.1 Ön Denemeler

Ön denemelerde beşinci gün sonunda 2,4-D'nin 100, 500, 1000 ve 2500 ppm'lik konsantrasyonlarında ergin *M. desertus* bireylerinde ölüm olmadığı, çekirge ölümlerinin 5000 ppm'de başladığı, 7500 ve 10000 ppm'lik konsantrasyonlarında ise ölüm oranının giderek arttığı görülmüştür. 5000 ppm'de *M. desertus* ergin bireylerindeki ölüm oranı %33.3, 7500 ppm'de %75 ve 10000 ppm'de ise %91.3 olarak saptanmıştır. Bu bilgilere göre asıl denemelerde çekirge ölümlerinin başladığı 5000 ppm'in yüksek, 2500 ppm'in orta ve 1000 ppm'inde düşük uygulama konsantrasyonu olarak kullanılarak, 2,4-D'nin hemositler üzerindeki etkisinin gözlemlenebileceği düşünülmüştür.

3.2 Histolojik Bulgular

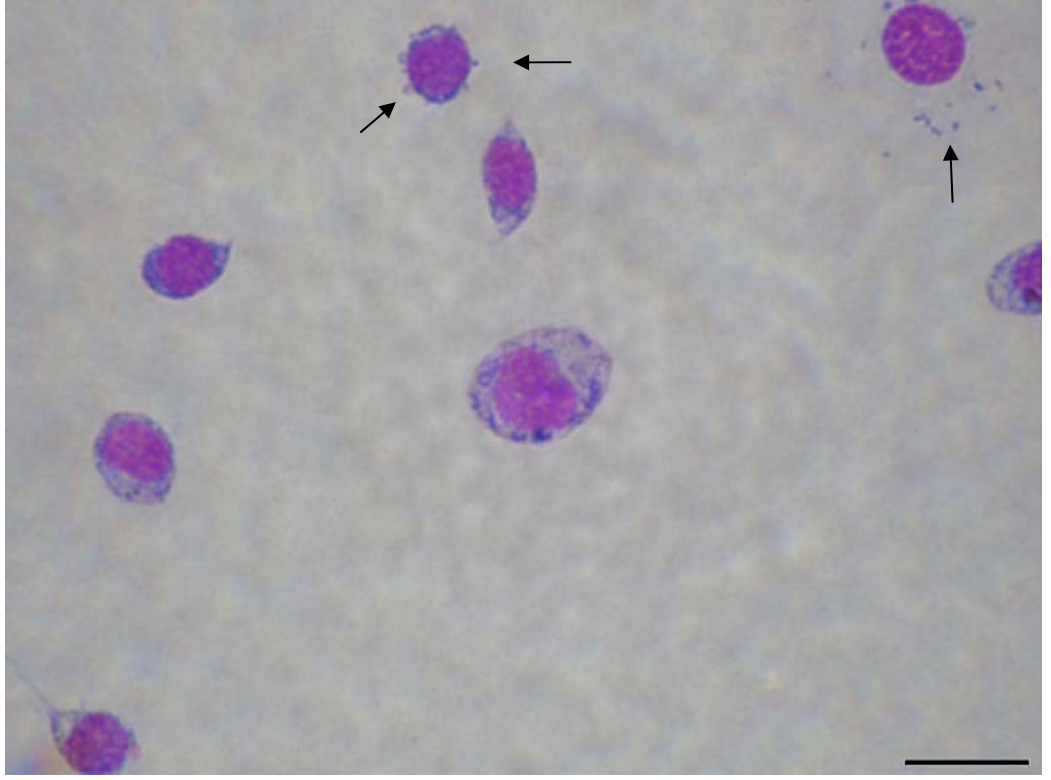
3.2.1 Hemolenf Hücreleri

Kontrol grubunda, *M. desertus* erginlerinin hemolenfinden Giemsa ile hazırlanmış yayma preparatlarda farklı tipteki hemositlerin çekirdekleri açık-koyu kırmızı, sitoplazmaları ise açık-koyu lacivert renkte boyanmıştır (Şekil 3.1).

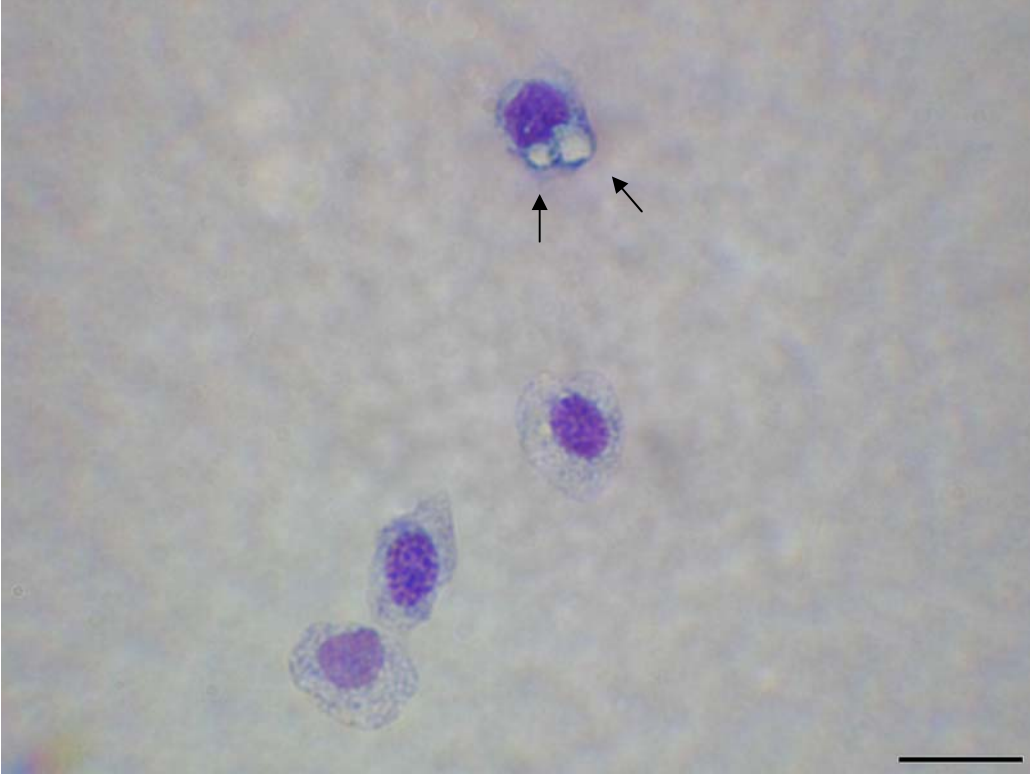


Şekil 3.1 *M. desertus* 'da hemositlerin genel görünümü. Ölçek 20µm.

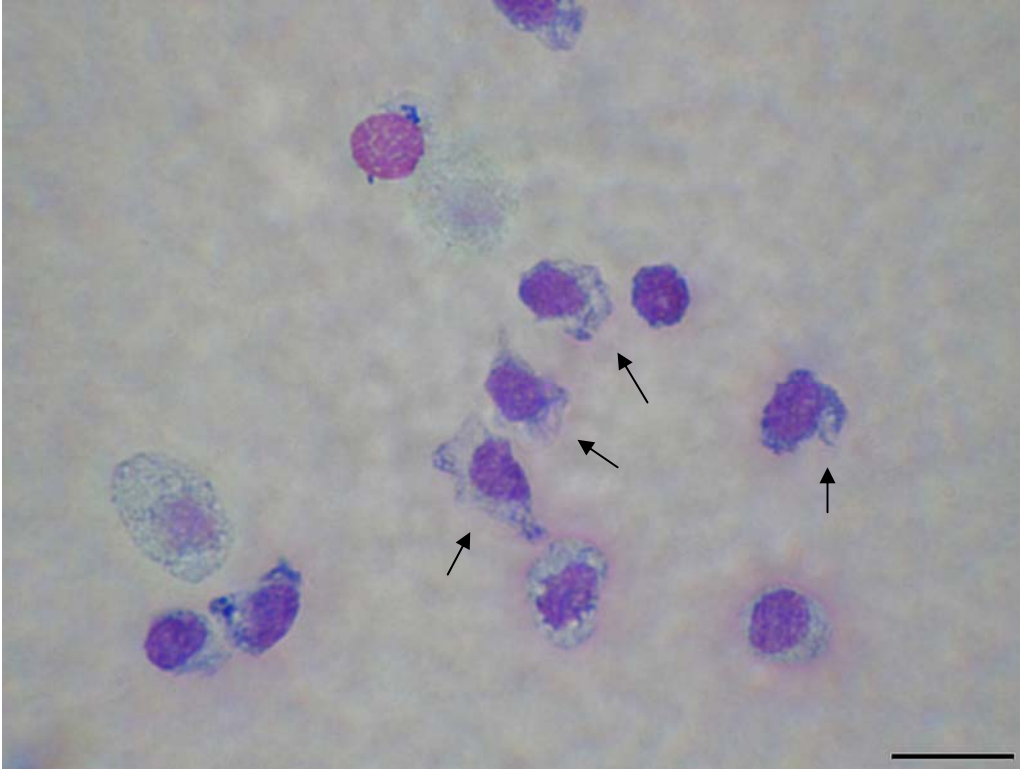
2,4-D uygulanan çekirgelerin incelenen preparatlarında hemosit membranlarında tomurcuklanmaların (Şekil 3.2) ve sitoplazmada büyük vakuollerin oluştuğu (Şekil 3.3) saptanmıştır. Bazı hücrelerin membranlarında dalgalanmalar ve yer yer zar bütünlüğünün kaybolduğu (Şekil 3.4), sitoplazmik içeriğin hücre dışına dağıldığı (Şekil 3.5) ve lizise benzer hücre bozulmaları gözlenmiştir (Şekil 3.6).



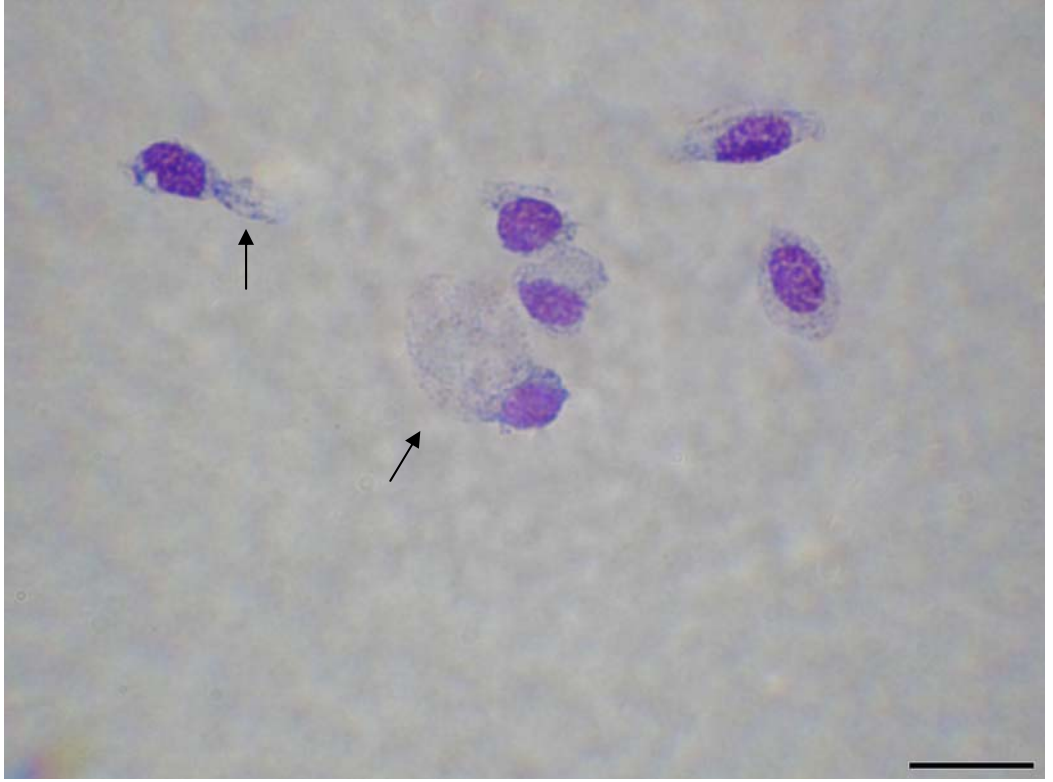
Şekil 3.2 *M. desertus*'da hemosit membranlarında tomurcuklanmalar (Siyah oklar). Ölçek 20 μ m.



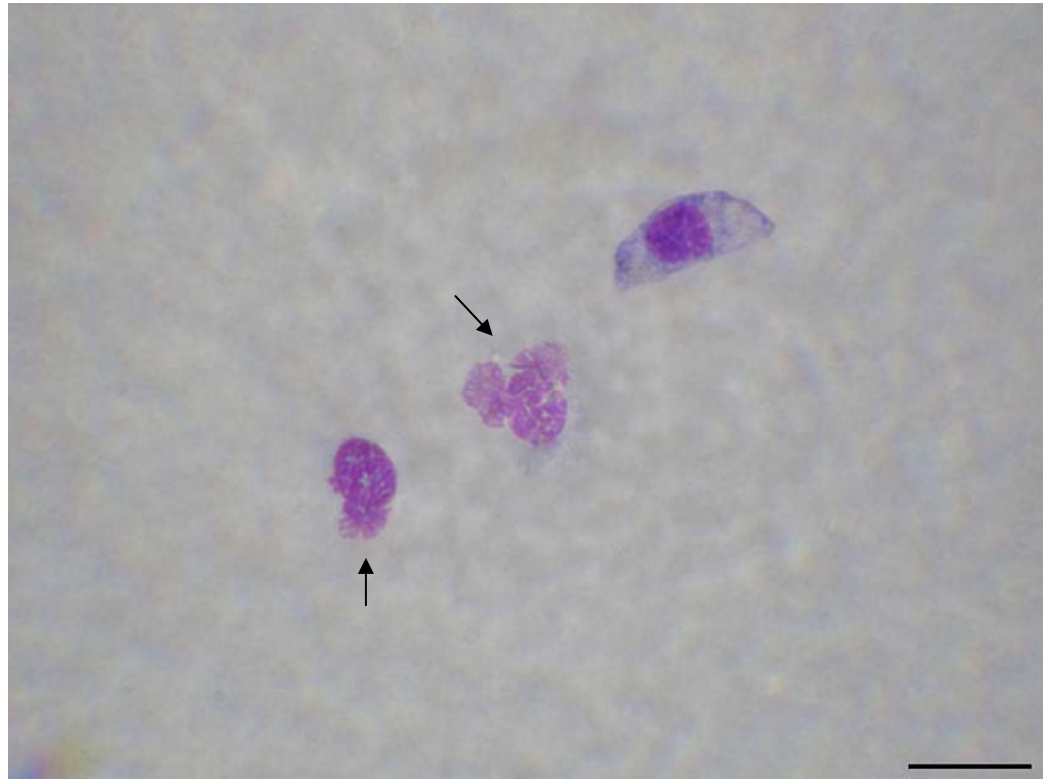
Şekil 3.3 *M. desertus* 'da hemosit sitoplazmasında vakuol oluşumu (Siyah oklar). Ölçek 20µm.



Şekil 3.4 *M. desertus* 'da hemosit membranlarında dalgalanmalar (Siyah oklar). Ölçek 20µm.



Şekil.3.5 *M. desertus* 'da hemosit sitoplazmik içeriğin hücre dışına dağılması (Siyah oklar). Ölçek 20 μ m.

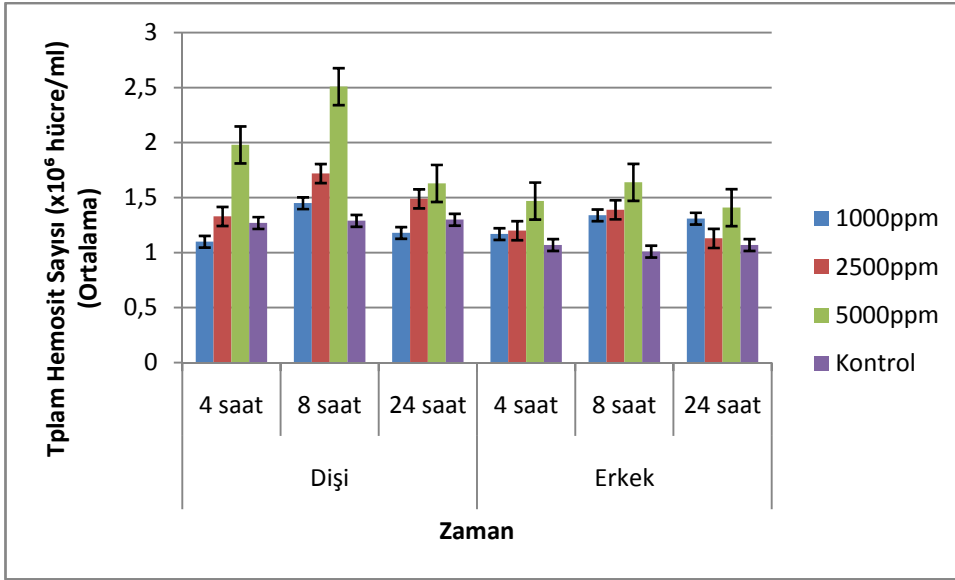


Şekil 3.6 *M. desertus* 'da hemositlerinde lizise benzer hücre bozulmaları (Siyah oklar). Ölçek 20 μ m.

3.3 İstatistiksel Değerlendirme

3.3.1 2,4-D'nin Ergin *M. desertus* Toplam Hemosit Sayılarına Etkisi

Ergin dişi ve erkek *M. desertus*'da 2,4-D'nin toplam hemosit sayılarına etkisi 3 tekrarlı deney serileri ile belirlendi. 2,4-D konsantrasyonu, uygulama zamanı ve eşeye bağlı olarak ergin *M. desertus* toplam hemosit sayılarında görülen değişiklikler ANOVA çizelgesinde verilmektedir (Çizelge 3.1). 2,4-D uygulaması ile ergin çekirge toplam hemosit sayılarında kontrole göre meydana gelen artış eşeyler, konsantrasyon grupları ve uygulama zamanları arasında istatistiksel olarak farklılıklar göstermiştir ($p \leq 0,05$).



Şekil 3.7 2,4-D konsantrasyonu, zaman ve eşeye bağlı olarak ergin *M. desertus* toplam hemosit sayılarındaki değişimler.

Kontrol grupları karşılaştırıldığında, dişi bireylerin toplam hemosit sayısının erkek bireylerden fazla olduğu görülmüş (Şekil 3.7) ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. 2,4-D konsantrasyonu, zaman ve eşeye bağlı olarak ergin *M. desertus* toplam hemosit sayılarının Çok Yönlü Varyans Analizi. K.T. (Kareler Toplamı), Df (Serbestlik Derecesi), K.O. (Kareler Ortalaması), P (önem Derecesi). *: $P \leq 0,05$

| Kaynak | K.T. | Df | K.O. | F | P |
|--------------------------|-----------|-----|---------|----------|---------------|
| Düzenlemiş Model | 15,156(a) | 23 | 0,659 | 3,176 | 0,000* |
| Kesişme | 279,893 | 1 | 279,893 | 1349,011 | 0,000* |
| Eşey | 2,310 | 1 | 2,310 | 11,136 | 0,001* |
| Konsantrasyon | 7,687 | 3 | 2,562 | 12,350 | 0,000* |
| Zaman | 1,613 | 2 | 0,806 | 3,887 | 0,023* |
| Eşey*Konsantrasyon | 1,434 | 3 | 0,478 | 2,304 | 0,080 |
| Eşey*Zaman | 0,377 | 2 | 0,189 | 0,909 | 0,406 |
| Konsantrasyon*Zaman | 1,278 | 6 | 0,213 | 1,027 | 0,411 |
| Eşey*Konsantrasyon*Zaman | 0,456 | 6 | 0,076 | 0,367 | 0,899 |
| Hata | 24,898 | 120 | 0,207 | | |
| Toplam | 319,946 | 144 | | | |
| Düzenlenmiş Toplam | 40,054 | 143 | | | |

2,4-D uygulamasına bağlı olarak eşeyler arasındaki toplam hemosit sayılarında meydana gelen artışın, 1000 ppm konsantrasyon grubu hariç 2500 ppm ve 5000 ppm' de istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P \leq 0,05$) saptanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. 2,4-D uygulamasına bağlı olarak toplam hemosit sayılarının eşeye göre çoklu karşılaştırma çizelgesi. K.T. (Kareler Toplamı), Df (Serbestlik Derecesi), K.O. (Kareler Ortalaması), P (önem Derecesi). *: $P \leq 0,05$

| Kaynak | Bağımlı Değişken | K.T. | Df | K.O. | F | P |
|--------|------------------|-------|----|-------|-------|---------------|
| Eşey | 1000ppm | 0,008 | 1 | 0,008 | 0,052 | 0,821 |
| | 2500ppm | 0,672 | 1 | 0,672 | 5,522 | 0,026* |
| | 5000ppm | 2,560 | 1 | 2,560 | 5,309 | 0,028* |
| | Kontrol | 0,504 | 1 | 0,504 | 7,216 | 0,012* |

M. desertus'da toplam hemosit sayılarının, konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 3.7). Bu artış kontrol grubu, 1000 ppm ve 2500 ppm grubundaki örnekler arasında birbirine benzerken ($P > 0,05$), 5000 ppm grubundaki artışın diğer konsantrasyon gruplarına göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Konsantrasyon gruplarına göre toplam hemosit sayılarının çoklu karşılaştırma çizelgesi. O.F. (Ortalama Fark), S.H: (Standart Hata), P (Önem Derecesi). *: $P \leq 0,05$

| (I) Konsantrasyon | (J) Konsantrasyon | O.F. (I-J) | S.H. | P | 95% Güven Aralığı (CI) | |
|-------------------|-------------------|------------|---------|---------------|------------------------|-----------|
| | | | | | Alt Sınır | Üst Sınır |
| 1000ppm | 2500ppm | -0,1183 | 0,10736 | 0,689 | -0,3981 | 0,1614 |
| | 5000ppm | -0,5150(*) | 0,10736 | 0,000* | -0,7947 | -0,2353 |
| | Kontrol | 0,0900 | 0,10736 | 0,836 | -0,1897 | 0,3697 |
| 2500ppm | 1000ppm | 0,1183 | 0,10736 | 0,689 | -0,1614 | 0,3981 |
| | 5000ppm | -0,3967(*) | 0,10736 | 0,002* | -0,6764 | -0,1169 |
| | Kontrol | 0,2083 | 0,10736 | 0,217 | -0,0714 | 0,4881 |
| 5000ppm | 1000ppm | 0,5150(*) | 0,10736 | 0,000* | 0,2353 | 0,7947 |
| | 2500ppm | 0,3967(*) | 0,10736 | 0,002* | 0,1169 | 0,6764 |
| | Kontrol | 0,6050(*) | 0,10736 | 0,000* | 0,3253 | 0,8847 |
| Kontrol | 1000ppm | -0,0900 | 0,10736 | 0,836 | -0,3697 | 0,1897 |
| | 2500ppm | -0,2083 | 0,10736 | 0,217 | -0,4881 | 0,0714 |
| | 5000ppm | -0,6050(*) | 0,10736 | 0,000* | -0,8847 | -0,3253 |

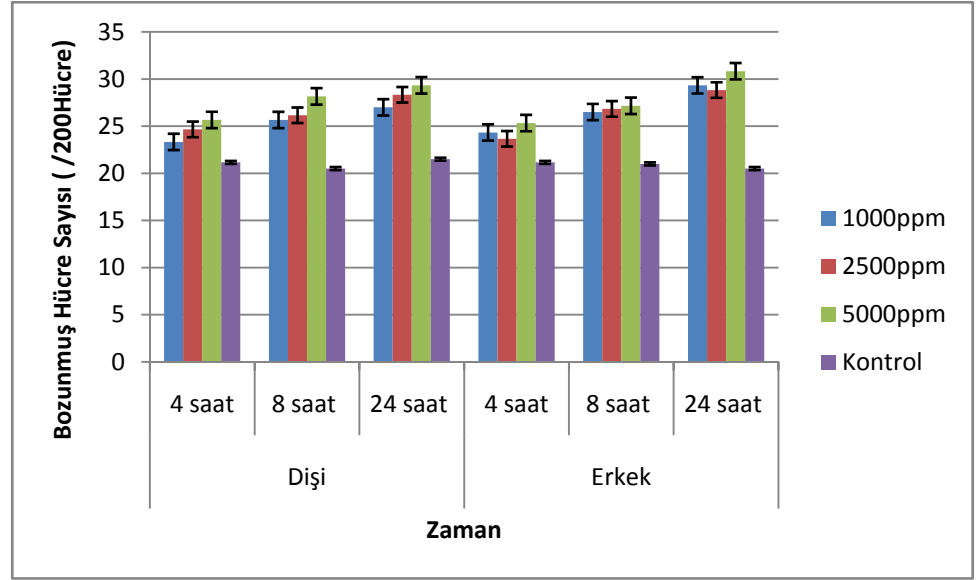
2,4-D uygulamasını izleyen 4. saatte toplam hemosit sayılarının kontrol gruplarına göre arttığı, bu artışın 8. saatte en fazla olduğu, 24. saatte ise 4. saatteki seviyesine yakın bir düzeye indiği gözlenmiştir (Şekil 3.7). İstatistiksel olarak 4. ve 8. saatteki toplam hemosit sayısındaki artış birbirine benzerlik gösterirken, 24. saatteki düşüş nedeniyle toplam hemosit sayılarında 8. saate göre farklılık gözlemlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Uygulama zamanına göre toplam hemosit sayılarının çoklu karşılaştırma çizelgesi. O.F. (Ortalama Fark), S.H: (Standart Hata), P (Önem Derecesi). *: $P \leq 0,05$

| (I) Zaman | (J) Zaman | O.F. (I-J) | S.H. | P | 95% Güven Aralığı (CI) | |
|-----------|-----------|------------|---------|---------------|------------------------|-----------|
| | | | | | Alt Sınır | Üst Sınır |
| 4 saat | 8 saat | 0,2200 | 0,09298 | 0,051 | -0,4407 | 0,0007 |
| | 24 saat | 0,0088 | 0,09298 | 0,995 | -0,2119 | 0,2294 |
| 8 saat | 4 saat | 0,2200 | 0,09298 | 0,051 | -0,0007 | 0,4407 |
| | 24 saat | 0,2288(*) | 0,09298 | 0,040* | 0,0081 | 0,4494 |
| 24 saat | 4 saat | -0,0088 | 0,09298 | 0,995 | -0,2294 | 0,2119 |
| | 8 saat | -0,2288(*) | 0,09298 | 0,040* | -0,4494 | -0,0081 |

3.3.2 2,4-D'nin Ergin *M. desertus* Hemositlerine Etkisi

2,4-D uygulamasına bağılı olarak bozulmuş hemosit sayılarında meydana gelen değişiklikler Şekil 3.8'de verilmektedir. Kontrol grubunda düşük olan bozulmuş hücre sayısının 2,4-D konsantrasyonu ve uygulama zamanı artıkça yükseldiği görülmektedir (Şekil 3.8) .



Şeki3.8. 2,4-D konsantrasyonu, zaman ve eşeye bağılı olarak ergin *M. desertus* bozulmuş hemosit sayılarındaki değişmeler.

Bozulmuş hücre sayıları arasında, uygulama saatine ve uygulanan konsantrasyonlara bağılı olarak istatistiksel bir farklılık gözlenmiştir ($P \leq 0,05$), ancak bozulmuş hücre sayısı açısından dişi ve erkek bireyler arasında konsantrasyon uygulaması ve saatine göre istatistiksel bir farklılık ($P > 0,05$) bulunamamıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. 2,4-D konsantrasyonu, zaman ve eşeye bağlı olarak ergin *M. desertus* bozulmuş hemosit sayılarının çok yönlü varyans Analizi. K.T. (Kareler Toplamı), Df (Serbestlik Derecesi), K.O. (Kareler Ortalaması), P (önem Derecesi). *: $P \leq 0,05$

| Kaynak | K.T. | Df | K.O. | F | P |
|--------------------------|-------------|-----|-----------|----------|---------------|
| Düzenlemiş Model | 1351,750(a) | 23 | 58,772 | 4,359 | 0,000* |
| Kesişme | 92112,250 | 1 | 92112,250 | 6831,564 | 0,000* |
| Eşey | 4,000 | 1 | 4,000 | 0,297 | 0,587 |
| Konsantrasyon | 954,306 | 3 | 318,102 | 23,592 | 0,000* |
| Zaman | 260,167 | 2 | 130,083 | 9,648 | 0,000* |
| Eşey*Konsantrasyon | 13,667 | 3 | 4,556 | 0,338 | 0,798 |
| Eşey*Zaman | 5,167 | 2 | 2,583 | 0,192 | 0,826 |
| Konsantrasyon*Zaman | 96,944 | 6 | 16,157 | 1,198 | 0,312 |
| Eşey*Konsantrasyon*Zaman | 17,500 | 6 | 2,917 | 0,216 | 0,971 |
| Hata | 1618,000 | 120 | 13,483 | | |
| Toplam | 95082,000 | 144 | | | |
| Düzenlenmiş Toplam | 2969,750 | 143 | | | |

Bozulmuş hemosit sayılarındaki artışın kontrol ile konsantrasyon grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P \leq 0,05$), konsantrasyon grupları (1000, 2500, 5000 ppm) arasında ise istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Konsantrasyon gruplarına göre bozulmuş hücre sayılarının çoklu karşılaştırma çizelgesi. O.F. (Ortalama Fark), S.H. (Standart Hata), P (Önem Derecesi). *: $P \leq 0,05$

| (I) Konsantrasyon | (J) Konsantrasyon | O.F. (I-J) | S.H. | P | 95% Güven Aralığı (CI) | |
|-------------------|-------------------|------------|---------|---------------|------------------------|-----------|
| | | | | | Alt Sınır | Üst sınır |
| 1000ppm | 2500ppm | -0,3889 | 0,86549 | 0,970 | -2,6438 | 1,8661 |
| | 5000ppm | -1,7222 | 0,86549 | 0,198 | -3,9772 | 0,5327 |
| | Kontrol | 5,0556(*) | 0,86549 | 0,000* | 2,8006 | 7,3105 |
| 2500ppm | 1000ppm | 0,3889 | 0,86549 | 0,970 | -1,8661 | 2,6438 |
| | 5000ppm | -1,3333 | 0,86549 | 0,417 | -3,5883 | 0,9216 |
| | Kontrol | 5,4444(*) | 0,86549 | 0,000* | 3,1895 | 7,6994 |
| 5000ppm | 1000ppm | 1,7222 | 0,86549 | 0,198 | -0,5327 | 3,9772 |
| | 2500ppm | 1,3333 | 0,86549 | 0,417 | -0,9216 | 3,5883 |
| | Kontrol | 6,7778(*) | 0,86549 | 0,000* | 4,5228 | 9,0327 |
| Kontrol | 1000ppm | -5,0556(*) | 0,86549 | 0,000* | -7,3105 | -2,8006 |
| | 2500ppm | -5,4444(*) | 0,86549 | 0,000* | -7,6994 | -3,1895 |
| | 5000ppm | -6,7778(*) | 0,86549 | 0,000* | -9,0327 | -4,5228 |

2,4-D uygulamasını izleyen 4., 8. ve 24. saatte bozulmuş hemosit sayısının arttığı görülmüştür (Şekil 3.8). 2,4-D'ye bağlı olarak bozulmuş hemosit sayılarındaki artışın 4. saat ile 8. saat ve 8. saat ile 24. saatte birbirine benzerlik

gösterdiği, 4. saat ve 24. saat arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Uygulama zamanına göre bozulmuş hemosit sayılarının çoklu karşılaştırma çizelgesi. O.F. (Ortalama Fark), S.H: (Standart Hata), P (Önem Derecesi). *: $P \leq 0,05$

| (I) Zaman | (J) Zaman | O.F. (I-J) | S.H. | P | 95% Güven Aralığı (CI) | |
|-----------|-----------|------------|---------|---------------|------------------------|-----------|
| | | | | | Alt Sınır | Üst Sınır |
| 4 saat | 8 saat | -1,5833 | 0,74954 | 0,092 | -3,3621 | 0,1954 |
| | 24 saat | -3,2917(*) | 0,74954 | 0,000* | -5,0704 | -1,5129 |
| 8 saat | 4 saat | 1,5833 | 0,74954 | 0,092 | -0,1954 | 3,3621 |
| | 24 saat | -1,7083 | 0,74954 | 0,063 | -3,4871 | 0,0704 |
| 24 saat | 4 saat | 3,2917(*) | 0,74954 | 0,000* | 1,5129 | 5,0704 |
| | 8 saat | 1,7083 | 0,74954 | 0,063 | -0,0704 | 3,4871 |

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarımda birim alandan alınan verimin artırılması amacıyla kullanılan ve pestisit olarak adlandırılan tarımsal ilaçlar zamanla zararlılarla mücadelenin vazgeçilmez aracı olmuştur. Ancak aşırı ve denetimsiz kullanım sonucu oluşan zararlı etkiler, zamanla insan ve çevre sağlığını da tehdit edecek boyutlara ulaşmaktadır. Yabancı otlarla mücadelede herbisitler kullanılmaktadır. Herbisitler içinde olduğu gibi, tüm pestisitler içinde de ülkemizde en yoğun tüketilen etkili maddelerden biri 2,4-D'dir.

2,4-D'nin etki şekli memelilerde açıkça belirlenmiştir. Mevcut çalışmalara dayanarak, laboratuvar hayvanları 2,4-D ile akut oral doza maruz kaldıklarında gözlenen etkiler: ataksi (kasların koordinasyon bozukluğu), miyotoni (bir kasın tonik spazmı) ve uzuv kuvvetinin azalmasıdır (U.S EPA/OPP, 2005). Köpek ve rodentlerde 2,4-D ye maruz kalma, vücut ağırlığının azalmasına, besin tüketiminin düşmesine ve karaciğer ile böbreklerde bazı bozukluklara neden olmuştur. Farelerde 2,4-D nin ters etkileri olarak tiroid ağırlığının artması (tiroid), T3 ve T4 azalması (tiroid fonksiyonu), kan hücreleri, hematokrit, dişilerde hemoglobin ve her iki eşeyde platelet azalması (hematoloji), kan glukoz, kolestrol, trigliserit azalması (kolestrol ve glukoz metabolizması), testis ve ovaryum doku ağırlığı azalması (üreme organları), katarakt (göz), adipoz dokuda ve karaciğerde mikroskobik lezyonlar gözlenmiştir (USDA, 2006).

4.1 2,4-D'nin Ergin *M. desertus* Toplam Hemosit Sayılarına Etkisi

Yaptığımız çalışmada 2,4-D uygulamasının *M. desertus* ergin bireylerinde toplam hemosit sayısını arttırdığı belirlendi. Bu artış 1000 ppm ile 2500 ppm'de birbirine benzerlik gösterirken, 5000 ppm'deki hemosit sayısı artışının daha yüksek olduğu belirlendi. Toplam hemosit sayılarındaki bu artış, böceğin bağışıklık sisteminin harekete geçmesi nedeniyle olabilir. Entomopatojenik bir mantar olan *Metarhizium anisopliae* var *acridum*'un *Schistocerca gregaria* (Çöl çekirgesi) üzerindeki bağışıklık tepkisinin araştırıldığı çalışmada, mantarın topikal uygulamasını izleyen ikinci günde toplam hemosit sayısının arttığı, dördüncü günde ise toplam hemosit sayısının kontrol gruplarının aşağısına indiği gözlenmiştir (Gillespie et al., 2000). Parazitlenme durumuna göre *Anastrepha obliqua* (Diptera; Tephritidae) larvasında hemosit tipleri ve toplam hemosit

sayıları üzerine yapılan bir çalışmada parazitlenmiş larvanın toplam hemosit sayılarının, parazitlenmemişe göre daha fazla olduğu bulunmuştur. (Silva et al., 2001). Sistemik fungusitin (bayleton), *Beauveria bassiana* ile infekte edilmiş ipek böceğinde toplam hemosit sayıları ve hemosit biyokimyası değişimlerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, fungusit uygulaması sonucu ipek böceği toplam hemosit sayısının arttığı gözlenmiştir (Balavenkatasubbaiah et al., 2002). *Carabus lefebvrei* larva ve erginlerinin hemosit tipleri ve fagositoz aktivitesi üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise larvalara fosfat tamponu (PBS) ve karboksilatlı tanecikler enjekte edildiğinde, toplam hemosit sayılarında artış gözlenmiştir (Giglio et al., 2008). Yapılan diğer bir çalışmada ise *Gryllus texensis*'e akut stres (uçma ya da koşma) uygulaması sonucu hemolenfteki hemosit sayısında artış gözlenmiştir (Adamo, 2010). Araştırmacılar toplam hemosit sayılarındaki bu artışın nedenini, bağışıklık sisteminin harekete geçmesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu veriler bizim deneylerimizde elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Ayrıca toplam hemosit sayılarındaki artışın 2,4-D'nin böcek endokrin sistemine etki etmesi nedeniyle olabileceğini düşündürmektedir. Hemosit oluşumu ve sayısının korunmasının böcek endokrin sisteminin kontrolünde olduğu (Hoffmann and Joly, 1969; Gupta'dan, 1985) benzer şekilde 2,4-D'nin omurgalı endokrin sisteminde de olumsuz etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Journal of Pesticide Reform, 1999).

M. desertus'da uygulama zamanına bağlı olarak 5000 ppm konsantrasyonunda dişi bireylerde daha fazla olmak üzere 8. saatte hemosit sayıları kontrol ve diğer doz gruplarına göre oldukça yüksek bulundu (Şekil 3.7). Uygulamanın 24. saatinde ise toplam hemosit sayılarının 4. saatteki seviyesine indiği gözlemlendi. Hemosit sayısındaki bu azalma, 2,4-D uygulamasını takiben, hasar gören hemositlerin hücrel bağışıklık tepkisi ile fagosite edilmesi veya nodül oluşumu sonucu dolaşımdaki hemositlerin azalması nedeniyle meydana gelebileceğini gösterdi. Hemositlerin maya, bakteri, apoptotik cisimcikler gibi biyotik ve sentetik tanecikler ve mürekkep gibi küçük abiyotik hedefleri fagosite ettiği ve yabancı cisimlerin etrafında nodül oluşturduğu bilinmektedir (Lavine and Strand, 2002). Ayrıca hemosit sayılarındaki bu artış ve azalmalar hemolenfteki 2,4-D konsantrasyon değişimleri veya homeostazisin korunması için detoksifikasyon mekanizmalarının devreye girmesi nedeniyle de olabilir. 2,4-

D'nin çoğu türde oral doz uygulamasından sonraki 8 saat içinde yüksek plazma konsantrasyonuna ulaştığı (Erne, 1966) ve dermal uygulamanın ardından 2-8 saat arasında kandaki konsantrasyon sabit bir düzeye ulaşarak hızlı bir düşüş gösterdiği bildirilmektedir (Garabrant and Philbert, 2002).

4.2 2,4-D'nin Ergin *M. desertus* Hemositlerine Etkisi

M. desertus ergin bireylerinde 2,4-D uygulamasının toplam hemosit sayıları üzerinde olduğu gibi hemositler üzerinde de sitolojik yönden olumsuz etkilerinin olduğu görüldü. 2,4-D uygulanan çekirgelerin incelenen hemosit preparatlarında hemosit membranlarında tomurcuklanmalar meydana geldiği (Şekil 3.2), sitoplazmada büyük vakuollerin oluştuğu (Şekil 3.3), hücre membranı bütünlüğünün kaybolduğu (Şekil 3.4), sitoplazmik içeriğin hücre dışına dağıldığı (Şekil 3.5) ve lizise benzer çeşitli hücre bozulmaları (Şekil 3.6) gözlemlendi. Kontrole göre 2,4-D uygulanan tüm gruplarda bozulmuş hücre sayısındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P \leq 0,05$). Suwalsky et al. (1996), 2,4-D'nin eritrosit membranının çift tabaka fosfolipid yapısını bozduğunu, aynı araştırmacılar eritrositlerdeki morfolojik değişimlerin, membran iskeletinde spesifik oksidatif dönüşümlerin sonucu olabileceğini kabul etmişlerdir. Pech and Strand (2000), *Pseudoplusia includens* hemositleri ile yaptıkları çalışmada hücresel bağışıklık tepkilerinden biri olan enkapsülasyon sırasında granüositlerin plazmositlere bağlı olarak apoptozis geçirdiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar apoptozis geçiren hemositlerde tipik olarak hücrede küçülme, membranda kabarcıklaşma, kromatinde yoğunlaşma ve DNA parçalanması olduğunu belirtmişlerdir. Kaioumova et al. (2001 a; 2001 b), 2,4-D'nin dimetilamin (DMA) tuzunun direkt olarak mitokondrilere etki edip apoptozise, dolayısı ile kademeli olayların başlamasına neden olarak insan lenfositlerini öldürdüğünü göstermişlerdir. 2,4-D, 2,4,5-T, ve MCPA fenoksiasetik asitleri ile metabolitlerinin insan eritrositlerinde doza bağlı olarak hemolizise neden olduğu belirtilmiştir (Duchnowicz et al., 2002). Bukowska and Zatorska (2003), 2,4-D ile inkübe edilen insan eritrositlerindeki şekil değişimlerini incelemişler ve 2,4-D'nin eritrosit morfolojisinde önemli değişimlere (yıldız şekilli eritrositler ve hemolizis) neden olduğunu bildirmişlerdir. Büyük tatlı su karidesi, *Macrobrachium rosenbergii*'de sekiz ayrı phthalate esterinin hemositlerde apoptozis ve nekroz ile hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (Sung et al., 2003). 2,4-D'nin,

enzimlere bağlanıp onların aktivitesini ve bazı kimyasal reaksiyonları bozduğu, fosfolipidleri etkilediği, hücre zarında fiziksel etkileşimleri uyardığı bilinmektedir (Bukowska, 2006). Cypermethrinin *Pimpla turionellae* larvalarında hemositler üzerine sitotoksik etkisinin incelendiği araştırmada cypermethrin uygulamasının doza bağlı olarak mitotik aktivitede azalmaya, apoptotik hücre sayısında ise artmaya neden olduğu gösterilmiştir (Uçkan ve Sak, 2010). Bizim araştırmamızda hemosit preparatlarına ait incelemelerimizden edindiğimiz izlenim de aynı olmasına rağmen, Giemsa ile boyanan yayma preparatlarda apoptozis geçiren hücrelere özgü olan morfolojik özelliklerin bazıları (kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler) görülemedi. Bu nedenle, apoptozisin belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemler (immunohistokimyasal, biyokimyasal v.b) uygulanmadan, 2,4-D'nin *M. desertus* hemositleri üzerinde kesin bir apoptotik etkiye neden olduğunu söylemek zordur.

Sonuç olarak bu araştırma *M. desertus*' ta 2,4-D'ye bağlı olarak hemositlerde meydana gelen değişikliklerin, bu herbisitinin sitolojik düzeyde toksik etkilerinin olası varlığını göstermesi açısından önemlidir.

Yukarıda tartışılan bu ve benzeri çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, tarımda yaygın olarak kullanılan 2,4-D'nin çok daha bilinçli ve kontrollü kullanılması hem çevre hem de insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. USDA (2006)'ya göre birçok herbisitinin böcekler ve diğer omurgasızlar için zararsız olduğu varsayımı göz önüne alındığında; herbisite maruz kalmış böcek türlerinde hemositlerin fizyolojisi, sitolojisi ve biyokimyasının kısıtlı kaynak nedeni ile çok iyi bilinmediği söylenebilir. Bu nedenle 2,4-D'nin böcek hemositleri üzerinde meydana getirebileceği olumsuz etkileri incelemek için ışık mikroskobu ile yapılan bu tez çalışmasının, bu alandaki az sayıda olan araştırmalara katkısının olabileceği ümit edilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Adamo S.A., 2010. Why should an immune response activate the stress response? Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (2010) 194–200.

Balavenkatasubbaiah M., Mallikarjuna M., Nataraju B. and Thiagarajan V., 2002. Effect of Systemic Fungicide on Total Hemocyte Count and Hemolymph Biochemical Changes in Silkworm, *Bombyx mori* L., infected with *Beauveria bassiana*. *Int. J. Indust. Entomol.* Vol. 5, No. 2, 2002, pp. 189~194.

Biçer S., Ateş U., Uyanıkgil Y., Baka M., Özdaş E., Yavaşoğlu A., Ergen G., 2006. Bir Herbisit Olan 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)' in Sıçanlarda Ovaryum Dokusu Üzerine Etkisi. *Toksikoloji Dergisi*, 6 (1-2): 19-26.

Bradberry S.M., Watt B.E., Proudfoot A.T. and Vale J.A., 2000. Mechanisms of Toxicity, Clinical Features, and Management of Acute Chlorophenoxy Herbicide Poisoning: A Review. *Clinical Toxicology*,38:2,111 — 122.

Bukowska B., 2006. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid – Molecular Mechanisms. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 15, No. 3 (2006), 365-374.

Bukowska B. and Zatorska A., 2003. The Prehemolitycal Changes İn Human Erythrocytes Treated With 2,4- Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Current Topics İn Biophysics* 2003, 27(1-2), 11-15.

De Moliner K.L., Evangelista De Duffard A.M., Soto E., Duffard R. and Adamo A.M., 2002. Induction of apoptosis incerebellar granule cells by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Neurochem Res.* 27(11):1439-46.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A., 2005. Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongre, Ankara.

Demirsoy, A., 1995. ”Yaşamın Temel Kuralları, Omurgasızlar/ Böcekler, Entomoloji”, Cilt-II/ Kısım II, II.Baskı, Meteksan Matbaacılık, Ankara, 119-122.

Duchnowicz P. and Koter M., 2003. Damage to the erythrocyte membrane caused by chlorophenoxyacetic herbicides. *Cell Mol Biol Lett.* 8(1):25-30.

Duchnowicz P., Koter M., and Duda W., 2002. Damage of erythrocyte by phenoxyacetic herbicides and their metabolites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74 (2002) 1–7.

Erne, K., 1966. Distribution and elimination of chlorinated phenoxyacetic acids in animals. *Acta. Vet. Scand.,* 7: 240-. 256.

Gall A. and Dogger J.R., 1967. Effect of 2,4-D on the wheat stem sawfly. *J. Econ. Entomol.* 60(1): 75-7. (Cited in USDA 1997).

Garabrant D.H. and Philbert M.A., 2002. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol.* 32(4):233-57.

Giglio A., Silvia B., Fabia F. , Tullia T., Brandmayr Z. and Giulianini P.G., 2008. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. *Micron* 39 (2008) 552–558.

Gillespie J. P., Burnett C., Charnley A. K., 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae var acridum*. *Journal of Insect Physiology* 46 (2000) 429–437.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gupta, A. P., 1985.“Cellular Elements in the Hemolymph”, In Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology, .G. A. Kerkut and L. I. Gilbert Eds. Pergamon Pres, New York, 3 : 401-451.

Hoy J.B., 1985. Toxicity of 2,4-D to millepedes (Polydesmidae: Diplopoda): Food contamination and residue distribution as factors. *J. Econ. Entomol.* 78(2): 302-304. (Cited in USDA 1997).

Journal of Pesticide Reform / Spring 1999 . Vol.19, No. 1 .

Kaioumova D; Kaioumov F; Opelz G; Susal C., 2001a. Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. *Chemosphere.* 43(4-7):801-5.

Kaioumova D., Susal C. and Opelz G., 2001 b. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Hum Immunol.* 62(1):64-74.

Kao L.M., Wilkinson C.F. and Brattsten L.B., 1995. In-vivo Effects of 2,4-d and Atrazine on Cytochrome P-450 and Insecticide Toxicity in Southern Armyworm (*Spodoptera eridania*) Larvae. *Pest. Sci.* 45: 331-334.

Kaplan M. 2009. Organik Gıdalar Neden Tercih Edilmeli?. *Bilim Teknik Dergisi* Sayı 501: 30-33.

Kaya B. ve Yanıkoğlu A., 1999. 2,4-D ve 4-CPA'nın *Drosophila melanogaster* in F1, F2 ve F3 kuşaklarında gelişim süresi ve ergin birey sayılarına etkisi. *Tr. J. of Zoology.* 23 (1999) Ek Sayı 1, 297-301.

Lavine M.D. and Strand M.R., (2002) Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1237-1242.

Martinez I.M., Lumaret J.P. and Cruz M.R., 2001. Suspected side effects of a herbicide on dung beetle populations (Coleoptera: scarabaeidae). *C R Acad Sci III.* 324(11):989-94.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Munro I.C., Carlo G.L., Orr J.C., Sund K.G., Wilson R.M., Kennepohl E., Lynch B.S., Jablinske M. and Lee N.L., 1992. A comprehensive, integrated review and evaluation of the scientific evidence relating to the safety of the herbicide 2,4-D. *J. Amer. Coll. Toxicol.* 5:559-664.

Özkan A. ve Yanikaolu A., 1999. Effects of 2,4-D and maleic hydrazide on the glycogen level in the embryonic development of *Pimpla turionellae* (L.) (Hym., ichneumonidae). *J Appl Entomol.* 123:211-6.

Özdaş E., Ateş U., Uyanıkgil Y., Baka M., Yavaşoğlu A., Biçer S., Ergen G., 2006. Bir Herbisit Olan 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)' in Sıçanlarda Testis Dokusu Üzerine Etkisi. *Ege Tıp Dergisi* 45(3) : 169 – 174.

Palmer S. and Krueger H., 1997. 2,4-D Dimethylamine Salt: An Acute Contact Toxicity Study with the Honey Bee: Lab Project Number: 467-102: 467/052297/BLDNC.EFA/SUB467. Unpublished study prepared by WildlifeInternational Ltd. 32 p. {OPPTS 850.3020}. MRID 44517304.

Pech L.L. and Strand M.R., 2000. “Plasmotocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells”, *J. Insect Physiol.*, 46, 1565-1473.

Sak O., 2004. Cypermethrinin *Pimpla turionellae* L. (Hym.;Ichneumonidae), Toplam Protein, Lipit ve Karbohidrat Miktarı ile Hemositlerine Etkisi (Doktora Tezi).

Silva, J. E. B., Boleli, I. C. and Simoes, Z. L. P., 2001. Hemocyte Types And Total And Differential Counts In Unparasitized And Parasitized *Anastrepha obliqua* (DIPTERA, TEPHRITIDAE) Larvae. *Braz. J. Biol.*, 62(4A): 689-699.

Strand M.R., 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science.* 15, 1-14

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sung H. , Kao W. And Su Y., 2003. Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic Toxicology* 64 (2003) 25-37.

Suwalsky M., Benites M., Villena F., Aguilar F. and Sotomayor P., 1996. Interaction of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with cell and model membranes. *Biochim Biophys. Acta* 125: 111–119.

Suwalsky M., Quevedo L., Norris B. and Benites M., 1999. Toxic action of the herbicide 2,4-D on the neuroepithelial synapse and on the nonstimulated skin of the frog *Caudiverbera caudiverbera*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 62(5): 570-577. (U.S EPA/OPP 2005a).

Uçkan F. ve Sak O., 2010. Cytotoxic Effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) Larval Hemocytes. *Ekoloji* 19, 75, 20-26.

U.S EPA/OPP (U.S. Environmental Protection Agency/ Office of Pesticide Programs), 2005. Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. EPA 738-R-005-002.

USDA (U.S. Department of Agriculture), 2006. 2,4-D Human Health and Ecological Risk Assessment FINAL REPORT.

Ward T. and Boeri R., 1991. Chronic Toxicity of 2,4-D to the Daphnid *Daphnia magna*: Lab Project Number: 9040-D. Unpublished study prepared by Resource Analysts, *Inc./EnviroSystems Div.* 38 p. MRID 418535211.

Yalçinkaya M., 2006. Bir Herbisit Olan 2,4-D(Diklorofenoksiasetik asit)' in *Poecilia reticulata* P., 1859'da Medulla Spinalis Üzerine Etkileri (Yüksek Lisans Tezi).

ÖZGEÇMİŞ

Hüseyin Deniz ÖNER, 1984 yılında Van'da doğmuştur. İlk ve orta öğrenimini Çorlu'da tamamlamıştır. 2003 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne kayıtlanmıştır. 2007 yılında lisans eğitimini tamamlayıp, aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.