

## Diazinonun *Drosophila melanogaster*' in Politen Kromozomlarında Puflaşma Aktivitesi Üzerine Etkisi

Ayla KARATAS<sup>1\*</sup>, Zafer BAHCECI<sup>2</sup>, Ensar BASPINAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli University, Faculty of Education, Department of Primary Education, Umuttepe Campus 41380 Kocaeli- TURKIYE

<sup>2</sup>Ahi Evran University, Faculty of Education, Department of Primary Education 40100 Kirsehir- TURKIYE

<sup>3</sup>Sinop University, Faculty of Science and Literature, Department of Statistics 57010 Sinop- TURKIYE

\*Corresponding author: karatasayla@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada organik fosforlu bir insektisit olan diazinonun *Drosophila melanogaster*' in tükrük bezi politen kromozomlarının, puflaşma aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ergin bireylere diazinon uygulanmış ve F1 nesli elde edilmiştir. F1 neslinde üçüncü instar larvaların tükrük bezi politen kromozomları incelenmiştir. Politen kromozomlarda gözlenen puf bölgeleri aktif RNA sentezi yapılan bölgelerdir ve interfaz nükleusu hakkında bilgi verir. Diazinon uygulamasından sonra politen kromozomların puflaşma modelinde farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılıklar aktif olan bazı bölgelerin geri çekilmesi ya da bazı bant bölgelerinin aktifleşmesi şeklindedir. 1D, 4C, 22AB, 38B, 63F, 71F, 72D, 74C, 97A, 97E, 98A, 98D, 98E bant bölgelerindeki puf bölgeleri diazinon uygulaması ile geri çekilmiştir. Bunun yanı sıra, 1E, 2D, 3AB, 7AB, 42E, 43F, 57EF, 58EF, 61CD, 67AB, 72AB, 82D ve 88F bant bölgelerinde ise diazinon uygulamasından sonra aktifleşen puf bölgeleri tespit edilmiştir. Bazı puf bölgelerinde de puflaşma sıklığında farklılık olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak diazinon uygulamasının, politen kromozomlarda interfaz nükleusunun işleyişini, dolayısıyla gelişimsel programı değiştirdiği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Diazinon, *Drosophila*, politen kromozom, puflaşma aktivitesi.

### The Effect of Diazinon on Puffing Activity in Polytene Chromosomes of *Drosophila melanogaster* Abstract

This study investigates the effects of diazinon, an organic phosphoric insecticide, puffing on salivary gland polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Adult flies are applied diazinon and F1 generations were developed. The third instar larvae's salivary glands polytene chromosomes were examined in F1 generation. Puff areas in polytene chromosomes are regions of RNA synthesis and provide information on interphase nucleus. Certain differences were detected in puffing model of polytene chromosomes following the diazinon application. These differences were either the retreat of certain active regions or the activation of certain band regions. Puffs in 1D, 4C, 22AB, 38B, 63F, 71F, 72D, 74C, 97A, 97E, 98A, 98D, and 98E band regions retreated with diazinon application. On the other hand, active puff areas were detected in 1E, 2D, 3AB, 7AB, 42E, 43F, 57EF, 58EF, 61CD, 67AB, 72AB, 82D and 88F band regions after diazinon application. Some differences were observed in puffing frequency in some puff areas. In conclusion, it could be said that diazinon application changed the interphase nucleus mechanism in polytene chromosomes, and thus the developmental program.

**Keywords:** Diazinon, *Drosophila*, puffing activity, polytene chromosome.

Karatas A, Bahceci Z, Baspinar E (2012) The Effect of Diazinon on Puffing Activity in Polytene Chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Ekoloji 21 (85): 98-106.

### GİRİŞ

*Drosophila melanogaster* genotoksosite çalışmaları için oldukça kullanışlı bir organizmadır (Askin ve Incekara 2010). *Drosophila melanogaster* larvalarının tükrük bezlerinde gözlenen politen kromozomlar, interfaz kromozomlarının ve özel yapılarının anlaşılmasında oldukça önemlidir. Bu kromozomlarda nispeten şişmiş, kabarmış olarak gözlenen

bölgeler puf bölgeleridir. Puf bölgeleri kromozomların diğer bölümlerine göre daha çok RNA sentezinin gerçekleştiği aktif gen bölgeleridir. Politen kromozomlardaki puflaşma modeli, interfaz nükleusundaki gen aktivitesinin bir göstergesidir ve sitogenetik metotlarla rahatlıkla incelenebilir (Schwartz ve ark. 1999, Zhimulev ve ark. 2004). *Drosophila*'nın üçüncü instar larva döneminde,

Geliş: 25.04.2012 / Kabul: 26.06.2012

hemolimfde ekdizon hormonunun konsantrasyonundaki artış, larvanın pupa evresine geçişini başlatır. Hemolimfdeki ekdizon konsantrasyonu ile puflaşma aktivitesi arasında tam ve nedensel bir ilişki vardır. Puflaşma aktivitesinin başlaması ve devamında, ekdizonun politen kromozomlarda kendine özgü bölgelere bağlanarak puflaşmayı kontrol ettiği ortaya çıkmıştır (Dworniczak ve ark. 1983). Politen kromozomlardaki puflaşma aktivitesindeki değişimler geçici ve bir seri olaydır. Bir gen kompleksi setinin kontrolüyle gerçekleşen bu bir seri olaylar dizisi, gelişimsel prosesin anlaşılmasını mümkün kılar (Dworniczak ve ark. 1983). Değişen çevresel koşullar, puflaşma modelinde farklılıklar oluşmasına neden olur (Zhimulev 1999). Örneğin *Drosophila*'da artan sıcaklık uygulaması sonucu puflaşma modeli değişir ve bir dakika içinde puflaşma başlar, bu pufklar 20-30 dakika içinde en büyük ölçülerine ulaşırlar (Zhimulev ve ark. 2004). *Drosophila* larvalarının politen kromozomları ve puflaşma modeli, çevresel faktörlerin gen aktivitesine etkilerinin sitolojik gözlemlerle anlaşılmasında yararlı bir modeldir.

Diazinon organik fosforlar grubundan bir insektisittir. Organik fosforlu pestisitler hızlı yıkılmaları ve çabuk elimine edilmeleri nedeniyle oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat iki alkil kökü içermeleri nedeniyle, alkilleyici ajanlardır ve bu bileşikler potansiyel mutajendirler (Vélazquez ve ark. 1990). Alkilleyici ajanlar Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından, insanlar için kesinlikle kanserojen olan kimyasallar arasında sınıflanmaktadır (Hollaender 1971, Singer ve Grunberger 1985). Diazinonun toksik etkileri üzerine çok fazla araştırma sonucu olmasına rağmen, erken embriyonik dönemlerde etkisi üzerine oldukça az bilgi mevcuttur (Schneider ve ark. 2006, Slotkin ve ark. 2008). Bu çalışmada, diazinonun *Drosophila melanogaster*' in üçüncü instar larvalarının politen kromozomlarının puflaşma aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir.

#### MATERYAL VE METOT

Deneylerimizde, ileri derecede kendileşmiş *Drosophila melanogaster*'in Meig (Diptera: Drosophilidae) yabani tip Oregon-R soyunun, üçüncü instar larvaları kullanılmıştır. Üçüncü instar larvalar, ergin sineklerin standart bira mayası, mısır unu içeren besiyerinde çaprazlaması ile elde edilmiştir. Larvaların seçiminde erkek ve dişi ayırımına dikkat edilmemiştir. Madde uygulaması

yapmak için, kontrol ve deney grubu olmak üzere iki deney seti hazırlanmıştır. Kontrol ve deney grupları deneyler süresinde,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklık ve sürekli karanlık koşul taşıyan inkübatörlerde tutulmuştur. Ergin bireylere diazinon uygulaması beslenme yoluyla yapılmıştır. Ergin bireyler 1 ml ( $6 \times 10^{-5}$  ppm) diazinon çözeltisi içeren besiyerinde yumurta bırakmış ve yumurtlama gerçekleşikten sonra besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Hem deney hem de kontrol grubunu oluşturan besiyerine *Drosophila melanogaster*'in ergin bireylerinden 7 erkek ve 7 dişi birey konulmuştur. Yumurtadan sonra ortaya çıkan 1. 2. ve 3. evre larvalar, deri değişiminin tüm safhalarını diazinon içeren besiyerinde geçirmişlerdir. Çaprazlamanın başlangıcından itibaren 5. gün, 3. evre larvalar oluşmaktadır. Bu larvalar besiyerlerini terk edip, şişenin kenarlarına çıkar ve orada yaşarlar (Ayar ve ark. 2009). Kültür şişesinden bir larva alınıp, petri kutusu içindeki bir miktar *Drosophila* Ringer Solüsyonu' na aktarılmıştır. Binoküler mikroskop altında larvanın başı, diseksiyon iğneleri yardımıyla, vücudundan ayrılırsa, bu esnada şeffaf torbacıklar biçiminde hafifçe uzun tükrük bezleri ortaya çıkmaktadır. Tükrük bezi ince bir pens yardımıyla çıkarılıp, yağından temizlenmiş ve bir lam üzerine aktarılmıştır. Lakto aseto-orsein boyası ile boyanarak ezme preparat hazırlanmıştır (Uysal ve Bahçeci 1992, Levent ve ark. 1998). Kolları iyi açılmış ve iyi boyanmış olan kromozomlar incelenmiş ve birden fazla anormallik gösteren kromozom kollarının fotoğrafları çekilmiştir. Deney ve kontrol grubu için ortalama yüzer hücre mikroskopta incelenmiştir. Politen kromozomların puflaşma aktivitesi, daha önceki araştırmacıların hazırlamış olduğu puflaşma modeline göre incelenmiştir (Bridges 1935, Lindsley ve Zimm 1992, Henderson 2004).

Öncelikle, pestisitlerin hangi konsantrasyonda mutajenik olduğunun bilinmesi gereklidir. Bu nedenle  $LC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır (Cetin ve ark. 2010). Yüksek konsantrasyonlar toksik etkiye sahipken, düşük konsantrasyonlar önemli bir etki yapmayacağı için letal konsantrasyon tespiti yapılması önemlidir.  $LC_{50}$ , letal konsantrasyonun yarısı olan değerdir. Bu değer üzerindeki miktarlar toksik etki yaptığı için, diğer etkilerinin araştırılmasına olanak vermemektedir. Buna göre  $LC_{50}$  konsantrasyonu diazinon için  $6 \times 10^{-4}$  ppm ve  $1 \times 10^{-4}$  ppm arasında bulunmuştur (Karataş ve Bahçeci 2009a). Bu araştırmanın içinde olduğu bir

araştırmada diazinonun aynı organizmanın gelişimsel ve morfolojik özelliklerine etkisi üç farklı konsantrasyonda araştırılmış ve en yüksek oranda toksik etki, araştırılan en yüksek konsantrasyon olan  $6 \times 10^{-5}$  de görülmüştür (Karatay ve Bahçeci 2009a, Karatay ve ark. 2011). Bu nedenle diazinonun politen kromozomlara etkisinin araştırıldığı bu araştırmada, bu en yüksek konsantrasyon olan  $6 \times 10^{-5}$  lik konsantrasyon kullanılmıştır.

Kromozom kollarının teşhisinde yararlanılan yapısal işaretler; X kromozomunun uç kısmında 2B bant bölgesindeki “büyük puf”, 11 A bant bölgesindeki “daralma=zayıf benek”; 2L kromozom kolunda 21 A bant bölgesindeki “topuz yapısı”, 30 A bant bölgesindeki “kalkan biçimli yapı”, 31 BF bant bölgesinde “kaz boynu”; 2R kromozom kolunun başlangıç kısmı olan 60 EF bant bölgesinde “soğan kaidesi benzeri yapı”, 3L kromozom kolunda 68 BC bant bölgesinde “balerin eteği”, 74-75 bant bölgelerinde “şeytan feneri” olarak ifade edilen bir çift yapısal puf, 79 CE bant bölgesinde “kapsül tabakası” ve 3R kromozom kolunun 85 EF bant bölgesindeki “eşkenar üçgen şeklindeki yapı” ile 100 EF bant bölgesindeki “mantar şeklindeki yapı”lardır. Ayrıca kromozom kollarının serbest uçlarının biçimlerinden de yararlanılmıştır (Uysal 1992, Levent 1998, Stalling ve ark. 2006).

Deneylerden elde edilen verilerin istatistik değerlendirmesinde kullanılan istatistik yöntem oranların karşılaştırmasına ait z-testidir.

$$Z = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{\frac{P_1 \cdot (1-P_1)}{N_1} + \frac{P_2 \cdot (1-P_2)}{N_2}}}$$

Hesaplamalarda minitab for Windows ver 13.0 istatistik programı kullanılmıştır.

### BULGULAR

Diazinon uygulaması sonucunda *Drosophila melanogaster*' in politen kromozomlarının puflaşma modelinde farklılıklar ortaya çıkmıştır. Hem kontrol hem de deney grubunda ortak olduğu gözlenen aktif puf bölgeleri kaydedilmiştir. Diazinon deney grubunda puflaşma bölgelerinin bazılarını değiştirmiş, puflaşmayan bazı bölgelerde de puflaşmaya neden olmuştur (Tablo 1). Ayrıca muamelenin toplam puflaşma üzerindeki etkisi ve istatistik sonuçları da değerlendirilmiştir. Puflaşma bölgeleri DNA sentez aktivitesini gösterdiği için diazinonun toplam puflaşma oranı, toplam RNA sentezi üzerindeki etkisi hakkında da kabaca bilgi

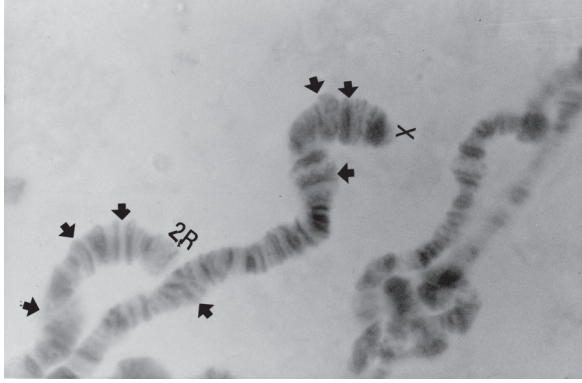
verecektir. Puflaşma oranı ile ilgili oran ve istatistik verileri tablo 2' de verilmiştir.

X kromozom kolunda, kontrol grubunda puflaşma oranı %11,30, deney grubunda ise %15,84' tür. Bu iki oran arasındaki fark istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur (Tablo 2). Diazinon uygulaması X kromozom kolunda puflaşma oranını yükseltmiştir. 2C, 2B ve 3A bant bölgeleri hem deney hem de kontrol grubunda puflaşmıştır. Kontrol grubunda oldukça sık gözlenen 1D bant bölgesindeki puflaşma diazinon uygulamasından sonra geri çekilmiştir (Tablo1). Diğer yandan 1E, 2D ve 7AB bant bölgeleri ise diazinon uygulaması sonucu puflaşan ve puflaşma sıklığı oldukça yüksek olan bölgelerdir (Şekil 1 ve 2). Politen kromozomlarda kontrol grubunda gözlenmeyip diazinon uygulamasından sonra ortaya çıkan puflar, toksisiteye karşı aktifleşen gen bölgeleri olabilir.

2L kromozom kolunda diazinon uygulaması sonucu puflaşma oranı düşmüştür (%11,48). Kontrol grubunda bu oran %15,77' dir ve aradaki fark, istatistik olarak anlamlıdır (Tablo 2). 21EF, 23E, 25AB ve 33B bant bölgelerindeki puflar, hem deney hem de kontrol grubunda gözlenmiştir (Tablo 1). Kontrol grubunda 22AB ve 38B bant bölgelerinde gözlenen puflar ise diazinon uygulamasından sonra geri çekilmiştir (Şekil 3). Bu puf bölgeleri, toksik etki nedeniyle kapanan, gelişimsel gen ya da protein şifrelerini kodlayan bölgeler olabilir. 2L kromozom kolunda diazinon etkisiyle ortaya çıkan puflaşma kaydedilmemiştir.

2R kromozom kolunda diazinon uygulaması puflaşma sıklığını yükseltmiştir (%29,51). Kontrol grubunda bu oran % 21,29' dur ve aradaki fark 0.05 düzeyinde anlamlı bulunmuştur (Tablo 2). 42A, 43DE, 50CD, 52C, 55D, 55E, 58DE ve 60B bant bölgeleri hem deney hem de kontrol grubunda puflaşmıştır (Tablo 1). Diazinon uygulamasından sonra geri çekilen puf bölgesi gözlenmemiştir, fakat 52C bandındaki puflaşma sıklığının, deney grubunda kontrol grubuna göre düştüğü gözlenmiştir. 42E, 43F, 57EF ve 58EF bant bölgelerinin ise diazinon uygulamasından sonra aktifleşerek puflaştığı gözlenmiştir (Şekil 4). Diazinon uygulaması 2R kromozom kolunda puflaşma oranını yükseltmiştir.

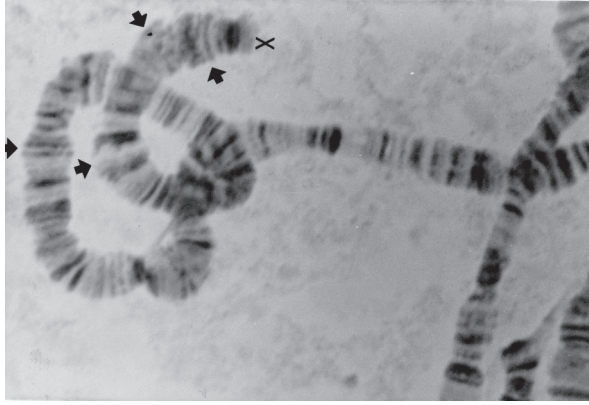
3L kromozom kolunda ise deney ve kontrol grubunun puflaşma oranında, istatistik açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 2). Hem deney hem kontrol grubunda gözlenen puflar, 62A,



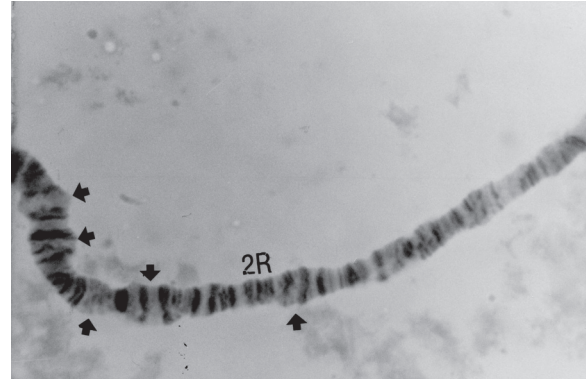
**Şekil 1.** X ve 2R kromozom kollarında puf bölgeleri; X: 1CD, 2B, 3AB, 7AB; 2R: 58DE, 59EF, 60CD.



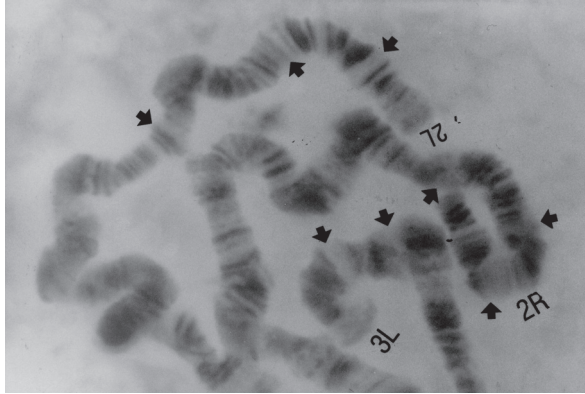
**Şekil 4.** 2L ve 3L kromozom kollarında puf bölgeleri; 2L: 23E; 3L: 61A, 61CD, 62BC, 63F.



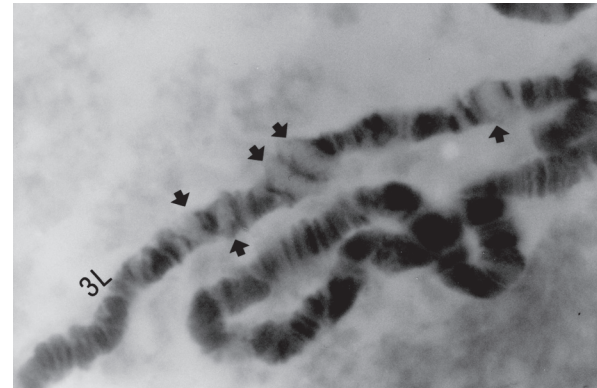
**Şekil 2.** X kromozom kolunda puf bölgeleri; X: 1CD, 2B, 3AB, 9B.



**Şekil 5.** 2R kromozom kolunda puf bölgeleri; 2R: 42A, 42C, 42E, 43F, 45DE.



**Şekil 3.** 2L, 2R ve 3L kromozom kollarında puf bölgeleri; 2L: 21EF, 23E, 25B; 2R: 58DE, 56EF, 52DE; 3L: 61A, 62CD



**Şekil 6.** 3L kromozom kolunda puf bölgeleri; 3L: 71CDE, 72AB, 74EF, 75AB, 78CD .

62C, 62DE, 68BC, 69F, 71CDE, 73B, 74EF, 75AB bant bölgelerindedir. Diazinon uygulamasından sonra geri çekilen puflar, 63F, 71F, 72D ve 74C bant bölgelerinde; aktifleşen puflar ise 61CD, 67AB, 72AB bant bölgelerinde tespit edilmiştir. Özellikle 61CD bant bölgesinde puflaşmaya oldukça sık rastlanmıştır (Şekil 5 ve 6). Ayrıca 71CDE bant

bölgesindeki puflaşmanın, deney grubunda gözlenme sıklığı düşmüştür (Tablo 1).

3R kromozom kolunda diazinon uygulamasından sonra puflaşma oranı düşmüştür. Kontrol grubunda bu oran %22,8 iken, diazinon uygulanan grupta %16,42' dir ve aradaki fark istatistik olarak anlamlıdır (Tablo 2). 82F, 85EF, 90BC, 91B, 93D bant bölgeleri hem deney hem de kontrol grubunda puflaşmıştır (Tablo 1). Kontrol grubunda 82D ve 88F bant bölgelerinde puf gözlenmemiş fakat,

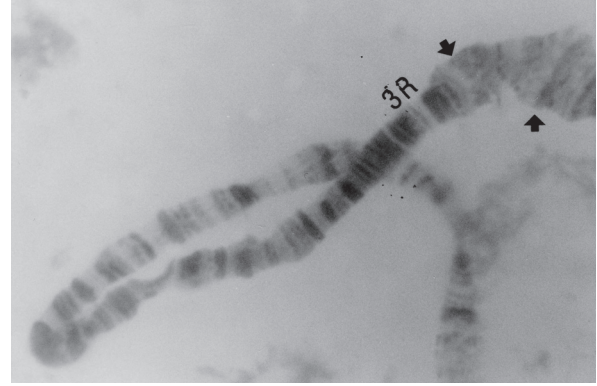
**Tablo 1.** Diazinonun politen kromozomlarda puflaşma modeline etkisi.

Kromozom Kolu	Puf Bölgesi	Kontrol Grubu	Dency Grubu	Kontrol grubunda puflaşma tekrarı	Dency grubunda puflaşma tekrarı
X	1D	+	-	12	0
	1E	-	+	0	5
	2B	+	+	33	28
	2C	+	+	22	15
	2D	-	+	0	10
	3A	+	+	10	18
	3AB	-	+	0	18
	4C	+	-	9	0
7AB	-	+	0	15	
				86	109
2L	21EF	+	+	14	13
	22AB	+	-	13	0
	23E	+	+	30	22
	25AB	+	+	32	27
	33B	+	+	24	17
	38B	+	-	7	0
				120	79
2R	42A	+	+	14	17
	42E	-	+	0	8
	43DE	+	+	8	10
	43F	-	+	0	10
	50CD	+	+	38	35
	52C	+	+	23	8
	55D	+	+	14	15
	55E	+	+	23	21
	57EF	-	+	0	12
	58DE	+	+	14	13
	58EF	-	+	0	27
	60B	+	+	28	27
				162	203
3L	61CD	-	+	0	15
	62A	+	+	11	15
	62C	+	+	26	21
	62DE	+	+	17	11
	63F	+	-	16	0
	67AB	-	+	0	9
	68BC	+	+	16	18
	69F	+	+	10	7
	71CDE	+	+	31	11
	71F	+	-	9	0
	72AB	-	+	0	5
	72D	+	-	6	0
	73B	+	+	13	12
	74C	+	-	4	0
	74EF	+	+	33	30
	75AB	+	+	33	30
				225	184
3R	82D	-	+	0	16
	82F	+	+	39	26
	85EF	+	+	14	18
	88F	-	+	0	9
	90BC	+	+	30	22
	91B	+	+	26	11
	93D	+	+	24	11
	97A	+	-	6	0
	97E	+	-	4	0
	98A	+	-	8	0
	98D	+	-	4	0
	98E	+	-	13	0
				168	113

diazinon uygulaması sonucu bu bant bölgeleri puflaşmıştır (Şekil 7). 97A, 97E, 98A, 98D ve 98E bant bölgelerindeki puflar ise diazinon uygulaması sonucu geri çekilmiştir.

### TARTIŞMA VE SONUÇ

*Drosophila melanogaster*'in normal larval gelişimi sırasında politen kromozomlarında oluşan puflar, gelişimsel puflardır. Bunlar 2L kromozom kolunda 23E, 25AB; 2R kromozom kolunda 52C, 55E; 3L kromozom kolunda 69F, 73B; 3R kromozom kolunda 82EF, 90BC ve 93D bant bölgelerinde gözlenen puflardır (Uysal ve Bahçeci 1992, Levent ve ark. 1998). Diazinon uygulamasından sonra,

**Şekil 7.** 3R kromozom kolunda puf bölgeleri; 82D, 82F.**Tablo 2.** Kromozom kollarında puflaşma tekrarı oranlarının karşılaştırması.

Kromozom Kolu	Gruplar				Toplam	
	Kontrol grubunda puflaşma		Dency grubunda puflaşma		Puf sayısı	%
	Puf sayısı	%	Puf sayısı	%		
X	86 <sub>a</sub>	11.30	109 <sub>b</sub>	15.84	195	13.46
2L	120 <sub>a</sub>	15.77	79 <sub>b</sub>	11.48	199	13.73
2R	162 <sub>a</sub>	21.29	203 <sub>b</sub>	29.51	365	25.19
3L	225 <sub>a</sub>	29.57	184 <sub>b</sub>	26.74	409	28.23
3R	168 <sub>a</sub>	22.08	113 <sub>b</sub>	16.42	281	19.39
Total	761	100.00	688	100.00	1449	100.00

Aynı satırda aynı altsimgiyi paylaşmayan gruplar arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.

gelişimsel puflarda geri çekilme gözlenmemiştir. Fakat 52C, 23E, 82F, 90BC ve 93D bant bölgelerindeki gelişimsel pufların, gözlenme sıklığı azalmıştır (Tablo 1). Çinko klorür uygulaması sonucu gelişimsel pufların büyük çoğunluğunun geri çekildiği, başka araştırmacılar tarafından da kaydedilmiştir (Levent ve ark. 1996). Gelişimsel puflarda meydana gelen geri çekilme, normal gelişim programında aksama olarak değerlendirilebilir.

Diazinon uygulamasından sonra geri çekilen puflar, 1D, 4C, 22AB, 38B, 43DE, 55D, 63F, 71F, 72D, 74C, 97A, 97E, 98A, 98D ve 98E bant bölgelerindeki puflardır. Aynı zamanda pek çok bant bölgesinde (2C, 23E, 33B, 52C, 62DE, 71CDE, 82F, 90BC, 91B, 93D) puflaşma sıklığı, kontrol grubuna göre düşmüştür (Tablo 1). Bu bölgeler toksik etki nedeniyle kapanan, gelişimsel gen ya da protein şifrelerini kodlayan bölgeler olabilir. Bir araştırmada 63F pufunun iki gen içerdiği ve bu genlerin, ekdizonu teşvik eden ve  $Ca^{2+}$  bağlama proteinlerini kodlayan genler olduğu açıklanmıştır (Andres ve Thummel 1995). Nitekim, diazinon uygulaması sonucu 63F bant bölgesindeki puflaşmanın geri çekilmiş olması, gelişimsel genlerin etkilendiği düşüncesini desteklemektedir. Spt4, Spt5 ve Spt6 olarak isimlendirilen üç tip proteinin aktif

transkripsiyonla ilişkili oldukları ve uzatma faktörleri özelliklerine sahip oldukları, ayrıca maya, memeli ve *Drosophila*'da ortak özellikler gösterdikleri ifade edilmiştir. Bu proteinlerin politen kromozomlarda, 5E, 23DEF, 25AB, 49B, 56D, 63BC, 64F, 68C, 71E, 75B, 87A, 87C, 90B, 93D ve 95A bant bölgelerinde yer aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca Spt5'in RNA Polimeraz II ile ve Spt6'nın da histonlarla karşılıklı etkileşimi olduğu açıklanmıştır (Kaplan ve ark. 2000). Araştırmamızda diazinon uygulamasından sonra, sözü edilen bu proteinlerin kodlandığı bölgelerin bazılarında, puflaşma aktivitesinde farklılıklar tespit edilmiştir. Diazinon uygulamasıyla, 25AB, 71CDE, 90BC ve 93D bant bölgelerinde puflaşma sıklığı azalmıştır (Tablo 1). Diazinon bu gen bölgelerini baskılamış ya da gen işleyişini değiştirmiş olabilir. Bir başka araştırmada, *Drosophila melanogaster*'de 62E pufunda, ekdizonu düzenleyen bir genin varlığı teşhis edilmiştir (Keegan ve ark. 2001). Araştırmamızda, 62DE bant bölgesinin puflaşma aktivitesinde azalma olduğu ortaya çıkmıştır (Tablo 1). Diazinon puflaşma aktivitesini etkileyerek, ekdizon düzenlemesini değiştirmiş, dolayısıyla gelişimsel programın aksamasına neden olmuş olabilir. *Drosophila*'da torasik ve abdominal segmentlerin özelleşmesini sağlayan ve bir homeotik gen olan *Ultrabithorax* (*Ubx*) geninin politen kromozomlardaki lokasyonu tespit edilmiştir (Botas ve Auwers 1996). Mutant ırkta politen kromozomlarda ortalama yüz farklı lokasyonu tespit edilen bu gen bölgelerinden bizim araştırmamızda puflaşan ya da geri çekilen bazı ortak bölgeler olduğu gözlenmiştir. Diazinon uygulamasında sonra söz konusu bölgelerden 3B, 42DE, 57E, 58E, 82C bant bölgelerinin puflaştığı, uygulamadan sonra ise 22A, 38B, 72D ve 97A bant bölgelerinin geri çekildiği gözlenmiştir. Homeotik genlerin işleyişinin olası değişimi segmentasyonu ve dolayısıyla ergin birey morfolojisini değiştireceği tahmin edilebilir. Nitekim araştırmamızda politen kromozomlarda lokasyonu tespit edilen *Ubx* geninin yüz lokasyondan dokuzunda farklılık tespit edilmiştir. Aynı maddenin ergin morfolojisine etkilerinin araştırıldığı diğer araştırmamızda  $6 \times 10^{-5}$  ppm diazinon uygulanan deney grubunda anormal birey oranının %9,86 oluşu da (Karataş ve Bahçeci 2009a) bu ilişkiyi gösterebilir. Aynı maddenin uygulanmasıyla ergin bireylerdeki anormallik oranı ile homeotik bir genin lokasyonlarındaki puflaşma farklılığı oranının benzer çıkışı önemli bir bulgudur

ve homeotik genlerin işleyişinin değişmiş olabileceği ifade edilebilir.

Steroid hormon olan ekdizonun kademeli artışı *Drosophila*'da metamorfozun başlamasını düzenlemektedir. Larval gelişim sonundaki ekdizon artışları, larvanın pupa evresine geçişi başlatır ve prepupal gelişimi destekler, bunu izleyen on saat sonunda bir başka ekdizon artışı, prepupal-pupal geçişi haber verir. Pek çok larval doku, pupal gelişim esnasında yıkılır ve imaginal progenitör hücrelerin bir araya gelmesiyle oluşan imaginal disklerin, büyümesi ve farklılaşması sonucu ergin yapı ortaya çıkar. Bu farklı gelişimsel yolların net sonucu olarak, sürünen bir larvadan, oldukça hareketli ve yürüyebilen ergin sinekler ortaya çıkar. Politen kromozomların puflaşma modellerinin gözlenmesi, ekdizonun kompleks tepkiler yoluyla düzenlediği gelişimsel mekanizmayı aydınlatmıştır. Ekdizon pufları olarak bilinen puflar, 2B, 8EF, 10EF, 12DE, 13E, 21C, 22C, 23E, 27C, 28A, 29F, 42A, 43E, 44A, 46A, 46F, 47A, 47BC, 48B, 49E, 50CD, 50F, 62E, 63F, 67B, 70C, 70E, 72D, 73B, 74EF, 75B, 75D, 76A, 76D, 78C, 86E, 87F, 89B, 98F, 99B ve 100E bant bölgelerindedir (Lam ve ark. 1997). Diazinon uygulaması sonucu, ekdizon puflarında farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin 63F ve 72D (Tablo 1) ekdizon pufları geri çekilmiş, ayrıca 23E ve 62E puflarının, puflaşma oranı düşmüştür. Cypermethrinin politen kromozomlara etkisini araştırdığımız bir başka çalışmada da 63F ve 72D bant bölgelerindeki ekdizon puflarının geri çekildiği tespit edilmiştir (Karataş ve Bahçeci 2009b). Bu puf bölgelerindeki değişimin, hormon sentezini değiştirdiği, dolayısıyla da gelişimi aksattığı ifade edilebilir.

Araştırmada ortaya çıkan bir başka bulgu ise kontrol grubunda gözlenmeyip sadece diazinon uygulamasından sonra ortaya çıkan puf bölgelerinin varlığıdır. *Drosophila*'da yeni oluşan pufların çevresel faktörün niteliğine göre farklılıklar gösterdiği ifade edilmiştir (Uysal ve Bahçeci 1992). Nitekim diazinon uygulaması sonucu 1E, 2D, 3AB, 7AB, 42E, 43F, 57EF, 58EF, 61CD, 67AB, 72AB, 82D ve 88F bant bölgeleri puflaşmıştır (Tablo 1). Daha önce yapılan benzeri çalışmalar bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. *Drosophila melanogaster*'e bakır klorür uygulaması ve 25BC, 48B, 53DEF, 54AC, 55E, 56DE, 61F, 63A, 63BC, 66AB, 71B, 76C, 76D, 85BC, 87EF, 94A, 97AE, 98A, 99A, 99EF bant bölgelerinin puflaştığını gözlemiştir. Ayrıca yine aynı araştırmacı bakır klorür uyguladığında; 22A,

23EF, 27E, 28B, 35F, 47A, 54BD, 55DE, 56DE, 58EF, 59B, 62A, 62DE, 68BC, 70DE, 73B, 74D bant bölgelerinin puflaştığını gözlemiştir (Levent ve ark. 1998). Uysal ve Bahçeci (1992) aynı organizmaya oksijensizlik uygulamış ve 10EF, 26A, 30DE, 45E, 48B, 53BC, 55E, 63BC, 66DEF, 76D, 84E, 85B, 86F, 91EF ve 96A bant bölgelerinin puflaştığını gözlemiştir. Ayrıca cypermethrinin politen kromozomlara etkisini araştırdığımız bir başka araştırmada, 1E, 2D, 3C, 7AB, 15BC, 43C, 47A, 61A, 61CD, 63CD, 72AB, 79F, 82D, 88F, 92A ve 96A bant bölgelerinin, cypermethrin uygulaması sonucu puflaştığı görülmüştür (Karatat ve Bahçeci 2009b). Bu bölgeler toksik etkiyi azaltmak için aktifleşen gen bölgeleri olabilir. Örneğin, memeli canlılarda ağır metal toksisitesine karşı, metallothionein proteininin arttığı ve toksisiteyi azalttığı bilinmektedir. Bu proteinin, bakır, çinko ve kadmiyum gibi metalleri bağlayarak, organizmayı toksik etkilerden koruduğu düşünülmektedir. *Drosophila*'da larvalar kadmiyum ve bakırla muamele edilmiş ve kadmiyum muamelesinden sonra tRNA modellerinde ve proteinde çeşitli değişiklikler tanımlanmıştır. Kadmiyum ve bakır alımıyla metallothionein benzeri proteinlerin sentezinin başladığı, buna ilave olarak bu iki metalin önemli bir kısmının bu protein ile birleştiğine dair veriler elde edilmiştir. Çeşitli metal iyonlarının herhangi biri ile muamele edilen larvalarda metallothionein ile komplementer olan spesifik RNA'ların düzeyinde önemli bir artış gözlenmiştir. Ayrıca *Drosophila*'da metallothioneinin dört ayrı çeşidinin varlığı açıklanmıştır (Maroni ve ark. 1986, Egli ve ark. 2006). Fakat bu tip proteinlerin politen kromozomlardaki lokasyonuna dair bir referans bulunmamıştır. Kontrol grubunda gözlenmeyip, sadece deney grubunda yoğunlukla gözlenen puf bölgeleri, insektisit toksisitesine karşı bu tip proteinlerin şifrelediği bölgeler ya da direnç gelişimi sağlayan genlerin bulunduğu bölgeler olabilir. Sitokrom P450 monooksijenazlar, mikrozomlarla dolayısıyla, karsinogen ve mutajen ksenobiyotik bileşiklerle ve çeşitli hücrel endojen metabolitlerle ilişkilidirler. Ayrıca insektisitlere karşı direnç gelişimiyle de ilişkilidirler (Maitra ve ark. 2000, Mora ve ark. 2010). *Drosophila melanogaster*'de iki numaralı kromozomun sağ kolunda ve 43A1-2 bant bölgesinde bir sitokrom P450 geni olan Cyp6a2 geninin varlığı tespit edilmiştir (Dunkov ve ark. 1997). Nitekim bizim çalışmamızda, bu bölgeye çok

yakın olan, 42E ve 43F bant bölgeleri, diazinon uygulamasından sonra puflaştı. Toksik etkiye karşı aktifleşen bu ve benzeri puf bölgeleri, direnç gelişimini sağlayan gen bölgeleri ya da metallothionein benzeri proteinlerin şifrelediği gen bölgeleri olabilir. Bu nedenle görülme sıklığının düşük olmasına rağmen, sadece deney grubunda gözlenen puf bölgeleri dikkat çekicidir.

Ayrıca, X kromozomunun 2B bant bölgesinde yer alan erken ekdizon pufu, üçüncü instar larva evresinin sonunda puflaşan, kompleks genetik bir lokustur, Broad-Complex olarak adlandırılır ve birbirini tamamlayıcı allellerden oluşan dört gen grubunun karışımıdır. Bu allellerin farklı bileşimleri, farklı kanat kenarları fenotipinin ortaya çıkmasına neden olur (Kiss ve ark. 1988). Nitekim yaptığımız çalışmada, 2B bant bölgesinin puflaşma sıklığı insektisit uygulaması sonucunda azalmıştır. Ayrıca bu çalışmanın ilgili olduğu bir başka araştırmamızda üç farklı konsantrasyonda diazinon ( $6 \times 10^{-5}$ ,  $6 \times 10^{-6}$ ,  $6 \times 10^{-7}$ ) ergin bireylere uygulanmış, daha sonra F1 ve F2 nesli morfolojileri incelenmiştir. F1 ve F2 neslinde özellikle kanatlarda oldukça yüksek olmak üzere üyelerde, toraksta ve abdomende oldukça yüksek oranda fenotipik malformasyon gözlenmiştir. En yüksek oranda anormallik her iki nesilde de  $6 \times 10^{-5}$  uygulanan grupta gözlenmiştir. F2 nesline madde uygulanmamış olmasına rağmen anormalliğin yüksek oluşu kalıtsal mutasyonlara dayandırılmıştır (Karatat ve Bahçeci 2009b). Bu durumda diazinonun etkisiyle bu ve benzeri gen bölgelerindeki toksik etkinin gelişimsel programı aksatarak, fenotipe malformasyon olarak yansıdığı ifade edilebilir.

Politen kromozomlarda lokasyonları belirlenmiş ve ifadesi aydınlatılmış genlerle ilgili bilgiler ve diazinon uygulamasından sonra aktifleşen ya da kaybolan puf bölgeleri ile ilgili olarak diyebiliriz ki, diazinon etkisi nedeniyle, genlerin işleyişi değişebilir. Bu değişiklikler genlerde ya da gen işleyişinde görevli enzim, protein gibi moleküllerin yapısında ya da gen işleyişinin değişimi şeklinde olabilir. Dolayısıyla diazinon uygulaması sonucu hedef olmayan organizmalarda benzer toksik etkiler sonucu istenmeyen ve türe zarar verecek sonuçlar gözlenebilir.

**KAYNAKLAR**

- Andres AJ and Thummel CS (1995) The *Drosophila* 63F early puff contains E63-1, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel Ca<sup>2+</sup>-binding protein. *Development* 121: 2667-2679.
- Askin H, Incekara U (2010) The study of the genotoxic effect of the Karasu River surface water containing local fat plant waste water on the *Drosophila melanogaster* using the wing somatic mutation and recombination test (SMART). *Ekoloji* 19 (74): 45-50.
- Ayar A, Uysal H, Altun D (2009) The effects of cold shock on the longevity in Oregon R wild and *vestigial* mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera: *Drosophilidae*). *Ekoloji* 74: 38-44.
- Botas J and Auwers L (1996) Chromosomal binding sites of Ultrabithorax homeotic proteins. *Mechanism of Development* 56: 129-138.
- Bridges CB (1935) Salivary chromosome maps. With a key to the banding of chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity* 26: 60-64.
- Cetin H, Demir E, Kocaoglu S, Kaya B (2010) Insecticidal activity of some synthetic pyrethroids with different rates of piperonyl butoxide (PBO) combinations on *Drosophila melanogaster* (Diptera: *Drosophilidae*). *Ekoloji* 75: 27-32.
- Dworniczak B, Seidel R, Pongs O (1983) Puffing activities and binding of ecdysteroid to polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal* 2 (8): 1323-1330.
- Dunkov BC, Guzov VM, Mocelin G, Shotkoski F, Brun A, Amichot M, French Constant RH, Feyereisen R (1997) The *Drosophila* cytochrome P450 gene *Cyp6a2*: Structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital. *DNA and Cell Biology* 16 (11): 1345-1356.
- Egli D, Domènech J, Selvaraj A, Balamurugan K, Hua H, Capdevila M, Georgiev O, Schaffner W, Atrian S (2006) The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. *Genes to Cells* 11: 647-658.
- Henderson DS (2004) *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Humana Press, New York.
- Hollaender A (1971) *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*. Plenum Press, New York.
- Kaplan DC, Morris RJ, ting Wu C, Winston F (2000) Spt5 and Spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes and Development* 14: 2623-2634.
- Karataş A, Bahçeci Z (2009a) Toxic effects of diazinon on adult individuals of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Applied Biological Sciences* 3 (2): 102-108.
- Karataş A, Bahçeci Z (2009b) Cypermethrinin *Drosophila melanogaster*'in üçüncü instar larvalarının tükrük bezi politen kromozomları üzerine etkisi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* (01): 117-126.
- Karataş A, Bahçeci Z, Başpınar E (2011) The effect of diazinon on egg fertility and development in *Drosophila melanogaster*. *Turkish Journal of Biology* 35: 95-101.
- Keegan J, Schmeurer M, Ring B, Garza D (2001) The 62E early-late puff of *Drosophila* contains *D-spinophilin*, an ecdysone-inducible PDZ-domain protein dynamically expressed during metamorphosis. *Genetic Research* 77: 27-39.
- Kiss I, Beaton AM, Tardiff J, Fristrom D, Fristrom JW (1988) Interactions and developmental effects of mutations in the broad-complex of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 247-259.
- Lam GT, Jiang C, Thummel CS (1997) Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila metamorphosis*. *Development* 124: 1757-1769.
- Levent S, Uysal H, Bahçeci Z (1998) *Drosophila melanogaster*'in tükrük bezi politen kromozomlarında bakır klorürün gen aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi. *Turkish Journal of Biology* 22: 7-14.
- Lindsley DL and Zimm GG (1992) *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc, San Diego.
- Maitra S, Dombrowski SM, Basu M, Raustol O, Waters LC, Ganguly R (2000) Factors on the third chromosome affect the level of *Cyp6a2* and *Cyp6a8* expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 248: 147-156.
- Maroni G, Lastowski-Perry D, Otto E, Watson D (1986) Effects of heavy metals on *Drosophila* larvae and metallothionein cDNA. *Environmental Health Perspectives* 65: 107-116.



Mora R, Kuruganti S, Lam V, Lucchesi JC, Ganguly R (2010) Functional analysis of the cis-acting elements responsible for the induction of the Cyp6a8 and Cyp6g1 genes of *Drosophila melanogaster* by DDT, phenobarbital and caffeine. *Insect Molecular Biology* 19 (1): 121-130.

Schneider MI, Pineda P, Smagghe G (2006) Side effects of conventional and non-conventional insecticides on eggs and larvae of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) in Argentina. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 71 (2B): 425-427.

Schwartz YB, Ioudinkova ES, Demakov SA, Razin SV, Zhimulev IF (1999) Interbands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes contain matrix association regions. *Journal of Cellular Biochemistry* 72: 368-372.

Singer B, Grunberger D (1985) *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*. Plenum Press, New York.

Slotkin TA, Bodwell BE, Levin ED, Seidler FJ (2008) Neonatal exposure to low doses of diazinon: Long-term effects on neural cell development and acetylcholine systems. *Environmental Health Perspective* 116: 340-348.

Stallings DM, Hepburn DD, Hannah M, Vincent JB, O'Donnell J (2006) Nutritional supplement chromium picolinate generates chromosomal aberrations and impedes progeny development in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 610: 101-113.

Uysal H, Bahçeci Z (1992) *Drosophila melanogaster*'in larvalarının tükürük bezi politen kromozomlarında oksijensizliğin (anoxia) gen aktivitesi üzerine etkileri. *Turkish Journal of Biology* 16:67-74.

Vélazquez A, Xamena N, Creus A, Marcos R (1990) Mutagenic evaluation of the organophosphorus insecticides methyl parathion and triazophos in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Toxicology Environmental Health* 31: 313-325.

Zhimulev IF (1999) Genetic organization of polytene chromosomes. *Advances in Genetics* 39: 1-589.

Zhimulev IF, Belyaeva E, SemeshiN VF, Koryakov DE, Demakov SA, Pokholkova GV, Andreyeva EN (2004) Polytene chromosomes: 70 years of genetic research. *International Review of Cytology* 241: 203-275.