

Fipronilin Soğan (*Allium cepa* L.) Kök Ucu Hücrelerine Sitogenetik Etkileri

Emine ARSLAN¹, Kuddisi ERTUĞRUL

Özet: Bu çalışmada, fipronilin farklı dozlarının soğan (*Allium cepa*) kök ucu hücreleri üzerine sitogenetik etkileri çalışılmıştır. Kökler 5, 10, 15 mg/100 ml fipronil ile 6-12-24 saat muamele edilmiştir ve daha sonra kök ucu hücrelerinin 12, 24, 48 saat iyileştirmeye bırakılarak mitoz bölünmelerindeki değişiklikleri incelenmiştir. Fipronilin doz artışına bağlı olarak kromozom anormalliklerinin arttığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Fipronil, *Allium cepa*, mitoz hücre bölünme, kromozomal anormallikler.

The Effects of Fipronil on the Root Tip Cells of Onion (*Allium cepa* L.)

Abstract: In this studies, the cytogenetic effects of fipronil on root tip of *Allium cepa*, at different concentrations, were studied. The roots were treated with 5, 10, 15 mg/100 ml of the fipronil for 6 and 24 hours and then the root tip cells were examined in mitosis division variations by recovering for 12, 24, and 48 hours. It was observed that mitotic abnormalities were increased depending on the concentration of fipronil.

Key words: Fipronil, *Allium cepa*, mitosis cell division, chromosomal aberrations.

Giriş

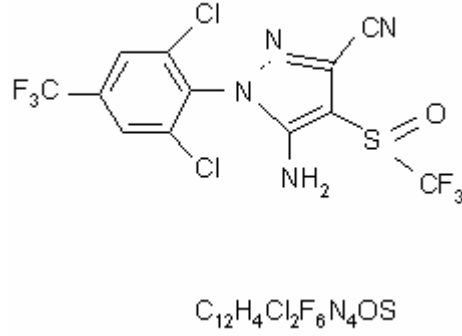
Tarım ürünlerinin verimini artırma ve zararlı haşerata karşı korunma çarelerinin uzun bir geçmişi vardır. Bitki koruma ilaçlarının ekonomik önemi tartışmasız kabul edilen bir gerçektir. Bilinçli kullanımları halinde verimi birkaç kat artırabilmektedirler. Bugüne kadar yapılmış araştırmaların ortak özellikleri, hemen bütün pestisitlerin, canlılarda az ve ya çok anormalliklere yol açmasıdır.

Kromozom aberasyonları, pestisitler ve diğer bazı kimyasal maddelerin toksitesinin ölçmede güvenilir indikatör olarak kullanılmaktadır [1,2]. Modern ziraatta ürün korunması için pestisitlerin artarak kullanımı, bu kimyasalların hücrelerde sitolojik hasara sebep olması mümkün olacağı ile ilgili sorular artmaktadır. Pestisitlerin kullanımı bir ihtiyaç olmasına rağmen, bu kimyasalların sık sık ve gelişmiş güzel kullanımı yüksek bitkiler üzerinde birçok sakıncalı sonuçlar meydana getirdiği kanıtlanmıştır [3].

1987'de çöl çekirgelerine karşı önleyici kontrol yönteminin ana aracı olarak dieldrinin kullanımı çevresel sebeplerden dolayı yasaklanmıştır. Dieldrin yüksek etkinliği sayesinde, uzak Sahra bölgelerindeki erken bir evrede çöl çekirgelerinin ani ve hızlı artışlarının kontrolü sağlanmıştır. Bu önleyici kontrol yöntemi 20-30 yıldır başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Böylece geniş bölgeler üzerinde kimyasal püskürtmelerden ve saldırılardan kaçınılmıştır. O zamandan beri, uzak çöl bölgelerindeki çöl çekirgelerine gerekli etkili ve kaliteli kontrolü hiçbir alternatif insektisitler göstermemiştir (organikfosfatlar, piretroidler, karbamatlar).

¹ Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 42031 KONYA E-Mail: earslan@selcuk.edu.tr

Fipronil, 1994'de fenil pirazol kimyasal grubunun yeni bir insektisit bileşiğidir (Şekil 1). Bu insektisitın çekirgelere karşı etkisi kesin olarak ilk laboratuvar denemeleri ile kanıtlanmış ve uzun vadeli etkileri ileri sürülmüştür [4,5,6]. Fenil pirazol kimyasal grubunun bir bileşiği olan fipronil, 1981'de Rhone-Poulenc tarafından keşfedilmiştir, çöl çekergelerini (*Schistocerca gregaria* Forskal) kontrolünde dieldrinin yerine önerilmiştir. Fipronilin test sahalarında çekirgeleri öldürürken tarlaya ekilmiş ürüne ve ya yaban otlarına zarar verip vermediği konusunda her hangi bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak, bitkilerde oluşabilecek zararlar mutasyonlara yol açarsa ıslahçılar açısından önemli problemler oluşturacağı kanısındayız.



Şekil 1. Fipronilin yapısal formülü

Laboratuvarında alan testlerinde fipronilin düşük dozları ($5-20g\ ha^{-1}$) kahverengi çekirgelere (*Locustana pardalina* Walker), Afrika göç çekirgelerine (*Locusta migratoria migratorioides* Reiche ve Fairmaire) ve çöl çekirgelerine karşı etkilidir [4,5,6,7].

Moritanya'daki alan testlerine ilaveten, çöl çekirgeleri [8] ve bazı hedef olmayan böceklerin ergin popülasyonunda 2–5 günde % 90'ın üzerinde azalma olmasına karşın, 1-9 günde bütün çöl çekirgelerinin elimine edildiği, $4,2-13,4g\ ha^{-1}$ dozlarda doğru çekirge kontrolü sağlanmıştır [9].

Fipronil, çayır çekirgeleri ve hedef olmayan böcekler üzerine çok düşük dozlarda ($4\ g\ ha^{-1}$) bile yüksek insektisial aktivite gösterir. Zirai faydaları olan organizmalarda çok düşük ölüm oranına sebep olurken, esas olarak çayır çekirgelerinin etkili kontrolünün sağlanması amaçlanmıştır [10].

Materyal ve Metot

Bu çalışmada hepsi yaklaşık eşit ağırlıkta sağlıklı yemeklik soğan (*Allium cepa* L.) kullanılmıştır. Soğanlar distile suda çimlendirilmiştir. Kökleri 1cm. uzunluğuna gelen soğanlar saf su ile hazırlanmış fipronil çözeltisinin farklı dozlarıyla ($5mg/100\ ml$, $10mg/100\ ml$ ve $15mg/100\ ml$) oda sıcaklığında 6, 12 ve 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Soğanlar bundan sonra 12, 24 ve 48 saat oda sıcaklığında saf su içinde iyileştirmeye alınmıştır. Daha sonra kökler kesilerek ezme preparat için ön işleme geçilmiştir.

Mitoz bölünmenin incelenmesi için elde edilen kök uçları 3:1 etanol-glasial asetik asit içinde fikse edilmiş ve $60^{\circ}C$ 'de 1N HCl'de hidrolizi yapılmıştır. Feulgen kullanılarak ezme preparatlar hazırlanmıştır. Tesadüfi olarak seçilen herhangi bir bölgedeki toplam 500 hücre sayılmıştır.

Sonuç

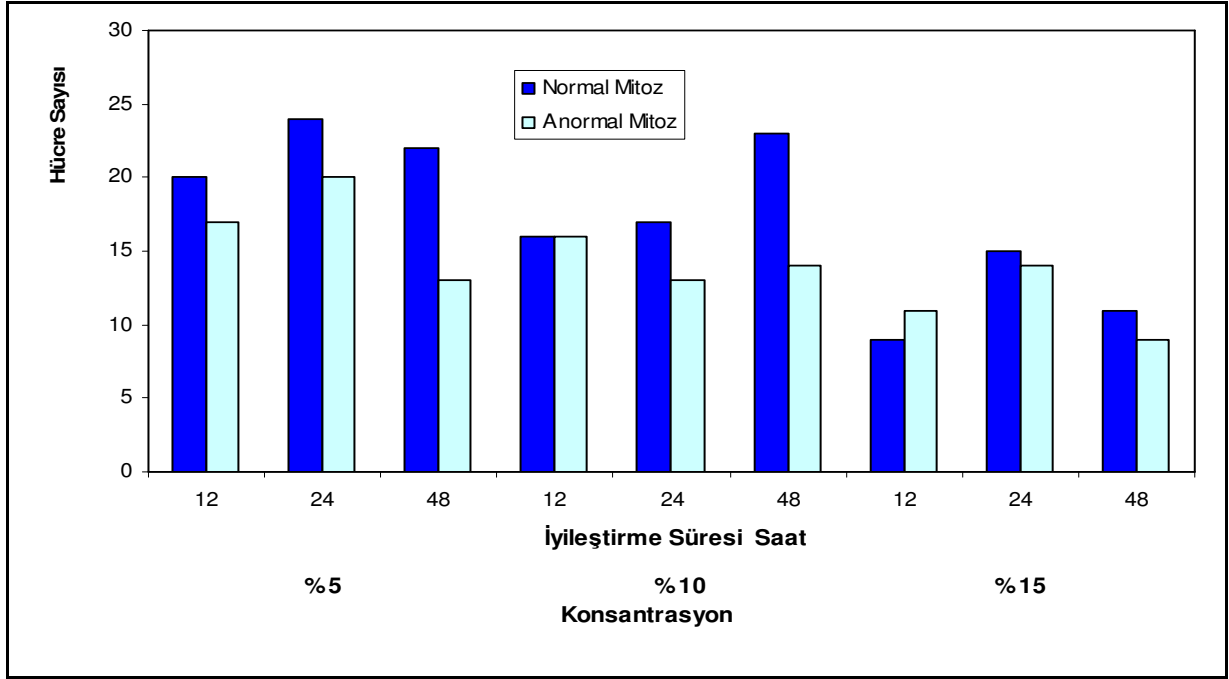
Soğan kök ucu hücrelerine uygulanan farklı dozlarda fipronil, mitoz bölünmenin tüm evrelerini olumsuz yönde etkilemiştir. Bu etki doza, uygulama ve iyileştirme süresine bağlı olarak

farklılık göstermektedir. Doz artışına bağlı olarak anormal hücre sayısı artmıştır. Grafik 1 ve 2). Kontrol grubunda ise anormal hücre oranı deney gruplarına göre düşüktür (Tablo 1).

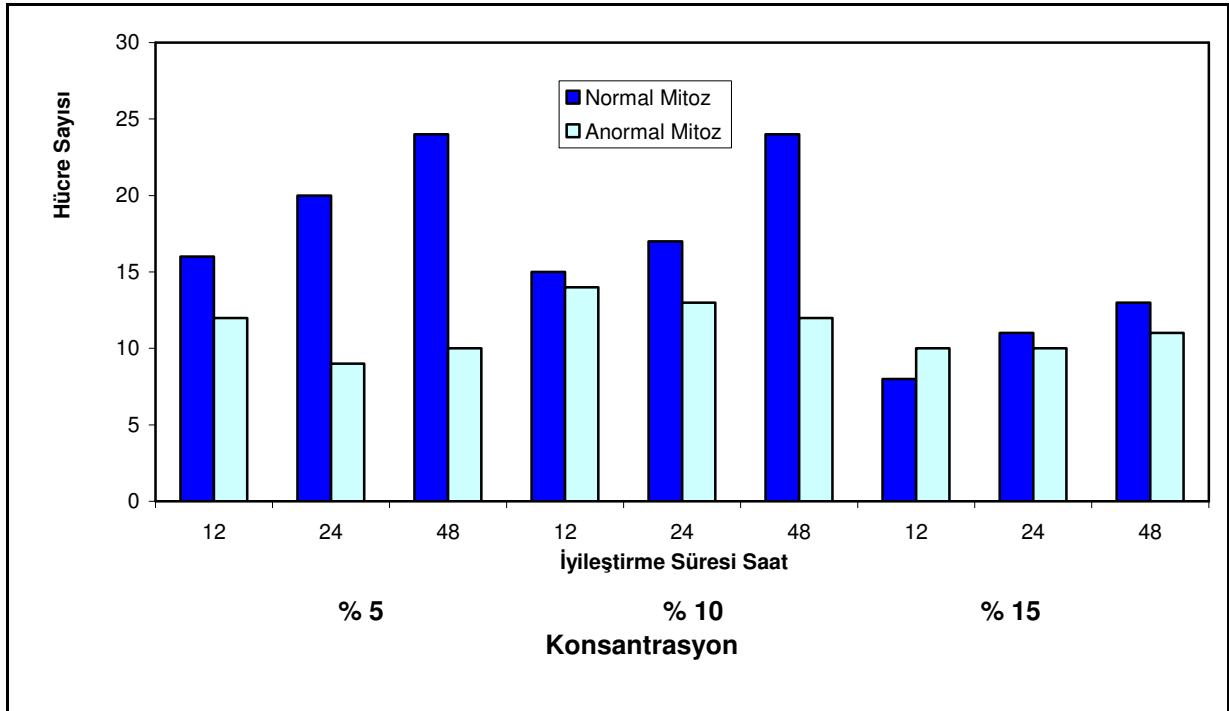
Tablo 1. Mitoz bölünmenin farklı evrelerinde fipronilin dozlarının etkisi (P: Profaz, M:Metafaz, A:Anafaz,T:Telofaz)

İlaç Kons. mg/100ml	Uygulama saati	İyileştirme saati	Normal Mitoz					Anormal Mitoz					Toplam Mitoz	% Anomali
			P	M	A	T	Toplam	P	M	A	T	Toplam		
5	6	12	5	6	2	7	20	3	4	5	5	17	37	0.46
5	6	24	11	0	1	12	24	5	3	4	8	20	44	0.45
5	6	48	7	4	6	5	22	4	2	5	2	13	35	0.37
10	6	12	4	5	1	6	16	2	6	4	4	16	32	0.50
10	6	24	7	1	5	4	17	5	6	2	0	13	30	0.43
10	6	48	12	2	3	6	23	5	3	4	2	14	37	0.38
15	6	12	6	0	1	2	9	5	4	2	0	11	20	0.55
15	6	24	4	1	2	8	15	7	1	3	3	14	29	0.48
15	6	48	5	3	1	2	11	4	1	1	3	9	20	0.45
5	24	12	9	2	1	4	16	4	3	3	2	12	28	0.42
5	24	24	8	2	2	8	20	4	1	3	1	9	29	0.31
5	24	48	7	3	4	10	24	1	3	4	2	10	34	0.29
10	24	12	11	1	0	3	15	5	3	2	4	14	29	0.48
10	24	24	10	2	1	4	17	5	4	2	2	13	30	0.43
10	24	48	9	6	2	7	24	5	3	4	0	12	36	0.33
15	24	12	3	4	1	0	8	4	2	3	1	10	18	0.56
15	24	24	4	2	0	5	11	3	5	1	1	10	21	0.48
15	24	48	3	3	2	5	13	1	3	4	3	11	24	0.46
Kontrol grubu			21	6	4	5	36	4	3	0	2	9	45	0.20

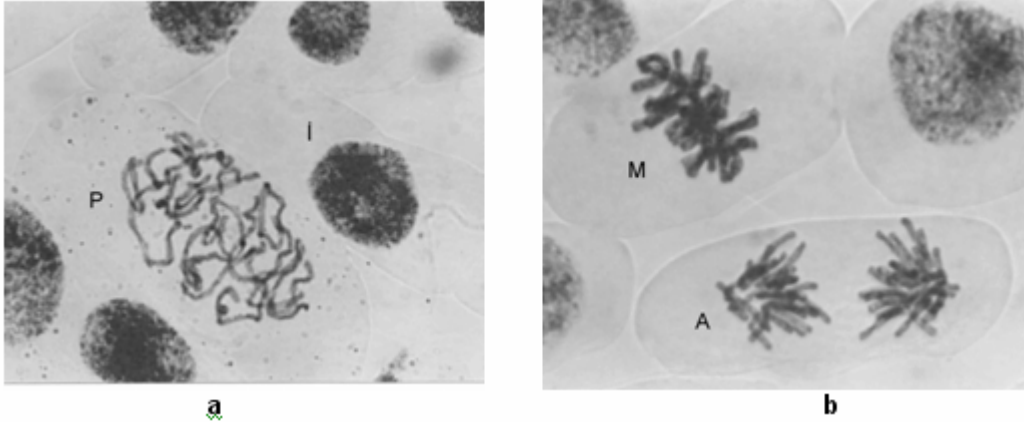
Uygulama süresinin uzaması, anormal hücre oranını artırırken iyileştirme süresinin uzaması ise bu oranı düşürmektedir. Fipronil uygulanan soğan kök ucu hücrelerinde mitoz bölünmenin farklı evrelerinde kromozomal anormallikler gözlenmiştir. Kontrol grubundaki mitoz bölünme evreleri (Şekil 2a, b) ile kıyaslandığında, profaz evresinde nükleusta granülasyon, kromatin yoğunlaşmasında düzensizlik ve mikronükleus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3a). Metafazda en sık görülen anormallikler düzensiz kromozom dağılımı ve kromatit kümelenmesi şeklinde olmuştur. Anafazda görülen anormallikler ise bazı kromozomların ayrılmada geç kalması, kromozom köprüsü ve kromatit kırılmalarıdır (Şekil 3b, c). Telofazda görülen anormallikler eşit olmayan kromatin dağılımıdır. Ayrıca interfaz evresinde hücrelerde şekil bozukluklarına, piknotik nükleusa ve özellikle yüksek dozlarda, tam olarak çekirdekçik olup olmadığı anlaşılmayan çekirdekçik benzeri yapılara rastlanmıştır (Şekil 3d). Kaymak'ın, alüminyumun soğan ve sarımsak kök ucu hücrelerindeki etkileri ile ilgili çalışmasında çekirdekçik benzeri bu yapıları, düzensiz şekilli çekirdekçik olarak tanımlamışlardır [11]. Ayrıca çift nükleuslu interfaz hücrelerine de rastlanmıştır (Şekil 3e).



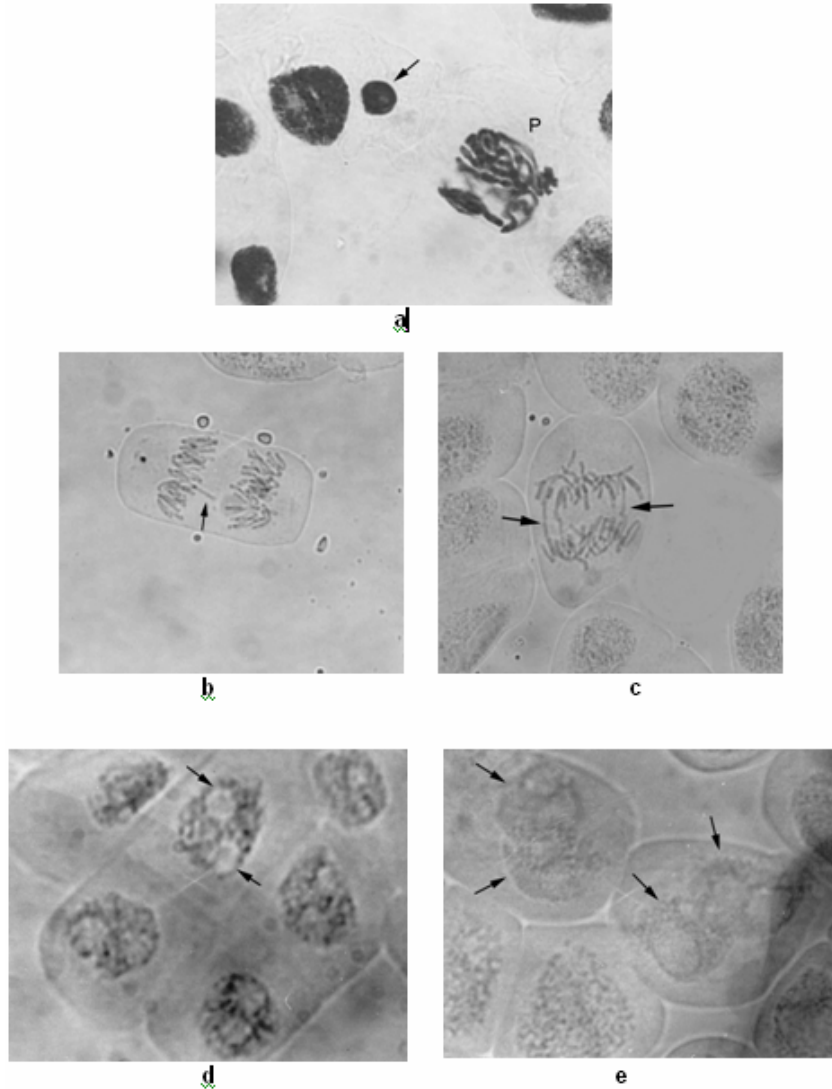
Grafik 1: Altı saatlik fipronil uygulamasında konsantrasyon ve iyileşme süresine göre normal ve anormal mitoz sayıları



Grafik 2: Yirmi dört saatlik fipronil uygulamasında konsantrasyon ve iyileşme süresine göre normal ve anormal mitoz sayıları



Şekil 2. a ve b kontrol mitoz evreleri (İ: interfaz, P:profaz, M:metafaz, A:anafaz)



Şekil 3. a: mikronükleus ve düzensiz kromatin kümelenmesi, b-c: anafaz anormallikleri, kromozom köprüleri ve kromatit kırılmaları, d: çok nükleoluslu interfaz, e: çift nükleoluslu interfaz

Tartışma

Bu çalışmada çeşitli dozlarda fipronil ile muamele edilmiş soğan kök uçlarındaki mitoz bölünmedeki anormallikler çalışılmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda fipronilin kök ucu hücrelerindeki mitoz bölünme üzerindeki etkileri ve kromozom anormallikleri ile ilgili bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

Fipronilin doz ve zaman artışına bağlı olarak hücre bölünmesi esnasındaki evrelerde çeşitli kromozomal anormalliklere neden olduğu gözlenmiştir. Bu gibi insektisitlerle veya bazı kimyasal bileşiklerle yapılan çalışmalarda da farklı dozlardaki çözümler *Allium cepa* kök ucu hücrelerine uygulanmış ve sonuçta çeşitli kromozomal anormalliklere sebep olduğu bulunmuştur [3,12,13,14]. Zaki ve ark [15] ise *Vicia faba* 'da insektisitlerin geri kalmış kromozom, kromozom yapışmaları, köprü gibi kromozom anormalliklerine sebep olduğunu bildirmişlerdir. Ancak fipronilin çeşitli dozları çeşitli çekirge türlerinde denenmiştir. Balanço ve de Visscher [10] 1994'de Moritanya'daki bir deney alanında çöl çekirgelerine karşı testetmişlerdir. Hedef olmayan Coleoptera ve Hymenoptera üzerine spray tedavilerinin etkileri de tartışılmıştır. Akriba organikfosforlu insektisitler genellikle çekirge türlerine karşı kullanılmıştır. Ama fipronilin çok daha etkili ve ısrarlı olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda fipronil muamelelerinin pozitif ve negatif yönleri de tartışılmıştır. Çekirge salgınlarını başarılı bir şekilde önlemek için en uygun insektisitlerden biri olarak görünmesine rağmen istila altındaki Sahra şartlarında aynı zamanda fipronille muamele edilen bazı hedef olmayan böcek gruplarında şiddetli ölüm oranına neden olmuştur.

Fipronilin suda eriyen 3 formülasyonu tütün kurduna (*Heliothis virescens*) karşı test edilmiştir. Formülasyonlar arasında toksitesi bakımından kayda değer bir farklılık gözlenmemiştir. Formülasyonların yayılan damlacığın morfoloji çökeltisi değerlendirilerek çalışılmıştır. Aynı formülasyonlar pamuk üzerinde de denenmiş ve çökelti örnekleri farklı bulunmuştur [16].

Brezilya'da fipronil, önleyici bir kontrol yöntemi içinde doğal vejetasyondaki 8. Evre *Rhammatocerus schistocercoides*'e karşı test edilmiştir. 2,15'den 11,8g /ha'a kadar dozlarla alan spreyleneştir. Kısa bir zamandaki yüksek doz ile ölüm oranı artmıştır. Fakat bütün test edilen dozlar 1-4 gün içinde %100 ölüm oranı ile sonuçlanmıştır. Bu çalışma silo bantları üzerinde *Rhammatocerus schistocercoides*'e karşı fipronil muamelesinin etkilerini belirlemek ve tavsiye edilen kontrol yöntemine göre (doz ve uygulama tekniği) bu fenil-pirazol insektisitinin nasıl kullanılacağını tespit etmek için yapılmıştır [17]. Çeşitli laboratuvar ve alan testleri, 0,6'dan 20g /ha'a kadar dozlarının bir çok Afrika, Asya ve Kuzey Amerika çayır çekirgeleri ve çekirge türlerine karşı etkili olduğunu göstermiştir [4,6,7,8,10,18,19].

Fipronil, böcekleri öldürmek isterken bitkilere de zarar verirse mutasyonlar oluşabilir. Bu sebeple çalışmamızda bulduğumuz anormalliklerin geçici olup olmadığı araştırılmalıdır. Mutasyona meydan veriyorsa ıslahçılar için önemli problem oluşturacaktır.

Kaynaklar

- [1] Mohandas, T., Grant, W.F. **Cytoigenetic effects of 2,4 D and amitrol in relation to nuclear volume and DNA content in some higher.** Can. J. Genet. Cytol., 14:773-778 ,(1972).
- [2] Kilhman, B. A. **Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations.** Mutation Research, 31:401-412,(1975).
- [3] Sinha, R. K., Choudhury, R., Mallick, R. **Cytological Effects of Phosalone on Root Meristem of *Allium cepa* L.** Cytologia, 54:429-435, (1989).
- [4] Butler E.T. and Du Preez I. **Laboratory determination of the LD50 and LD90 values for fipronil against fifth instar nymphs of the brown locust *Locustana pardalina* (Walk.).** Agricultural Research Council, Plant Protection Research Institute, Pretoria, South Africa, (1994).
- [5] Kriel C.F., Butler E.T. and Du Preez I. **Laboratory determination of the LD50 and LD90 values for fipronil against fifth instar african migratory locust nymphs, *Locusta migratoria***

- migratorioides**. Agricultural Research Council, Plant Protection Research Institute, Pretoria, South Africa ,(1994).
- [6] Megenasa T. and Muinamia C.K. **Evaluation of fipronil (EXP. 60145 A) in the control and management of the desert locust (*Schistocerca gregaria*, Forskal) nymphs and adults**. DLCOEA, Nairobi, 30 pp, Kenya ,(1994).
- [7] Price R.E., Butler E.T. and Brown H.D. **Efficacy of fipronil against nymphal bands of the brown locust in the Karoo, South Africa**. Agricultural Research Council, Plant Protection Research Institute, Pretoria, 12 pp. ,(1994).
- [8] Rachadi T., Balança G., Duranton J.F. and Foucart A. **Les effets du fipronil sur *Schistocerca gregaria* (Forskal 1775) divers sauteriaux et la faune non-cible. Principaux resultans experimentaux obtenus par le Mauritanie** (october a december 1994). D.513, CIRAD-GERDAT-PRIFAS, Montpellier, France, 116 pp. ,(1995).
- [9] Balança G. and de Visscher M.N. **Impacts on Nontarget Insects of a New Insecticide Compound used Against the Deseryt Locust (*Schistocerca gregaria*, Forskal 1775)**. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 58-62 France ,(1997-a).
- [10] Balança G. and de Visscher M.N. **Effects of very low doses of fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control**. Crop Protection, Vol. 16, No. 6pp. 553-564 ,(1997-b).
- [11] Kaymak F., **Effects Aluminium (Al³⁺) on the root meristem cells of *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L.** 20: 139-145 (1996)
- [12] Khyriam D and Prasad S.B. **Effect of cisplatin on *Allium cepa* root meristem cells**. Cytobios, 100, 171-180, (1999).
- [13] Chauhan L.K.S. and Sundararaman V. **Effect of substituted ures on plant cell I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa***. Cytologia, 55: 91-98, (1990).
- [14] Rencüzoğulları E., Kayraldız A., İla H.B., Çakmak T. ve Topaktaş M. **The Cytogenetic effects of sodium metabisulfite, a food preservative in root tip cells of *Allium cepa***. Turk J Biol, 25: 361-370, (2001).
- [15] Zakia M. A., Fawzia A. E., Abo-El-Kheir A. And İman -El- Sheikh A. **Alteration in nucleic acids protein content and mitotic division of *Vicia faba* root tips cells as affected by malathion and tamaron insecticides**. Cytologia, 55: 349-355, (1990).
- [16] Pedibhotla V.K., Hall F.R., Holmsen J. **Deposit characteristics and toxicity of fipronil formulations for tobacco budworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) control on cotton**. Crop Protection, 18: 493-499 ,(1999).
- [17] Lecoq M. and Balança G. **Field trials of fipronil for control of *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn, 1906) hopper bands in Brazil**. Crop Protection, Vol. 17, No. 2 pp. 105-110 ,(1998).
- [18] Rachadi T. and Foucart A. **L'efficacite du fipronil en barrieres contre les bandes larvaires du criquet pelerin, *Schistocerca gregaria* (Forskal 1775) en conditions reelles d'operations antiacridiennes**. Mauritanie (october november 1995). D.538, CIRAD-GERDAT-PRIFAS, Montpellier, France, 42 pp. ,(1996).
- [19] Lockwood J., Schell S., Rockwell R., Isu N. **Field test of fipronil for control of rangeland grasshoppers in Wyoming (USA): implications for reduced agentlarea treatments**. A Repor to Rhone Poolenc. University of Wyoming. Laramie WY, USA, 31 pp. ,(1996).