



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİO-YL-2002-0003

**AZADİRACHTİN'İN *Allium cepa* L. KÖK UCU
MERİSTEM HÜCRELERİNDE MİTOTİK BÖLÜNME
ÜZERİNE ETKİLERİ**

HAZIRLAYAN: Ali ÖZMEN

DANIŞMAN: Prof.Dr. Şenay SÜMER

AYDIN 2002

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİO-YL-2002-0003

AZADİRACHTİN'İN *Allium cepa* L. KÖK UCU
MERİSTEM HÜCRELERİNDE MİTOTİK BÖLÜNME
ÜZERİNE ETKİLERİ

HAZIRLAYAN: Ali ÖZMEN

DANIŞMAN: Prof.Dr. Şenay SÜMER

AYDIN 2002

ÖZ

Ülkemizde park ve bahçelerde yetiştirilen, *Meliaceae* familyasına ait olan *Melia azedarach*' tan elde edilen ve bir biopestisit olarak kullanılan Azadirachtin'in genotoksik etkileri bir bitkisel test sistemi ile araştırılmıştır. 25 gr tohum/lt, 50 gr tohum/lt ve 75 gr tohum/lt olmak üzere 3 ayrı konsantrasyondaki ekstraktların etkileri *Allium* test ile belirlenmiştir. Tarımsal uygulamada tavsiye edilen 50 gr tohum/lt'lik dozda en düşük etkiyi göstermiştir. Azadirachtin'in zararlı etkilerinin düşük olacağı ve geleneksel kimyasal pestisit kullanımını azaltacağı düşünülmektedir.

ABSTRACT

Azadirachtin, which is used as a biopesticide obtained from *Melia azedarach*. *Melia azedarach* belongs to the *Meliaceae* family and grown in the parks and gardens of our country. Genotoxic effects of Azadirachtin have been investigated with a plant test system. The effects of the extracts at 25 gr kernel/lt, 50 gr kernel/lt and 75 gr kernel/lt have been investigated with *Allium* test, which is a plant test system. At the 50 gr kernel per lt. concentration, which is recommended in the agricultural application, Azadirachtin showed the lowest effect. It was thought that the harmful effects of Azadirachtin would be low and Azadirachtin would decrease the use of traditional chemical pesticides.

ANAHTAR SÖZCÜKLER / KEY WORDS:

Sitogenetik, *Allium* test, Genotoksisite, Biopestisit, Azadirachtin /
Cytogenetics, *Allium* test, Genotoxicity, Biopesticide, Azadirachtin

İÇİNDEKİLER

ÖZ, ABSTRACT.....	1
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	11
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	111
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	1V
1. GİRİŞ.....	1
2. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL ve METOT.....	13
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	18
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	34
ÖZET.....	35
SUMMARY.....	36
TEŞEKKÜR.....	37
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	42

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1. Kontrol ve uygulama gruplarındaki Allium-test sonuçları.....	18
Çizelge 2. Kök sayılarının istatistik sonuçları.....	19
Çizelge 3. Kök uzunluklarının istatistik sonuçları.....	19
Çizelge 4. Azadirachtin uygulanmış köklerde mitotik indeks değerleri ve standart sapmaları.....	20
Çizelge 5. Mitotik indeks istatistik sonuçları.....	21
Çizelge 6. Kromozom hasarları ve standart sapmalar.....	22
Çizelge 7. Kromozom hasarı sayıları istatistik sonuçları.....	24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Azadirachtin'in yapısı.....	4
Şekil 2.a, b, c ve d <i>M.azedarach</i> çiçek, yaprak yapısı, yeşil meyve ve genel görünüş.....	13
Şekil 3. Aydın'da yetişen bir <i>Melia azedarach</i> ağacı.....	14
Şekil 4. <i>Allium cepa</i> kromozomları ($2n=16$).....	15
Şekil 5. Metafaz kromozomları.....	16
Şekil 6. Mitotik indeks değerleri.....	20
Şekil 7. Kromozom hasar durumu.....	23
Şekil 8. Kromozom hasarları.....	23
Şekil 9. Fragment dağılımı.....	24
Şekil 10.a ve b; Gözlenen fragment oluşumları.....	25
Şekil 11. Köprü dağılımı.....	26
Şekil 12. a, b ve c; Gözlenen köprü oluşumları.....	27-28
Şekil 13. Kromozom yapışması dağılımı.....	28
Şekil 14. a ve b; Gözlenen kromozom yapışmaları.....	29
Şekil 15. Yanlış kutuplaşma dağılımı.....	30
Şekil 16 a ve b; Gözlenen yanlış kutuplaşma olayları.....	30-31
Şekil 17 a ve b; Gözlenen mikronukleus oluşumları.....	32

KISALTMALAR VE SİMGELER

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
%	Yüzde
EPA	Çevre koruma ajansı (Environment Protection Agency)
ppm	parts per million
µg	mikrogram
cm	santimetre
µM	mikromolar
dk	dakika
ml	mililitre
HPLC	High Performance Liquid Chromotagraphy
LC ₅₀	Letal konsantrasyon
IC ₅₀	İnhibe edici konsantrasyon
EC ₅₀	Büyümei engelleyici konsantrasyon
M	Molar
mg	miligram
kg	kilogram
m	metre
l	litre
°C	Santigrad
N	Normal
HCl	Hidroklorik asit
Ort.	Ortalama
SD.	Standart Deviation (Standart Sapma)
mm	milimetre
gr	gram
toh.	Tohum
M.B.	Mikroskop Büyütmesi

1. GİRİŞ

İnsanlar eski çağlardan bu yana tarım ile iç içe olmuşlardır. Bu nedenle tarım zararlıları ile ilgilenmişlerdir. Bitkilerdeki hastalıklar ve zararlılarla ilgili gözlemler yapmış ve bunlara karşı değişik savaş yöntemleri geliştirmişlerdir. Bitkilere zarar veren hastalık etmenleri, zararlılar ve yabancı otlar kültür bitkilerinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Ülkemizde kültür bitkileri ve ürünlerinde zarar meydana getiren hayvansal organizma türleri yaklaşık 500 kadardır ve bunların ancak yarısı ekonomik önem taşımaktadır (Öncüer, 2000).

Geçtiğimiz yüzyılda bilimsel gelişmelere dayalı olarak zararlılarla savaşta değişik mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Bunların içerisinde kimyasal tarım ilaçları en çok kullanılan ve en iyi bilinen mücadele yöntemidir.

Ancak bunların çevrede ve diğer canlılar üzerinde yarattığı sorunlar büyük boyutlarda olup günümüzün önemli konularındandır (Öncüer, 2000).

Zirai mücadelede tarım ilaçlarının kullanımı çok değişik ve karmaşık sorunlar yaratmakla birlikte özellikle; kalıcı etkileri, çevre kirliliği ve doğal denge bakımından tehlikeler taşımaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde her yıl 10 bin kişi tarım ilacından zehirlenerek ölmekte, ayrıca 400 bin kişi de bu nedenle ciddi olarak hastalanmaktadır (Bora ve Özaktan, 1998).

İnsan sağlığına etkilerinin yanı sıra kullanılan ilacın bir kısmı toprağa karışmakta ve buradan yeraltı sularına, göllere ve nehirlere bulaşmaktadır. Bunun sonucu olarak da çevre kirliliği oluşmaktadır.

Meyve ve sebzelerdeki pestisit kalıntıları, kanser gibi olumsuz etkilerinden dolayı toplumsal kaygıları devam ettirmektedir. Pestisitler muhtemel kimyasal mutajenler olarak düşünülmektedir. Deneysel veriler çeşitli tarım kimyasallarını oluşturan bileşenlerin; gen mutasyonu, kromozomal değişme ve DNA hasarına yol açan mutajenik aktivitelere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Bolognesi ve Morasso, 2000).

Genetik etki, kullanılan kimyasal bileşenlerinin sayısına ve çeşidine bağlıdır. Ancak yüksek derecede maruz kalma, yoğun kullanım ve yağ dokusunda birikme sonucu genetik hasar oluşabilmektedir.

Pestisitler, ağız, deri ve solunum gibi yollarla vücuda girebilmekte ve doğrudan yada dolaylı olarak etkiler oluşturabilmektedirler. Etkileri akut olabileceği gibi teratojenik, mutajenik, allerjik ve kanserojen de olabilmektedir.

Son yıllarda yaygın olarak kullanılan 100 pestisit bileşenini kapsayan test kimyasallarının % 59'unun gen mutasyonu, %83'ünün kromozomal hasar ve % 71'inin DNA hasarında etkili olduğu görülmüştür. Ancak %10'unun tüm testlerde negatif sonuçlar verdiği görülmüştür (Bolognesi ve Morasso, 2000).

Pestisitler toksik etkileri nedeniyle kullanılırlar. Seçici olarak bazı organizmalara karşı etkilidirler. Bununla beraber kesin seçiciliğin elde edilmesi zordur ve bir çok pestisit insanlara karşı zararlı olma riskini de beraberinde taşımaktadır.

Sentetik pestisitlerin zararlı etkilerinin anlaşılması ile dünya çapında; sentetik olmayan, zararsız pestisitlere doğru bir yönelme olmuştur. Bitkilerden elde edilen çeşitli maddeler, toksik olan sentetik kimyasalların yerine geçebilecek en iyi maddelerdir. Son on yılda çalışmalar, çeşitli bitki ürünleri ve mikrobiyolojik ürünler üzerinde odaklanmıştır. Bunlardan bir çoğu tarlada denenmiştir ve bazıları günümüzde kullanılmaktadır.

Bütün canlı organizmalar diğer başka organizmalarla avcılık, parazitlik ve rekabet ilişkileri içerisinde bulunmaktadır. Bu etkileşimlerin çalışılması canlı organizmaların; zararlı böcekler, mantarlar, yabancı otlar, nematodlar, yumuşakçalar gibi zararlılara ve bakteriyel veya viral hastalıklara karşı tarımsal ürünleri korumada, biopestisit olarak kullanılabilme fırsatını ortaya koymuştur. Zararlı böcekleri kontrol etmek için kullanılan biopestisit ürünleri ticari olarak piyasada bulunmaktadır (Rodgers, 1993).

İnsan sağlığı, çevre ve doğal dengeyi korumaya ilginin artması doğal pestisitlerin kullanımını arttırmaktadır. Zirai mücadelede; çevreye en az zarar veren ve kalıcı etkileri düşük veya hiç olmayan bu maddelerin kullanımı

yaygınlaşmaktadır. Bu maddelere doğal pestisitler de denilmektedir. Bunlar hayvanlardan, bitkilerden ve bakterilerden elde edilen doğal ürünlerdir.

1998 yılı sonunda yaklaşık 700 ürün ve 175 biopestisit etkili olan aktif bileşik kayıtlarda yer almaktadır. Biopestisitler; US-EPA' nın yapmış olduğu sınıflandırmada; mikrobiyal pestisitler, bitki pestisitleri ve biyokimyasal pestisitler olmak üzere 3 büyük sınıfa ayrılırlar.

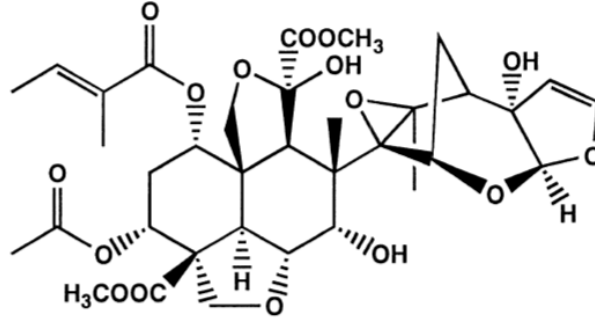
Biopestisitler genelde geleneksel pestisitlerden daha az zararlıdır. Sadece hedef zararlıyı ve bununla bağlantılı organizmaları etkilemektedirler. Düşük miktarlarda etkilidirler ve çabuk parçalanırlar.

Günümüzde 2000 kadar bitki tür ve çeşidinin böcek öldürücü etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Böcek öldürücü etkiye sahip bitkilerin, ekstraktları veya kurutulup öğütülerek elde edilmiş tozları kullanılır (Öncüer, 2000).

Biopestisitler içerisinde Azadirachtin, sahip olduğu biyolojik aktiviteler nedeniyle dikkatleri üzerine toplamıştır. Azadirachtin'in mükemmel bir böcek kontrol aktivitesi ve çeşitli tıbbi özellikleri vardır. Son on yılda yapılan yoğun çalışmalar ile Azadirachtin'in biyolojik indirgenme, düşük toksisite ve bol bulunması özellikleri ile toksik pestisitlere karşı en iyi alternatif olacağı belirlenmiştir. Azadirachtin 200'den fazla böcek türüne karşı çeşitli böcek kontrol aktiviteleri göstermektedir. Bunun üstüne yapılan araştırmalar, insan sağlığı ve ekosistem üzerinde büyük tehlike gösteren toksik sentetik kimyasalların kullanımının kısıtlanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Azadirachtin, *Rutales* ordosuna ait bitkilerde üretilen, 4,4,8-trimetil-17 furanilsteroid iskelet yapısından türedikleri için; modifiye olmuş triterpenler de denilen sekonder metabolitlerin limonoid grubu içerisinde yer almaktadır. Son çalışmalar bu bileşiklerin antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkilerinin yanı sıra, böcek beslenme engelleyici ve böcek büyüme düzenleyici etkilerinin de olduğunu ortaya koymuştur. Limonoidlerin otçul böceklere karşı gösterdikleri aktivitenin nedeni halkasal yapı ve kimyasal oksidasyon durumlarıdır.

Azadirachtin



Şekil 1. Azadirachtin'in yapısı (Schaaf ve ark.2000).

Bir oksijenin iki karbon atomuna aralarında çift bağ oluşturacak şekilde bağlanması, çoğu zaman insanda enzimlerle biyoaktif edilen, toksik bir metabolit meydana getirmektedir. Bu şekildeki oksijen ilaveleri çoğu zaman olumsuz etkiler yaratmakta ve genelde DNA veya bağlanıcı enzimlerde görülen problemlere neden olmaktadır (Bagge ¹).

Azadirachtin'in 200'ün üzerinde böcek türüne karşı etkili olduğu bilinmektedir. Diğer pestisitler gibi böcekleri hemen öldürmez. Üreme döngüsü, beslenme alışkanlıkları ve vücut gelişimi üzerindeki etkilerinin yanı sıra doğrudan toksin olarak da etki göstermektedir. Yapısal olarak, böceklerin larva döneminden pupa evresine geçtikleri metamorfoz olayının kontrolünü düzenleyen "ecdysone" hormonlarına benzemektedir. Azadirachtin'in toksikolojik etkileri, kronik toksisitesi, üremeye etkisi, mutajenik etkileri, karsinojenik etkisi, organ toksisitesi, insanlara etkisi, ekolojik etkileri, diğer organizmalara etkileri ve parçalanması araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Azadirachtin'in toksisitesinin çok düşük ve memeliler için toksik olmadığı yönündedir. Ayrıca güneş ışığında çabuk parçalanmaktadır (Exttoxnet ²).

¹ http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_1998/bagge.htm

² <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/azadirac.htm>

Bir biopestisit olan Azadirachtin'in kimyası, çevresel davranışı ve biyolojik etkileri üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Böceklerle karşı etkisi olduğu bilinmektedir. Azadirachtin, zararlılar üzerinde %90 etkili görünmektedir. Azadirachtin hedef olmayan ve faydalı organizmalara karşı düşük toksisiteli, çabuk parçalanan, mutajen olmayan, seçici görünen ve ekosistemde minimum zarara yol açan bir biopestisit olarak bilinmektedir (Raizada ve ark., 2001).

Her ne kadar önerilen dozlardaki kullanımlarda Azadirachtin'in memelilere karşı güvenilir olduğu gösterilmişse de gelecekte oluşturabileceği tehlikeler olasılığı araştırılmalıdır. Doğada kalıcılığı, organizmalardaki fizyolojisi ve toksikolojisi ile ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Bu nedenle bu konuda yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Ergin farelerde yapılmış olan bir çalışmada; ağız yoluyla Azadirachtin ekstraktı ile beslenen farelerin kemik iliği hücrelerinin yapısal olaylarını ve mitozunu bozduğu, metafaz kromozomu bozukluklarını belirgin bir şekilde arttırdığı görülmüştür (Awasthy ve ark., 1999).

Azadirachtin uygulanarak; insan glioblastoma hücre hatlarında yapılmış olan bir çalışmada sitotoksik etkilere rastlanmıştır. Bunlar çift çekirdeklik, hücre çoğalması, mikronukleus oluşumu ve hücre yaşamı ölçütleriyle belirlenmiştir (Akudugu ve ark., 2001).

Çeşitli kimyasalların, su örneklerinin ve ekstraktların genotoksik etkileri hayvansal, bakteriyel ve bitkisel test sistemleri ile saptanabilmektedir. Bunlardan elde edilen sonuçlar materyalin genotoksitesine ilişkin bilgiler vermektedir.

Bir bitkisel test sistemi olan Allium-test ile, soğan bitkisinin köklerinin büyümesini engelleyen uygulamaların toksisiteleri ölçülebilmektedir. Allium-testinin sonuçları prokaryot veya diğer ökaryotlardan oluşan test dizileri ile uygunluk göstermektedir (Fiskesjö, 1993).

N-metil-N-nitrosoüre, maleik hidrazid, sodyum azid ve etil-metansülfonat'ın genotoksiteleri Allium test ile gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm maddeler istatistiki olarak belirgin seviyelerde kromozom hasarlarına neden olmuştur (Rank ve Nielsen, 1997).

Danimarka'da çeşitli bölgelerden alınan atık su çamuru örnekleri *Allium cepa* genotoksisite testiyle analiz edilmiştir (Rank ve Nielsen, 1998).

Başka bir çalışmada endüstriyel atık ve kömür madenlerinden alınan kontamine toprakların genotoksik etkileri, *Allium* test ve *Vicia*-mikronukleus testi kullanılarak belirlenmiştir (Cotelle, 1999).

Pestisitler ile kontamine olmuş topraklar ve sığ kaynak sularının genotoksik etkilerinin belirlenmesinde; *Allium*-test, *Tradescantia*-mikronukleus testi (Trad-MCN) ve *Tradescantia* stamen tüyü mutasyonu testi (Trad-SHM) olmak üzere üç büyük bitkisel test sistemi kullanılmıştır (Kong ve Ma, 1999).

Bunun dışında organik fosforlu insektisitler olan cypermethrin ve fenvalerate'in sitogenetik etkileri *Allium cepa*'nın kök meristemi hücrelerinde araştırılmıştır (Chauhan, 1999).

Hindistan'da atık su ve endüstriyel atıkların bulaştığı kirli suların genotoksisiteleri *Allium* test kullanılarak belirlenmiştir (Grover ve Kaur., 1999).

Azadirachtin'in bulunması ve uygulama alanlarının genişlemesi ile birlikte araştırmacılar bu madde üzerinde çeşitli çalışmalar yapmıştır. Öncelikle insektisit etkisi araştırılmış ve Azadirachtin'in etkili olduğu, zararlı böcek türleri tespit edilmiştir. Daha sonraki aşamalarda bu maddenin zararlılara etki mekanizması ve canlılardaki fizyolojisi üzerinde çalışılmıştır. Azadirachtin ve bağlantılı bileşiklerin izolasyonları ile birlikte kimyasal yapıları da belirlenmiştir. Elde edilen maddelerin toksik etkileri, deney hayvanları ve hücre kültürlerinde test edilmiştir. Bunlarla ilgili bazı çalışmalar örnek olarak verilmiştir.

2. KONU İLE İLGİLİ ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Son 40 yıl boyunca tarımda, ormancılıkta, evlerde ve insan hastalıklarının taşıyıcı vektörlerinde, zararlılarla entegre mücadelenin gereklerini yerine getirmeyen bir çok sentetik pestisit kullanılmıştır. Buna bağlı olarak zararlıların pestisitlere karşı dirençlilik kazanmaları gibi problemler son yıllarda bitkisel insektisitlere ilgiyi hızla arttırmıştır. Son 20 yıl içerisinde çalışılan bir çok bitkinin arasında, neem ağacı *Azadirachta indica*'nın ekstraktı ve içeriği dünya çapındaki entomolog ve bitki kimyacılarının özel ilgisini çekmiştir. Son yıllarda ticareti yapılan neem kökenli ürünler geliştirilmiştir. Bu yüzden böceklere karşı etkili olan neem ürünlerinin özellikleri ve zararlıları kontroldeki potansiyelleri hakkında günümüzdeki bilgiler derlenmiştir (Schmutterer, 1990).

Melia azedarach var. *japonica*'nın gövde kabuklarında yapılan kimyasal araştırmalar ile yeni bir limonoid ortaya çıkartılmıştır. Bilinen limonoidler 12-hydroxyamoorastatin ve 12-acetoxyamoorastatin'in yanında yeni bir limonoid olan 12-hydroxyamoorastatone ortaya çıkartılmıştır. Yeni bileşiğin yapısı spektral veriler ile ortaya konmuştur ve stereokimyası di-p-brombenzoate üzerindeki NOE deneyi ile belirlenmiştir. Bileşiklerin her 3'ü de, insan tümör hücrelerinin 5 hattı üzerinde belirgin bir sitotoksikite göstermiştir (Ahn ve ark., 1994).

Melia azedarach'ın kök kabuğundan, böcek beslenme engelleyici etkiye sahip Azedarachin C adında yeni bir limonoid izole edilmiştir. Yapısı spektroskopik metotlarla açıklanmıştır. Böcek beslenme engelleyici aktivitesi zararlı bir böcek olan *Spodoptera exigua* üzerinde yaprak diski metoduyla denenmiştir. Azedarachin C 400 ppm'de (yaklaşık 8 $\mu\text{g cm}^{-2}$ konsantrasyonuna denk düşmektedir) larvaların beslenmesini engellemektedir (Huang ve ark.,1995).

Neem tohumlarının preparasyonları aktif böcek beslenme engelleyici veya büyüme düzenleyici olarak sadece Azadirachtin içermez. Aynı zamanda çeşitli diğer limonoidlerden de içerir. Bunlar N1E-1158 nöroblastoma (fare), 143B.TK. Osteosarkoma (insan) ve Sf 9 (böcek) hücre kültür hatları için sitotoksiktir. Bunların içinde en etkili limonoid IC_{50} aralığı 4-10 μM ve üç hücre hattı için ortalama 6 μM olan nimboliddir. Diğer düşük etkili limonoidlerin ortalama IC_{50} değerleri,

epoxyazadiradione'ın 2µM, salannin'in 112µM ve nimbin, deacetylnimbin ve Azadirachtin'in > 200µM'dir. 10µM nimbolid nöroblastoma hücrelerinde etkisini hızla göstermektedir. Sitoplazmik zarların yıkımıyla ilişkili olarak sinyalizasyonu arttırır ve hemen hemen hücrelerin %50'sinin canlılığının yitirilmesini 30 dk içinde sağlar. 5µM nimbolid'de hücreler uzar ve sinir şeklini alarak sivri uçları ve yan yüzeyleri birleşir. 1-2 saat içerisinde geri dönüşümü olmayan ve hücre ölümüne yol açan büyük sitolojik değişiklikler ve vakuoller oluşur. Buna karşın büyük morfolojik değişimler göstermeden hücre canlılığının %50'sini kaybetmek için epoxyazadiradione'ın daha yüksek konsantrasyonları olması gerekmektedir. Bu da nimbolid ve epoxyazadiradione'ın etki mekanizmalarının farklılığını göstermektedir (Cohen ve ark.,1996).

Biyogenetiği ilgilendiren ring-C seco limonoid sallanal ve güçlü bir böcek beslenme engelleyici olan meliacarpinin E, *Melia azedarach*'ın kök kabuklarından izole edilmiştir. Bunların yanında bilinen 4 adet seco-limonoid, salannin, deacetylsalannin, nimbolinin B ve nimbolidin B izole edilmiştir. Yeni limonoidlerin yapıları spektroskopik çalışmalarla aydınlatılmıştır ve beslenme engelleyici aktiviteleri *Spodoptera eridania*'nın larvaları ile denenmiştir. Meliacarpinin E 50 ppm'de en güçlü aktiviteyi göstermiştir. Bu konsantrasyon meliacarpinin A ve D'nin 1µg cm⁻² 'lik konsantrasyonuyla uygunluk göstermektedir (Huang ve ark.,1996).

Sri Lanka'da; neem tohumlarının toplanmasındaki en iyi zamanı belirlemek için yağ içeriğiyle birlikte 5 büyük triterpenoid miktarı, meyvelenme sezonu boyunca 6 işaretli ağaç üzerinde belirlenmiştir. Triterpenoid içeriği ve ilgili bileşiklerin miktarları meyvelerin yeşilden, olgun tohuma dönmelerinde çok az değişmektedir. Halbuki yağ oranı zamanla bariz bir şekilde artmaktadır. En yüksek Azadirachtin oranına yeni olgunlaşmış tohumlarda rastlanmıştır. Toplandıktan 6 ay sonra depoda salannin ve Azadirachtin'in bir kısmı kaybedilmiştir (Johnson ve ark., 1996).

Melia azedarach'ın kök kabuğu ekstraktından bilinen limonoid 1-cinnamoyl-3-acetyl-11-methoxymeliacarpinin'in yanı sıra 4 adet yeni limonoid, 1-tigloyl-3,20-diacetyl-11-methoxymeliacarpinin,3-tigloyl-1,20-diacetyl-11-methoxymeliacarpinin, 1-cinnamoyl-3hydroxy-11-methoxymeliacarpinin ve 1-deoxy-3-methacrylyl-11-methoxymeliacarpinin izole edilmiştir. Yapıları spektroskopi ile aydınlatılmıştır.

Sitotoksiteleri P 388 hücrelerinin in vitro testleri ile belirlenmiştir (Takeya ve ark., 1996).

12-deacetyltrichilin I, 1-acetyltrichilin H, 3-deacetyltrichilin H, 1-acetyl-3-deacetyltrichilin H ve 1-acetyl-2-deacetyltrichilin H, olmak üzere 5 adet yeni trichilin tipi limonoid, bilinen 4 adet trichilin meliatoxin B, trichilin H, trichilin D ve 1,12-deacetyltrichilin ile birlikte *Melia azedarach*'ın kök kabuğunun ekstraktından izole edilmiştir. Yapıları spektroskopik metotlarla ortaya konmuştur ve sitotoksiteleri P 388 hücrelerine karşı in vitro olarak MTT yöntemine göre test edilmiştir. Bu trichilinlerin hepsi bariz bir şekilde sitotoksik aktivite göstermiştir. Bunların sitotoksitelerinin içerdikleri asetil gruplarına bağlı olduğu görülmüştür (Takeya ve ark.,1996).

Azadirachtin, neem ağacından elde edilen doğal bir biopestisitir. Memeliler için güvenilirliği henüz kanıtlanmamıştır. Bu çalışmada Azadirachtin'in *Spodoptera frugiperda* hücrelerinin (SF-9) ve fare eritrolökemia hücrelerinin (MEL-GM 86) morfolojileri ve çoğalmaları üzerindeki etkileri incelenmiştir. 24 ile 144 saat aralığında sürdürülen hücre kinetiği çalışmaları, Azadirachtin muamelelerinin (0.05, 0.20 ve 0.50 µg/ml) SF-9 hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Bu inhibitör etki, doza bağlılık göstermiştir. Buna karşın 30µg/ml'lik Azadirachtin, MEL-GM 86 hücrelerinin çoğalmasında azalmaya neden olmamıştır. SF-9 hücreleri, 48 saatlik Azadirachtin muamelesinden sonra hücre şişmesi ve hücre anormalliklerinde bir artış göstermektedirler. Fakat MEL-MG 86 hücrelerinde böyle değişiklikler bulunamamıştır. Bir scanning-elektron mikroskop çalışması 0.10 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonlardaki Azadirachtin ile yapılmış uygulamaların, SF-9 hücrelerinde 48 saatlik uygulama sonrasında hücre şişmesini arttırdığı ve kabarcık ve çöküntüler ile belirlenebilen hücre yüzeyi bozukluklarına neden olduğu ortaya konmuştur. Bununla beraber bu etkiler Azadirachtin ile muamele edilmiş MEL-GM 86 hücrelerinde görülmemiştir (Reed ve Majumdar,1998).

Melia toosendan Sieb. Et. Zucc. 'in meyvelerinden üç adet bilinen limonoid meliatoxin B₁, trichilin H ve toosendanin'in yanında toosendanal ve 12-O-methylvolkensin olmak üzere iki adet yeni limonoid izole edilmiştir. Yeni

limonoidlerin yapıları spektroskopik yöntemlerle saptanmıştır. Toosendanin C-1/C-29 ve C-19/C-29 arasında asetal köprülere sahiptir. Hem meliatoxin B₁ Hem de toosendanin, insan KB hücrelerine (tümör hücresi) karşı sitotoksik aktivite göstermiştir (Tada ve ark., 1999).

Neem tohumu çekirdeklerinin ekstraktlarındaki toplam Azadirachtin bağlantılı limonoidlerin belirlenmesi için kolorimetrik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde standart Azadirachtin veya neem tohum çekirdeği ekstraktlarının, diklorometan içerisinde renklenmesi için, vanilin konsantrasyonu, asit ve renk oluşumu için gerekli zaman gibi duyarlılığı etkileyen çeşitli faktörlerin optimum şartları, yöntemi oluşturmak için seçilmiştir. Ekstraktların HPLC analizlerinde, ekstraksiyon metanol ile yapıldığında ve diklorometan ile ayrıştırıldığında, vanilin yöntemi ile belirlenen değerlerin yaklaşık %50'sinin Azadirachtin içeriğini gösterdiği görülmüştür (Dai ve ark.,1999).

Saf Azadirachtin ve neem kökenli insektisitlerin (Neemix ve Bioneem) 48 ve 96 saatlik kısa süreli akut toksisite testleri, sekiz adet sucul hayvan (kerevit, iki çeşit karides, su piresi, istiridye, salyangoz ve sivrisinek) ve iki hücre (hibridoma, istiridye) çeşidinde yapılmıştır. Her tür için LC₅₀ (in vivo) ve IC₅₀ (in vitro) değerleri tespit edilmiştir. Azadirachtin neemix ve bioneem'den daha düşük toksisite göstermiştir. İnsektisitlerin toksik ve gelişme engelleyici aktiviteleri doz ve zamana bağımlılık göstermiştir. Neem kökenli insektisitlerin arttırılmış kullanımı tarımsal alanlardan kaçığın artması şeklinde sonuçlanır. Bu çalışma Azadirachtin'in sucul organizmalar üzerinde doğrudan yan etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşın bitkilerden elde edilen insektisitlerin ekosistem için bir risk göstermedikleri yönünde genel bir inanış vardır (Göktepe, 1999).

Melia azedarach yaprak ve meyvelerinin ekstraktları kaçırtıcı ve insektisit özellikleri bakımından; *Triatoma infestans*'ın yumurtaları ve nimflerinde test edilmiştir. Yapraklar etkisiz olduğu halde olgun meyveler çok zayıf bir etki göstermiştir. Yumurtadan çıkma, nimf yaşamı veya gelişme zamanı üzerinde etkiler belirlenmiştir ama ekstrakt uygulanmış bölgelerde yetişen ilk larvalar erginleşmeden sonra kontrollere göre bariz bir şekilde küçük olmuşlardır (Valladares ve ark.,1999).

Melia azedarach yapraklarından; esas insektisit etkili ve büyüme durdurucu olarak 1,3-dicinnamoyl—11-hydroxymeliacarpin, 1-cinnamoyl-3-methacrylyl-11-hydroxy-meliacarpin ve 1-cinnamoyl-3acetyl-11-hydroxymeliacarpin adında üç yeni meliacarpin türevi elde edilmiştir. Bunların yapıları MS-spektrometrik ve NMR spektroskopik veriler ve bilinen bileşiklerle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Yeni izole edilmiş olan meliacarpin türevlerinin insektisit özellikleri, bir çok bitki üzerinden beslenen zararlı böcek *Spodoptera littoralis*'in larvaları kullanılarak denenmiştir. Bir kronik besleme yöntemiyle, 1-cinnamoyl-3-acetyl-11-hydroxymeliacarpin suni besine karıştırılıp larvaya verildiğinde 0,27ppm EC₅₀ ve 0,48ppm LC₅₀ değerlerini vermektedir. Bu da insektisit aktivitesi iyi bilinen Azadirachtin ile mukayese edilebilir bir düzeydir. Bundan başka her üç meliacarpin türevinin de larval metamorfoz üzerinde olumsuz etkileri olduğu söylenebilir (Bohnenstengel ve ark.,1999).

Bitkilerden elde edilen pestisitlerin, hücre çoğalması üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla bir çok omurgalı ve omurgasız hücrelerinin kültürleri yapılmıştır. Özellikle neem ağacının saf terpenoidleri ve onların ürünleri üzerinde durulmuştur. Elde edilen bulgular, Azadirachtin'in *Spodoptera* hücrelerine karşı $1,5 \times 10^{-10}$ M ve *Aedes albopictus* hücrelerine karşı $6,3 \times 10^{-9}$ M'lık bir EC₅₀ değeri ile etkili bir böcek hücre eşleşmesi inhibitörü olması ve memeli hücrelerini ancak 10^{-4} M'dan büyük konsantrasyonlarda etkilemesi şeklindedir (Salezadah ve ark.,2000).

Bir diğer çalışmada, organogenez süresince %12'lik Azadirachtin'e maruz kalan sıçanlar, gebelik günlerinde 500, 1000 ve 1500 mg/kg/gün Azadirachtin olmak üzere ağız yoluyla beslenmiştir ve embriyo/fetotoksitesisi ve teratogenik etkileri bakımından belirtiler araştırılmıştır. Farklı dozlardaki Azadirachtin, üreme parametrelerinde belirgin etkilere sebep olmamıştır. İmplantasyon ve implantasyon sonrası düşüklerin toplam sayısı ve fetal ağırlık için belirti olabilecek belirgin bir embriyo/fetotoksik etki, uygulanan doz derecelerinden elde edilmemiştir. Yüksek dozlarda bulunan küçük değişiklikler bileşik veya doz ile ilgili olmadığı için büyük şekil bozukluklarına rastlanmamıştır. Fetal büyüme, morfoloji ve iskelette anormalliklerin olmaması, Azadirachtin'in kullanılan dozlarda sıçanlar için teratogenik olmadığını ortaya koymaktadır (Srivastava ve Raizada, 2001).

Azadirachtin ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, genotoksik etkilerine ilişkin verilerin eksik olduğu grlmektedir. Her ne kadar Azadirachtin, toksisitesi düşük bir biopestisit olarak gösterilse de henüz araştırılması tamamlanmamıştır.

Araştırmada bir biopestisit olarak kullanılan Azadirachtin'in, genotoksik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Genotoksik etki, bir bitkisel test sistemi olan Allium test ile belirlenmeye çalışılmıştır. Uygulanan bu test sonucu elde edilen köklerden hazırlanan preparatlarda Azadirachtin'in hücre ve kromozom düzeyinde genotoksik etki gösterip göstermediği de mikroskopik gözlemlerle incelenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi, Azadirachtin'in genotoksitesine ilişkin bilgiler verecektir.

3. MATERYAL ve METOT

Araştırmamızda kullanılan *Melia azedarach* bitkisi genelde parklarda ve bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. 15 m kadar boylanabilen ve yaprak dökken bir ağaçtır. Çiçekleri güzel kokulu ve morumsu renktedir. Meyve küre şeklinde, sarı renkli, etli ve 5 tohum içermektedir (Seçmen ve ark.,1995).



Şekil 2a



Şekil 2b



Şekil 2c



Şekil 2d

Şekil 2³: a-M.azedarach çiçek, b- yaprak yapısı, c-yeşil meyve, d-ağacın genel görünüşü.
³ <http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/consumer/poison/Meliaaz.htm> den alınmıştır.

Meliaceae familyasına ait *Melia azedarach* ülkemizde tespah ağacı olarak bilinmektedir. Bu ağaçlarda insektisit olarak kullanılan ve etkisi yüksek bir limonoid olan Azadirachtin bulunmaktadır. Azadirachtin, *Melia* ve *Azadirachta* cinslerine ait bitkilerde tüm bitki kısımlarında bulunmaktadır. Kullanılabilir ürün, direkt olarak bitkiden ekstrakte edildiği için buna “zararsız pestisit” de denilmektedir.

Araştırmamızda kullanılan tohumlar, Aydın’da daha önce yerleri belirlenmiş ve mevsimsel gelişimleri izlenmiş olan *Melia azedarach* türünün bireylerinden toplanmıştır. Bu ağaçlardan bir tanesinin fotoğrafı Şekil 3’te görülmektedir.



Şekil 3. Aydın’da yetişen bir *Melia azedarach* ağacı

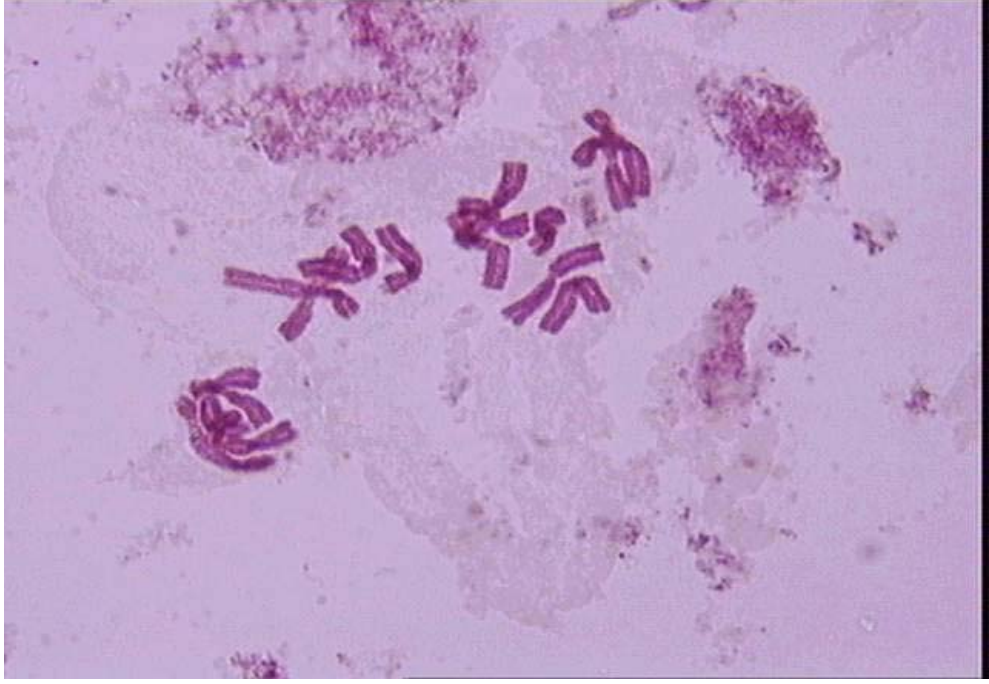
Tarımsal amaçlı olarak zararlılarla mücadelede, tohumların su ekstraktı kullanılmaktadır. Bu ekstrakt kabuğu çıkartılmış tohumlarda 25 gr/l ve kabuğu çıkartılmamış tohumlarda 50 gr/l olmak üzere hazırlanmaktadır. Tarımsal uygulamalarda yaygın olarak 50 gr/l kabuğu çıkartılmamış tohumların ekstraktları kullanılmaktadır⁴.

Araştırmamızda tohumların kabukları çıkartılmadan 25gr/l, 50 gr/l ve 75gr/l olmak üzere 3 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Öncelikle meyvelerin içindeki çekirdekler kırılmış ve bunların içerisinde elde edilen tohumlar bir havanda ezilmiştir. Tartımlar yapılarak her konsantrasyon için gerekli miktar alınmıştır ve bir tülbent bezine sarılarak bir gece su içerisinde bekletilmiştir. Elde edilen ekstraktlar Allium-test ile soğanlara uygulanmıştır. Genotoksisitenin belirlenmesi için bu soğanların köklendirilmesiyle elde edilen kök ucu meristem dokusu hücreleri incelenmiştir. *Allium cepa*'nın normal kromozom sayısı $2n=16$ 'dır.



Şekil 4. *Allium cepa* kromozomları ($2n=16$)(M.B. 15x100)

⁴ <http://www.theneemtree.com/what3.htm>



Şekil 5. *Allium cepa* metafaz kromozomları (M.B. 15x100)

Allium test için uygun olan soğanlar seçilmiştir ve test için gerekli hazırlık aşamaları uygulanmıştır. Uygulama çözeltileri olarak, 25gr/l, 50 gr/l ve 75gr/l olmak üzere 3 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Kontrol grubu için çeşme suyu kullanılmıştır. *Allium* test yöntemine uygun olarak deney tüpleri içerisine hazırlanan konsantrasyonlardaki ekstraktlar ilave edilmiştir ve soğanlar 25 °C oda sıcaklığında bu ekstraktlar içerisinde köklenmeye bırakılmıştır. 72 saatlik uygulama sonunda uzamış olan soğan kökleri bir pens ve jilet yardımıyla kesilerek taze hazırlanmış Asetil Alkol (3 Alkol: 1 Asetik Asit) (Farmer fiksatif) çözeltilisi içerisine alınmıştır. Her bir konsantrasyondan ve kontrol grubundan 10'ar adet olmak üzere toplam 40 adet soğandan ayrı ayrı fiksel yapılmıştır. Sonraki aşamalarda yapılacak sayımlar nedeniyle bir soğandan en az 10 adet kök fikse edilmiştir. 24 saatlik fikse süresinden sonra materyal %70'lik alkole alınarak, +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Boyama için stok olarak hazırlanmış olan %1'lik aseto-orcein kullanılmıştır. Stoktan alınan boyaya kullanımdan önce 9:1 (aseto-orcein : HCl) oranında N HCl eklenmiştir. Bunun amacı, saat camı içerisinde ve alev üzerinde boyama yapılırken, aynı zamanda hidrolizi de sağlamaktır. Aseto-orcein ezme preparat yöntemine uygun

olarak preparatlar hazırlanmıştır. Saat camı içerisinde boyanmış ve hidrolizleri yapılmış olan kökler, üzerinde bir damla stok aceto-orcein olan lam'ın üzerine alınmıştır. Burada, kök ucunun morfolojik yapısında bulunan ve stereo-mikroskop ile ayırt edilebilen kaliptra kısmı bir jilet yardımıyla kesilip atılmıştır. Daha sonra kalan kısmından 2-3 mm kesilip jiletle küçük parçalara ayrılmıştır. Üzerine lamel kapatılarak ezme işlemi yapılmış ve bu şekilde hazırlanan preparatlar mikroskopik gözleme alınmıştır.

Araştırmamızda bilgisayara görüntü aktarma ataçmanına sahip olan Olympus BX-50 tipi bir araştırma mikroskobu kullanılmıştır. Mikroskopik gözlemde her kök için 3 tesadüfi bölgedeki toplam hücre, bölünen hücre ve bölünme safhaları, 15x40 büyütmede sayılmıştır. Bölünen hücrelerdeki fragment, köprü, kromozom yapışması, yanlış kutuplaşma ve mikronukleus oluşumu gibi kromozomal hasarların oranları hesaplanmıştır. Ayrıca her bir kök için mitotik indeks (MI) hesaplanmıştır. Elde edilen veriler her konsantrasyon için dağılımı içeren genel bir tabloya aktarılmıştır. SPSS 9.0 programında (Independet Samples Test) yapılan istatistik analizleri ile sonuçlar değerlendirilmiştir. Kromozom anormallikleri çekilen fotoğraflarla gösterilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Allium test sisteminde, Azadirachtin'in farklı konsantrasyonları uygulanarak, 72 saatlik gelişme periyodu sonunda soğanların her birinde ayrı ayrı olmak üzere kök sayıları ve ortalama kök uzunlukları belirlenmiştir.

Allium test sonuçları:

Çizelge 1.Kontrol ve uygulama gruplarındaki Allium-test sonuçları

Konsantrasyon	Soğan no:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ort.	SD(±)
Kontrol	Kök sayısı	41	30	54	36	28	46	37	32	42	39	38,5	±7,8
	Kök uzunluğu ort.(mm)	25	30	35	3	25	30	35	20	30	35	26,5	±9,7
25 gr tohum/lt	Kök sayısı	38	36	44	28	26	35	22	29	17	20	29,5	±8,6
	Kök uzunluğu ort.(mm)	15	10	15	10	4	15	5	3	3	4	8,4	±5,2
50 gr tohum/lt	Kök sayısı	24	41	43	34	0	27	26	42	37	26	33,3	±12,8
	Kök uzunluğu ort.(mm)	10	5	8	10	0	7	5	5	5	8	7,0	±3,0
75 gr tohum/lt	Kök sayısı	28	30	42	50	39	24	41	38	29	38	35,9	±7,9
	Kök uzunluğu ort.(mm)	5	7	8	5	8	8	7	8	5	5	6,6	±1,4

Kontrol grubunda kök sayısı ortalama 38,5 ($\pm 7,8$) buna karşın 25 gr tohum/lt'de 29,5 ($\pm 8,6$), 50 gr tohum/lt'de 33,3 ($\pm 12,81$) ve 75 gr tohum/lt'de 35,9 ($\pm 7,9$) olarak hesaplanmıştır. İstatistik veriler sonucu, kök sayısı bakımından kendi grubu içerisinde en büyük sapmayı, 50 gr tohum/lt ekstraktında yetiştirilen soğanlar göstermektedir. Yapılan istatistik analizlerinde kontrol-25 gr tohum/lt, kontrol-50 gr tohum/lt, kontrol-75 gr tohum/lt, 25 gr tohum/lt-50 gr tohum/lt, 25 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt ve 50 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt grupları karşılaştırılmıştır. Buradan elde edilen P değeri, sonuçlar arasındaki farklılığın önemini belirtmektedir. Durum Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Kök sayılarının istatistik sonuçları

Karşılaştırma grupları	P
kontrol-25 gr tohum/lt	0,025*
kontrol-50 gr tohum/lt	0,093
kontrol-75 gr tohum/lt	0,470
25 gr tohum/lt-50 gr tohum/lt	0,920
25 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt	0,102
50 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt	0,235

*P< 0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır.

Kök uzunluklarında yapılan ölçümlerden elde edilen veriler de Çizelge 1’de gösterilmiştir. Kontrol grubunda kök uzunluğu ortalama 26,5 ($\pm 9,7$) mm iken 25 gr tohum/lt’de 8,4 ($\pm 5,2$) mm, 50 gr tohum/lt 7,0 ($\pm 3,0$) mm ve 75 gr tohum/lt’de 6,6 ($\pm 1,4$) mm olarak belirlenmiştir.

Gruplar istatistik programında karşılaştırılmıştır;

Çizelge 3. Kök uzunluklarının istatistik sonuçları

Karşılaştırma grupları	P
kontrol-25 gr tohum/lt	0,000*
kontrol-50 gr tohum/lt	0,000*
kontrol-75 gr tohum/lt	0,000*
25 gr tohum/lt-50 gr tohum/lt	0,287
25 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt	0,316
50 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt	0,779

*P< 0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır.

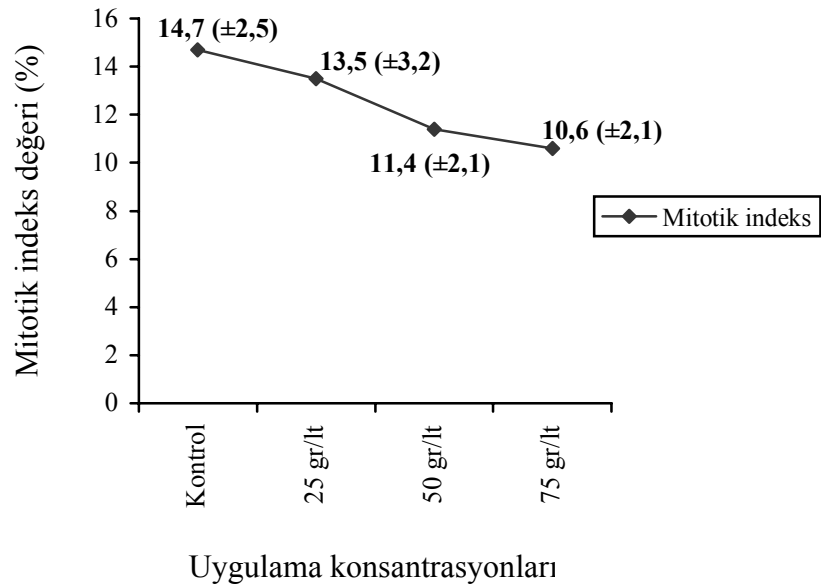
Çizelge 2 ve 3’den izlenebileceği gibi uygulanan ekstraktların kök sayısı üzerine etki etmediği ancak uygulama dozunun kök uzunluğu üzerine etkili olduğu görülmektedir. İstatistiki olarak da durum değerlendirilmiştir. Kök uzunlukları uygulama dozunun artışı ile azalma göstermiştir. Bu durum bölünen hücre sayısını da

etkilemiştir. Nitekim Çizelge 4 ve Şekil 6'da bu durum açıkça görülmektedir. Artan dozlar bölünen hücrelerin sayısını etkilemiştir.

Çizelge 4. Azadirachtin uygulanmış köklerde mitotik indeks değerleri ve standart sapmaları

Konsantrasyon	Soğan Adet	Kök Adet	Sayılan hücre (Toplam)	Bölünen hücre (Toplam)	Mitotik indeks (Toplam)	SD(\pm)
Kontrol	10	50	12660	1866	14,7%	$\pm 2,5$
25 gr tohum / lt	10	50	11912	1604	13,5%	$\pm 3,2$
50 gr tohum / lt	10	50	12531	1425	11,4%	$\pm 2,1$
75 gr tohum / lt	10	50	13553	1434	10,6%	$\pm 2,1$

Her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için eşit sayıda soğan ve kök ucundan sayımlar yapılmıştır. Ortam sıcaklığı ve çimlenme zamanları aynı olmasına rağmen, bölünen hücre sayısının sayılan hücre sayısına oranı yani mitotik indeks uygulanan farklı konsantrasyonlarda değişim göstermiştir. Çeşme suyu ile büyütülmüş olan kontrol grubunda mitotik indeks %14,7 ($\pm 2,5$) iken 25 gr tohum/lt'de %13,5 ($\pm 3,2$), 50 gr tohum/lt'de %11,4 ($\pm 2,1$) ve 75 gr tohum/lt'de %10,6 ($\pm 2,1$) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4).



Şekil 6. Mitotik indeks değerleri

Mitotik indeks değerlerinin istatistik analizleri sonucunda elde edilen değerler izelge 5’te gösterilmiştir.

Çizelge 5. Mitotik indeks değerleri istatistik sonuçları

Karşılaştırma grupları	P
kontrol-25 gr tohum/lt	0,031*
kontrol-50 gr tohum/lt	0,000*
kontrol-75 gr tohum/lt	0,000*
25 gr tohum/lt-50 gr tohum/lt	0,000*
25 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt	0,000*
50 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt	0,040*

*P < 0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır.

Gruplardaki değerlerin karşılaştırılması sonucu elde edilen istatistik verileri (izelge 5), mitotik indeks değerleri arasındaki farkın önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Tohum ekstraktının hücre bölünmesini azaltması yönündeki etkinin,

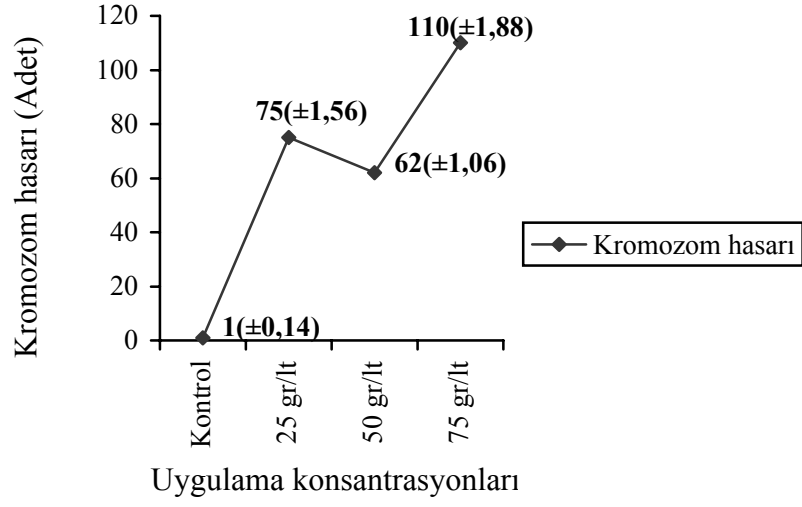
- hücre zarlarının dengeleri bozularak besin alışverişi yapamamaları,
- hücreler arası haberleşmenin bozulması,
- hücrelerin yeterli büyüklüğe ulaşmamaları ve
- hücreler içerisindeki biyolojik aktivite olaylarının ekstrakt içerisinde bulunan bileşikler ile etkilenmesi

gibi nedenlerden dolayı ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

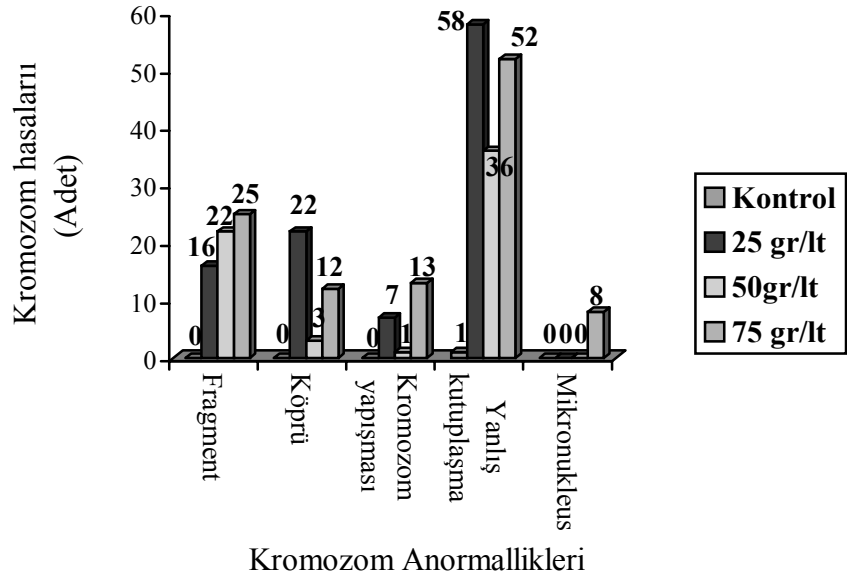
Azadirachtin’in üç ayrı konsantrasyonda uygulanan ekstraktları ve kontrol grubundan elde edilen kromozom hasarı verileri orantılı bir değişim göstermemektedir (izelge 6). Farklı özelliklerdeki kromozom hasarlarının oranı, farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlarda değişiklikler göstermektedir. Durum Şekil 7 ve 8’den izlenebilir.

Çizelge 6. Kromozom hasarları ve standart sapmalar

Konsantrasyon	Kontrol	25 gr toh / lt	50 gr toh / lt	75 gr toh / lt
Bölünen hücre (Toplam)	1866	1604	1425	1434
Fragment (Toplam)		16	22	25
Fragment / bölünen hücre (Toplam)		%1	%1,5	%1,7
Köprü (Toplam)		22	3	12
Köprü / bölünen hücre (Toplam)		%1,4	%0,2	%0,8
Kromozom yapışması (Toplam)		7	1	13
Kromozom yapışması / bölünen hücre (Toplam)		%0,4	%0,07	%0,9
Yanlış kutuplaşma (Toplam)	1	58	36	52
Yanlış kutuplaşma / bölünen hücre (Toplam)	%0,05	%3,6	%2,5	%3,6
Mikronukleus (Toplam)				8
Mikronukleus / bölünen hücre (Toplam)				%0,6
Kromozom hasarı (Toplam)	1	75	62	110
Kromozom hasarı / bölünen hücre (Toplam)	%0,05	%4,7	%4,4	%7,7
SD(±)	± 0,14	± 1,56	± 1,06	± 1,88



Şekil 7. Kromozom hasar durumu



Şekil 8. Kromozom hasarları

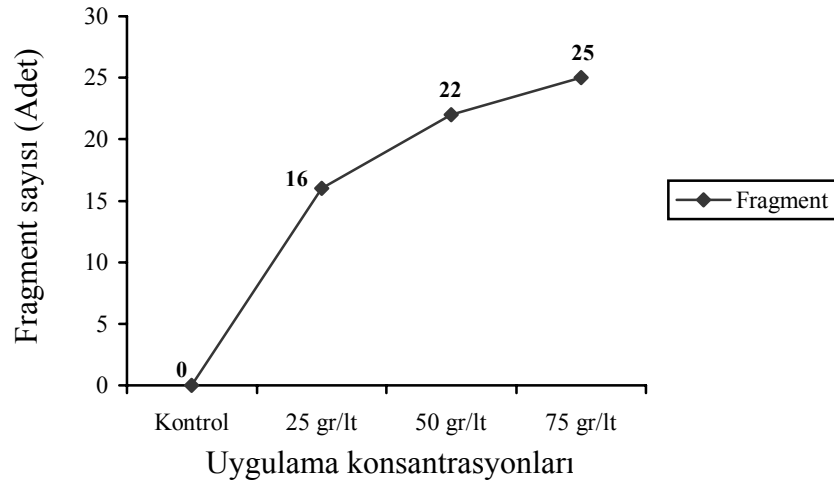
Kromozom hasarlarının, kontrol ve uygulama konsantrasyonlarında saptanan sayıları ile istatistik analizleri yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 7’de verilmiştir. Çizelgede aradaki farkların önemleri belirtilmektedir.

Çizelge 7. Kromozom hasarı sayıları istatistik sonuçları

Karşılaştırma grupları	P
kontrol-25 gr tohum/lt	0,000*
kontrol-50 gr tohum/lt	0,000*
kontrol-75 gr tohum/lt	0,000*
25 gr tohum/lt-50 gr tohum/lt	0,003*
25 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt	0,686
50 gr tohum/lt-75 gr tohum/lt	0,002*

*P< 0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır.

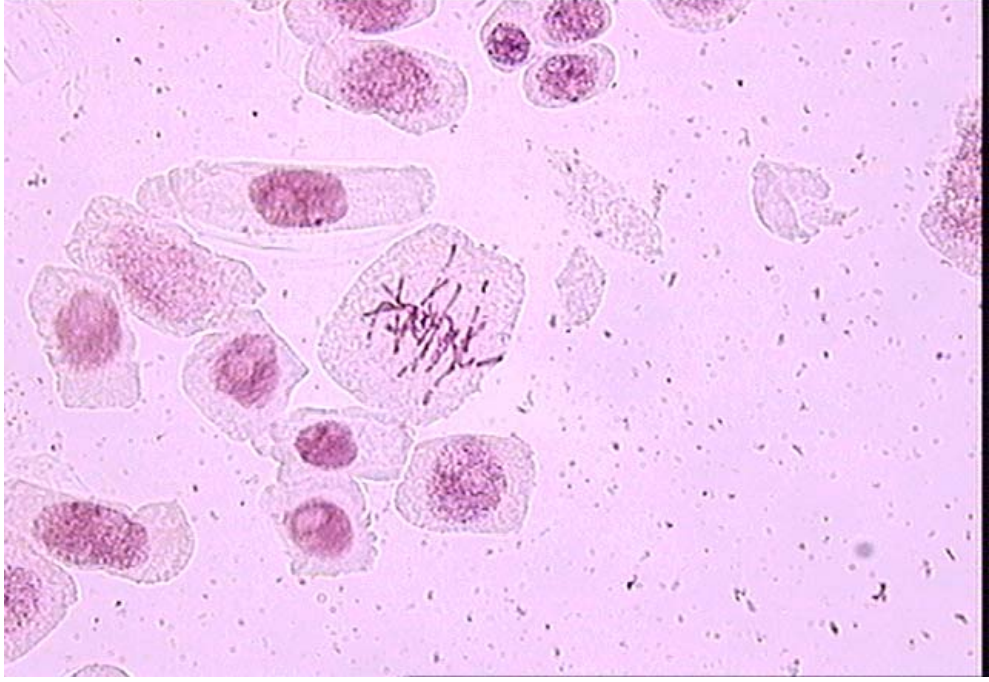
Fragment oluşumu, temelde fiziksel ve kimyasal etkiler sonucu kromozomlarda meydana gelen kırılmalara dayanmaktadır. Mikroskopik gözlemlerimizde kontrol grubunda fragmentlere hiç rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra 25, 50 ve 75 gr tohum/lt’lik konsantrasyonlardaki ekstraktlarda gözlenen fragment sayıları Şekil 8’de görülmektedir.



Şekil 9. Fragment dağılımı

Fragmentlerin uygulanan konsantrasyonlardaki bölünen hücrelere oranı 25 gr tohum/lt'de %1, 50 gr tohum/lt'de %1,5 ve 75 gr tohum/lt'de %1,7'dir.

Mikroskobik incelemelerde gözlenen fragmentlerin fotoğrafları Şekil 10'da verilmiştir.



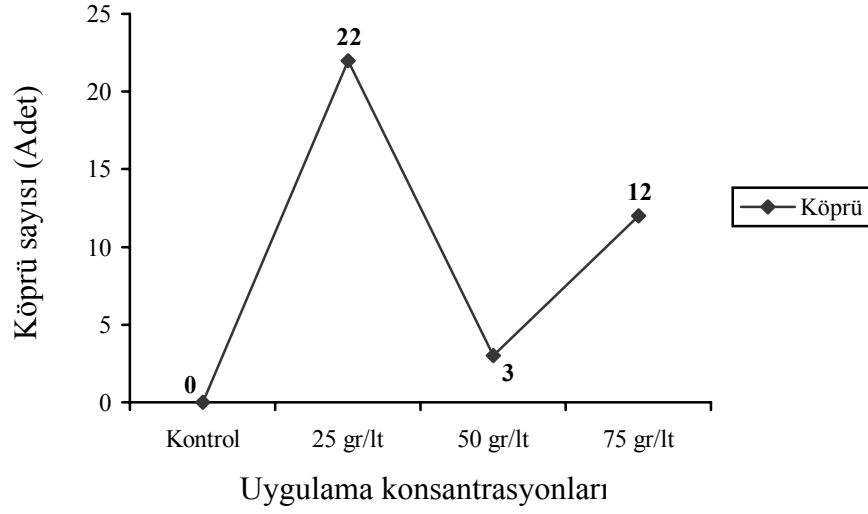
Şekil 10a (M.B. 15x40)



Şekil 10b (M.B. 15x100)

Şekil 10 a ve b; gözlenen fragment oluşumları

Bir diğerkromozom anormalliği; kromozomlar veya kromatitler arasındaki kırılıp yapışmalara bağlı olarak oluşabilen ve anafazda kromozomların veya kromatitlerin kutuplara çekilmesiyle birlikte ortaya çıkan köprülerdir. Çalışmada gözlenen köprüler mitotik köprülerdir. Araştırmada köprü oluşumu farklı uygulama konsantrasyonlarında düzensiz bir dağılım göstermiştir (Şekil 11).



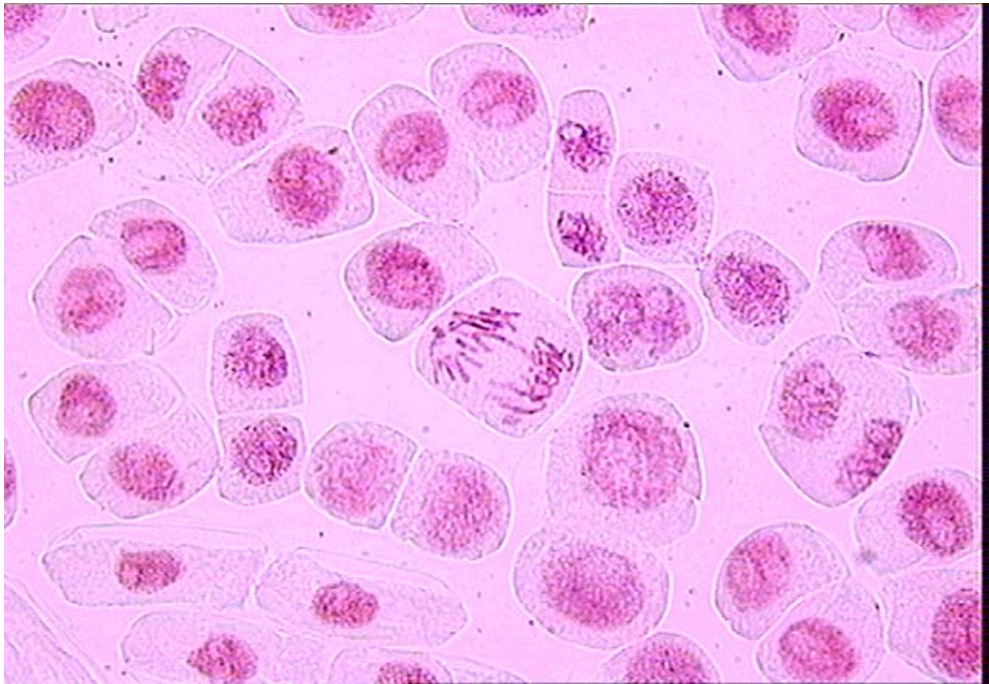
Şekil 11. Köprü dağılımı

Kontrol grubunda köprü oluşumuna rastlanmamıştır. Buna karşın 25gr tohum/lt'de 22 adet (%1,4), 50 gr tohum/lt'de 3 adet (%0,2) ve 75 gr tohum/lt'de 12 adet (%0,8) köprü sayılmıştır.

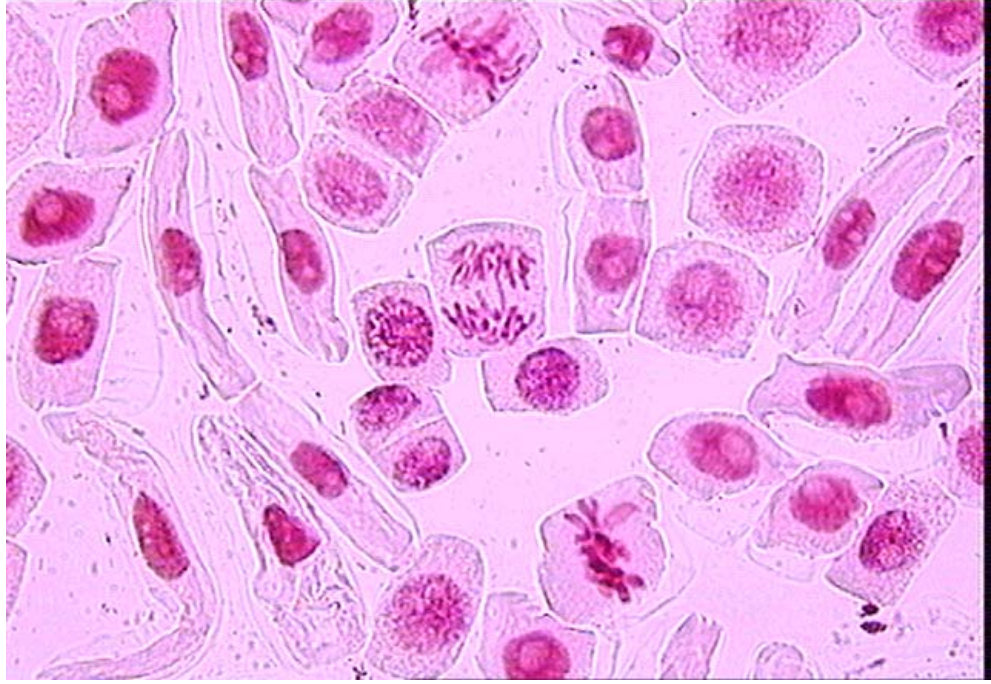
Mikroskobik incelemede gözlenen mitotik köprülerin fotoğrafları Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 12a (M.B. 15x100)



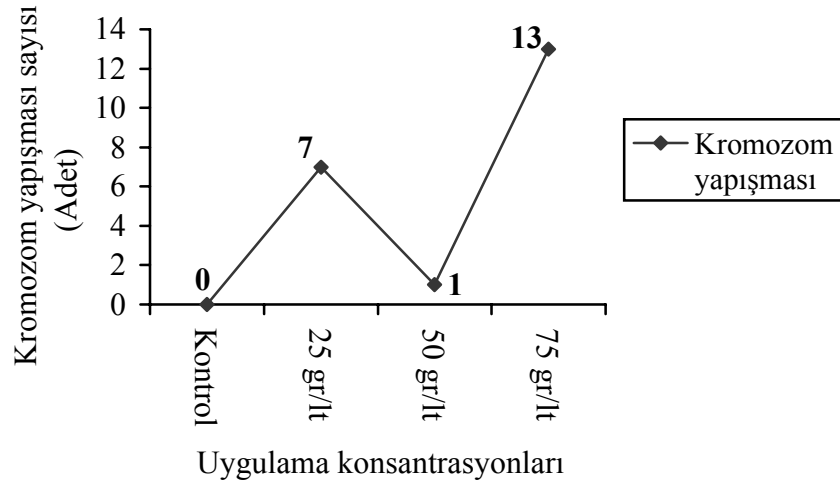
Şekil 12b (M.B. 15x40)



Şekil 12c (M.B. 15x40)

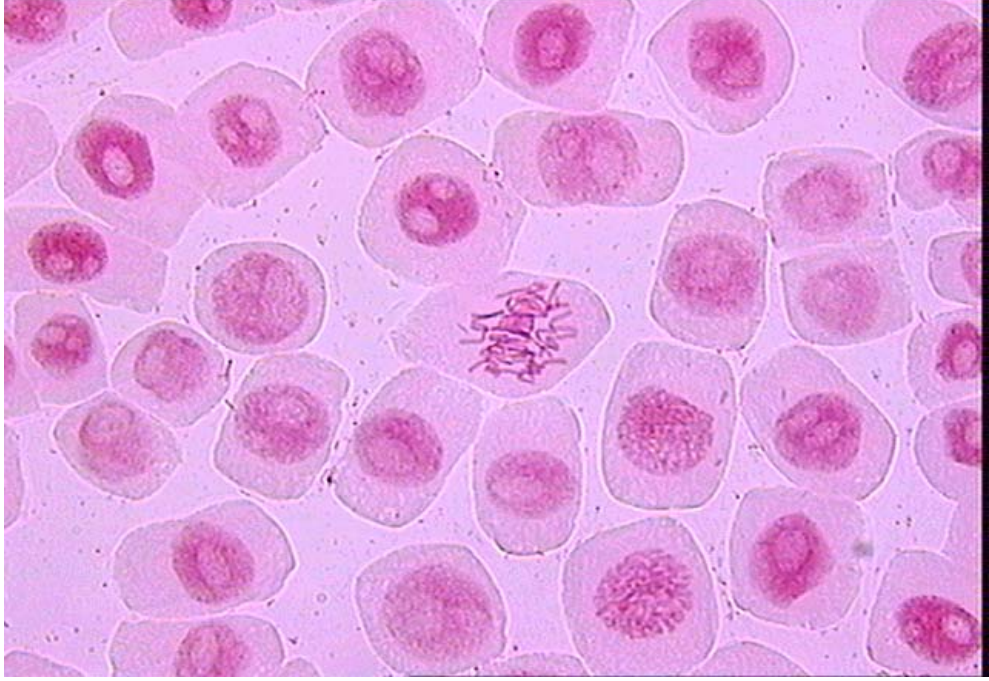
Şekil 12 a, b ve c; gözlenen köprü oluşumları

Araştırmada bir başka kromozom anormalliği olan kromozom yapışması olaylarına da rastlanmıştır. Kromozom yapışması kontrol grubunda gözlenmezken 25 gr tohum/lt'de 7 adet (%0,4), 50 gr tohum/lt'de 1 adet (%0,07) ve 75 gr tohum/lt'de 13 adet (%0,9) kromozom yapışması sayılmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Kromozom yapışması dağılımı

Mikroskobik incelemede gözlenen yapışma olaylarının fotoğrafları Şekil 14'de verilmiştir.



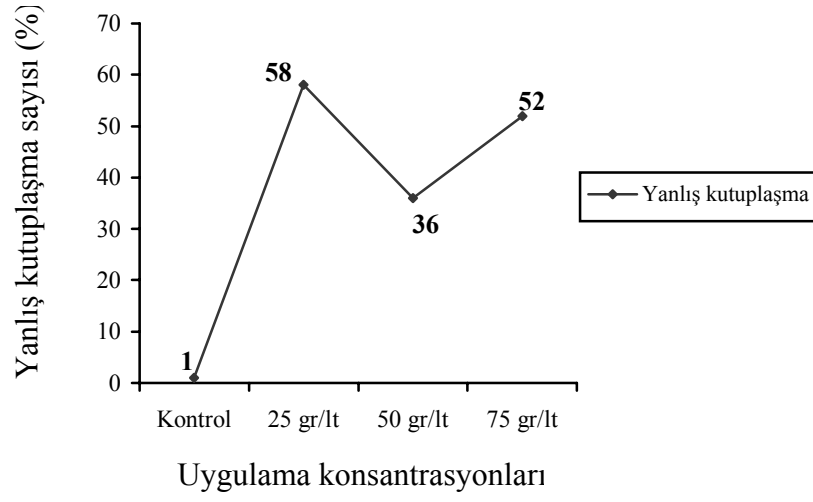
Şekil 14a (M.B. 15x40)



Şekil 14b (M.B. 15x40)

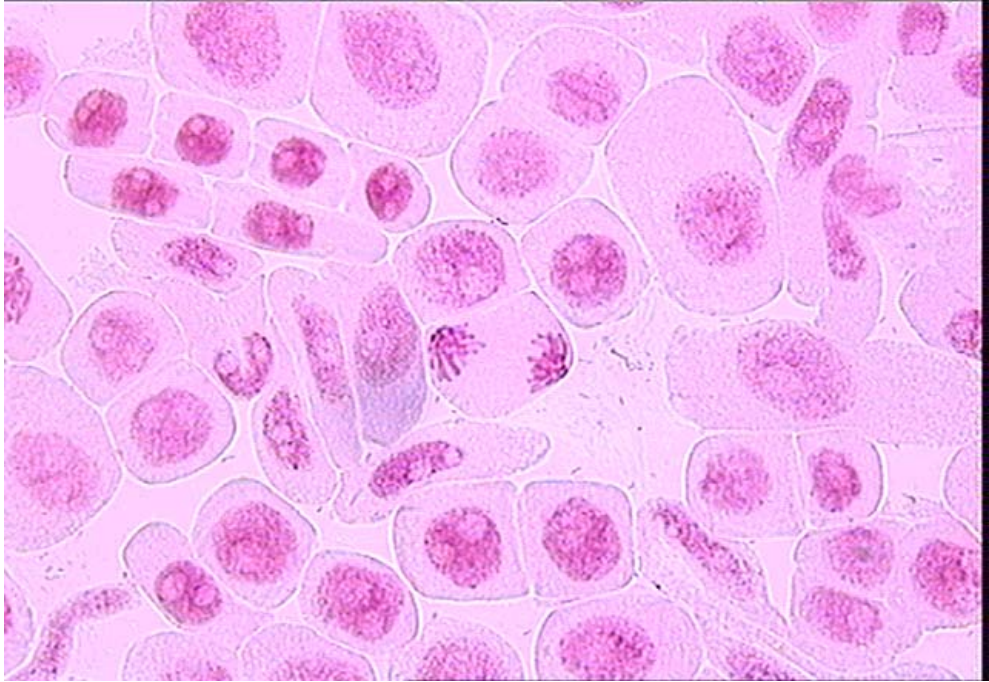
Şekil 14 a ve b; gözlenen kromozom yapışmaları

Araştırmada yapılan mikroskobik gözlemlerde kromozom anormalliği olarak en fazla yanlış kutuplaşma olaylarına rastlanmıştır. Tesadüfi bölgelerde yapılmış olan sayımlarda yanlış kutuplaşma kontrol grubunda 1 adet (%0,05), 25 gr tohum/lt'de 58 adet (%4,7), 50 gr tohum/lt'de 36 adet (%4,4) ve 75 gr tohum/lt'de 52 adet (%7,7) sayılmıştır. Dağılım Şekil 15'te görölmektedir.

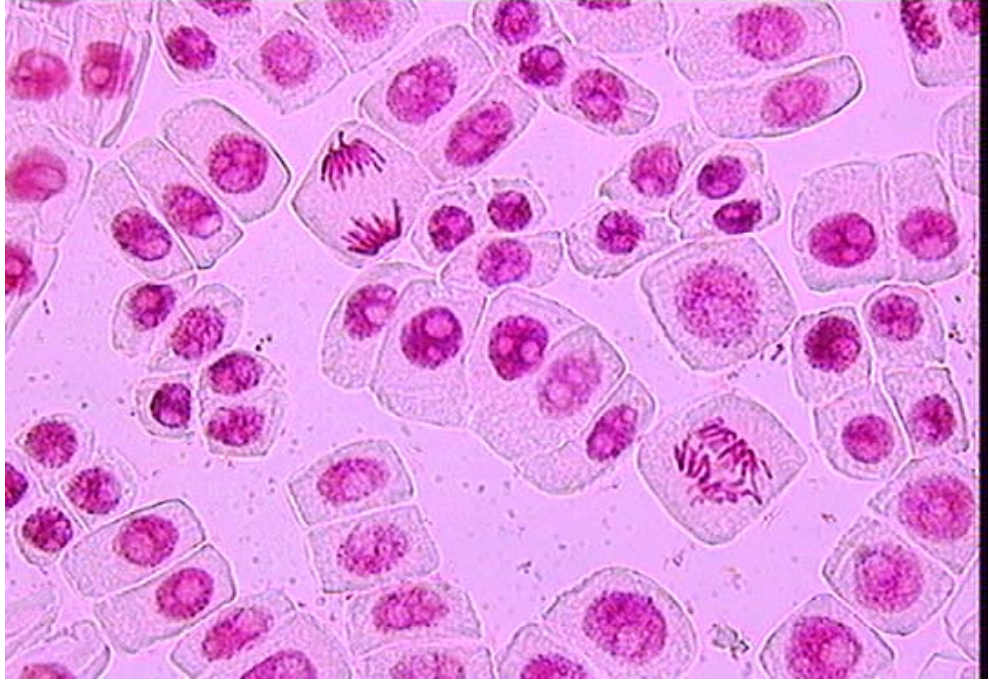


Şekil 15. Yanlış kutuplaşma dağılımı

Mikroskobik incelemelerde gözlenen yanlış kutuplaşmaların fotoğrafları Şekil 16'da verilmiştir.



Şekil 16a (M.B. 15x40)



Şekil 16b (M.B. 15x40)

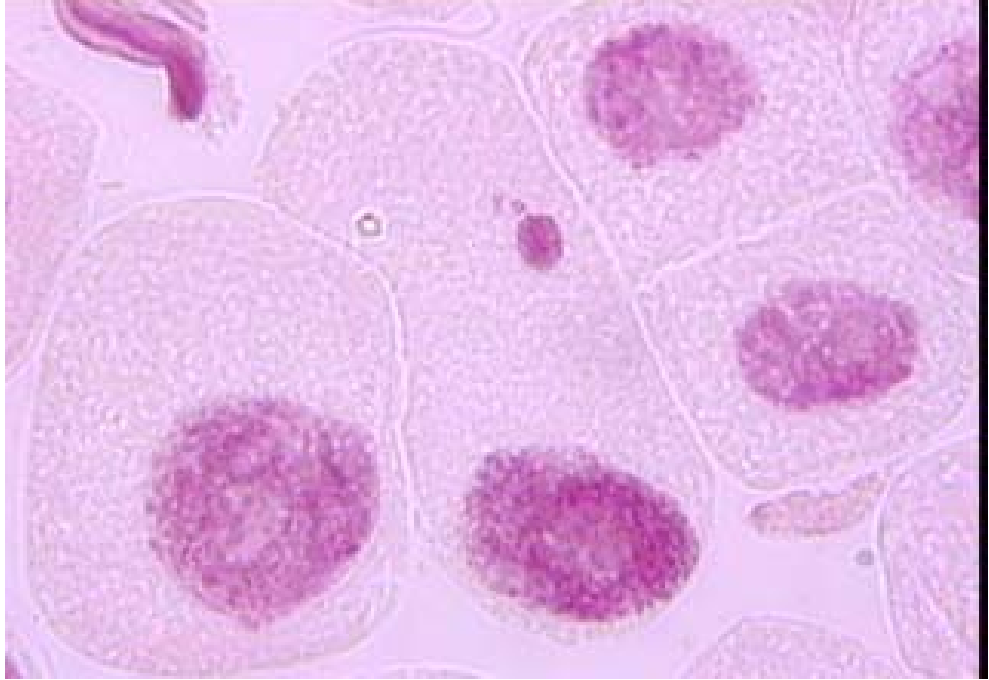
Şekil 16 a ve b; gözlenen yanlış kutuplaşma olayları

Normalde kromozomlar hücrenin uzun eksenindeki kutuplara doğru gitmeleri gerekirken çapraz yönde yada yan taraflara doğru çekilmişlerdir. Bu durum hücre polarizasyonunun yada hücre iskelet yapısının etkilenmiş olması nedeniyle ortaya çıkabilmektedir.

Araştırmada çok düşük oranda da olsa mikronukleus oluşumuna da rastlanılmıştır. Kontrol, 25 gr tohum/lt ve 50 gr tohum/lt'de hiç mikronukleus oluşumu yokken 75 gr tohum/lt'de 8 adet mikronukleus (%0,6) sayılmıştır. Bunların mikroskopik görüntüleri Şekil 17'de verilmiştir..



Şekil 17a (M.B. 15x40)



Şekil 17b (M.B. 15x100)

Şekil 17 a ve b; gözlenen mikronukleus oluşumları

Kromozom hasarlarına ilişkin olarak elde edilen bulgular düşündürücüdür. Kromozomlardaki kırılmalar ve yeniden düzenlenmeler sonucu ortaya çıkan mitotik köprülerde fragment oluşumunun doza bağımlılığı (Şekil 9) açıkça görülmekte fakat bu değişim oluşan köprülerin oranı ile bir uyum göstermemektedir. İlk uygulama dozunda (25 gr tohum/lt) önemli artış gösteren köprülerin daha yüksek dozda (50 gr tohum/lt) düşüş göstermesini açıklamak zordur. Ancak bu azalmanın tesadüfi olduğu söylenebilir. Buna karşın (Şekil 13) kromozom yapışmalarındaki değişimin köprülerin dağılımı ile uyum göstermesi dikkat çekicidir. Yine Şekil 15'te yanlış kutuplaşmadaki doza bağlı değişim eğiliminin diğer değişimlerle paralelliği görülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırmada kontrol grubu ve 3 ayrı konsantrasyon uygulaması sonucu elde edilen toplam 200 adet kökün preparasyonu ile yapılan sayımlarda 50656 adet hücre sayılmıştır. Bunların içerisinde mitoz bölünmenin değişik safhalarının gözlenebildiği bölünen hücrelerin toplam sayısı 6329 olmuştur. Mitotik indeks değeri, kontrol ile karşılaştırıldığında doz artışı ile birlikte düşüş göstermesine rağmen ortalama %12,5 değerinde kalmıştır. Bölünen hücreler içerisindeki kromozom anormalliklerinin toplamı 248 adettir ve bu da yaklaşık %4,2 oranına karşılık gelmektedir. Elde edilen değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında uygulanan ekstraktın tüm konsantrasyonlarda etkili olduğu görülmüştür. Ancak tarımsal uygulamalarda tavsiye edilen 50 gr tohum/lt konsantrasyonundaki hasarın minimum düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bu noktadaki hasar oranı düşüşünün açıklanabilmesi için sonraki aşamalarda moleküler düzeyde çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Meliaceae familyasına ait bitkilerden elde edilen bir biopestisit olan Azadirachtin'in kullanımının yaygınlaştırılması ve geleneksel kimyasal pestisitlerin oluşturacağı zararların önlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle ülkemizde halen kullanılmamakta olan bu bitki ürünlerinin kullanımının artırılması yönünde çalışmalar yapılmalıdır. Bunun için öncelikle, yeni olması nedeniyle etkileri tam olarak bilinmeyen Azadirachtin'in ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bu bitkilerin ülkemizde yetiştirilmesi ve ticari ürünlere dönüştürülmesinin milli gelire katkıda bulunmasının yanı sıra insan sağlığı ve çevre koruma açısından da yararları olacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Ülkemizde park ve bahçelerde yetiştirilen, *Meliaceae* familyasına ait olan *Melia azedarach*' tan elde edilen ve bir biopestisit olarak kullanılan Azadirachtin'in genotoksik etkileri bir bitkisel test sistemi ile araştırılmıştır.

Tohumlar Aydın'daki *Melia azedarach* türlerinin meyvelerinden elde edilmiştir. 25 gr tohum/lt, 50 gr tohum/lt ve 75 gr tohum/lt olmak üzere 3 ayrı konsantrasyondaki ekstraktların etkileri *Allium* test ile belirlenmiştir. Elde edilen kökler mikroskopik gözlemler için kullanılmıştır. Azadirachtin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre bölünmesi ve kromozomlar üzerinde etkili bulunmuştur. Ancak tarımsal uygulamada tavsiye edilen 50 gr tohum/lt'lik dozda en düşük etkiyi göstermiştir. Yapılan sayımlar neticesinde Azadirachtin'in mitotik indeksi düşürdüğü görülmüştür.

Azadirachtin'in zararlı etkilerinin düşük olacağı ve geleneksel kimyasal pestisit kullanımını azaltacağı düşünülmektedir.

SUMMARY

Azadirachtin, which is used as a biopesticide obtained from *Melia azedarach*. *Melia azedarach* belongs to the *Meliaceae* family and grown in the parks and gardens of our country. Genotoxic effects of Azadirachtin have been investigated with a plant test system.

The kernels were obtained from the fruits of *Melia azedarach* species in Aydın. The effects of the extracts at 25 gr kernel/lit, 50 gr kernel/lit and 75 gr kernel/lit have been investigated with Allium test, which is a plant test system. The roots that were obtained, have been used in microscopic observations. Azadirachtin was found to be effective on cell division and chromosomes with respect to control group. But at the 50 gr kernel per lit. concentration, which is recommended in the agricultural application, Azadirachtin showed the lowest effect. As a result of the countings, it was found that Azadirachtin decreases the mitotic indexes.

It was thought that the harmful effects of Azadirachtin would be low and Azadirachtin would decrease the use of traditional chemical pesticides.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince danışmanlığımı yürüten ve her konuda yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Prof.Dr.Şenay SÜMER'e, değerli görüş, öneri ve katkılarından dolayı sayın Yrd.Doç.Dr.Tülay CELİK (AŐKIN)'a, olanaklarının tümünü kullanmama izin veren Biyoloji Bölümü'ne ve çalışmamı destekleyen ADÜ Araştırma Fon Saymanlığı'na teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

AHN, J.W., CHOI, S.U. and LEE, C.O. 1994. Cytotoxic Limonoids from *Melia azedarach* var. *japonica*. **Phytochemistry**, Vol.36, No. 6. pp. 1493-1496.

AKUDUGU, J., GADE, G. and BÖHM, L. 2001. Cytotoxicity of Azadirachtin A in Human Glioblastoma Cell Lines. **Life Sciences**, 68, 1153-1160.

AWASTHY, K.S., CHAURASIA, O.P. and SINHA, S.P. 1999. Prolonged Murine Genotoxic Effects of Crude Extracted from Neem. **Phytotherapy Research**, 13, 81-83.

BOHNENSTENGEL, F.I., WRAY, V., WITTE, L., SRIVASTAVA, R.P. and PROKSCH, P. 1999. Insecticidal Melicarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, 50, 977-982.

BOLOGNESI, C. and MORASSO, G. 2000. Genotoxicity of Pesticides: Potential Risk for Consumers. **Food Sci.and Techn.**, 11, 182-187.

BORA,T. ve ÖZAKTAN H., 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. **Prizma Matbaası**. İzmir.

CHAUHAN, L.K.S., SAXENA, P.N. and GUPTA, S.K. 1999. Cytogenetic Effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the Root Meristem Cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, 42, 181-189.

COHEN, E., QUISTAD, G. B. and CASIDA, J.E. 1996. Cytotoxicity of Nimbolide, Epoxyazadiradione and other Limonoids from Neem Insecticides. **Life Sciences**, Vol. 58, No. 13, pp. 1075-1081.

COTELLE, S., MASFARUD, J.F. and FERARD, J.F. 1999. Assessment of the Genotoxicity of Contaminated Soil with the Allium/Vicia-micronucleus Assays. **Mutation Research**, 426, 167-171.

DAI, J., YAYLAYAN, V.A., RAGHAVAN, G.S.V. and PARE, J.R. 1999. Extraction and Colorimetric Determination of Azadirachtin-Related Limonoids in Neem Seed Kernel. **J.Agric.Food Chem.**, 47, 3738-3742.

FISKESJÖ, G. 1993. A 2-3 Day Plant Test for Toxicity Assessment by Measuring the Mean Root Growth of Onions (*Allium cepa* L.). **Environ. Toxicol. and Wat. Quality**, Vol.8, 461-470

GÖKTEPE, I. 1999. Toxicity of Neem-Based Insecticides on Aquatic Animals and Cell Lines. **PhD. The Louisiana State University and Agricultural and Mechanical Col.** AAT 9960055.

GROVER, I.S. and KAUR, S. 1999. Genotoxicity of Wastewater Samples from Sewage and Industrial Effluent Detected by the *Allium* Root Anaphase Aberration and Micronucleus Assays. **Mutation Research**, 426, 183-188.

HUANG, R.C., TADERA, K., YAGI, F., MINAMI, Y., OKAMURA, H., IWAGAWA, T. and NAKATANI, M. 1996. Limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, Vol. 43, No. 3, pp.581-583.

HUANG, R.C., OKAMURA, H., IWAGAWA, T., TADERA, K. and NAKATANI, M. 1995. Azederachin C. A Limonoid Antifeedant from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, Vol.38, No. 3. pp. 593-594.

JOHNSON, S., MORGAN E.D. and PEIRIS, C.N. 1996. Development of the Major Triterpenoids and Oil in the Fruit and Seeds of Neem. **Annals of Botany**, 78: 383-388.

KONG, M.S. and MA, T.H. 1999 Genotoxicity of Contaminated Soil and Shallow Well Water Detected by Plant Bioassays. **Mutation Research**, 426, 221-228.

ÖNCÜER,C., 2000. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. **Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, No:13.** Aydın.

RAIZADA, R.B., SRIVASTAVA, M.K., KAUSHAL, R.A. and SINGH, R.P. 2001. Azadirachtin, a Neem Biopesticide; Subchronic Toxicity Assessment in Rats. **Food and Chemical Toxicology**, Vol. 39, Issue 5, 477-483.

RANK, J., NIELSEN, M.H. 1998. Genotoxicity Testing of Wastewater Sludge Using the *Allium cepa* Anaphase-Telophase Chromosome Aberration Assay. **Mutation Research**, 418, 113-119.

RANK, J., NIELSEN, M.H. 1997. *Allium cepa* Anaphase-Telophase Root Tip Chromosome Aberration Assay on N-methyl-N-nitrosourea, Maleic Hydrazide, Sodium Azide and Ethyl Methanesulfonate. **Mutation Research**, 390, 121-127.

REED, E. & MAJUMDAR, S.K. 1998. Differential Cytotoxic Effects of Azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* and Mouse Cultured Cells. **Entomologia Experimentalls et Applicata**, 89, 215-221.

RODGERS, P.B. 1993. Potential of Biopesticides in Agriculture. **Pestic. Sci.**, 39, 117-129

SALEZADAH, A., JABBAR, A., JENNENS, L., LEY, S.V., ANNADURAI, R.S., ADAMS, R.L.P. and STRANG, R.H.C. 2000. The Effects of Phytochemical Pesticides on the Growth of Cultured Invertebrate and Vertebrate Cells. **Pest Management Science**. July 2000.

SCHMUTTERER, H. 1990. Properties ana Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta indica*. **Annu.Rev.Entomol.**, 35:271-97.

SCHAAF, O., JARVIS, A.P., VAN DER ESCH, S.A., GIACNACOVO, G. and OLDHAM, N.J. 2000. Rapid and Sensitive Analysis of Azadirachtin and Related Triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. **Journ. of Chromatography A**, 886, 89-97.

SEÇMEN, Ö., GEMICI, Y., GÖRK, G., BEKAT, L. ve LEBLEBICI E. 1995. Tohumlu Bitkiler Sistematiği. **Ege Üniversitesi Basımevi**. İzmir.

SRIVASTAVA, M.K. and RAIZADA, R.B. 2001. Assessment of Embryo/ Fetotoxicity and Teratogenicity of Azadirachtin in Rats. **Food and Chemical Toxicology**, Vol.39, Issue 10, 1023-1027.

TADA, K., TAKIDO, M. and KITANAKA, S. 1999. Limonoids from Fruit of *Melia toosendan* and their Cytotoxic Activity. **Phytochemistry**, 51, 787-791.

TAKEYA, K., QIAO, Z.S., HIROBE, C. and ITOKAWA, H. 1996. Cytotoxic Azadirachtin-Type Limonoids from *Melia azaedarach*. **Phytochemistry**, Vol.42, No.3, pp. 709-712.

TAKEYA, K., QIAO, Z.S., HIROBE, C. and ITOKAWA, H. 1996. Cytotoxic Trichilin-Type Limonoids from *Melia azaedarach*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Vol. 4, No. 8, pp. 1355-1359.

VALLADARES, G.R., FERREYRA, D., DEFAGO, M.T., CARPINELLA, M.C. and PALACIOS, S. 1999. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia**, 70, 421-424.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Avusturya'nın Linz şehrinde doğdu. İlk öğrenimini Avusturya'da tamamladıktan sonra Orta ve Lise öğrenimini Türkiye'de sürdürdü. 1994 yılında Aydın Efeler Lisesinden mezun oldu. Aynı yıl Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi. 1998 yılında Biyolog unvanı ile mezun oldu. 1998 Kasım ayında vatani görevini yapmak üzere askere gitti. 1999 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. Aynı yıl Araştırma görevlisi olarak atandı. Halen bu üniversitede görevine devam etmektedir. Evlidir.